สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาวิธีผลิตสารปรุงรสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโต

นาย ชัชวาล เมฆชลา
นางสาว มณฑนา เดชเจริญ
นางสาว ศิริพร สิงห์หล้า

ปพ.
ช354ก
เลขหมู่ 2538
เลขทะเบียน 25413
วัน, เดือน, ปี 9 ก.ค. 2539

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
7154B

Study of Meat Flavour Production from Natto.

Mr. Chatchawan Mhekkala

Miss Montana Dechjaroen

Miss Siriphorn Singlah

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirment for the Degree of Bachelor of Science.

Department of Applied Biology.

Facultly of Science.

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

1995

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาวิธีผลิตสารปรุงแต่งรสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโต

โดย นาย ชัชวาล เมฆขลา
นางสาว มณฑนา เดชเจริญ
นางสาว ศิริพร สิงห์หล้า

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

---------------------------- หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(อาจารย์ อุ่นเรือน ศิริวานิชกุล)

คณะกรรมการโครงงานพิเศษ

---------------------------- ประธานกรรมการ
(ผศ. มาลินี ตันติยาภรณ์)

---------------------------- กรรมการ
(ผศ.ดร. เรียม เตชะโสภณมณี)

---------------------------- กรรมการ
(รศ. สุขใจ ชูจันทร์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาวิธีผลิตสารปรุงรสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโต
นักศึกษา นายชัชวาล เมฆขลา
นางสาวมณฑนา เดชเจริญ
นางสาวศิริพร สิงห์หล้า
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.เรียม เตชะโสภณมณี
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา 2538

บทคัดย่อ

ในการศึกษาการสกัดสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโต (Natto) โดยใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* โดยการนำถั่วเหลืองต้มสุกหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่า นัตโตมีสีน้ำตาลเทา ให้สารที่มีคุณสมบัติให้กลิ่นรสเนื้อ (Meaty flavour) เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่า ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองหมัก (paste) และถั่วเหลืองหมักอบแห้ง (chip) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีปริมาณโปรตีน 35.0, 21.9 และ 38.9 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักแห้งตามลำดับ เนื่องจากปริมาณโปรตีนมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโน (กลูตามิกและอะลานีน) และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่เสริมรสชาติของอาหาร ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของนัตโตด้วยอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (IR) พบว่าองค์ประกอบส่วนใหญ่จะประกอบด้วยสารประกอบคาร์บอนิล (Carbonyl compound), สารประกอบไฮดรอกซิล (Hydroxyl compound) และสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ซึ่งจะพบสารเหล่านี้ใน HPP มาตราฐานและซีอิ๊วผงด้วย ผลจากการศึกษาด้วย แก๊สโครมาโทกราฟี (GC) ของ HPP รสไก่อบ, รสหมูอบ, เนื้ออบและนัตโต พบว่า นัตโตสามารถจะใช้เป็นวัตถุดิบที่ใช้ผลิตสารปรุงรสได้ เนื่องจากว่าในนัตโตมีองค์ประกอบส่วนใหญ่คล้ายกับ HPP และการทำการทดสอบเพื่อประเมินผลทางด้านรสชาติ (Sensory Test) ให้ผลว่าจากผู้ทดสอบ 20 คน สามารถแยกความแตกต่างของนัตโตและ HPPได้ และผู้ทดสอบ 16 คน ยอมรับว่านัตโตมีกลิ่นและรสคล้ายเนื้อ ดังนั้น โครงงานพิเศษนี้จึงสามารถใช้เป็นแนวทางเพื่อทำการศึกษาและผลิตสารปรุงรสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโตในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Study of Meat Flavour Production from Natto

Name Mr. Chatchawan Mhekkala

Miss Montana Dechjaroen

Miss Siriphorn Singlah

Special Project Advisor Assist. Prof. Dr. Reum Techasoponmanee

Department Applied Biology

Academic Year 1995

Abstract

Natto, a traditional Japanese food product, was prepared from soybeans by fermentation with Bacillus subtilis at temperature 37°c , for 3 days. It had some characteristic liked meat flavour and aroma components from meat. The protein concentrated in Soybean, Natto paste and Natto chip was found 35.0 , 21.9 and 38.9% dry weight , respectively. The percentages of protein could indicated to the level of amino acid (especialy glutamic and alanine) and nucleotide which were flavour enhancer in food. The chemical components of Natto was analyzed on Infrared Spectroscopy (IR) were found carbonyl compounds, hydroxyl compounds and nitrogen compounds which found in Standard Hydrolyzed Plant Protein (HPP) and Soy Souce powder. Gas Chromatography (GC) on Natto compared with HPP Roasted Chicken , HPP Roasted Pork and Roasted Beef were showed Natto had meat flavour characterization. The current literature available on meat flavour did not provided a clear path to the formulation of essences that could used this special project on basic to improve for scale-up and industry more than this.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความร่วมมือและความช่วยเหลือของ ผศ.ดร.เรียม เตชะไสภณมณี อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ขอขอบคุณ อาจารย์ดวงใจ ไอชัยกุล ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ รศ.ดร.โกศัลย์ คูสำราญ และ ดร. อรวรรณ ชัยลภากุล ภาควิชาเคมี ที่ให้คำปรึกษาและความรู้ในการใช้เครื่องมือที่ถูกต้อง

ขอขอบคุณบริษัท FIS (Food Ingredients Specialities) ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านตัวอย่างของรสต่างๆ ในการนำมาเป็นมาตรฐานในโครงงานพิเศษฉบับนี้

นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ และน้องๆ รวมถึงพี่ปริญญาโททุกๆ ท่านที่ให้ความช่วยเหลือและร่วมมือในการทำแบบทดสอบชิม ตลอดจนให้กำลังใจ ที่ทำให้โครงงานพิเศษฉบับนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

กลิ่นรสของอาหารเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่ผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารจำเป็นต้องให้ความสนใจเนื่องจากเป็นสมบัติอย่างหนึ่งที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคในตัวผลิตภัณฑ์อาหารนั้น สารปรุงแต่งกลิ่นรสจึงถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวาง เพื่อวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ เพื่อเพิ่มความหลากหลายในด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ตามความต้องการของผู้บริโภคหรือเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารแทนวัตถุดิบราคาแพงที่ต้องใช้เพื่อให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์

การทำอาหารหมักดองในอดีตมีจุดประสงค์เพื่อต้องการยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เท่านั้น ส่วนเครื่องดื่มที่มีการหมักก็เพื่อต้องการแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น แต่ในปัจจุบันได้มีการค้นคว้าและมีความเข้าใจดีขึ้นเกี่ยวกับบทบาทของจุลินทรีย์และเอ็นไซม์ที่มีผลต่ออุตสาหกรรมการหมักอาหารและเครื่องดื่ม ซึ่งมีผลต่อกลิ่นรสในเครื่องดื่มหรือให้กลิ่นรสที่ดีเฉพาะตัวของอาหารหมักนั้นๆ ดังนั้นอาหารหมักแบบดั้งเดิมจึงยังคงเป็นที่นิยมจนถึงปัจจุบัน เช่น การหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อราของชาวเอเชีย ได้แก่ เทมเป้ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และการหมักถั่วเหลืองด้วยเชื้อแบคทีเรียของชาวญี่ปุ่น ได้แก่ นัตโต เป็นต้น

ในปัจจุบันสารปรุงแต่งรส ได้ถูกนำมาใช้กับอุตสาหกรรมอาหารเป็นจำนวนมาก เช่น อุตสาหกรรมบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปรสต่างๆ เช่น รสเนื้อ รสไก่ รสหมู และรสอื่นๆ ได้นำสารปรุงแต่งรสมาใช้แทนเนื้อซึ่งมีราคาแพง ซึ่งส่วนใหญ่ในปัจจุบันจะใช้สาร HPP (Hydrolyzed Plant Protein) โดยการผลิตจากการนำถั่วเหลืองมาย่อยสลายด้วยกรด (Hydrolysis) แต่เนื่องจากกระบวนการนี้จะก่อให้เกิดสาร 2 ชนิด คือ Monochlorophenol (MCP) และ Dichlorophenol (DCP) ซึ่งเป็นสารที่ก่อมะเร็ง จึงหันมาสนใจวิธีการอื่นๆ แทน เช่น การใช้เอ็นไซม์ แต่เนื่องจากว่ามีต้นทุนการผลิตสูง จึงหันมาสนใจอาหารหมักจากถั่วเหลือง ซึ่งจะประกอบด้วยกลิ่นและรสที่มีลักษณะเฉพาะ ที่สามารถจะนำมาสกัดเพื่อแยกกลิ่นของเนื้อแต่ละชนิดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาถึงปัจจัยในการผลิตนัตโต (Natto) ที่มีต่อการเกิดกลิ่นและรส
2. ศึกษาการสกัดสารให้รสเนื้อจากอาหารหมักจากถั่วเหลือง เพื่อทดแทนสารที่ใช้ในปัจจุบัน
3. เพื่อศึกษาแนวทางในการผลิตสารปรุงรสเนื้อจากนัตโต (Natto)
4. เพื่อนำถั่วเหลืองซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีภายในประเทศมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

1. หาปัจจัยในการผลิตที่มีผลต่อการเกิดกลิ่นและรสของนัตโต
2. พยายามผลิตสารปรุงรสเนื้อจากนัตโตและประเมินผลผลิตที่ได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ความรู้ในการผลิตนัตโตและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของถั่วเหลืองโดยใช้จุลินทรีย์
2. ทราบถึงบทบาทของจุลินทรีย์ที่มีต่อการเกิดกลิ่นและรสในนัตโต
3. ความรู้ทางด้านคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพในสารปรุงรสที่สกัดได้
4. เป็นการใช้ความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพเพื่อใช้ในเทคโนโลยีการผลิตสารปรุงรสเนื้อซึ่งมีบทบาทสูงในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทยในปัจจุบัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

1. Flavour

ปัจจุบันกลิ่นรสของอาหาร (flavour) มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก เช่น อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง, อาหารสำเร็จรูป เป็นต้น โดยสามารถแบ่งออกเป็นชนิดใหญ่ๆ ได้ 2 ชนิด คือ

1. Natural flavour เป็น flavour ที่ได้มาจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 5 กลุ่มดังนี้ คือ

1.1 รสชาติที่สามารถใช้เป็นอาหารได้ ซึ่งโดยปกติจะไม่มีกลิ่นรสนั้น แต่เมื่อนำมาผ่านความร้อน หรือ กรรมวิธีต่างๆ จะได้ flavour ที่มีลักษณะเฉพาะ เช่น ถั่ว เมื่อผ่านความร้อนโดยการทอดจะให้รสชาติของถั่วทอด

1.2 รสชาติและกลิ่นจากผลไม้ เช่น สตรอเบอร์รี่, ฝรั่ง เป็นต้น

1.3 อาหารที่สามารถนำมาสกัด flavour ได้ เช่น ผิวส้ม, กาแฟ, ชา, โกโก้ เป็นต้น

1.4 flavour ที่ได้จากจุลินทรีย์

1.5 อาหารที่มีปฏิกิริยาเฉพาะตัว เช่น ปฏิกิริยาระหว่างเอ็นไซม์ของกระเทียม

2. Processing flavour เป็นการนำวัตถุดิบหรือสารตามธรรมชาติมาผ่านกระบวนการอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น

2.1 การอบ (roasted)

2.2 การใช้ปฏิกิริยา (reaction)

2.3 การใช้เอ็นไซม์ (enzymatic) มักจะได้จากการสกัดเอ็นไซม์จากจุลินทรีย์มาผ่านกระบวนการให้เอ็นไซม์ทำงาน

2.4 การหมัก (fermentation) เป็นการใช้จุลินทรีย์มาเปลี่ยนสารตั้งต้นโดยผ่านกระบวนการหมัก จะทำให้ได้สารที่มีลักษณะเฉพาะตัว นิยมใช้การผลิต flavour โดยวิธีนี้กับอาหารหมักที่มีคุณสมบัติเฉพาะ โดยถ้าหากใช้วิธีทางเคมีจะทำได้ยากและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง เช่น การหมักเครื่องดื่มแอลกอฮอล์, ซีอิ๊ว, เทมเป้ เป็นต้น

2.5 การรมควัน (smoking) การรมควันนอกจากจะเป็นการสร้าง flavour แล้วยังเป็นการถนอมอาหารอีกด้วย นิยมใช้กับเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอก, แฮม, เบคอน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิต flavour ในทางอุตสาหกรรม มีขั้นตอนดังนี้ คือ

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติขั้นต้นในการให้กลิ่นและรส (basic analysis)

2. การสกัดสารที่ต้องการ นิยมใช้การสกัดด้วยตัวทำละลาย (solvent extraction), การกลั่นด้วย Simultaneous Distilation Extraction หรือการใช้ Headspace collection

3. วิเคราะห์องค์ประกอบและการคัดเลือกสารที่ให้กลิ่นที่ต้องการ (Identification and Selection) จะเป็นการวิเคราะห์สารขนาดเล็กหรือสารที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ได้ นิยมใช้เครื่องมือที่สามารถวิเคราะห์ได้ชัดเจนและละเอียด คือ Gas chromatography / Mass spectrometry (GC-MS) โดยอาศัยการเปรียบเทียบจาก spectra ของเครื่องที่อาจมีสูงถึง 135,000 spectra

4. การรวบรวมสารที่ให้คุณสมบัตินั้นๆ (Formulated) โดยจะอาศัยคุณสมบัติของกลิ่นและรสที่ได้จากขั้นที่ 3 จะรวบรวมสารเหล่านั้น โดยปกติจะเป็นสาร aroma compound เป็นส่วนใหญ่

5. การทดสอบคุณสมบัติที่มีต่อการให้กลิ่นรส (Sensory Test) สิ่งจำเป็นในการตรวจสอบ คือ การใช้ Sensory Evaluation โดยใช้การดม เพราะกลิ่นจะมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ขั้นนี้อาจจะมีการตรวจสอบสารที่เป็นอันตรายด้วยการนำไปทดสอบในห้องปฏิบัติการสัตว์ทดลองก่อนนั่นเอง (เอกสาร FIS)

ขั้นตอนที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น เป็นการใช้คุณสมบัติทางเคมีด้วยอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูง รวมถึงการตรวจสอบในขั้นต่างๆ จำเป็นต้องใช้ความรู้ ความสามารถทางด้านวิทยาศาสตร์เข้ามาเกี่ยวข้อง การผลิต flavour อาจจะได้จากกรรมวิธีหลายๆ แบบ แต่จะด้วยกรรมวิธีใดก็ตามควรจะคำนึงถึงคุณภาพและปริมาณของ flavour ที่ได้กับความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจด้วย เพื่อเป็นการใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพและเกิดประโยชน์สูงสุด

2. นัตโต (Natto)

นัตโตเป็นอาหารหมักพื้นบ้านของชาวญี่ปุ่น โดยอาศัยการหมักจากถั่วเหลือง แต่ตามปกติแล้วการหมักถั่วเหลืองมักจะใช้เชื้อราเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งจะใช้เวลาค่อนข้างนาน แต่ในการทำนัตโตอาศัยการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus natto* (มีลักษณะคล้าย *B. subtilis*) ดังนั้นลักษณะของนัตโตที่ได้รับหลังจากการหมักจึงมีกลิ่นและรสชาติที่เฉพาะตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลิ่นเหม็นอับ (musty odor) ของ B. *natto* นั่นเอง นอกจากนี้แล้วเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถผลิตเมือกซึ่งเป็นสารโพลีเมอร์ออกมา จึงทำให้ก้อนนัตโตมีเมือกอยู่ที่ผิวโดยรอบอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบริโภคนัตโตในประเทศญี่ปุ่น นิยมรับประทานร่วมกับซอสหรือซีอิ๊วและข้าว เป็นอาหารเช้าหรืออาหารค่ำ

การทำนัตโตสามารถทำได้ง่ายและมักทำกันในระดับครัวเรือน โดยเริ่มจากนำถั่วเหลืองที่นึ่งให้สุกมาถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงไป จากนั้นจึงนำไปห่อด้วยฟางข้าว (40-43 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 1-2 วัน ก็จะได้นัตโตลักษณะต่างๆ ดังที่กล่าวข้างต้น การที่เราเลือกใช้ฟางข้าวห่อถั่วเหลืองไว้ในระหว่างการหมักนี้ ฟางข้าวจะช่วยให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตได้ดี และยังได้กลิ่นของฟางข้าวออกมา ซึ่งมีผู้บริโภคจำนวนมากที่ชอบกลิ่นนี้ นอกจากนี้แล้วฟางข้าวยังช่วยดูดซับกลิ่นของแอมโมเนีย ซึ่งเราไม่ต้องการออกไปด้วย

Bacillus subtilis

สัณฐานวิทยาและลักษณะทั่วไป

1 มี endospore โดยรูปร่างสปอร์จะเป็นรูปไข่ (ellipsoidal) อยู่ตรงกลางเซลล์
2. รูปร่างเป็นรูปท่อน (rod shape) บางครั้งจะต่อกันเป็นสาย
3. ติดสีแกรมบวก
4. ขนาดความกว้างของเซลล์ 0.7-0.8 µm และยาวประมาณ 2-3 µm
5. เป็น stric aerobe, facultative aerobe, microaerophile ขึ้นอยู่กับภาวะที่เจริญ
6. สามารถสร้างกรดแลคติกได้โดยใช้กลูโคส
7. มีเอ็นไซม์ catalase สามารถสร้างเอ็นไซม์ oxidase, β-galactosidase และ lipase ได้
8. สามารถใช้ D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-manitol, sucrose และ trehalose เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้
9. pH ที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 5.5-8.5
10. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 30-40 องศาเซลเซียส
11. โคโลนีกลมหรือไม่แน่นอน บนอาหาร agar media จะมีลักษณะด้านและทึบแสง มีสีครีมหรือสีน้ำตาล
12. เมื่อเลี้ยงบน glucose 1% nutrient agar จะแบนราบและหนาขึ้น
13. เจริญได้ในอาหารเหลว จะเจริญเป็นรอยย่นบนผิวอาหารโดยรอบ อาหารเหลวจะขุ่นเล็กน้อย หรือไม่มีความขุ่นเลย
14. สามารถสร้าง polysaccharide ได้ เช่น levan และ dextran จาก sucrose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถั่วเหลือง

ถั่วเหลืองเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร โดยเฉพาะอาหารหมัก ในโครงงานพิเศษฉบับนี้ได้เลือกใช้ถั่วเหลืองในการผลิตนัตโต ใช้เชื้อจุลินทรีย์คือ *Bacillus subtilis* ในการหมัก ถั่วเหลืองมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่สูง คือ ประมาณ 35% ซึ่งสูงกว่าไข่ไก่ประมาณ 4 เท่า, สูงกว่าเนื้อสัตว์ประมาณ 2 เท่า และสูงกว่านมประมาณ 10-12 เท่า (ภาคผนวก ก.)

ปริมาณโปรตีนมีผลต่อกลิ่นรส เนื่องจากโปรตีนเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อกลิ่นรส เช่น อลานีนและกรดกลูตามิก โดยเฉพาะกรดกลูตามิกจะเป็น flavour enhancer ซึ่งเป็นตัวช่วยเสริมกลิ่นรส นอกจากนี้ถั่วเหลืองยังมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ทรีฮาโลส และโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นต้น ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยา Miallard reaction กับกรดอะมิโนที่ย่อยสลายได้จากถั่วเหลือง ทำให้เกิดกลิ่นรสต่างๆ (ภาคผนวก ข.) ถั่วเหลืองยังประกอบด้วยแร่ธาตุที่สำคัญอื่นๆ คือ K (Potassium), P (Phosphorus), Ca (Calcium) ซึ่งจะมีผลต่อรส (ภาคผนวก ค.) ในการนำถั่วเหลืองมาผลิตนัตโตจะช่วยลดกลิ่นถั่ว (beany flavour) กลิ่นเหม็นเขียว (green odour) และรสขม (bitter) ซึ่งเกิดจากองค์ประกอบพวก saponin และ isoflavin (ภาคผนวก ง.) สำหรับน้ำตาลทรีฮาโลสที่ได้จากคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของถั่วเหลืองนั้น ยังใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนของเชื้อ *Bacillus subtilis* อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Infrared Spectroscopy)

อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเทคนิคอย่างหนึ่งที่นิยมใช้ในการวิเคราะห์ ตรวจสอบ พิสูจน์ และศึกษาเกี่ยวกับโมเลกุลของสาร ซึ่งอาจอยู่ในสถานะของแข็งหรือของเหลว หรือแก๊สก็ได้ อินฟราเรดสเปกโทรสโกปีเป็นเรื่องที่เกี่ยวกับการดูดกลืนรังสีอินฟราเรดของสาร

การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับอินฟราเรดนี้ได้ดำเนินมาเป็นเวลานานแล้ว ตั้งแต่ปี ค.ศ.1800 Sir William Herschel ได้ศึกษาเกี่ยวกับ heating effect ในช่วงต่าง ๆ ของสเปกตรัม และพบว่า heating effect มีมากที่สุดในแถบของสเปกตรัมที่เลยสีแดง (red end) ไปแล้ว และในช่วงปลายของศตวรรษที่ 19 ได้เริ่มมีการศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัมแล้ว ในปี ค.ศ.1910 Coblentz ได้ศึกษาการดูดกลืนแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสารต่างๆ และได้สร้างความสัมพันธ์ของอินฟราเรดสเปกตรัมกับโครงสร้างของสารขึ้น ซึ่งยังคงใช้อยู่กระทั่งปัจจุบันนี้

ในปี ค.ศ.1939-1945 ได้มีการศึกษาและการนำไปใช้ประโยชน์ของอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการวิเคราะห์ของผสมพวกไฮโดรคาร์บอนและสารในกลุ่มใกล้เคียงกันได้ดี จึงมีผู้วิจัยด้านนี้มากขึ้น ทั้งเครื่องมืออิเลกทรอนิกส์และเครื่องวัดที่มีสภาพไวสูง ๆ จนกระทั่งสร้างเครื่องมือทั้งชนิดลำแสงเดี่ยวและลำแสงคู่ขึ้นมาใช้ในการศึกษาอินฟราเรดสเปกตรัม เพื่อนำไปสู่การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารที่สนใจ จนกลายเป็นงานประจำได้

อินฟราเรดเป็นช่วงหนึ่งของสเปกตรัมของการแผ่รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งมี wave numbers อยู่ในช่วงประมาณ 12,800 ถึง 10 cm^{-1} หรือมีช่วงความยาวคลื่นจาก 0.78 ถึง 1,000 μm เพื่อให้ง่ายและสะดวกขึ้น จะแบ่งช่วงของอินฟราเรดสเปกตรัมออกเป็น 3 ช่วง คือ

1.ช่วงใกล้อินฟราเรด (near IR region) หรือ overtone region ซึ่งเป็นช่วงที่อยู่ใกล้กับช่วงวิสิเบิล เกิดจากการรวมกันของ IR ที่อยู่ในช่วงกลาง (นั่นคือเป็น 2v, 3v เป็นต้น) หรือช่วงที่ต่ำกว่า 2.5 μm และมักจะพบว่า absorption band ที่ได้ค่อนข้างต่ำ (weak) overtone absorption มีประโยชน์ในการวิเคราะห์สารพวก aromatic compounds หรือพวก aromatic substitution

2.ช่วงกลางอินฟราเรด (middle IR region) หรือ fundamental region ยังแบ่งออกได้เป็น

1. <u>group-frequency region</u> เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 4,000-1,300 cm^{-1} หรือ 2.5-8 μm ซึ่งสเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่ได้จากพวก functional groups แต่ไม่ให้ complete structure

2. <u>finger print region</u> เป็นช่วงที่อยู่ระหว่าง 1,300-650 cm^{-1} สเปกตรัมที่ได้ในช่วงนี้ส่วนใหญ่เกิดจากโครงสร้างของโมเลกุลที่สมบูรณ์ ดังนั้น สเปกตรัมที่ได้จึงค่อนข้างยุ่งยาก การวิเคราะห์จึงต้องใช้วิธีเปรียบเทียบกับสเปกตรัมของสารที่ทราบโครงสร้างแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.ช่วงไกลอินฟราเรด (far IR region) ช่วงนี้ไม่ค่อยจะได้ใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากสเปกตรัมช่วงนี้มักจะเกิดจากการสั่นของโครงสร้าง (molecular structure) หรือเกิดจากการหมุนของโมเลกุล

ช่วงที่จะใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์นั้นเป็นช่วงกลางอินฟราเรดเป็นส่วนใหญ่ คือจาก 4,000-400 cm^{-1} หรือ 2.5 ถึง 25 μm

ตารางที่ 1 แสดงช่วงต่าง ๆ ของอินฟราเรดสเปกตรัม

ช่วง (Region)	ช่วงความยาวคลื่น (μm)	จำนวนคลื่น (Wave number) (cm^{-1})	ช่วงความถี่ (Hz)
ช่วงใกล้	0.78-2.5	12,800-4,000	$3.8*10^{4}$-$1.2*10^{14}$
ช่วงกลาง	2.5-50	4,000-200	$1.2*10^{14}$-$6.0*10^{12}$
ช่วงไกล	50-1,000	200-10	$6.0*10^{12}$-$3.0*10^{11}$
ช่วงที่ใช้มาก	2.5-15	4,000-670	$1.2*10^{14}$-$2.0*10^{13}$

3.1 <u>กระบวนการดูดกลืนแสงอินฟราเรด (The Infrared Absorption Process)</u>

โมเลกุลของสารเคมีจะดูดกลืนแสงในช่วงของอินฟราเรด (IR) ได้นั้น ก็จะมีลักษณะเช่นเดียวกับการดูดกลืนแสงในช่วงยูวี-วิสิเบิล ดังได้กล่าวมาแล้ว เพียงแต่ต่างกันที่ IR มีพลังงานน้อยกว่า ดังนั้นโมเลกุลเมื่อดูดกลืนแสง IR โมเลกุลจะถูกกระตุ้น (excite) เป็นโมเลกุลที่มีพลังงานสูงกว่าอยู่ที่สภาวะพื้นโดยมีพลังงานเปลี่ยนแปลงอยู่ในราว 2-10 Kcal/mole ซึ่งเป็นพลังงานพอที่จะทำให้โมเลกุลเกิดการสั่น (vibration) เท่านั้น การดูดกลืนแสง IR ของโมเลกุลมิใช่ว่าทุกโมเลกุลของสารจะดูดกลืนแสง IR ได้หมด แต่จะต้องมีลักษณะเฉพาะ สภาวะก็ต้องเหมาะสมด้วย คือ

1. **รังสีหรือแสงนั้นจะต้องมีพลังงานพอเหมาะพอดี (quantise) ที่จะทำให้เกิดแทรนซิชัน**
2. **จะต้องเกิดการควบคู่ (coupling) พอดีระหว่างสนามไฟฟ้าจากการแผ่รังสีกับสารนั้น เมื่อมีการดูดกลืนพลังงานแล้วจะทำให้เกิดโมเมนต์ขั้วคู่ (dipole moment) ของโมเลกุลนั้นเปลี่ยนไป**

ดังนั้นเมื่อใช้ IR ผ่านเข้าไปในโมเลกุลของสารใดก็ตาม แล้วเกิดปรากฏการณ์สองอย่างข้างบนนี้ เรียกสารนั้นว่า IR active ถ้าไม่มีการเปลี่ยนโมเมนต์ขั้วคู่ แสดงว่าสารนั้นเป็น IR inactive ถือว่าไม่มีการดูดกลืนแสง IR ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงโมเมนต์ขั้วคู่มากจะได้ IR absorption peak สูง ถ้าเปลี่ยนแปลงน้อยก็จะได้ weak absorption peak

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 <u>ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (IR Spectrophotometer Components)</u>

ส่วนประกอบของเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ก็มีลักษณะคล้าย ๆ ยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ แต่การจัด (arrangement) อาจแตกต่างกันบ้าง ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ

1. ต้นกำเนิดแสงอินฟราเรด (IR Source)
2. เซลล์ที่ใส่สารตัวอย่าง (Sample Cell)
3. โมโนโครเมเตอร์ (Monochromator)
4. เครื่องวัดแสงอินฟราเรด (IR Detector)
5. เครื่องบันทึกสเปกตรัม (Recorder หรือ Read out Devices)

1. ต้นกำเนิดแสงอินฟราเรด (IR Source) ที่ใช้กันทั่วไปนั้นเป็นของแข็งที่เฉื่อย ซึ่งสามารถเผาให้ร้อนด้วยไฟฟ้าจนมีอุณหภูมิประมาณ 1,500-2,000 K ได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะให้แสงมีความเข้มสูงสุดที่ความถี่ประมาณ 5,000 cm^{-1}

2. โมโนโครเมเตอร์ ซึ่งประกอบด้วยช่องแสงผ่าน (slits) เกรตติง (grating) คืออาจมีฟิลเตอร์ (filter) ประกอบด้วยก็ได้ ซึ่งส่วนนี้จะมีลักษณะเหมือนกับระบบโมโนโครเมเตอร์ในเครื่องยูวี-วิสิเบิลสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ทุกประการ

3. เครื่องวัดแสงอินฟราเรด (IR Detector) เนื่องจากแหล่งกำเนิดแสงอินฟราเรดที่ผลิตได้ในปัจจุบันนี้ล้วนเป็นพวกที่ให้ความเข้มต่ำ ประกอบกับแสงอินฟราเรดเป็นแสงที่มีพลังงานต่ำ จึงทำให้การตรวจค่อนข้างยุ่งยากกว่าการตรวจวัดแสงยูวีและวิสิเบิล เพราะพลังงานไม่พอที่จะทำให้เกิดอิเลคตรอนในหลอดวัดแสง (phototube) ได้ จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือวัดอย่างอื่น ในปัจจุบันเครื่องวัดแสงอินฟราเรดที่ใช้กันอยู่แบ่งออกเป็น 2 พวก คือ

1. อาศัยหลักการทาง Photoconductive effect ซึ่งเกิดขึ้นเช่นเดียวกับสารกึ่งตัวนำ เป็นแบบ photon detector

2. อาศัยหลักการ Heating effect โดยที่แสงอินฟราเรดถูกดูดกลืนจะเกิดความร้อนขึ้นแล้วทำให้ความต้านในเส้นลวดของเครื่องวัดเปลี่ยนแปลง เรียกว่า Thermal Detector ที่ใช้เป็นเครื่องวัดครอบคลุมความยาวคลื่นได้กว้างขวาง

4. เครื่องบันทึกสเปกตรัม หรือ Read Out Devices สัญญาณที่ได้จากดีเทคเตอร์ซึ่งเป็นสัญญาณที่น้อยจำเป็นจะต้องเข้าเครื่องขยายสัญญาณเสียก่อนก่อนที่จะเข้าเครื่องบันทึกหรืออ่านสัญญาณเช่นเดียวกับเครื่องยูวี-วิสิเบิล สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ ซึ่งอาจเป็นเครื่อง recorders, printers, video display terminals หรือ xy plotters เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 <u>การวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง (Solid Samples)</u>

ในกรณีที่ต้องการแสงอินฟราเรดสเปกตรัมของสารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง โดยไม่มีผลของตัวทำละลายหรือสารอื่น ๆ ผสมอยู่เกี่ยวข้อง นั่นคือมีแต่เฉพาะตัวอย่างเท่านั้น จำเป็นจะต้องทำให้สารตัวอย่างมีลักษณะบางมาก ๆ เป็นฟิล์มที่หนาประมาณ 0.01-0.1 มม. เพื่อให้แสงผ่านได้ เทคนิคต่าง ๆ ที่จะเลือกใช้ยังขึ้นอยู่กับสมบัติทางกายภาพของสารนั้นด้วย เทคนิคต่าง ๆ มีดังต่อไปนี้

1. ใช้วิธีอัดและรีดให้เป็นแผ่นบาง ๆ ด้วยโลหะบนแผ่นโลหะเรียบ หรือแผ่นพลาสติก หรือบนแผ่นโลหะที่ฉาบด้วยพวกโพลิเมอร์ที่ทนความร้อน เมื่อนำสารตัวอย่างไปอัดและรีดจนได้เป็นแผ่นบางๆ หรืออาจให้ความร้อนในขณะอัดและรีดด้วยก็ได้ เทคนิคนี้เหมาะที่จะใช้กับสารตัวอย่างที่เป็นพลาสติก ถ้าสารตัวอย่างไม่แข็งมากนักอาจใช้ windows 2 แผ่น รีดสารตัวอย่างก็ได้ แต่จะต้องระวังการแตกของ windows ด้วย

2. ใช้วิธีหลอม ถ้าสารตัวอย่างมีมวลโมเลกุลต่ำ อาจหลอมเหลวได้ง่าย แล้วนำสารตัวอย่างที่หลอมเหลวเทลงไปบนแผ่นโลหะเรียบให้เป็นแผ่นบาง ๆ หรือเทลงไปในระหว่างแผ่น windows 2 แผ่นประกบกันแล้วทิ้งไว้ให้เย็น

3. ในกรณีที่สารตัวอย่างเป็นพวกชีวสาร พลาสติก หรือ ขี้ผึ้ง เป็นต้น อยู่ในรูปเป็นก้อนหรือเป็นแท่ง สามารถใช้ไมโครโทมตัดให้เป็นแผ่นบาง ๆ ได้

4. ใช้วิธีทำให้เป็นสารละลาย โดยให้สารตัวอย่างละลายในตัวทำละลายที่ระเหยได้ง่าย ๆ แล้วนำสารละลายนั้นเทลงบนแผ่นกระจก หรือแผ่นโลหะที่ขัดมัน หรือแผ่นพลาสติก หลังจากตัวทำละลายระเหยออกไปแล้ว ใช้มีดตัดแผ่นฟิล์มออกมา ถ้าสารตัวอย่างนั้นไม่ละลายน้ำ ให้นำแผ่นฟิล์มจุ่มลงไปในน้ำ หลังจากทำให้แห้งแล้วจะสังเกตเห็นว่าแผ่นฟิล์มตรงกลางจะบางกว่าที่ขอบ เนื่องจากความเข้มข้นของสารละลายไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยใช้สารละลายให้มีความเข้มข้นมากที่สุดเท่าที่จะทำได้ อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ยังคงมีตัวทำละลายหลงเหลืออยู่บ้างเล็กน้อย

5. ใช้ Mull technique วิธีนี้ได้รับความนิยมมากสำหรับการวิเคราะห์สารตัวอย่างที่เป็นของแข็ง

<u>อุปกรณ์และวัสดุที่ต้องใช้มี</u>

โกร่งอะเกต (agate mortar) พร้อมสาก

mineral oil หรือเรียก Nujol หรือ พาราฟินเหลว หรืออาจใช้ hexachlorobutadiene หรือ fluorolube ซึ่งเป็น perfluorokerosene

<u>ในการเตรียมสารด้วยเทคนิคนี้ คือ</u>

ใช้สารตัวอย่าง 2-3 มก. บดให้ละเอียดด้วยโกร่งอะเกต หรือ ball mill เล็ก ๆ แล้วหยด Nujol ลงไป1-2 หยด แล้วบดต่อไปจนเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำสารตัวอย่างที่บดได้นี้ไปใส่ลงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. แก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography , GC)

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคอีกชนิดหนึ่งที่ใช้สำหรับแยกสารผสม เทคนิคนี้ใช้แยกสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิหนึ่ง (ไม่เกิน 450°C) ถ้าสารใดเปลี่ยนให้เป็นแก๊สยาก ก็อาจใช้เทคนิคอื่น ๆ บางอย่างเข้าช่วย เช่น อาศัยปฏิกิริยาเคมีเปลี่ยนให้เป็นอนุพันธ์อื่น ๆ หรืออาจใช้หลักการแยกสลายด้วยความร้อน (pyrolysis) เมื่อสารนั้นถูกเปลี่ยนให้อยู่ในแก๊สเฟสแล้ว ให้สารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas สารผสมเหล่านั้นจะเกิดการแยกขึ้น แก๊สโครมาโทกราฟีแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีด้วยกัน คือ

1. แก๊ส-ของแข็งโครมาโทกราฟี (Gas-Solid Chromatography หรือ GSC)

วิธีนี้ใช้เฟสคงที่เป็นของแข็งที่สามารถดูดซับ (adsorption) สารที่เป็นแก๊สซึ่งต้องการแยกได้และไม่มีสารอื่นใดเคลือบอยู่ ส่วนใหญ่แล้ววิธีนี้ค่อนข้างจะแคบ เพราะใช้แยกเฉพาะสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่เป็นโมเลกุลเล็ก ๆ เท่านั้น ดังนั้นคอลัมน์ที่ใช้มักจะบรรจุด้วย active solids เช่น Molecular sieves หรือ porous polymers, silica gel, alumina และ activated carbon เป็นต้น

2. แก๊ส-ของเหลวโครมาโทกราฟี (Gas-Liquid Chromatography หรือ GLC)

สารที่เป็นแก๊สหรือไอของสารที่ผสมกันอยู่ เมื่อผ่านคอลัมน์จะสามารถแยกออกจากกันได้ด้วยการกระจายตัวที่แตกต่างกันของแก๊สหรือไอระหว่างเฟสเคลื่อนที่กับเฟสคงที่ที่มีของเหลว (liquid phase) ฉาบอยู่บนของแข็ง หรือมีค่า partition coefficient ต่างกัน วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางสำหรับแยกสารที่เป็นแก๊สหรือสารที่สามารถเปลี่ยนให้เป็นไอหรือแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิกำหนด

4.1 องค์ประกอบของการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางแก๊สโครมาโทกราฟี

1. ถังแก๊สที่ใช้บรรจุตัวพา (carrier gas) เพื่อจะพาไอของสารตัวอย่างผ่านเข้าไปยังคอลัมน์ได้แก่ ไนโตรเจน ฮีเลียม และอาร์กอน เป็นต้น

2. ส่วนที่ใช้ควบคุมการไหลของแก๊สต่าง ๆ (flow controller) ได้แก่ ไฮโดรเจน อากาศ และไนโตรเจน เป็นต้น

3. ส่วนที่จะฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (injection port)

4. คอลัมน์ (column) ซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดที่ใช้สำหรับแยกสาร

5. ดีเทคเตอร์ (detector) เป็นส่วนที่ใช้สำหรับตรวจวัดสารแต่ละชนิดที่ถูกแยกมาจากคอลัมน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller) ให้กับคอลัมน์ดีเทคเตอร์ และ injector

7. ส่วนที่ใช้ประมวลผลและข้อมูลต่าง ๆ ได้แก่ อินทิเกรเตอร์ เครื่องบันทึกโครมาโทแกรม หรือ data processor หรือคอมพิวเตอร์

ดังนั้น ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยใช้เทคนิคทาง GC นั้น สามารถแสดงให้เข้าใจได้ง่าย ๆ ดังนี้ คือ เมื่อเลือกสภาวะต่าง ๆ ของการวิเคราะห์ และจัดสภาวะของเครื่อง GC ให้เรียบร้อยแล้ว จึงนำสารตัวอย่างไปฉีดเข้าที่ sample injection port สารจะกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยแก๊สพา (carrier gas) อย่างช้า สารผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วน ๆ ที่คอลัมน์นี้ แล้วออกไปสู่ดีเทคเตอร์ (detector) จะทำให้ได้สัญญาณเกิดขึ้น ซึ่งสามารถเขียนออกมาเป็นโครมาโทแกรมด้วยเครื่อง recorder หรือต่อเข้ากับ printer หรือ integrator ก็จะทำให้ผู้วิเคราะห์สามารถทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่างได้

4.2 <u>ทฤษฎีและกระบวนการแยกสารทางโครมาโทกราฟี</u>

กระบวนการแยกสารทางโครมาโทกราฟีนั้นสามารถกำหนดได้ด้วย 2 สถานะ คือ

1. ค่า partition coefficient หรือ distribution constant (K) ซึ่งแทนด้วย distribution isothems อาจเป็นได้ทั้งแบบเส้นตรง (linear) หรือไม่เป็นเส้นตรง (non linear)

ไอโซเทอร์ม (isotherms) แสดงด้วยกราฟถึงความสัมพันธ์ของตัวดูดซับ (adsorbent) กับตัวถูกดูดซับ (sorbate) ในสารละลายที่อุณหภูมิหนึ่งซึ่งกำหนดไว้ ทำให้ค่าที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับในเฟสคงที่ กับความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับในเฟสเคลื่อนที่หรือแก๊สเฟสมีค่าคงที่ ซึ่งเรียกว่า ค่าคงที่การแผ่กระจาย (distribution constant หรือ partition coefficient , K) คือ

$$K = C_s / C_g$$

C_s = ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับในเฟสคงที่

C_g = ความเข้มข้นของตัวถูกดูดซับในแก๊สเฟส

2. ระบบของโครมาโทกราฟีจะเป็นระบบอุดมคติ (ideal) หรือไม่เป็นระบบอุดมคติ (non-ideal) ก็ได้ ถ้าเป็นระบบอุดมคติ แสดงว่าการแลกเปลี่ยนระหว่างเฟส 2 เฟสนั้นเป็น Thermofynamically reversible และสมดุลระหว่างอนุภาคที่เป็นของแข็ง หรือของแข็งที่มี liquid phase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฉาบผิวและแก๊สเฟสจะเข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็ว กระบวนการ diffusion เกิดขึ้นน้อยมาก แต่ถ้าเป็น non-ideal การตั้งสมมติฐานนี้จะใช้ไม่ได้

ไอโซเทอร์มจึงมีได้ทั้งที่เป็นเส้นตรงและเส้นโค้ง ถ้าเป็นเส้นตรง ลักษณะพีกของโครมาโทแกรมจะเป็นแบบเกาส์เซียน แสดงว่าการแยกสารไม่มีปัญหา ถ้าไอโซเทอร์มเป็นเส้นโค้ง แสดงว่าพีกของโครมาโทแกรมไม่สมมาตรกัน (asymmetry) บางไอโซเทอร์มจะเป็นเส้นตรงบางช่วงของความเข้มข้นเท่านั้น ในกรณีนี้จึงจำเป็นต้องทำการวิเคราะห์ในช่วงความเข้มข้นจำกัดเพื่อป้องกันการเกิดปัญหาที่จะตามมา

ในการอธิบายทฤษฎีทางโครมาโทกราฟี โดยอาศัยพื้นฐานของ discontineous model จะต้องตั้งสมมติฐานขึ้นหลายอย่างด้วยกัน คือ

1. ความเข้นข้นของตัวถูกละลาย (solute) ในเฟสทั้งสองจะเข้าสู่สมดุลอย่างรวดเร็ว
2. การแพร่กระจายของตัวถูกละลายในเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ตลอดคอลัมน์จะต้องมีน้อยมาก
3. สารที่บรรจุในคอลัมน์หรือ liquid phase ที่ฉาบ (coated) ในคอลัมน์จะต้องสม่ำเสมอ

ในการแยกสารทางโครมาโทกราฟีนั้น อาจจะมีสภาวะไม่ครบทั้ง 3 ข้อนี้ก็ได้ ถ้าอัตราเร็วคงที่ (rate constant) ของกระบวนการดูดซับและการคายการดูดซับ (sorption-desorption processes) มีค่าน้อย สมดุลของเฟสทั้งสองไม่จำเป็นต้องเกิดอย่างรวดเร็ว ผลของปรากฏการณ์ที่เกิดเรียกว่า resistance-to-mass-transfer ดังนั้น ตัวถูกละลายจะมีการแพร่กระจายจากเฟสหนึ่งไปยังอีกเฟสหนึ่งตามธรรมชาติ

4.3 <u>รายละเอียดของแต่ละส่วนของเครื่องมือและข้อมูลต่าง ๆ ของการใช้ GC</u>

4.3.1 แก๊สพา (Carrier Gas)

เป็นแก๊สที่ใช้สำหรับพาสารตัวอย่างที่ถูกทำให้เป็นไอหรือแก๊สเฟสแล้วที่ injection port ให้เข้าสู่คอลัมน์ต่อไป แก๊สพานี้จะต้องมีการควบคุมอัตราการไหล (flow rate) ให้คงที่เสมอ โดยสามารถเลือกใช้อัตราการไหลให้เหมาะสมได้ตามต้องการ อัตราการไหลของแก๊สพามีส่วนสำคัญต่อการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้คงที่

แก๊สพาที่ใช้กันโดยทั่วไป ได้แก่ แก๊สไนโตรเจน ฮีเลียม หรือแก๊สไฮโดรเจน ลักษณะที่ดีของแก๊สพาควรจะเป็นดังนี้ คือ

1. ควรมีสมบัติเฉื่อย เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือตัวทำละลายหรือเฟสคงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. เป็นแก๊สที่มีการแพร่น้อยและมีมวลโมเลกุลต่ำ

3. สามารถจัดหาได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูง

4. ราคาไม่แพง

5. เป็นแก๊สที่เหมาะสำหรับใช้กับดีเทคเตอร์ได้ แก๊สพาที่ออกจากท่อแก๊สควรทำให้บริสุทธิ์ขึ้นโดยให้ผ่านท่อที่บรรจุด้วย molecular seive เพื่อช่วยขจัดไอน้ำหรือไอน้ำมัน

4.3.2 คอลัมน์ (Columns)

คอลัมน์ที่ใช้กันทั่วไปใน GC นั้นมี 2 ประเภท คือ

(1) packed columns มีอยู่ 2 ชนิด คือ partition column และ adsorption column สำหรับ partition column เป็นคอลัมน์เปล่าที่บรรจุด้วยอนุภาคของแข็งซึ่งมีคุณสมบัติเฉื่อย (inert solid particles) แล้วฉาบผิว (coated) ด้วยสารอินทรีย์บางชนิดที่เรียกว่า liquid phase (ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป) อีกชนิดหนึ่งเป็นคอลัมน์ที่บรรจุด้วยอนุภาคของสารดูดซับ (adsorptive particles) เช่น alumina, activated charcoal, silica gel หรือ molecular sieves เป็นต้น

(2) capillary columns คอลัมน์ชนิดนี้ โดยทั่วไปเป็นหลอดรูเล็กๆ กลวง ทำด้วยเหล็กกล้าหรือเหล็กไร้สนิม, แก้ว, quartz (fused silica) มีรัศมีภายใน 0.3-0.6 มม. ภายในฉาบผิวด้วย liquid phase เป็นฟิล์มบางๆ ตลอดรูเล็กๆ ซึ่งอาจมีความยาว 25-100 เมตร คอลัมน์ชนิดนี้แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพ (efficiency) ของคอลัมน์ต่อหน่วยความยาวค่อนข้างต่ำ แต่สามารถใช้คอลัมน์ยาวมากได้ เพราะมี pressure drop เพียงเล็กน้อย ดังนั้น เมื่อใช้คอลัมน์ยาวมากๆ จึงทำให้ประสิทธิภาพในการแยกมีค่าสูง และเมื่อใช้ภาวะที่เหมาะสมแล้ว capillary column จะมีประสิทธิภาพในการแยกที่ดีที่สุด

4.3.3 Liquid Phase

Liquid phase เป็นสารเคมีที่ใช้ฉาบ (coated) บน solid support เพื่อใช้เป็นตัวทำหน้าที่แยกสารตัวอย่างและใส่อยู่ในคอลัมน์ การจะเลือก liquid phase ให้ดีที่สุดสำหรับแยกสารนั้นไม่มีกฎเกณฑ์ที่แน่นอน โดยมากการเลือกคอลัมน์ที่เหมาะสมที่สุดขึ้นอยู่กับความชำนาญ หรือได้จากการลองใช้ดู อย่างไรก็ตาม การเลือกใช้คอลัมน์ก็มีหลักทั่ว ๆ ไปอยู่บ้าง และอาจเลือกคอลัมน์จากข้อมูลของผู้ที่ได้เคยใช้แยกมาแล้ว

Liquid phase ควรมีคุณสมบัติดังนี้

(1) ควรเป็นตัวทำละลาย (solvent) ที่ดี เมื่อละลายได้ดี การชะ (elute) ออกจากคอลัมน์จะช้าทำให้การแยกได้ผลดี

(2) ควรละลายสารต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน จึงจะทำให้การแยกสารต่าง ๆ ออกจากกันได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ต้องเป็นสารที่อยู่ตัวหรือไม่ระเหยในช่วงของอุณหภูมิที่ต้องใช้งาน เพราะจะทำให้คอลัมน์มีอายุการใช้งานได้นาน

(4) ต้องไม่ทำปฏิกิริยากับสารตัวอย่างหรือกับเฟสเคลื่อนที่

(5) ควรจะมีสภาพขั้ว (polarity) ใกล้เคียงกับสารตัวอย่าง จะทำให้การแยกได้ผลดี ดังคำกล่าวที่ว่า "like separates like"

4.3.4 เครื่องดีเทคเตอร์ (Detectors)

เป็นเครื่องที่สามารถบ่งบอกว่ามีสารที่ต้องการวิเคราะห์หรือมีสารอื่นที่แตกต่างไปจากแก๊สพาออกมาจากคอลัมน์หรือไม่ ถ้ามีก็จะสามารถวัดได้ว่ามีปริมาณเท่าใดได้ด้วย ดังนั้น ดีเทคเตอร์จึงต้องเป็นเครื่องที่มีลักษณะเฉพาะสามารถให้สัญญาณกับสารต่าง ๆ ได้ ให้สภาพไวที่สูงพอ มีการตอบสนองที่ดีในช่วงความเข้มข้นของสารที่กว้างพอ และมีหลากหลายชนิด แล้วแต่งานของห้องปฏิบัติการนั้น ๆ

ลักษณะเฉพาะที่ต้องการของดีเทคเตอร์

ดีเทคเตอร์ที่จะใช้ในการตรวจหาสารในเครื่อง GC นั้น ควรจะต้องมีลักษณะเฉพาะในการตอบสนองต่อสารเคมีที่ต้องการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้ คือ

(1) ควรจะต้องให้สภาพไวสูง (high sensitivity) นั่นคือ การตอบสนอง (response) ต่อปริมาณสารควรจะต้องมาก เพื่อจะได้สามารถตรวจหาปริมาณของสารน้อย ๆได้ หรือมีค่า MDL (minimum detectable level) ต่ำ ๆ ซึ่งในทางปฏิบัติจะหมายถึงปริมาณของสารที่สามารถทำให้เกิดความสูงของพีกได้เป็น 2 หรือ 3 เท่าของพีกจากสัญญาณรบกวน (signal/noise = 2 หรือ 3)

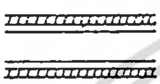
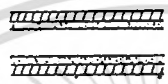
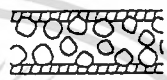
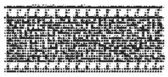
(2) ควรมีความเฉพาะต่อการตรวจหาสาร (selectivity) บ้าง เช่น สารต่างประเภทกันควรให้การตอบสนองที่แตกต่างกัน ถ้าดีเทคเตอร์ใดให้การตอบสนองต่อสารทุกประเภทเหมือน ๆ กัน ดีเทคเตอร์นั้น ก็จัดเป็นประเภททั่วไป (universal detector) และถ้าดีเทคเตอร์ที่ให้การตอบสนองเฉพาะสารใดสารหนึ่ง จะทำให้ดีเทคเตอร์นั้นสามารถตรวจหาสารนั้นๆได้อย่างดีในของผสม ซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องการ

(3) ควรจะต้องมี Dynamic Range ที่กว้าง คือ ดีเทคเตอร์นั้นควรให้ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณมีช่วงความเข้มข้นที่กว้างพอที่จะวัดได้อย่างถูกต้อง

(4) ในทางปฏิบัติ ดีเทคเตอร์ควรจะต้องมีเสถียรภาพ (stability) และความเที่ยง (reproducibility) ที่ดีด้วย มิฉะนั้นค่าที่วัดได้จะไม่มีความถูกต้องและแตกต่างกันจึงใช้ไม่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงชนิดต่างๆ ของ capillary columns

ชนิดของคอลัมน์	WCOT (wall coated open) tubular	SCOT (PLOT) (solid coated หรือ porous layer) open tubular	Packed capillary	Micropacked
ลักษณะการทำ				
วัสดุที่ใช้	แก้วหรือโลหะ	แก้วหรือโลหะ	แก้ว	แก้วหรือโลหะ
เส้นผ่านศูนย์กลางภายใน	0.1-0.5 มม.	0.3-0.5 มม.	0.25 0.5 มม.	0.5—1.0 มม.
ความยาว	20—100 เมตร	20—25 เมตร	2—20 เมตร	0.3—5 เมตร
การเตรียม	ใช้ liquid phase ฉาบที่ผิวภายในหลอด	ผนังภายในฉาบด้วยตัวดูดซับซึ่งมี diatomaceous earth หรือ silanized silica	เป็นหลอดแก้วหนาบรรจุด้วย solid support แล้วดึงให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางตามต้องการ แล้วฉาบด้วย liquid phase	นำ solid support หรือ adsorbent ใส่ใน capillary tube ผลจะดีเมื่อ packing material มีขนาดเล็ก ๆ
ข้อได้เปรียบ	เป็นคอลัมน์ที่มี efficiency สูง	เป็นคอลัมน์ที่มี capacity สูงกว่า WCOT เพราะผิวภายในมีมากกว่า	เป็นคอลัมน์ที่ pack แน่นน้อยกว่า และมี pressure drop เล็กน้อยจึงเป็นคอลัมน์ที่มีประสิทธิภาพสูง เหมาะสำหรับ GSC	มี number of theoretical plate (NTP) สูงถึง 4,000—5,000 ต่อเมตร พีกที่ได้จะ sharp
ข้อเสีย	มี capacity ต่ำกว่าชนิดอื่น ๆ		มี pressure drop มากกว่า WCOT	มี pressure drop มาก จะใช้ column ยาวไม่ได้
ประโยชน์	ใช้วิเคราะห์สารที่ต้องการประสิทธิภาพในการแยกสูง ๆ	เหมือน wcot	ใช้ในการวิเคราะห์ที่ต้องการประสิทธิภาพการแยกมาก ๆ โดยใช้เวลาสั้น	ทำการวิเคราะห์ได้เร็ว เพราะใช้คอลัมน์สั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4.4 <u>การวิเคราะห์เชิงคุณภาพและปริมาณด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี (Qualitive and Quantitative Analysis by GC)</u>

แก๊สโครมาโทกราฟี จัดว่าเป็นเทคนิคที่ใช้สำหรับการแยกสารตัวอย่างซึ่งเป็นของผสมได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงเทคนิคหนึ่ง แต่มีข้อจำกัดอยู่ที่สารตัวอย่างนั้น ๆ จะต้องสามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแก๊สเฟสได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้เพื่อการตรวจสอบ พิสูจน์สารหรือหาปริมาณของสารได้ มี 3 ประการด้วยกัน คือ

1.เวลาที่สารแต่ละชนิดใช้ผ่านคอลัมน์จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสูงสุดของพีกซึ่งเรียกว่า retention time (t_R) ที่ได้จากโครมาโทแกรม สามารถนำไปใช้ในการทำคุณภาพวิเคราะห์ได้

2. ขนาดของพีกซึ่งอาจเป็นพื้นที่หรือความสูง สามารถนำไปใช้ในการทำปริมาณวิเคราะห์ได้

3. ลักษณะของพีกที่ได้จากโครมาโทแกรม ใช้เป็นข้อมูลสำหรับการวิเคราะห์ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณได้

4.4.1 <u>การวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย GC (Qualitative Analysis)</u>

วิธีการต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์เชิงคุณภาพด้วย GC นั้นมีดังต่อไปนี้

1. ใช้ Retention Data เป็นที่ทราบกันแล้วว่า retention volumn หรือ retention time นั้นเป็นลักษณะเฉพาะของสารแต่ละชนิด และลิควิดเฟสหรือชนิดของคอลัมน์ที่ใช้ โดยขึ้นอยู่กับอัตราการไหลของแก๊สพา (carrier gas) และอุณหภูมิที่ใช้กับคอลัมน์ ดังนั้นเมื่อให้สภาวะทั้งหลายคงที่ ค่า retention time ของสารต่างๆ ที่ใช้วิเคราะห์ควรจะต้องคงที่ หรือมีค่าใกล้เคียงกันที่สุด

2. ใช้วิธีอ่านจากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง retention time กับจำนวนอะตอมของคาร์บอนของสารที่อยู่ในพวกเดียวกัน (homologous series) ในการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยวิธีนี้ ก่อนอื่นจะต้องทราบชนิดของสารตัวอย่างเสียก่อน จะด้วยวิธีใดก็ได้ เพื่อที่จะได้เตรียมสารมาตรฐานได้อย่างถูกต้อง แล้วจึงทำการวิเคราะห์หา retention time

3. ใช้ดรรชนี Kovats (Kovats Index) Wehrli และ Kovats เป็นผู้นำหลักการของ retention index มาใช้เพื่อช่วยในการพิสูจน์โครงสร้างโมเลกุลของสารอินทรีย์ โดยใช้ n-alkanes เป็นสารมาตรฐาน การพิสูจน์ สามารถช่วยได้ด้วยการใช้ retention index(I)

$$I = 100\,N + 100\,\frac{\log V'_R(A) - \log V'_R(N)}{\log V'_R(n) - \log V'_R(N)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

25413

เมื่อ N และ n เป็น n-paraffin ที่เล็กกว่าและใหญ่กว่าตัวสาร A และ V'_R เป็น retention volumn ที่ปรับแล้ว retention index ของ n-alkanes ต่างๆ ให้มีค่าเป็น 100 เท่าของจำนวนอะตอมคาร์บอนในโมเลกุลของสารนั้นสำหรับทุกๆ อุณหภูมิและทุกๆ ลิควิดเฟส

4. การใช้คอลัมน์หลายชนิด (Multiple Columns) การวิเคราะห์สารตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานนั้น เมื่อใช้คอลัมน์ 2 ชนิดหรือมากกว่า จะช่วยให้การตรวจพิสูจน์สารตัวอย่างมีความถูกต้องและมั่นใจยิ่งขึ้น การใช้คอลัมน์ 2 ชนิดนั้น จะต้องเป็นคอลัมน์ที่ใช้ลิควิดเฟสที่มีสมบัติต่างกัน จึงต้องเลือกใช้ให้ถูกต้องและเหมาะสม เพราะประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับ polarities ของลิควิดเฟสและของสารตัวอย่างและอื่นๆ

5. การใช้เทคนิคอื่นช่วยในการตรวจพิสูจน์สาร ดังได้กล่าวมาแล้วว่า ถ้าต้องการตรวจพิสูจน์สารตัวอย่างว่าเป็นสารอะไรจริงๆ นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเข้าช่วย แต่มีวิธีง่ายๆ ที่สามารถใช้ตรวจหาฟังก์ชันนัลกรุ๊ปของสารตัวอย่างได้ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเรื่องของ microanalysis ที่ให้ผลการวิเคราะห์ที่ค่อนข้างเฉพาะ

4.4.2 .<u>การวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วย GC (Quantitative Analysis)</u>

ปัจจุบันนี้ การวิเคราะห์หาปริมาณของสารบางประเภทที่เป็นแก๊สของเหลวหรือของแข็งเทคนิคทาง GC ได้รับความนิยมสูงมาก เครื่องมือทันสมัยให้ความสะดวกในการวิเคราะห์ ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความแม่นยำและเที่ยงตรงสูง นอกจากนี้ เทคนิคทาง GC ยังให้สภาพไวสูงอีกด้วย และยังมีข้อดีอื่นๆ อีกหลายประการ อย่างไรก็ตาม ความผิดพลาดของการวิเคราะห์ย่อมเกิดขึ้นได้เสมอ ต่อไปนี้เป็นข้อผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้นจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทาง GC ที่ควรต้องระวัง

1. ความผิดพลาดเกิดจากการเก็บตัวอย่าง

1)สารตัวอย่างที่นำไปวิเคราะห์มีปริมาณแน่นอนเพียงใด

2)สารตัวอย่างที่ใส่เข้าไปในเครื่องวิเคราะห์มีความแน่นอนเพียงใดว่าสารนั้นเข้าเครื่องทั้งหมดโดยไม่มีการสลายตัวก่อนระเหยออกไป

2. สารตัวอย่างอาจดูดซับ (adsorp) หรือสลายตัวที่ injection port หรือในคอลัมน์หรือที่ดีเทคเตอร์ ถ้ามีสิ่งเหล่านี้เกิดขึ้นการวิเคราะห์หาปริมาณอาจผิดพลาดได้

3. สภาพของเครื่อง GC ถ้าสภาพของเครื่องไม่ดี การควบคุม การวัดต่างๆ ย่อมเกิดความผิดพลาดได้

4. การฉีดสารตัวอย่างเข้าเครื่อง GC

5. การเลือกใช้คอลัมน์

6. resolution ของพีก

7. การคำนวณหาปริมาณของสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องบันทึก ก่อนที่จะนำไปใช้ในการหาปริมาณของสาร จำเป็นจะต้องหาพื้นที่ของพีกแต่ละพีกเสียก่อน สำหรับเครื่อง GC สมัยใหม่ที่มีเครื่องอินติเกรเตอร์หรือคอมพิวเตอร์ หรือเครื่อง data system อย่างอื่นใช้ร่วมอยู่ด้วย เครื่องมือเหล่านี้จะทำหน้าที่คำนวณพื้นที่เอง ตลอดจนพิมพ์ค่า retention time ให้ด้วย แต่ถ้าเครื่อง GC ของผู้วิเคราะห์ มีแต่เฉพาะเครื่องบันทึกกราฟ ผู้วิเคราะห์ควรจะต้องคำนวณหาพื้นที่ของพีกเองได้

4.5 <u>ขั้นตอนต่างๆ ของการวิเคราะห์สารตัวอย่างด้วยเทคนิคทาง GC สรุปได้ดังนี้</u>

1. ต้องตรวจสอบเสียก่อนว่าสารที่จะวิเคราะห์ว่าเป็นสารประเภทใด เช่น เป็นอัลกอฮอล์หรือไฮโดรคาร์บอน เอสเทอร์ คีโตน หรือกรดไขมัน เป็นต้น หรือสารตัวอย่างนั้นมีสภาพขั้ว (polarity) อย่างไร เช่น เป็นสารประเภทมีขั้ว (polar) หรือไม่มีขั้ว (non-polar) หรือมีขั้วปานกลาง เป็นต้น

2. สารตัวอย่างนั้นมีจุดเดือด (ของเหลว) หรือมีอุณหภูมิที่จะกลายเป็นไอได้อยู่ในช่วงเท่าใด ถ้าสารตัวอย่างเป็นแก๊สก็สะดวกขึ้น

3. เลือกคอลัมน์ที่จะใช้ให้เหมาะสมตามข้อ 1. และข้อ 2.

4. เลือกดีเทคเตอร์ให้เหมาะสมกับสารที่จะวิเคราะห์และวัดภาวะให้เหมาะสม

5. นำคอลัมน์ไปติดตั้งในเครื่อง GC ให้ถูกตำแหน่ง

6. เปิดเครื่อง GC แล้วตั้งพารามิเตอร์ต่างๆ ให้เหมาะสม เช่น อัตราการไหลของแก๊สพาอุณหภูมิของตู้อบหรือคอลัมน์ อุณหภูมิของดีเทคเตอร์, injection port และพารามิเตอร์ต่างๆ ที่จะใช้ในการประมวลผล เป็นต้น

7.เลือกเทคนิคที่ต้องใช้ทำการวิเคราะห์ คือจะใช้วิเคราะห์แบบ isothermal หรือใช้ temperature program หรือ multi-stage temperature program ซึ่งทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารตัวอย่างและที่สำคัญที่ต้องระวัง คือ จะต้องไม่ใช้อุณหภูมิของคอลัมน์สูงกว่าที่กำหนดไว้

8. เลือกโปรแกรมที่จะใช้ในการประมวลผล

9. เมื่อจัดเครื่อง GC และพารามิเตอร์ต่างๆ ตามที่ต้องการแล้ว จึงเริ่มทำการวิเคราะห์ได้ และเมื่อพารามิเตอร์บางค่าไม่เหมาะสม ก็สามารถที่จะเปลี่ยนแปลงได้ในภายหลัง

4.6 <u>ประโยชน์ของการใช้เครื่อง GC ในการวิเคราะห์</u>

1. วิเคราะห์แก๊ส เช่น แก๊สธรรมชาติ, สารเจือปนในแก๊สต่างๆ (impurity gases) เป็นต้น

2. วิเคราะห์สารพวกไฮโดรคาร์บอน เช่น พวกพาราฟีน, พวกอโรมาติกไฮโดรคาร์บอน เป็นต้น

3. วิเคราะห์พวก essential oil เช่น พวกน้ำมันต่างๆ

4. วิเคราะห์พวก biomedical เช่น bile acids, กรดไขมันพวก fatty acid esters sugars เป็นต้น

5. วิเคราะห์พวกสารประกอบไนโตรเจน เช่น พวกเอมีน, พวกไนไตรน์ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. วิเคราะห์พวก Okygenated compounds เช่น กรด แอกอฮอล์ ไกลคอล คีโทน เป็นต้น
7. วิเคราะห์พวกยาฆ่าแมลง ยาปราบศัตรูพืช เป็นต้น
8. วิเคราะห์พวกสารประกอบของซัลเฟอร์ต่าง ๆ
9. วิเคราะห์อากาศและสิ่งแวดล้อม และมลพิษอื่น ๆ
10. วิเคราะห์สารพิษต่าง ๆ ทั้งในน้ำและอื่น ๆ
11. วิเคราะห์สารบางชนิดในดิน เป็นต้น
12. วิเคราะห์สารต่าง ๆ ในอาหาร เป็นต้น

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การทดสอบกลิ่นและรสอาหาร (Sensory Test)

การประเมินผลอาหารโดยวิธีการชิมและการดมกลิ่น เป็นการใช้คนเป็นเครื่องตัดสินว่าอาหารที่ทดสอบนั้น มีลักษณะอย่างไร เป็นที่ยอมรับกันหรือไม่ การให้คนชิมเป็นวิธีการที่มีความสำคัญมากสำหรับทดสอบอาหาร เพราะว่าโดยวิธีนี้ คนเราจะทราบถึงลักษณะสำคัญทุกอย่างของอาหาร ไม่ว่าจะเป็นรส กลิ่น เนื้อสัมผัสหรือลักษณะอื่นที่มองเห็นได้ จำต้องอาศัยประสาทสัมผัสทั้ง 5 ของคนเรา อันได้แก่ หู ตา จมูก ลิ้น และการสัมผัส ความจริงคนเรามีการประเมินผลโดยการชิมทุกวัน โดยการแสดงความชอบหรือไม่ชอบต่ออาหารที่รับประทาน สำหรับอาหารที่ใช้ทดสอบ เริ่มแรกผู้ทดสอบจะใช้วิธีชิมเองเมื่อทำเสร็จ เพราะเป็นการง่ายและสะดวก ผลที่ได้จึงขึ้นอยู่กับการตัดสินของผู้ทำเองซึ่งอาจเกิดความลำเอียงได้ การประเมินผลโดยวิธีการชิมมีจุดประสงค์เพื่อทำการปรับปรุงรสชาติอย่างมีหลักเกณฑ์ เพื่อให้ผลที่ได้นั้นมีความเที่ยงตรงและเป็นที่น่าเชื่อถือยิ่งขึ้น

5.1 <u>ตัวอย่างอาหารที่จะให้ชิม</u>

เกี่ยวกับตัวอย่างอาหารที่จะให้ชิมนั้น ผู้ชิมจะได้ทราบเกี่ยวกับตัวอย่างของอาหารที่จะชิมเท่าที่จำเป็นเท่านั้น ถ้าหากผู้ชิมมีการทราบรายละเอียดของตัวอย่างมากอาจมีผลต่อการตัดสินใจได้ โดยบางอย่างจะทำให้ผู้ชิมเกิดการคาดผลไว้ก่อนแล้ว เช่น ได้มีการให้ผู้ชิมทราบว่า อาหารที่ใช้ทดสอบทำจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพสูง ความชอบที่ได้จากการทดสอบก็อาจจะสูงตามไปด้วย ในทางตรงกันข้าม เมื่อให้รายละเอียดว่าอาหารนั้นทำจากวัตถุดิบคุณภาพต่ำ ค่าความชอบที่ได้ก็อาจจะต่ำตามไปด้วย

5.1.1 การเลือกตัวอย่าง อาหารที่จะนำมาประเมินผลเปรียบเทียบจะต้องเป็นชนิดที่มีวิธีการเตรียมหรือทำเหมือนๆ กัน สภาพการณ์ทุกอย่างในการทำจะต้องได้รับการควบคุมอย่างระมัดระวังให้คล้ายคลึงกัน จะต่างกันได้เฉพาะสิ่งที่เป็นตัวแปรปรวนเท่านั้น ตัวอย่างชนิดใดที่สามารถผสมเข้ากันได้ก็ควรทำ เพื่อให้ตัวอย่างนั้นจะประกอบไปด้วยส่วนที่เหมือนกัน หรือเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด เช่น จะทดสอบคุณภาพของน้ำผลไม้กระป๋อง ก็ควรจะผสมหลายกระป๋องที่เป็นชนิดเดียวกันเข้าด้วยกัน ตัวอย่างบางชนิดไม่สามารถจะทำให้เหมือนกัน หรือเป็นเนื้อเดียวกันได้ เช่น เนื้อสัตว์ เมื่อทำการเสิร์ฟเนื้อส่วนใดแก่ผู้ชิม ก็ควรให้ส่วนนั้นตลอดการประเมินผลชุดนั้น อาหารอบมีผิวนอกเกรียม ลักษณะจะแตกต่างไปจากส่วนอื่น ดังนั้นจึงไม่นำมาเป็นตัวอย่างให้ชิม

5.1.2 การเตรียมตัวอย่าง ผู้เตรียมตัวอย่างควรจะเป็นคนละคนกับผู้ทำหน้าที่ชิม อาหารที่จะเสิร์ฟแก่ผู้ชิมทุกตัวอย่าง ควรให้อยู่ในลักษณะสภาพเดียวกัน ทั้งการเตรียม รูปร่าง ขนาด อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และลักษณะอื่น ๆ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ อุณหภูมิปกติที่เรากินอาหารนั้น ๆ นอกจากอาหารที่ปกติจะกินร้อนจัดหรือเย็นจัด ซึ่งควรให้ชิมในอุณหภูมิค่อนข้างมาทางปานกลาง ทั้งนี้เพราะประสาทรับรสจะลดความไวในอุณหภูมิร้อนหรือเย็นจัด ทำให้รสชาติที่ได้รับนั้นผิดไป อาหารทุกอย่าง จะต้องเสิร์ฟในภาชนะที่มีขนาด รูปร่าง สีที่เหมือนกัน ปกตินิยมภาชนะที่มีสีขาว เพราะทำให้เห็นอาหารได้เด่นชัด โดยภาชนะนั้นต้องไม่ทำจากวัตถุที่จะมีผลต่ออาหารได้ และจะต้องเป็นภาชนะที่ไม่มีกลิ่น รส มีความสะอาด น่าดู และควรใช้ขนาดเล็ก ถ้าเป็นการทดสอบเกี่ยวกับกลิ่นของอาหารโดยเฉพาะ เช่น โดยการหาความแตกต่าง จำเป็นต้องปิดภาชนะให้สนิท จะต้องปิดในเวลาเดียวกัน เพื่อว่าจะไม่มีตัวอย่างใดเก็บกลิ่นได้มากกว่าตัวอย่างอื่น.

ปริมาณอาหารที่จะเสิร์ฟจะต้องมีเพียงพอที่จะให้ผู้ชิมได้ 2-3 คำ หรือดื่มได้ 2-3 จิบ โดยทำการแสดงตัวอย่างอาหารด้วยรหัสแทนการใช้ชื่อ โดยการใช้ตัวเลข 3 ตำแหน่งจากตัวเลขสุ่ม ถ้าจะต้องให้ชิมตัวอย่างชุดเดียวกันหลาย ๆ ครั้ง ควรจะมีการเปลี่ยนรหัส และลำดับของการเสิร์ฟตัวอย่างทุกครั้ง

5.1.3 จำนวนตัวอย่าง ในการประเมินผลครั้งหนึ่ง ๆ จะต้องจำกัดจำนวนตัวอย่าง แต่จะให้ประเมินประมาณกี่ตัวอย่างนั้น จะไม่มีเกณฑ์ที่ตายตัว ทั้งนี้จะขึ้นอยู่กับ

1. ลักษณะของอาหารนั้น ๆ อาหารที่มีรสจืด ให้ชิมได้มากกว่าอาหารที่มีรสจัด สำหรับไอศกรีมให้มีการชิมได้ไม่เกิน 6 ตัวอย่าง .

2. วิธีการให้คะแนน ถ้าเป็นการให้คะแนนสี หรือเนื้อสัมผัสของอาหารจะให้ประเมินได้มากกว่าการให้คะแนนรสชาติ และถ้าบัตรลงคะแนนเป็นแบบธรรมดา เข้าใจง่าย ก็ให้ชิมและประเมินผลได้หลายตัวอย่างกว่าวิธีที่ยุ่งยาก.

3. ประสบการณ์ของผู้ชิม ถ้าเป็นผู้ชิมอาชีพสำหรับ ชา ไวน์ กาแฟ สามารถจะประเมินผลได้นับร้อยตัวอย่างใน 1 วัน ในเรื่องจำนวนตัวอย่างที่จะให้ชิมนี้ ควรระวังอย่าให้ชิมมากตัวอย่างจนผู้ชิมเกิดความล้าซึ่งจะทำให้ไม่ได้ผล และในการทดลองชุดหนึ่ง ๆ ก็ควรจะให้มีการชิมให้คะแนนสามหรือสี่ซ้ำ

5.1.4 ลำดับการเสิร์ฟตัวอย่าง ลำดับการเสิร์ฟจะมีผลต่อการตัดสินใจของผู้ชิม โดยตัวอย่างใดที่มีการเสิร์ฟทีหลังจะได้คะแนนต่ำกว่า ถ้าเสิร์ฟตัวอย่างดีก่อนจะทำให้ผู้ชิมให้คะแนนตัวอย่างที่ด้อยกว่าต่ำลงไปอีก และถ้าเสิร์ฟต่อเนื่องกันตามลำดับจะตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นนั้นคล้ายคลึงกัน ดังนั้น เพื่อให้ได้ผลดี จึงได้มีการแนะนำให้ใช้วิธีสุ่มลำดับการเสิร์ฟ โดยเฉพาะในการใช้วิธีหาความต่าง วิธีชิมบางอย่างจำเป็นต้องลำดับการเสิร์ฟตามลำดับที่แน่นอน เช่น ในการทดลองหาความเข้มข้นต่ำสุดที่จะรู้รสได้ จะต้องเสิร์ฟตัวอย่างที่เจือจางที่สุดก่อน และลำดับมาตามความเข้มข้นท้ายสุดจะเป็นตัวอย่างที่เข้มข้นที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 <u>ผู้ชิมตัวอย่างอาหาร</u>

สำหรับการทดสอบอาหารในอาหารชนิดพิเศษนี้ ผู้ชิมจะเป็นกลุ่มนักศึกษากลุ่มอื่น และผู้ชิมจะเป็นเพื่อนนักศึกษาด้วยกันเอง. อย่างไรก็ตามไม่ควรให้ผู้ที่มีอคติไม่ชอบอาหารนั้น ๆ มาเป็นผู้ทดสอบ เพราะอาจเกิดอคติ และไม่เชิญผู้ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารนั้น ๆ หรือเตรียมอาหารนั้น ๆ มาเป็นผู้ทดสอบชิม เพราะอาจเกิดความลำเอียงได้

5.2.1 การเลือกผู้ชิม ผู้ที่ทำหน้าที่ชิม ควรจะมีลักษณะดังนี้

1. มีความสนใจและเต็มใจที่จะให้ความร่วมมือ

2. สามารถที่จะปลีกเวลามาทำการชิมได้ทุกครั้งที่มีการประเมินผล

3. มีความสามารถที่จะรู้ได้ถึงเหตุแห่งความรู้สึกในรสชาตินั้น ๆ (บางคนไม่สามารถบอกกลิ่นหรือรสได้)

4. มีความสามารถที่จะตัดสินได้คงที่และเชื่อถือได้ ลักษณะนี้ต้องอาศัยความจำที่ดี และประสบการณ์ช่วย

ผู้ชิมจะเป็นชายหรือหญิงก็ได้ แต่จะต้องมีสุขภาพดี คนที่เป็นหวัดจะไม่สามารถที่จะให้คะแนนการชิมที่ถูกต้องได้ ผู้ชิมจะต้องไม่มีการทานอาหารหรือสูบบุหรี่อย่างน้อย 30 นาทีก่อนการทดสอบชิม

5.3 <u>แบบทดสอบของการทดสอบชิม</u>

การทดสอบด้วยการชิมเพื่อประเมินผลอาหารมีมากมายหลายแบบ แต่ละแบบก็เหมาะที่จะใช้สำหรับปัญหาเฉพาะแต่ละอย่าง ดังนั้นการจะเลือกวิธีใดจึงมีความสำคัญ จะต้องทำความเข้าใจถึงลักษณะของวิธีการทดสอบด้วยการชิมแต่ละแบบที่มีให้เลือกใช้ นอกจากนี้ยังต้องระมัดระวังในการวางแผนทางสถิติและในการวิเคราะห์ข้อมูลอีกด้วย

การทดสอบอาจแบ่งเป็น 2 แบบ ใหญ่ ๆ คือ

1. การทดสอบหาความแตกต่าง

2. การทดสอบหาความชอบ

ในการทดสอบหาความแตกต่างนั้น ผู้ชิมจะได้รับตัวอย่าง 2 ตัวอย่าง หรือ มากกว่า และจะถูกถามว่าในระหว่างตัวอย่างเหล่านี้มีความแตกต่างกันหรือไม่ โดยไม่คำนึงถึงว่าผู้ชิมจะชอบตัวอย่างนั้นหรือไม่ก็ตาม โดยจะเพ่งเล็งไปถึงการประเมินผลเท่านั้น โดยจะไม่กล่าวถึงความคิดความรู้สึกของตน ผู้ชิมอาจไม่ชอบอาหารนั้น แต่จะต้องได้รับการสอนให้ทราบถึงองค์ประกอบอันทำให้คุณภาพดีหรือเลว แล้วนำไปทำการประเมินผลตามคำสั่งที่ได้รับ ดังนั้นผู้ชิมจึงเปรียบเสมือนเครื่องมือในการวัดคุณภาพอย่างหนึ่ง สำหรับทดสอบหาความชอบ หรือการยอมรับ โดยจะเป็นเครื่องตัดสินความชอบของประชากร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การทดลอง

1. การทำนัตโต

1.1 <u>อุปกรณ์และวัตถุดิบ</u>

1.1.1 หม้อต้มถั่วเหลือง

1.1.2 ผ้าขาวบาง

1.1.3 โกร่งบด

1.1.4 อุปกรณ์สำหรับทำเป็นแผ่น (แผ่นพลาสติก, แป้นกลม)

1.1.5 ตู้บ่ม (Incubator)

1.1.6 เครื่องโม่

1.1.7 ฟางข้าว

1.1.8 ถั่วเหลือง (พันธุ์ปกติที่ 100 เมล็ด หนัก 17.8 กรัม)

1.1.9 เชื้อ *Bacillus subtilis*

1.2 <u>ขั้นตอนการทำนัตโต</u>

1.2.1 นำถั่วเหลืองล้างน้ำให้สะอาด แช่ทิ้งไว้ 1 คืน

1.2.2 นำมาใส่หม้อต้มน้ำเป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเปื่อยยุ่ย

1.2.3 ทำการถ่ายเชื้อ *B. Subtilis* ลงไปในถั่วเหลืองที่ผ่านการต้มแล้ว (รินน้ำออกให้หมด)

1.2.4 ห่อด้วยผ้าขาวบางและห่ออีกชั้นด้วยฟางข้าว

1.2.5 นำไปบ่มในตู้บ่ม (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

1.2.6 นำมาบดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นอัดให้เป็นแผ่น

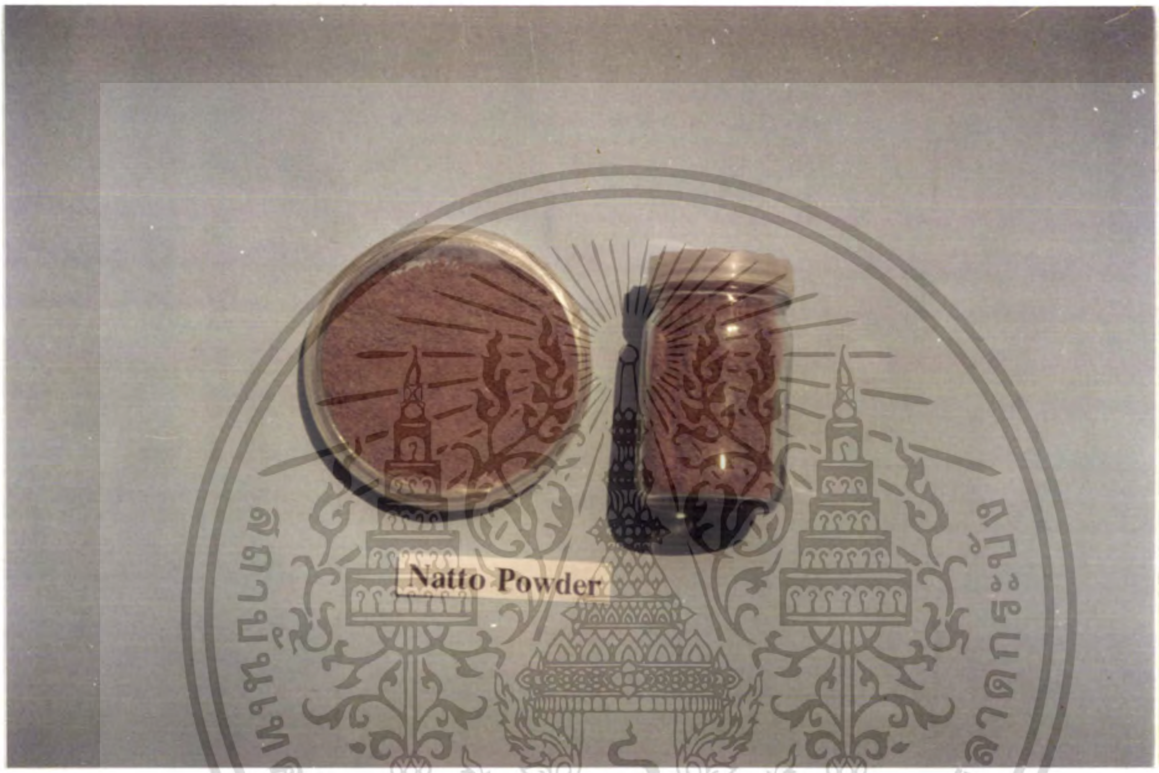
1.2.7 ให้แห้งที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง (หรือจนกระทั่งแห้งสนิท)

1.2.8 นำมาทำให้อยู่ในรูปผงเพื่อสะดวกต่อการเก็บรักษาและใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 1 แสดงนัตโตแผ่นที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงนัตโตผงที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การวิเคราะห์โปรตีนโดย Kjeldahl method

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 ชุดกลั่น

2.1.2 ตะเกียงบุนเซน

2.1.3 kjeldahl flask

2.1.4 kjeldahl bulb

2.1.5 ฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร

2.1.6 หลอดหยด

2.1.7 ลูกแก้วกันกระเด็น

2.1.8 เครื่องชั่ง

2.2 สารเคมี

2.2.1 K_2SO_4

2.2.2 $CuSO_4 . 5 H_2O$

2.2.3 selenium dioxide (catalyst)

2.2.4 H_2BO_3 (4%)

2.2.5 0.1 N H_2SO_4

2.2.6 screened methyl red (indicator)

2.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์

2.1 นำตัวอย่างแห้งที่มีน้ำหนัก 1 กรัมมาใส่ใน Kjeldahl flask

2.2 เติม K_2SO_4 7.68 กรัม, $CuSO_4. 5 H_2O$ 0.28 กรัม และ selenium dioxide 0.04 กรัม ลงไปใน Kjeldahl flask เพื่อเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst)

2.3 ค่อย ๆ เติม H_2SO_4 เข้มข้น 12 มล. ลงไปใน Kjeldahl flask ใส่ลูกแก้วกันกระเด็น 2-3 เม็ด .

2.4 นำไปย่อย (digest) บนตะเกียงบุนเซน ตอนแรกใช้ไฟอ่อน ๆ จนกระทั่งไม่มีฟอง เกิดขึ้นจึงใช้ไฟแรง ในระหว่างการย่อย ให้เขย่าฟลาสก์เป็นครั้งคราว

2.5 ย่อยต่อไปจนสารละลายใสเป็นสีฟ้าหรือเขียว แล้วจึงย่อยต่ออีก 10 นาที ปิดไฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ปล่อยให้สารละลายเย็น เติมน้ำกลั่นที่ไม่มีแอมโมเนียลงไป 25-80 มล. (เวลาเติมน้ำกลั่นให้ล้างที่รอบๆ ปากฟลาสก์เพื่อให้สารที่เกาะอยู่ละลายลงไปรวมกัน) ต่อฟลาสก์เข้ากับ Kjeldahl bulb เขย่าฟลาสก์จนสารละลายต่างๆ ละลายหมด

2.7 ต่อฟลาสก์เข้ากับเครื่องกลั่น

2.8 นำ H_2SO_3 (4%) 50 มล. ใส่ฟลาสก์มารองสารละลายที่ได้จากการกลั่นตัว(distillate) ระวังต้องให้ปลายท่อกลั่นอยู่ใต้ H_2BO_2 ตลอดเวลา เมื่อเตรียมทุกอย่างเรียบร้อยแล้วค่อย ๆ เติม NaOH (50%) ลงไป 50 มล. ปิดปากฟลาสก์ด้วย kjeldahl bulb แล้วเขย่าฟลาสก์จะได้สารละลายสีดำ

2.9 กลั่นจนได้ distillate 150-200 มล. เมื่อครบให้เลื่อนฟลาสก์ออก ให้ปลายท่อกลั่นแตะที่ปากฟลาสก์ 5 นาที

2.10 ทิ้งฟลาสก์ไว้ให้เย็นแล้วจึงนำไปไทเทรตกับ 0.1 N H_2SO_4

2.11 หยดอินดิเคเตอร์ (indicator) ลงไป 1-2 หยด อินดิเคเตอร์ที่ใช้คือ screened methyl red ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 0.16% methyl red และ 0.083% bromcresol green ในแอลกอฮอล์

2.12 ปริมาณกรดมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรต นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์โปรตีน

2.13 ทำ blank ควบคู่กันไปด้วย โดยใช้ทุกอย่างเหมือนกัน ยกเว้นไม่ใส่ตัวอย่าง

คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์โปรตีนจาก

$$\%\ \text{โปรตีน} = \frac{(\text{จำนวนมล.กรด } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ไป - blank}) * NH_2SO_4 * 14 * 6.25 * 100}{100 * \text{นน. ตัวอย่าง}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์

3.1 <u>การเตรียมสารตัวอย่าง โดยวิธี KBr-pellet technique</u>

3.1.1 <u>อุปกรณ์และสารเคมี</u>

1. KBr
2. สารตัวอย่าง ได้แก่ HPP รสต่างๆ และนัตโต
3. โกร่งอะเกต
4. เครื่องอัด (die)
5. ดิสก์โฮลเดอร์ (disc holder)
6. ตู้บ่ม (Incubator)
7. เดซิกเคเตอร์

3.2 <u>ขั้นตอนการเตรียมสารตัวอย่าง</u>

3.2.1 นำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.2.2 นำตัวอย่างที่อบแห้งแล้วมาเก็บไว้ในเดซิกเคเตอร์

3.2.3 ใช้สารตัวอย่างประมาณ 2.0 มก. ผสมกับ KBr 100-200 มก.

3.2.4 บดให้ละเอียดเป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยโกร่งอะเกต

3.2.5 เมื่อบดดีแล้วนำไปใส่ในเครื่องอัด หลังจากเปิดปั๊มดูดอากาศออกประมาณ 1 นาที จึงเริ่มอัดด้วยเครื่องอัด ประมาณ 3-4 นาที

3.2.6 ลดความดันและปลดปั๊มออกจากเครื่องอัด

3.2.7 นำตัวอย่างที่เป็น pellet ใสบางออกมาอย่างระมัดระวัง

3.2.8 นำไปใส่ในดิสก์โฮลเดอร์ เพื่อนำไปวิเคราะห์โดยเครื่องอินฟราเรดสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยแก๊สโครมาโทกราฟี

4.1 <u>องค์ประกอบในการวิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโทกราฟี</u>

4.1.1 ถังแก๊สที่ใช้บรรจุตัวพา (carrier gas)

4.1.2 ส่วนที่ใช้ควบคุมการไหลของแก๊สต่างๆ (flow controller)

4.1.3 ส่วนที่จะฉีดสารตัวอย่างเข้าไป (injection port)

4.1.4 คอลัมน์ (column)

4.1.5 ดีเทคเตอร์ (detector)

4.1.6 ส่วนที่ใช้ควบคุมอุณหภูมิ (temperature controller)

4.1.7 ส่วนที่ใช้ประมวลผลและข้อมูลต่างๆ

4.2 <u>จัดสภาวะต่างๆ ของเครื่องดังนี้</u>

4.2.1 ใช้ Shimadzu Model GC-gas Chromatogrph equiped with FID

4.2.2 ใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สพา ด้วยอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที เวลาเริ่มต้น 2 นาที

4.2.3 ส่วนที่จะใช้ฉีดสารเข้าไปใช้อุณหภูมิ 250 องศาเซลเซียส

4.2.4 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ใช้ คือ 35 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิสูงสุด คือ 200 องศาเซลเซียส

4.2.5 คอลัมน์ที่ใช้ขนาด 3 มิลลิเมตร * 30 เมตร

4.2.2 ดีเทคเตอร์ที่ใช้คือ Shimadzu Chromatopeek C-RIB integrater

4.3 <u>ขั้นตอนการวิเคราะห์</u>

4.3.1 ทำสารตัวอย่างให้อยู่ในรูปสารละลาย โดยใช้ไดคลอโรมีเทน (dichloromethane) เป็นตัวทำละลาย ด้วยอัตราส่วนสารตัวอย่าง 1 ส่วนต่อตัวทำละลาย 10 ส่วน

4.3.2 ทำการกรองเอาเฉพาะส่วนที่ใสไปตรวจสอบ เพื่อป้องกันการอุดตันของคอลัมน์

4.3.3 ใช้เข็มฉีดดูดสารละลายที่เตรียมไว้ ฉีดเข้าไปที่ส่วนที่จะใช้ฉีดสาร

สารละลายที่ถูกฉีดเข้าไปจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปแก๊สเฟส และถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ด้วยแก๊สพาอย่างช้าๆ ซึ่งสารละลายที่เป็นของผสมจะถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ที่คอลัมน์นี้ แล้วออกไปสู่ดีเทคเตอร์จะทำให้สัญญาณเกิดขึ้น ซึ่งสามารถเขียนออกมาเป็นโครมาโทแกรม ด้วยเครื่องบันทึกผล ก็จะทำให้ทราบองค์ประกอบของสารตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.วิธีการทดสอบผลของกลิ่นและรสชาติ (Sensory Test)

ในโครงงานพิเศษนี้จะใช้การทดสอบ 2 ชนิด คือ การทดสอบการยอมรับกลิ่นและรสของนัตโต และการทดสอบความแตกต่างของนัตโตและ HPP รสเนื้อที่มีผลต่อผู้บริโภค โดยใช้แบบสอบถามตามหลักทางสถิติและทฤษฎีอาหาร โดย ผู้ทดสอบจะต้องมีสุขภาพดี เช่น ไม่เป็นหวัด เพราะถ้าเป็นหวัดจะมีผลต่อการรับกลิ่นของนัตโตและ HPP ด้วย โดยใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 20 คน เป็นชาย 10 คน และหญิง 10 คน ช่วงอายุ 19-24 ปี ที่มีความหลากหลายของพื้นฐานและภูมิประเทศ โดยมาจากทุกภาคของประเทศ เพราะภาคเหนือจะมีการบริโภคถั่วเน่า ซึ่งเป็นอาหารที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับนัตโต ดังนั้นผู้ทดสอบจากภาคเหนืออาจจะคุ้นเคยและยอมรับมากกว่าภาคอื่นๆ

5.1 <u>วัสดุและอุปกรณ์ในการทดลอง</u>

1. **ชามพลาสติกขนาด 250 มล.**
2. **กาต้มน้ำร้อน**
3. **ช้อนโต๊ะ**
4. **เครื่องชั่ง**
5. **กระบอกตวงขนาด 500 มล.**
6. **เกลือ**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 แสดง HPP (Hydrolyzed Plant Protein) รสต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 <u>วิธีการทดลอง</u>

5.2.1 การทดสอบการยอมรับกลิ่นและรสของนัตโต

แบบสอบถามการยอมรับกลิ่นและรสของนัตโต

วันที่ _____________ เพศ __________ อายุ _________
การทดสอบโดยการชิมและการดม
ระดับของรสชาติและกลิ่นของอาหาร
ก. ดีมาก
ข. ดี
ค. ธรรมดา
ง. แย่
จ. แย่มาก
การทดสอบโดยการชิม
ตัวอย่างที่ 766________ ตัวอย่างที่ 841________
การทดสอบโดยการดมกลิ่น
ตัวอย่างที่ 766________ ตัวอย่างที่ 841________

จากแบบทดสอบจะให้ผู้ทดสอบคนละหนึ่งชุดตอบแบบสอบถามตามความรู้สึกที่ได้รับมากที่สุด โดยการทดสอบจะจัดตัวอย่างทั้งสองห่างกันจนไม่เกิดการรบกวนจากกลิ่นข้างเคียง ให้ผู้ทดสอบเข้าและออกคนละทางกัน โดยจะไม่มีโอกาสปรึกษากัน เพื่อผลการทดสอบที่แน่นอนจนครบทั้ง 20คน นำผลที่ได้มารวบรวมและประเมินผลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 <u>การทดสอบความแตกต่างของนัตโตและ HPP รสเนื้อทั่วไป</u>

แบบสอบถามความแตกต่างของนัตโตและ HPP รสเนื้อทั่วไป

วันที่ ______________ เพศ ___________ อายุ _________

ระดับความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสอง

ก.	766	ดีกว่า	841	มากที่สุด
ข.	766	ดีกว่า	841	มาก
ค.	766	ดีกว่า	841	เล็กน้อย
ง.	ไม่มีความแตกต่าง			
จ.	841	ดีกว่า	766	เล็กน้อย
ก.	841	ดีกว่า	766	มาก
ก.	841	ดีกว่า	766	มากที่สุด

จากแบบสอบถามทั้งสอง ตัวเลขทั้งสามตัวจะเป็นตัวเลขที่ได้มาจากการสุ่ม ในการทดสอบ 5.2 ตัวเลขสามตัวเป็นตัวแทนของนัตโตทั้งสองตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่หนึ่งจะเป็นนัตโต 1 กรัมต่อน้ำร้อน 100 มล. และตัวอย่างที่สองเป็น นัตโต 10 กรัม ต่อน้ำ 100 มล. ละลายให้เข้ากันก่อนนำไปทดสอบ ส่วนการทดสอบที่ 5.3 ตัวเลข 766 จะเป็นสัญลักษณ์แทน นัตโต 1 กรัมต่อน้ำร้อน 100 มล. และตัวเลข 841 เป็นสัญลักษณ์แทน HPP รสเนื้อ 1 กรัมต่อน้ำร้อน 100 มล. เช่นเดียวกัน นำผลที่ได้ไปประเมินผลและสรุปต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl Method

จากวิธีการทดลองข้างต้นที่กล่าวมาแล้วนั้น พบว่าปริมาณโปรตีนที่ได้แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณโปรตีนในถั่วเหลืองแบบต่างๆ

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีน* (% น้ำหนักแห้ง)
1.ถั่วเหลือง	35.0
2.ถั่วเหลืองหมัก 3 วัน ด้วย *B. subtilis* (paste)	21.9
3.นัตโตแผ่น (chip)	38.9

*หมายเหตุ

การหาปริมาณโปรตีน (% น้ำหนักแห้ง) คำนวณตามสูตร

$$\% \text{ Protein} = \frac{(\text{จำนวนมิลลิลิตรกรด } H_2SO_4 \text{ ที่ใช้ไป - blank}) * N.H_2SO_4 * 14 * 6.25 * 100}{100 * \text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

จากการทดลองพบว่าปริมาณโปรตีนที่พบสูงขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการหมักและอบแห้งด้วย Hot Air Oven ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยพบว่าถั่วเหลืองหมัก 3 วันมีปริมาณโปรตีนลดลงจากถั่วเหลืองปกติ เนื่องมาจากมีความชื้นหรือน้ำเป็นองค์ประกอบสูงกว่านัตโตแผ่นที่ผ่านการอบแห้งแล้ว

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน เพราะว่าเมื่อโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยกรดเข้มข้นจะเกิดกรดอะมิโน โดยเฉพาะกรดกลูตามิคและนิวคลีโอไทด์จะเป็นองค์ประกอบที่มีผลต่อรสชาติของอาหาร (วิวัฒน์, 2537) จากองค์ประกอบทางเคมีของนัตโต (ภาคผนวกข) พบว่าปริมาณโปรตีนจากตารางที่เป็น paste และ chip มีปริมาณ 16.0 และ 36.8 % น.น.แห้งตามลำดับ (Ko และ Hesseltine, 1979) แต่จากการทดลองโดยใช้วิธี Kjeldahl Method เช่นเดียวกันพบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงขึ้นเป็น 21.9 และ 38.9 % น.น.แห้ง ตามลำดับ ปริมาณโปรตีนที่พบในนัตโต (chip) จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงถึง 38.9 % น.น.แห้ง ซึ่งสูงกว่าเนื้อสัตว์ถึง 2 เท่า มีปริมาณสูงกว่าไข่ไก่ 4 เท่า สูงกว่านมถึง 10-12 เท่า (Shurtless และ Auyagi, 1985) และในนัตโตยังพบแร่ธาตุโดยเฉพาะ K (Potassium), P (Phosphorus) และ Ca (Calcium) โดยพบ 660 mg./100 g., 190 mg./100 g. และ 90 mg./100 g. ตามลำดับ (ภาคผนวก ก.)

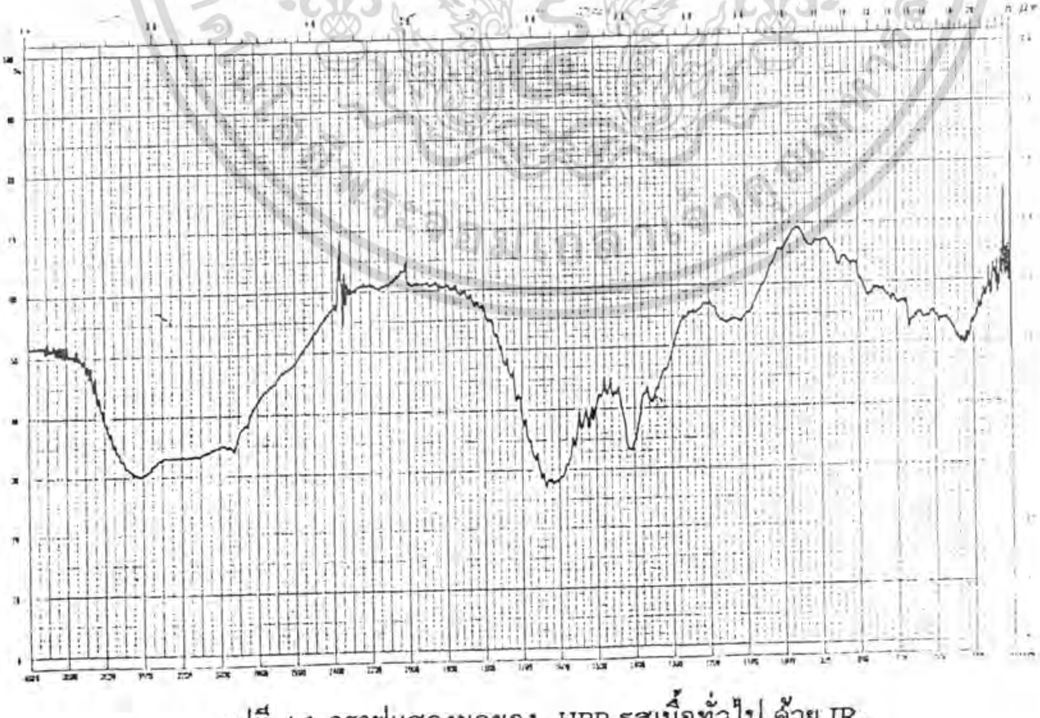
2.การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

2.1 การวิเคราะห์หมู่ Functional ทางเคมีด้วย Infrared Spectroscopy. (IR)

จากการทดลองใช้ตัวอย่าง 6 ชนิด คือ

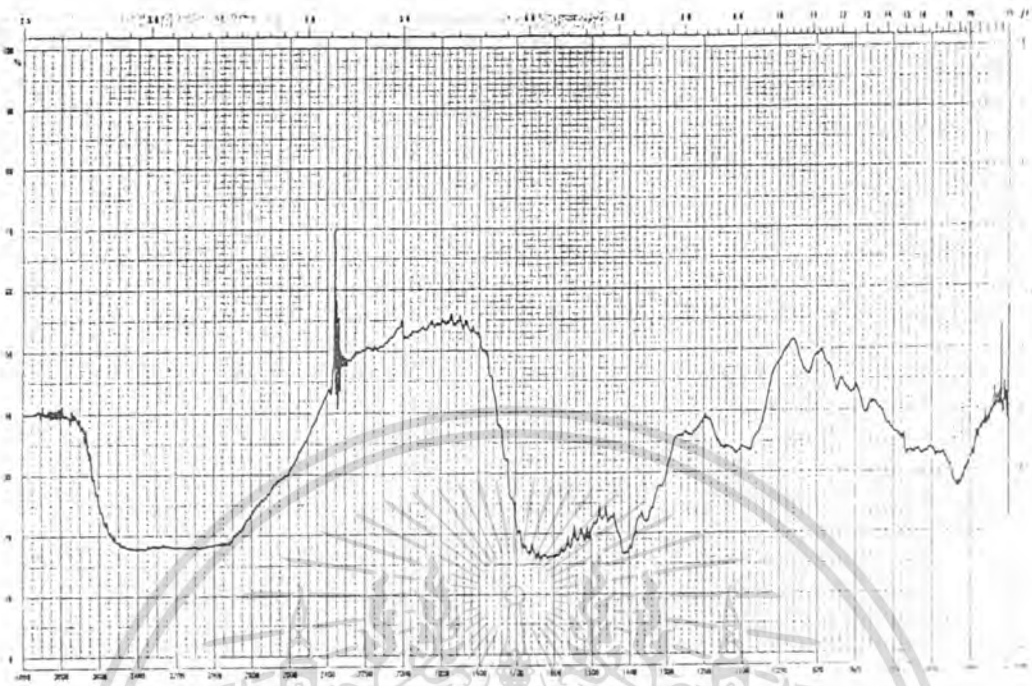
1. HPP รสเนื้อทั่วไป (General meaty)
2. HPP รสไก่อบ (Roasted Chicken)
3. HPP รสหมูอบ (Roasted Pork)
4. HPP รสเนื้ออบ (Roasted Beef)
5. ซีอิ๊วผง (Soy Sauce powder)
6. นัตโตผง (Natto Powder)

ผลการทดลองแสดงด้วยกราฟดังนี้

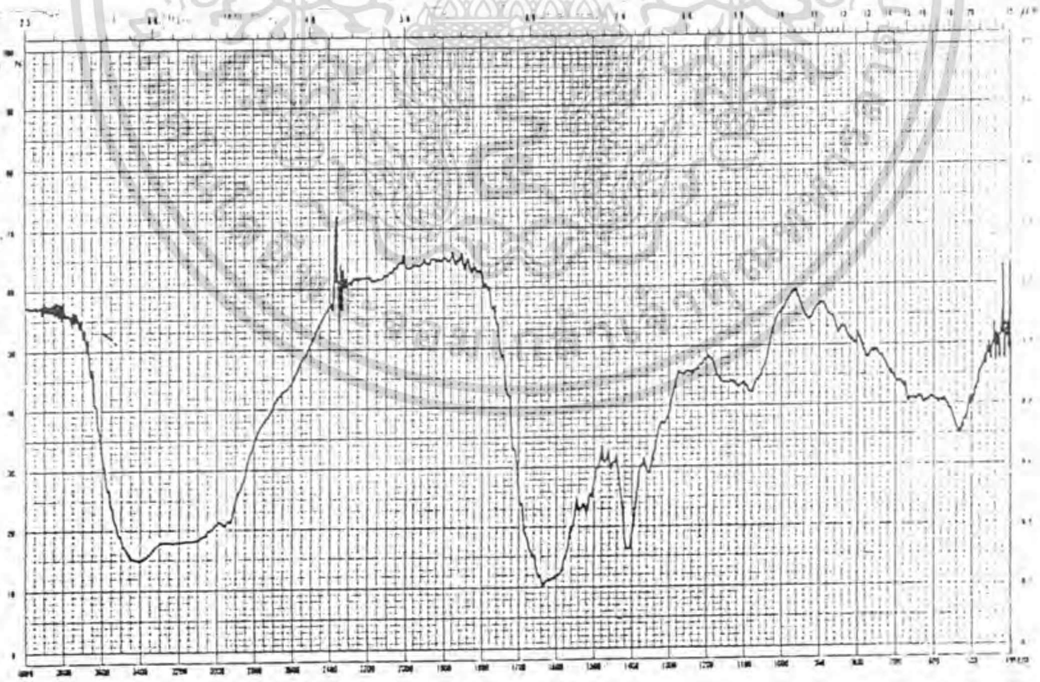


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงผลของ HPP รสเนื้อทั่วไป ด้วย IR.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

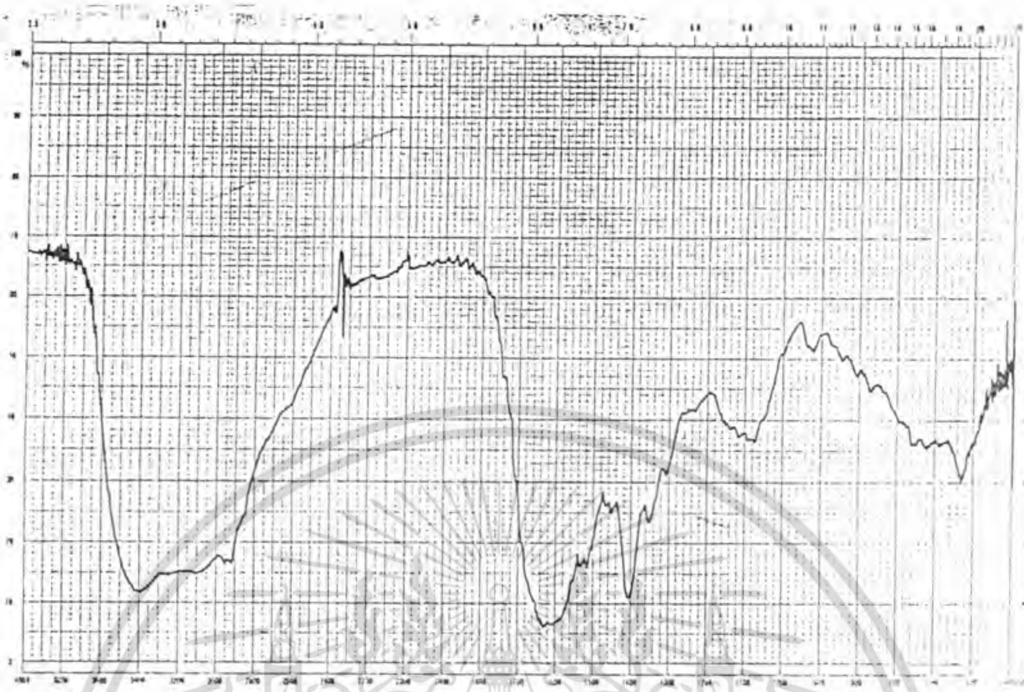


รูปที่ 4.2 กราฟแสดงผลของ HPP รสไก่อบ ด้วย IR.

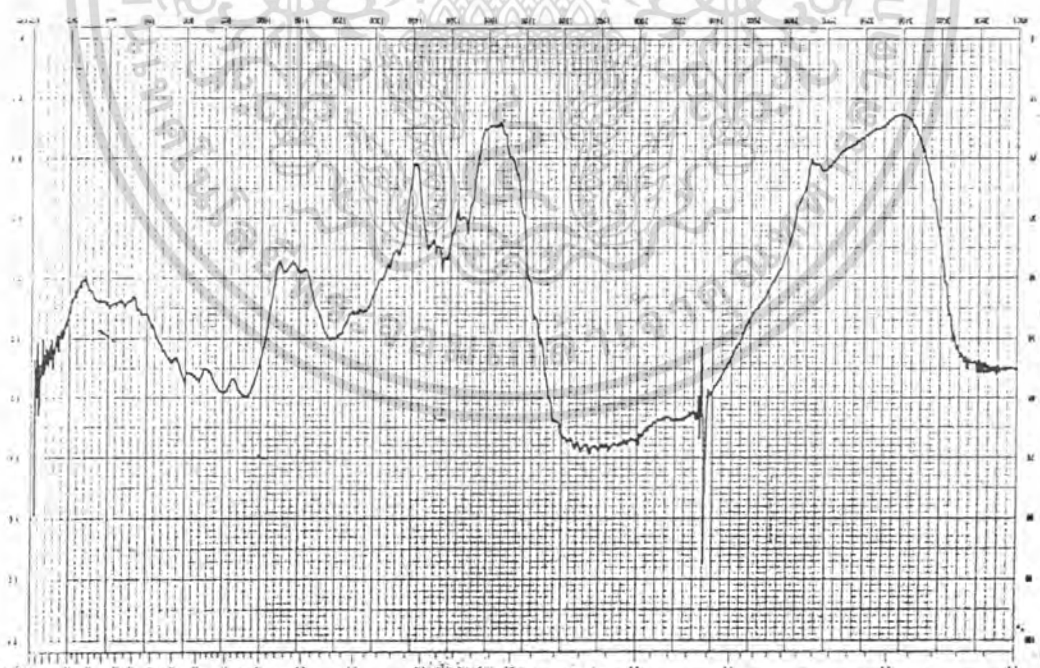


รูปที่ 4.3 กราฟแสดงผลของ HPP รสหมูอบ ด้วย IR.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงผลของ HPP รสเนื้ออบ ด้วย IR.



รูปที่ 4.5 กราฟแสดงผลของซีอิ๊วผง ด้วย IR.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟรูปที่ 4.1-4.5 พบว่าโดยปกติแล้ว HPP (Hydrolyzed Plant Protein) จะประกอบด้วยสารหลายชนิด ดังนั้นจากกราฟแสดงให้เห็นถึง peak ที่เด่นชัดมากมายและบาง peak ยังเกิดการบดบังจากสารอื่น (Interference) และจากกราฟของ HPP ทั้ง 4 รส มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากนั้น แสดงว่ามีองค์ประกอบทางเคมีส่วนใหญ่เหมือนกันหรือใกล้เคียงกันนั่นเอง โดยพอจะสรุปหมู่ Functional Group ได้ดังตารางที่ 4

สำหรับซีอิ๊วผง (Soy Sauce Powder) นั้นก็จะมีลักษณะกราฟคล้ายกันกับ HPP แต่จะมีช่วงแตกต่างกันคือ ที่ตำแหน่ง 2,000 cm^{-1}, 1,360 cm^{-1}และ 1,300 cm^{-1} จะพบใน HPP เท่านั้น ส่วนตำแหน่ง 1,040 cm^{-1} แต่ตำแหน่งเหล่านี้เราจะไม่สามารถบอกหมู่ functional ได้เนื่องจากไม่มี reference standard พบเฉพาะในซีอิ๊วผง การเลือกใช้ซีอิ๊วผงเป็นตัวอย่างมาตรฐานในโครงงานพิเศษฉบับนี้ เพราะขั้นตอนการผลิตซีอิ๊วจะได้มาจากกระบวนการหมักโดยใช้วัตถุดิบคือถั่วเหลืองเช่นเดียวกับการผลิตนัตโตหรือการผลิตถั่วเน่าทางภาคเหนือของประเทศนั่นเอง

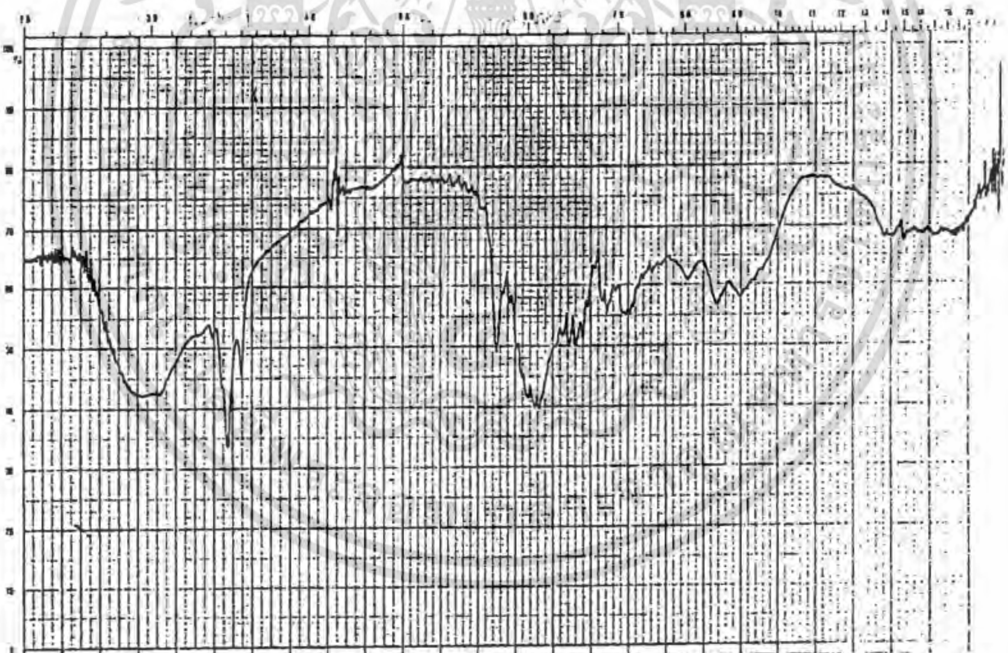
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงผล IR ของ HPP และ ซีอิ๊วผง

สารตัวอย่าง	ช่วง (cm^{-1})	หมู่ฟังก์ชั่นที่พบ (Functional Group)
1.HPP ทั้ง 4 ชนิด	3,600-2,800	O-H(Hydroxyl group)
	2,950-2,920	N-H
	2,385-2,375	P-H
	2,350-2,340	$C\equiv N$, $-R-C\equiv C-R'-$
	1,725-1,680	Carboxylic group or -C-
	1,550	$R-NH_2^+-R'$ (2° Amine)
	1,410	bending O-H
	1,240-1,110	C-O-
	680	$cis-R-CH=CH-R'-$
2.ซีอิ๊วผง	3,600-2,800	O-H(Hydroxyl group)
	2,920-2,950	N-H
	2,385-2,375	P-H
	2,350-2,340	$C\equiv N$, $-R-C\equiv C-R'-$
	1,680-1,725	Carboxylic group or -C-
	1,550	$R-NH_2^+-R'$ (2° Amine)
	1,410	bending O-H
	680	$cis-R-CH=CH-R'-$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

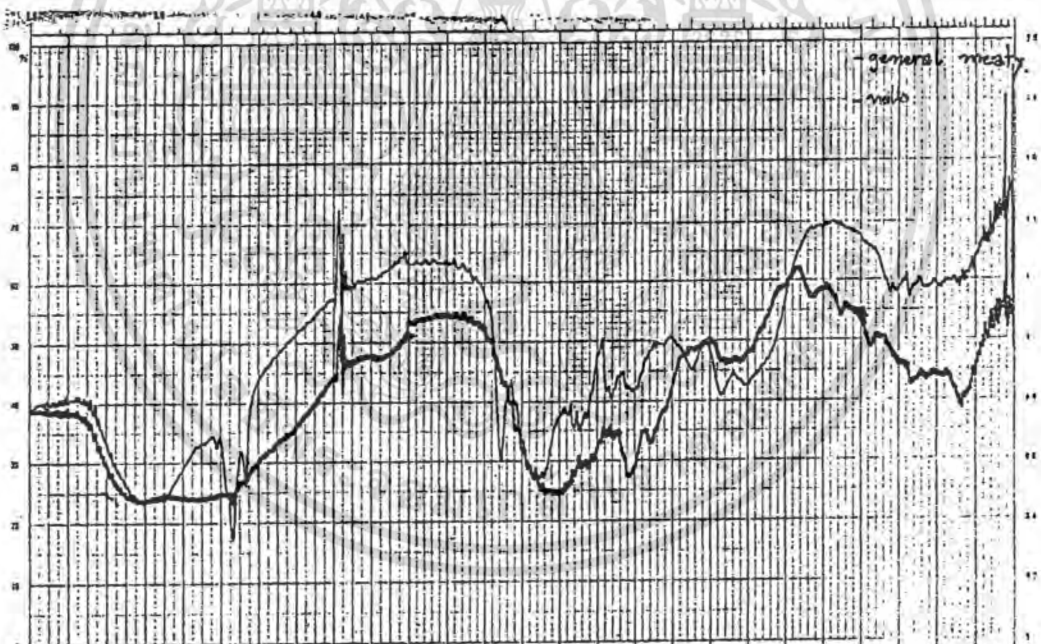
การศึกษาหมู่ฟังก์ชั่นของ HPP และซีอิ๊วผง พบว่าส่วนใหญ่ประกอบไปด้วยสารประกอบประเภทคาร์บอนิล (Carbonyl compomd), สารประกอบไฮดรอกซิล (Hydroxyl compound) และสารประกอบที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เช่น เอมีน (amine) เป็นต้น และสารประเภท Carbonyl compound และ Hydroxyl compound นั้นเป็นองค์ประกอบที่มีผลต่อกลิ่นอาหาร (วิวัฒน์, 2536) เนื่องจากพบสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ นั่นคือกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน และที่สำคัญที่สุดคือการเกิดกรดกลูตามิก ซึ่งเป็นสารเสริมกลิ่นรส (Flavour enhancer) (สันติ, 2536) และการเกิดกรดอะมิโนตัวอื่นๆ ยังทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีของ Maillard reaction ระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลชนิดต่างๆ เกิดกลิ่นต่างๆ รวมทั้งกลิ่นเนื้อด้วย เช่น กรดกลูตามิกทำปฏิกิริยากับน้ำตาล กลูโคส หรือ ฟรุกโตส โดย Maillard reaction จะได้กลิ่นไก่ เป็นต้น (ภาคผนวก ข.)



รูปที่ 4.6 กราฟแสดงผลของ นัตโตผง (Natto Powder) ด้วย IR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาองค์ประกอบของนัตโตโดยใช้ IR นั้น มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายคลึงกับ HPP และ Soy Sauce Powder โดยพบว่าลักษณะของกราฟจะไปในทำนองเดียวกัน การนำนัตโตมาศึกษาด้วย IR นั้นเป็นการศึกษาขั้นต้นของการศึกษานัตโตเพื่อใช้ทดแทน HPP การใช้นัตโตมาทดแทนเพราะเป็นอาหารหมักที่ทำจากถั่วเหลือง แต่จะไม่พบกลิ่นถั่วหรือกลิ่นเหม็นเขียวของถั่วเหลือง (E. Sugawara et al, 1985) เนื่องจากถั่วเหลืองผ่านการต้มสุกแล้วหมักต่อด้วย *B. Subtilis* ก็จะเกิดการย่อยโปรตีนโดย enzyme ในจุลินทรีย์ให้ได้กรดอะมิโน ดังนั้นจึงพบช่วงที่ 2,850-3,000 cm^{-1} ของหมู่อะมิโนดังกราฟและพบช่วง 2,800-3,600 cm^{-1} ที่เป็นช่วงกว้างๆ ของ Hydroxyl group และช่วงของ peak ที่ 1,800-1,640 cm^{-1} ซึ่งจะเป็นช่วงของสารประกอบ Carbonyl compound นั่นเองและยังพบว่านัตโตจะมีสารมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ HPP และ Soy Sauce Powder ดังนั้นการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง HPP และนัตโตจึงมีความสำคัญต่อการศึกษา เนื่องจากผลที่ได้จากการสกัดและใช้ทดแทน HPP ดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงผลของการศึกษาองค์ประกอบของนัตโตเปรียบเทียบกับ HPP มาตรฐาน (general meaty) ด้วย IR

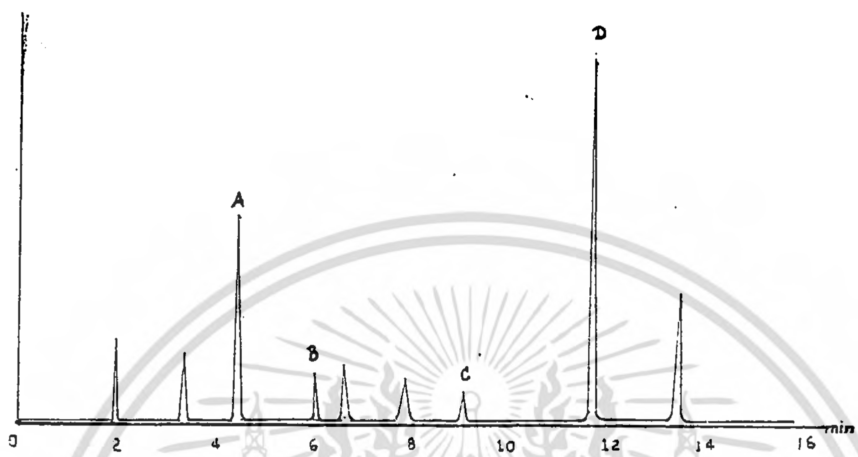
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟ พบว่าลักษณะของกราฟจะมีลักษณะไปในทำนองเดียวกัน โดยพบว่าจะมีหมู่ Hydroxyl group (-OH) เหมือนกันแต่นัตโตจะมีหมู่ของ -N-H เด่นชัดกว่าใน HPP และซีอิ๊วผง สำหรับตำแหน่ง P-H ที่ตำแหน่งประมาณ 2,350 cm^{-1} นั้นจะพบในตัวอย่างทุกตัวอย่าง และยังพบตำแหน่งที่สัมพันธ์กับ HPP รส General meaty ที่ 2,340-2,350 cm^{-1}, 1,600-1,640 cm^{-1}, 1,540 cm^{-1}, 1,520 cm^{-1}, 1,400-1,410 cm^{-1}, 670 cm^{-1} และ 530 cm^{-1} ดังกราฟ แต่ที่ตำแหน่ง 1,750 cm^{-1}, 1,460 cm^{-1}, และ1,250 cm^{-1} จะไม่พบใน HPP จะพบแต่ในนัตโตเท่านั้น สำหรับที่ตำแหน่ง 1,180 cm^{-1} จะพบเด่นชัดในนัตโตแต่จะพบเล็กน้อยใน HPP แต่สำหรับสารในช่วง 780-930 cm^{-1} จะพบเพียงแต่ใน HPP เท่านั้น ดังนั้นการศึกษาหมู่ฟังก์ชั่นจึงเป็นการบอกได้ว่าเราควรจะสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายตัวใดต่อไปหรือควรจะศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จากกราฟยังบอกได้อีกว่านัตโตประกอบไปด้วยสารประเภท Hydroxyl compound และ Carbonyl compound เช่นเดียวกับ HPP ซึ่ง Carbonyl compound เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดรสเนื้ออีกด้วย (E. Sugawara et al, 1985)

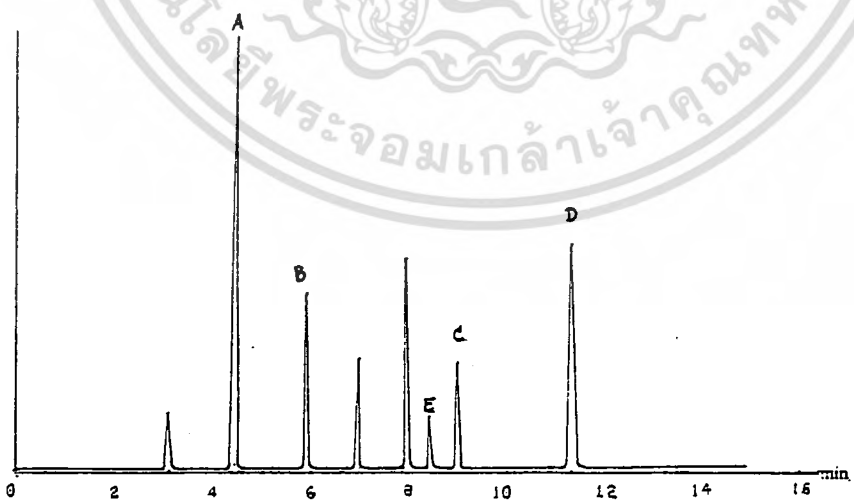
2.2 <u>การศึกษาด้วย Gas Chromatography (GC)</u>

จากการศึกษาด้วย Gas Chromatography ที่สภาวะดังวิธีการวิเคราะห์ข้างต้น พบว่าผลการทดลองโดยใช้ HPP เป็นมาตรฐานคือ HPP รสไก่อบ, รสหมูอบและรสเนื้ออบ ดังกราฟรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 พบว่า HPP ทั้ง 3 รสจะมี 9 peaks, 8 peaks และ 6 peaks ตามลำดับ จากการศึกษา HPP ทั้ง 3 รสพบว่าจะมี peak A และ B ใน HPP ทั้ง 3 รส สำหรับ peak C และ D จะพบในไก่อบ (Roasted Chicken) และหมูอบ (Roasted Pork) แต่ไม่พบในเนื้ออบ (Roasted Beef) และพบจุด E ในหมูอบและเนื้ออบด้วย ดังกราฟ สารที่พบยังมีความเข้มต่างกันอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

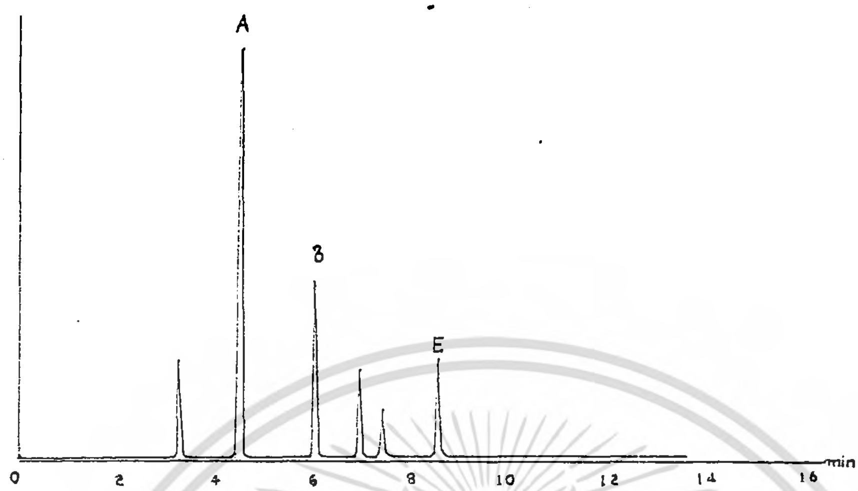


รูปที่ 4.8 กราฟแสดง Gas Chromatogram ของ HPP รสไก่อบ (Roasted Chicken) จาก บริษัท Food Ingredients Specialities S.A. (FIS)

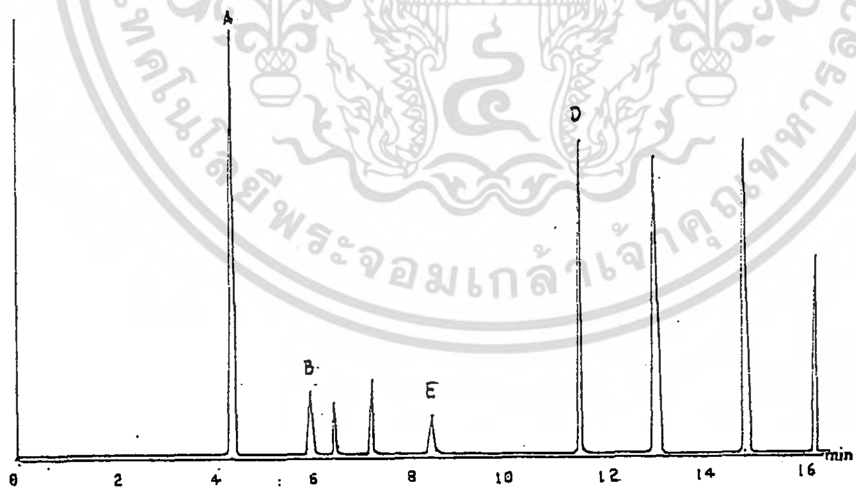


รูปที่ 4.9 กราฟแสดง Gas Chromatogram ของ HPP รสหมูอบ (Roasted Pork) จาก FIS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 กราฟแสดง Gas Chromatogram ของ HPP รสเนื้ออบ (Roasted Beef) จาก FIS



รูปที่ 4.11 กราฟแสดง Gas Chromatogram ของนัตโต โดยใช้ GC ของ Shimadzu Model. GC-9A gas chromatograph

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกราฟรูปที่ 4.11 พบว่าการวิเคราะห์ด้วย GC จะพบสาร 9 components และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ HPP มาตรฐานทั้ง 3 รส คือ กราฟรูปที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 พบว่าจะพบสาร A และ B เช่นเดียวกับ HPP รสไก่, รสหมูอบและรสเนื้ออบ และยังพบสาร E เช่นเดียวกับ HPP รสหมูอบและรสเนื้ออบ นอกจากนั้นยังพบสาร D ปริมาณความเข้มข้นสูงพอๆ กับใน HPP รสไก่อบ และพบสาร A ปริมาณเข้มข้นสูงมากซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่สำคัญที่พบใน HPP ทั้งสามรส แต่จากการศึกษาพบว่าจะไม่มีสาร C เหมือนใน HPP รสหมูอบและเนื้ออบ โดยสามารถแสดงสารที่พบกับเวลาได้ดังในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงสารประกอบกับเวลาที่ได้จาก GC ที่สภาวะข้างต้นตามวิธีทดลอง

สาร	Retention time (min)
A	4.62
B	5.96
C	9.13
D	11.40
E	8.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การทดสอบด้านรสชาติและกลิ่นของตัวอย่าง (Sensory test)

3.1 <u>การทดสอบการยอมรับของกลิ่นและรสของผู้บริโภคที่มีต่อนัตโต</u>

จากการใช้ผู้ทดสอบ 20 คน ในการทดสอบการยอมรับกลิ่นและรสของผู้บริโภคที่มีต่อนัตโต ดังตารางที่ 6 พบว่า 16 คน ใน 20 คน ยอมรับนัตโต ว่าสามารถให้กลิ่นและรสเนื้อได้ โดยที่ 16 คน จะยอมรับในด้านรสมากกว่ากลิ่น 2 คน จากผู้ทดสอบทั้งหมดยอมรับด้านรสชาติของนัตโตว่ามีรสชาติคล้ายเนื้อ แต่ไม่ยอมรับกลิ่น โดยระบุว่านัตโตมีกลิ่นฉุนเกินไป 2 คนจากผู้ทดสอบปฏิเสธการนำนัตโตมาใช้เป็นสารปรุงรส เนื่องมาจากกลิ่นและรสที่ไม่เหมาะสม

ตารางที่ 6 แสดงผลการยอมรับในการใช้นัตโตเป็นสารปรุงรส

จำนวนผู้ทดสอบ	ลักษณะของการยอมรับ
16 คน	ยอมรับว่า นัตโตสามารถให้กลิ่นและรสเนื้อ แต่ยอมรับรสมากกว่ากลิ่น
2 คน	ยอมรับว่า นัตโตสามารถให้กลิ่นและรสเนื้อ ยอมรับรสแต่ไม่ยอมรับกลิ่น
2 คน	ไม่ยอมรับว่า นัตโตสามารถที่จะให้กลิ่นและรสเนื้อได้ โดยให้เหตุผลว่านัตโตมีกลิ่นและรสที่ไม่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การทดสอบความแตกต่างของนัตโต และ HPP รส General meatly

จากการใช้ผู้ทดสอบ 20 คน สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง HPP และนัตโตได้โดยใช้แบบทดสอบระดับความแตกต่างดังนี้

ระดับความแตกต่างของตัวอย่างทั้งสอง				
ก.	766	ดีกว่า	841	มากที่สุด
ข.	766	ดีกว่า	841	มาก
ค.	766	ดีกว่า	841	เล็กน้อย
ง.		ไม่มีความแตกต่าง		
ฉ.	841	ดีกว่า	766	เล็กน้อย
ช.	841	ดีกว่า	766	มาก
ซ.	841	ดีกว่า	766	มากที่สุด

พบว่า ข้อ ก. ไม่มีผู้ทดสอบคนใดเลือกเลย

ข้อ ข. มีผู้ทดสอบเลือก 2 คน

ข้อ ค. มีผู้ทดสอบเลือก 7 คน

ข้อ ง. ไม่มีผู้ทดสอบคนใดเลือกเลย

ข้อ ฉ. มีผู้ทดสอบเลือก 5 คน

ข้อ ช. มีผู้ทดสอบเลือก 5 คน

ข้อ ซ. มีผู้ทดสอบเลือก 1 คน

จากการทดสอบตามแบบสอบถามพบว่า ผู้ทดสอบสามารถบอกความแตกต่างระหว่างตัวอย่างทั้งสองได้จึงไม่พบ ข้อ ง. เลย พบว่า ตัวอย่าง 766 (นัตโต) มีผู้ยอมรับว่าดีกว่ามาก 2 คน. ดีกว่าเล็กน้อย 7 คน (ข. และ ค. ตามลำดับ) สำหรับ ฉ. HPP ดีกว่า นัตโตเล็กน้อย พบว่ามีจำนวน 5 คน และ ช. HPP ดีกว่า นัตโตมาก 5 คน และ ซ. HPP ดีกว่านัตโตมากที่สุดเพียง 1 คน.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและวิจารณ์

นัตโตเป็นอาหารหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์คือ *B. subtilis* ในการหมักโดยใช้เชื้อสายพันธุ์ Fermented Soybeans จากญี่ปุ่นที่ผ่านการคัดเลือกมาใช้หมักถั่วเหลืองพันธุ์ปกติที่มีภายในประเทศ

โดยปกติแล้ว *B. subtilis* จะใช้น้ำตาล trehalose เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งน้ำตาลชนิดนี้พบมากในถั่วเหลือง (Gotsche และ Dahl, 1995) จากการทดลองหาปริมาณโปรตีนพบว่า ถั่วเหลือง ถั่วเหลืองหมัก (paste) และถั่วเหลืองหมักอบแห้ง (chip) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส มีปริมาณโปรตีน 35.0, 21.9และ 38.9 % น.น.แห้งตามลำดับ

เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนมีผลต่อกรดอะมิโนโดยเฉพาะปริมาณกลูตามิกและอลานีนรวมถึงนิวคลีโอไทด์ที่มีผลต่อการเกิดรส ดังนั้นเราจึงต้องทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วย (วิวัฒน์, 2536) การเลือกใช้นัตโตในโครงงานนี้เนื่องจากว่าระยะเวลาในการผลิตใช้เวลาประมาณ 2-3 วันเท่านั้น ซึ่งเหมาะสำหรับนำไปใช้ในงานอุตสาหกรรม ถั่วเหลืองที่จะเกิดการย่อยด้วย Fibrinolytic enzyme(M. fujita et al, 1993) จะได้นัตโตสีเทาปนดำที่มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว สามารถนำมาเป็นอาหารทดแทนเนื้อสัตว์ได้และเลือกนัตโตมาศึกษากลิ่นและรสนั้นยังเหมาะสมกว่าการศึกษาผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองอื่นๆ เพราะการหมักและการใช้ความร้อนในการต้มถั่วเหลืองจะมีผลทำให้ปริมาณของ 2-pentylfuran และ 1-Octen-3-ol ซึ่งเป็นตัวการสำคัญในการเกิดกลิ่นถั่วเหลือง (beany odour) ลดลง การใช้ความร้อนในการต้มถั่วเหลืองมากกว่า 5.5 ชั่วโมงขึ้นไปยังจะช่วยลด Hexanal, (E)-2-hexanal และ hexanol ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นเขียวในถั่วเหลือง (green odour) อีกด้วย (E. Sugawara et al., 1985) จากศึกษาของ Kosuge และคณะพบว่า ตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็นอับของนัตโตเกิดจากสาร tetramethylpyrazine และยังพบว่านัตโตยังมีองค์ประกอบของสารที่มีกำมะถัน (S) เป็นองค์ประกอบ สำหรับ pyrazine จะเป็นสารที่เกิดจากการหมักโดยเกิดปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับสารประกอบ Carbonyl Compound ดังนั้นจะพบสารประกอบของ pyrazine ในนัตโตสูง (ภาคผนวก ช.) และจาก E. Sugawara และคณะพบว่าจาก amino-carbonyl reaction จะเกิด (E) และ (Z)-3,5-Dimethyl-1,2,4-triolane ซึ่งเป็นสารที่ให้ลักษณะของรสเนื้อ (Beef) และไก่ (Chicken) และยังพบ Thialidine ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณน้อย มีคุณสมบัติเป็นกลิ่นเนื้ออบ (Roasted Beef) และสาร 2-Methylfuran ที่พบในยีสต์ออโตไลเสทยังพบในนัตโตด้วย สารชนิดนี้จะให้กลิ่นเนื้อที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง (Ames และ Mac Leoad, 1985)

จากการศึกษาของ Ramarathnam และคณะปี 1991 แสดงว่าจากการศึกษากลิ่นและรสของเนื้อ 3 ชนิด คือ เนื้อไก่, เนื้อหมูและเนื้อวัว ผ่านการศึกษาโดยอาศัย Gas Chromatograph/Mass Spectrometric (GC-MS) พบว่าสารที่ทำให้เกิด flavour ในเนื้อเกิดจากสารจำพวก Carbonyls และ Hydrocarbons รวมไปถึงสารพวก aromatic โดยเฉพาะ heterocyclic family โดยสามารถแบ่งลักษณะเฉพาะที่พบคือ

รสหมู	เกิดจาก	16-Octadecanal (พบทั้งในเนื้อวัวและเนื้อไก่)
		Benzaldione
		2,3-Octanedione
		(E,Z)-2,4-Decadienal
รสเนื้อวัว	เกิดจาก	2-Hexanone
		3,3-Dimethyl hexanal
		3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane
รสไก่	เกิดจาก	mixed complex ของสารหลายชนิดดังนี้
		3-Hexanone
		2-hexanal (ไม่พบในเนื้อวัว แต่พบเล็กน้อยในหมู)
		3-Methyl-4-Heptanone
		3-Methyl hexanal
		(E)-2-Heptanal
		Octanal
		(E)-2-Octanal
		Nonanal
		16-Octadecenal
		4-Ethyl benzaldehyde
		Decanal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าผลของ IR ที่ได้สอดคล้องกับสารที่ให้กลิ่นและรสเนื้อ เพราะการศึกษาใน IR สามารถสรุปได้ว่า HPP รสต่างๆ ซีอิ๊วผงและนัตโต จะมีสารประกอบของ Carbonyl compound และ Hydroxyl compound เป็นส่วนใหญ่จึงสอดคล้องกับทฤษฎี จึงสามารถสรุปได้ว่า เราสามารถจะสกัดสารที่ให้กลิ่นและรสเนื้อจากนัตโตได้ สำหรับการศึกษาด้วย Gas Chromatograph โดยปกติแล้วสารทางด้านอาหารจะมีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อนและพบสารมากมายที่อยู่เป็นองค์ประกอบของอาหาร แต่ผลจากการทดสอบพบเพียง 6-9 ชนิดเท่านั้น โดยพบว่านัตโตมีองค์ประกอบบางชนิดคล้ายกับ HPP และบางชนิดเป็นลักษณะเฉพาะของนัตโตเอง โดยปกติสารประเภท Volatile compounds สารที่ให้กลิ่นและรสมักจะเป็นสารที่มีมวลโมเลกุลและความเข้มข้นต่ำ ดังนั้นการศึกษาให้ทราบรายละเอียดนั้นควรใช้เครื่องมือ Gas Chromatography-Mass Spectrometric (GC-MS) จะดีกว่า ผลการทดลองการทดสอบกลิ่นและรสของนัตโตนั้นสามารถสรุปได้ว่า นัตโตมีคุณสมบัติที่ให้ลักษณะคล้ายHPPรสเนื้อทั่วๆไป สำหรับการทดลองของโครงงานนี้เป็นการศึกษาขั้นต้นของการสกัดสารให้รสเนื้อจากถั่วเหลืองหมักนัตโตเท่านั้น สำหรับการศึกษาเพื่อพัฒนาในระดับอุตสาหกรรม หรือการศึกษารายละเอียดมากขึ้นควรจะศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.

ตารางแสดงปริมาณโปรตีนในอาหารชนิดต่างๆ

อาหาร	โปรตีน (%โดยน้ำหนัก)
แป้งถั่วเหลืองสกัดไขมัน	51
เทมเป้ (ใช้ sun-dried soy)	43
แป้งถั่วเหลืองไม่ได้สกัดไขมัน	40
ถั่วเหลือง (dried)	35
เนย	30
ปลา	22
ไก่	21
เนื้อ	20
เทมเป้ (ใช้ fresh soy)	20
แฮมเบอร์เกอร์ (ดิบ)	18
ไข่	13
ข้าวสาลี	12
เต้าหู้	8
นม (whole dairy)	3

ที่มา : Shurtleff and Auyagi (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ตารางแสดง Miallard reaction ระหว่างแอลฟาอะมิโนแอซิด กับน้ำตาลชนิดต่างๆ

α aa น้ำตาล	gly	glu	lys	met	phe
glucose	น้ำตาลไหม้	กลิ่นไก่	มันฝรั่งทอด	กระหล่ำปลี	คาราเมล
fructose	น้ำต้มเนื้อ	กลิ่นไก่	มันฝรั่งทอด	น้ำต้มผัก	สุนัขสกปรก
maltose	กลิ่นเนื้อวัว	กลิ่นแฮมอบ	มันฝรั่งทอด	หัวผักกาด	กลิ่นหวาน
sucrose	กลิ่นเนื้อต้ม	กลิ่นเนื้ออบ	กลิ่นเนื้อต้ม	กระหล่ำปลี	ชอคโกแลต

ที่มา : เอกสารการสอนประกอบวิชาเทคโนโลยี สี, กลิ่น, รส คณะวิทยาศาสตร์ สจล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ตารางแสดงองค์ประกอบที่มีต่อกลิ่นรสอาหาร

Inorganic	Organic	
Taste	Taste	Odour
Sodium	Amino acid	Aliphatic acid
Potassium	Nucleotide	Aromatic acid
Magnesium	Peptide	Carbonyl compound
Chloride		Ester
Phosphate		Heterocyclic compound (N, O, S)
Sulphate		Hydroxyl compound
		Phenolic
		Pyrazine

ที่มา : บทความวิชาการ ; ยีสต์ออโตไลเสท : สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากยีสต์, อาหาร : ปีที่ 23 เมษายน-มิถุนายน 2536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.

ตารางแสดง Sensory property of undesirable components of soybean

Components	Properties	Sources
Phenolic acid	Sour, bitter, astrigent flavour	defatted seed
Oxidized phosphatidylcholine	bitter	defatted seed
Oxidized fatty acid	bitter	oxidized oil
Hydrophobic peptide	bitter	fermented products
Isoflavin	objectionable taste, bitter, astrigent, weak phenol-like taste	defatted seed
Daidzin	bitter, astrigent	whole seed
Genistin	bitter, astrigent	whole seed
Saponin	bitter	whole seed
A group saponin	bitter, astrigent	hypocotyl
B group saponin	bitter, astrigent	whole seed
Soyasaponin I	bitter, astrigent	dried pea

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ตารางแสดง Nutritional content of some soybean and pea products(Standard Tables of food Composition in japan ;fourth ed.,1982)

Composition	Natto	Moment tofu	Vegetable soybean	Pea	Green pea
Energy(Kcal/100g)	200	77	582	30	96
Water(g/100g)	59.5	86.8	71.1	90.3	75.7
Protein(g/100g)	16.5	6.8	11.4	2.9	7.3
Lipid(g/100g)	10.0	5.0	6.6	0.1	0.2
Nonfibrous carbohydrate(g/100g)	9.8	0.8	7.4	5.4	13
Fiber(g/100g)	2.3	0	1.9	0.8	2.9
Dietary Fiber(g/100g)			15.6		6.3
Ash(g/100g)	1.9	0.6	1.6	0.5	0.9
Calcium(mg/100g)	90	120	70	55	28
Phosphorus(mg/100g)	190	85	140	60	70
Iron(mg/100g)	3.3	1.4	1.7	0.8	1.9
Sodium(mg/100g)	2.0	3.0	1.0	1.0	3.0
Potaassium(mg/100g)	660	85	140	60	70
Carotein(mg/100g)	0	0	100	620	360
Vitamin B1	0.07	0.07	0.27	0.12	0.25
Vitamin B2	0.56	0.03	0.14	0.10	0.12
Niacin(mg/100g)	1.1	0.1	1.0	0.6	1.9
Ascorbic acid(mg/100g)	0	0	27	34	18

ที่มา : Vegetable soybean, Research Need for Production and Quality Improvement ; หน้า 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ.

ตารางแสดงองค์ประกอบของกลิ่นที่พบในถั่วเหลืองที่ใช้เวลาในการต้มสุกต่าง ๆ กัน

Peaks	Compound	0~3 hr (mg/ml)	3~5.5 hr (mg/ml)	5.5~8 hr (mg/ml)
a	Hexanal	1.78	-	-
b	(E)-2-Hexenal	0.07	-	0.02
c	2-Pentylfuran	0.08	0.05	0.03
d	3-Methyl-1-butanal	5.51	-	-
e	Hexanal	2.95	0.11	-
f	1-Octen-3-ol	16.72	0.80	0.53
g	Furfuryl alcohol	0.19	0.59	0.85
A	4-Ethyl-2-methylthiazole	-	0.01	0.71
B	(*E*)-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	-	0.58	0.69
C	(*Z*)-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	-	0.61	0.90
D	2,6-Dimethyl-1,3-dithiin	-	0.05	0.19
E	Thialdine	-	0.10	0.89

ที่มา: Suguwara et.al. (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ช.

ตารางแสดงองค์ประกอบของกลิ่นที่พบในถั่วเหลืองหมักนัตโต

Peaks	Compound	Natto (mg/ml)	
		Home-made	Commercial
1	2-Methylpyrazine	0.05	0.12
2	2,5-Dimethylpyrazine	4.41	6.35
3	2,3-Dimethylpyrazine	0.15	0.35
4	2-Ethyl-5-methylthiazole	0.02	0.05
5	2,3,5-Trimethylpyrazine	1.09	7.20
6	2-Ethyl-3,5-dimethylpyrazine	0.29	0.13
7	2-Ethyl-3,6-dimethylpyrazine	Trace	0.12
8	Tetramethylpyrazine	0.14	9.30
9	2-Ethyl-3,5,6-trimethylpyrazine	Trace	0.25
A	4-Ethyl-2-methylthiazole	0.38	0.05
B	(*E*)-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	0.21	0.18
C	(*Z*)-3,5-Dimethyl-1,2,4-trithiolane	0.25	0.65
E	Thialdine	0.70	1.17

ที่มา : Suguwara et.al. (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

แม้น อมรสิทธิ์, อมร เพชรสม. Principle of techniques of Instrumental analysis. โรงพิมพ์ชวนพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 108-188, 811-860.

วิวัฒน์ หวังเจริญ. ยีสต์ออโตไลเสท : สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารจากยีสต์, บทความวิชาการ, อาหาร. ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 เม.ย.-มิ.ย. 2536. หน้า 83-87.

ศิริลักษณ์ สินธวาลัย. 2522. หลักการทดลองอาหาร เล่ม 3, ทฤษฎีอาหาร. สงวนกิจการพิมพ์. กรุงเทพฯ. หน้า 43-72.

Fujita,-M. , Nomura,-K. , Ito,-Y. , Asada,-A. Nishimuro,-S. 1993. Biochem-biophy-res-commun.Orlando, Fla: Acadamic Press. Dec 30. V. 197 (3) p. 1340-1347.

Hara,-T. , Nagamoto,-S. , Ogata,-S. , Ueda,-S. 1992. Appl-microbiol-biotechnol. Berlin; New York: Springer International, May , V. 37 (2) p. 211-215.

Hasegawa,-Y. , Nagamura,-Y. , Tonotai,-Y. , Terasawa,-Y. , Ito,-Y. , Uchi-yama,-M. 1990 J-Food-prot. Des Moines, Iowa : International Association of Milk , Food , and Environmental Sanitarians. Dec , V. 53 (12) p. 1058-1061.

Ramarathnam,-N. , Rubin,-L.J. , Diosady,-L.L.1993 J-agric-food-chem. Washington, D.C. : American Chemical Society. June , V. 41 (6) p. 933-945.

Ramarathnam,-N. , Rubin,-L.J. , Diosady,-L.L.1991 J-agric-food-chem. Washington, D.C. : American Chemical Society. Oct , V. 41 (6) p. 1839-1847.

Sugawara,-E. , Ito,-T. , Odagiri,-S. , Kubota,-K. , Kobayashi,-A. 1985. Agric-Biol-Chem. Tokyo: Agricultural Chemical Society of Japan. Feb , V. 49 (2) p. 311-317.

Otsuka Kagaku Yakuhin KK, Processing fermented soybeans. Lift science Collection. 1995 Cambridge Sci Abs. All rts. reserv. Ohiko,-N. ; Yoneyama,-T. ; Muramatsu,-N. ; Miyazaki,-T. ; Negishi,-M. Research Report of the Nagano State Laboratory of Food Technology (No.11) : p. 30-35.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้