14600

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้แอลคาไลโปรติเอส

Production of Pretein Hydrolysate from Chicken Bone Residue using Alkali Protease

T097048

นางสาว จิราภา เสฐจินตนิน

นางสาว ดวงดี วิเชียรโหตุ

ป พ.
ค536ก
ร598
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 97048
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1314

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้แอลคาไลโปรติเอส

(Production of Protein Hydrolysate from Chicken Bone Residue using Alkali Protease)

โดย

นางสาว จิราภา เสฐจินตนิน รหัส 34417004

นางสาว ดวงดี วิเชียรโหตุ รหัส 34417007

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 18 มี.ค. 38 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(นายประพันธ์ ฝันดีโรภม)

ACC. NO.....
Date Received 23 พ.ค. 2538
Call No.....

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(ผศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ ..... **เดือน**..... **พ.ศ.** .....

ปพ.
ว 5367
2537

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9 มี.ค. 254

จิราภา เสฐจินตนิน และ ดวงดี วิเชียรโหตุ. 2538.: การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้แอลคาไลโปรติเอส (Production of Protein Hydrolysate from Chicken Bone Residue using Alkali Protease).ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม.

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase 2.4 L ในขั้นตอนการสกัดไขมันบางส่วนออกจากเศษกระดูกไก่ ได้ศึกษาอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน 3 ระดับ คือ 1:1, 1:1.5 และ 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาในการสกัดไขมัน 4 ระดับ คือ 5,15,25 และ 35 ชั่วโมง พบว่าสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งสกัดไขมันสูงสุด คือ ใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน 1:1 และ ระยะเวลาในการสกัด 35 ชั่วโมง ในขั้นตอนการย่อยสลายได้ศึกษาตัวแปรต่างๆ ดังนี้ อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 1:3,1:4 และ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:8 5 ระดับ คือ 0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 40 , 45, 50, 55 และ 60 °C pH เริ่มต้น 4 ระดับ คือ 7,8,9 และ 10 และระยะเวลาในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 30,60,90,120 และ 150 นาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ในแต่ละสภาวะ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด 34.69 % คือ ใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 1:5 ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.3 % อุณหภูมิในการย่อยสลาย 40 °C ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 และระยะเวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไประเหยน้ำจนมีปริมาณของแข็งทั้งหมด 38.40 % พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 39.87 % โปรตีน 22.34 % เถ้า 8.59 % ไขมัน 2.7 % โดยน้ำหนัก จากการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 10 CFU/ml โดยตรวจไม่พบ *Salmonella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทดลองนำโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L ในสภาวะที่เหมาะสมมาทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสในด้านรสขมและรสเค็ม พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L จะมีรสเค็มมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Neutrase 0.5 L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่ในด้านรสขมไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดข้างต้น มาใช้เป็นองค์ประกอบในการผลิตข้าวเกรียบปรุงรส แล้วนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้าน ลักษณะปรากฏ สีกลิ่นไก่ รสชาติ และการยอมรับโดยรวม เปรียบเทียบกับข้าวเกรียบที่เป็นตัวอย่างควบคุม พบว่าข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ในทุกด้าน และเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่าข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านกลิ่นไก่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จิตรา หรูสิทธิ์ วาณี วิชียงโชคชัย ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

28 มี.ค. 38 วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำปัญหาพิเศษเรื่องโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ โดยใช้เอนไซม์แอลคาไล โปรติเอส สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดีด้วยความอนุเคราะห์ของหลาย ๆ ฝ่ายด้วยกัน คือ พี่บัณฑิต จากบริษัทไก่สดศรีไทย ที่ได้เอื้อเฟื้อกระดูกไก่ รวมทั้ง บริษัทอีสต์เอเชียติก ที่เอื้อเฟื้อเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L ที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งต้องขอขอบพระคุณไว้ในโอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ อาจารย์ เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และอาจารย์ วิไล สนธิเพิ่มพูน ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมปัญหาพิเศษ สำหรับความเมตตา ความช่วยเหลือ เอาใจใส่ห่วงใยในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้จนลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ห้องธุรการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเอื้อเฟื้อความสะดวกในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้

และสุดท้ายขอขอบคุณกำลังใจ และน้ำใจที่มีให้กันตลอดมา จากเพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกคน ที่ทำให้ปัญหาพิเศษฉบับนี้เสร็จโดยสมบูรณ์

หากปัญหาพิเศษฉบับนี้ พอจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้อื่นอยู่บ้าง ขอยกความดีนี้ให้แก่ พ่อ แม่ ครู อาจารย์ ที่ได้อบรมสั่งสอน ให้ความรู้ ให้การศึกษา และความหวังดีมาโดยตลอด

จิราภา เสฐจินตนิน

ดวงดี วิเชียรโหตุ

มีนาคม 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ก

กิตติกรรมประกาศ ค

สารบัญตาราง ง

สารบัญภาพ ฉ

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทรรศน์

2.1 องค์ประกอบของเศษกระดูกไก่ 3

2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซท 4

2.3 สมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท 5

2.4 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท 9

2.5 การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท 10

2.6 วิธีการกำจัดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท 13

2.7 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน 16

2.8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์ 22

3. การทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง 29

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง 29

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 30

4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ 37

4.2 การเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท 37

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท 54

4.5 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase 55

4.6 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase 56

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 59

5.2 ข้อเสนอแนะ 61

เอกสารอ้างอิง 62

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก 67

ภาคผนวก ข 75

ภาคผนวก ค 86

ประวัติผู้เขียน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	องค์ประกอบของเศษกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้วจากเครื่องถอดกระดูก หน่วยเป็นเปอร์เซนต์	3
2.2	เปปไทด์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสขมซึ่งแยกได้จากโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย	11
2.3	ค่าความเป็นไฮโดรโฟบิคของกรดอะมิโน	12
2.4	สมบัติทางชีวเคมีของ Alcalase ที่เตรียมได้จาก *Bacillus licheniformis*	19
3.1	ส่วนผสมในการผลิตข้าวเกรียบปรุงรส	35
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกกระดูกไก่	37
4.2	เปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน และเวลาในการสกัดต่างๆ	38
4.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้	39
4.4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้ เมื่อใช้เวลาในการสกัดไขมันต่างๆ	39
4.5	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	42
4.6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ	43
4.7	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำต่างๆกัน	44
4.8	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	45
4.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำต่างๆกัน	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ หน้า

4.10 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและ pH เริ่มต้นต่างๆ 48

4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและค่า pH เริ่มต้นต่างๆ 49

4.12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและค่า pH เริ่มต้นต่างๆ 50

4.13 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆกัน 52

4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ 53

4.15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ 53

4.16 องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทในรูปของเหลวข้น 54

4.17 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทาที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase 56

4.18 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเคซีนที่ระดับขั้นการย่อยสลายเท่ากับ 55 เปอร์เซนต์ และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองที่ระดับขั้นการย่อยสลาย 10 เปอร์เซนต์ ที่ pH ต่างๆ	5
2.2	Storage Modulus (G′) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลือง และโปรตีนสกัดเมื่อได้รับความร้อน	7
2.3	Osmolality ของโปรตีนไฮโดรไลเซทชนิดต่างๆ	8
2.4	การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปติเดส(1) และเอนโดเปปติเดส (2)	17
2.5	ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.06 AU/ลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	20
2.6	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.06 AU/ลิตร ที่ pH เท่ากับ 8	21
2.7	ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 2.3 AU/ลิตร ที่ pH เท่ากับ 8.5	21
2.8	กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ	27
3.1	ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้เอนไซม์ Alcalase	32
4.1	ปริมาณไขมันเฉลี่ยที่สกัดได้จากเศษกระดูกไก่เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเศษกระดูกไก่ต่อเฮกเซน และเวลาในการสกัดต่างๆ	40
4.2	เศษกระดูกไก่บดละเอียดอบแห้งที่ผ่านการกำจัดไขมันออกบางส่วน	41
4.3	เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเศษกระดูกไก่เฉลี่ยที่อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	44
4.4	เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ยที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ หน้า

4.5 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิ และ pH เริ่มต้นต่างๆ 51

4.6 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยที่ระยะเวลาต่างๆ 52

4.7 ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้เอนไซม์ Alcalase และ Neutrase 55

4.8 ข้าวเกรียบปรุงรสที่ผลิตได้ 58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเริ่มมีการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็ง (Frozen Chicken) ไปจำหน่ายยังต่างประเทศ ในปริมาณและมูลค่าการส่งออกสูงถึง 5,884 ล้านบาท ในปี 2532 และจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในปีต่อๆไปอย่างแน่นอน

ปัจจุบันโรงงานชำแหละไก่ส่วนใหญ่จะแยกเศษเนื้อที่ติดโครงกระดูกออก โดยใช้เครื่องถอดกระดูก (deboner) ซึ่งพบว่า ถ้าใช้โครงกระดูก 100 กิโลกรัม จะแยกได้เศษเนื้อที่รับประทานได้ 65-70 กิโลกรัม และมีเศษกระดูกที่เหลืออยู่ 30-35 กิโลกรัม เศษกระดูกดังกล่าว ส่วนมากจะนำมาใช้เป็นปุ๋ย หรืออาหารสัตว์ ซึ่งปริมาณความต้องการใช้ยังอยู่ในขอบเขตจำกัด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูก พบว่ามีความชื้น 63.7 เปอร์เซนต์ โปรตีนทั้งหมด 20.5 เปอร์เซนต์ ไขมัน 9.9 เปอร์เซนต์ เถ้า 6.9 เปอร์เซนต์ และรงควัตถุ 0.21 เปอร์เซนต์ (Kijowshi และ Niewiarowice,1985) จะเห็นว่าเศษกระดูกมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 20.5 เปอร์เซนต์ ถ้าสามารถนำโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ดังกล่าว มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ นอกจากจะได้แหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพแล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษกระดูกไก่ ซึ่งเป็นวัสดุที่เหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมชำแหละไก่อีกด้วย

แนวทางหนึ่งในการนำเศษกระดูกไก่มาใช้ประโยชน์ คือ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน องค์ประกอบของไฮโดรไลเซทที่ได้เป็น กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ รวมทั้งโปรตีนโมเลกุลเล็กๆ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในระดับอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ การย่อยสลายด้วยกรด ด่าง และเอนไซม์

การใช้กรดหรือด่างในการย่อยสลายโปรตีนนั้น จะต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง คือใช้ความเข้มข้นของกรดหรือด่างสูง อุณหภูมิสูง ใช้เวลานานก่อให้เกิดการกัดกร่อนเครื่องมือ ในขณะที่การใช้เอนไซม์มีข้อได้เปรียบกว่า เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับเสตรทสูง จึงใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ในปริมาณน้อย ย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง อุณหภูมิและความดันปกติ ไม่เกิดปัญหาการกัดกร่อนของเครื่องมือ และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ทำให้กรดอะมิโนถูกทำลายอีกด้วย

จากปัญหาพิเศษเรื่องการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase 0.5 L(สมพรและสุดา,2537) พบว่าสามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยเท่ากับ 29.81 เปอร์เซนต์ ดังนั้นโครงการปัญหาพิเศษในครั้งนี้ จึงได้ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเอนไซม์แอลคาไลโปรติเอส (Alcalase 2.4 L) ซึ่งมีรายงานการวิจัยที่ใช้เอนไซม์นี้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทได้ดี

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบขั้นต้นเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase 2.4 L
3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้
4. ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้
5. ทดลองนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ในผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 องค์ประกอบของเศษกระดูกไก่

เศษกระดูกไก่ที่ได้ หลังจากแยกส่วนที่เป็นเนื้อติดกระดูกด้วยเครื่องถอดกระดูก (deboner)แล้ว ยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์อยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง เศษกระดูกไก่ดังกล่าวโดยทั่วไปมีความชื้น 63.7 เปอร์เซนต์ โปรตีนทั้งหมด 20.5 เปอร์เซนต์ ไขมัน 9.9 เปอร์เซนต์ เถ้า 6.7 เปอร์เซนต์ และรงควัตถุ 0.21 เปอร์เซนต์ องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่ที่ได้จากเครื่องถอดกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้ว แสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้ว จากเครื่องถอดกระดูก หน่วยเป็นเปอร์เซนต์

องค์ประกอบ	เศษกระดูกไก่	
	ไก่กระทง	แม่ไก่
Dry matter	36.6	36.1
Total protein (Nx6.25)	20.0	20.9
Collagen (% of total protein)	35.5	40.2
Fat	10.1	7.8
Ash	6.6	7.2
Haem pigments	0.19	0.22
Bone particles (raw bones)	33.0	34.1

ที่มา : Kijowski และ Niewiarowicz (1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลในตารางที่ 2.1 จะเห็นได้ว่าเศษกระดูกไก่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งถ้าสามารถนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะการใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากจะเป็นการนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์แล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วย การนำโปรตีนจากเศษกระดูกไก่ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ที่น่าสนใจวิธีหนึ่ง คือ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซท (Protein Hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ย่อยสลายแล้วจะประกอบด้วย กรดอะมิโน เปปไทด์สายสั้นๆรวมทั้งโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในระดับอุตสาหกรรม นิยมใช้การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับเสตรทสูง จึงสามารถใช้ปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อยย่อยสลายโปรตีนได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง กล่าวคือ อุณหภูมิและความดันปกติ ไม่เกิดปัญหาเรื่องการกัดกร่อน ไม่เกิดปฏิกิริยา racemization ซึ่งเป็นการเปลี่ยนกรดอะมิโนจากรูป L-form เป็น D-form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Olcott และ Fraenkel,1974) ไม่ก่อให้เกิดสารที่เป็นพิษ เช่น Lysino-alanine และที่สำคัญคือ เอนไซม์โปรติเอสไม่มีผลทำให้กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ทริปโทเฟน(tryptophane) ซีสทีน(cystine) เซอรีน (serine) ถูกทำลาย

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายทาง ได้แก่ การผลิตอาหารเสริมสุขภาพ (nutritional food) อาหารซึ่งเกี่ยวกับการแพทย์ (medical food) และการใช้ประโยชน์เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส (flavoring) บางครั้งการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดรสขมในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเซทก็ยังได้รับความสนใจมาก เพราะมีศักยภาพในการใช้เป็นองค์ประกอบในอาหาร (food ingredient) รวมทั้งสมบัติที่ดีอื่นๆ กล่าวคือ ถูกย่อยสลายได้ง่าย มีความสามารถในการละลายสูง ไม่เสียสภาพง่ายเมื่อได้รับความร้อน กรด หรือ เบส สามารถปรับปรุงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น มีสมบัติเป็นอิมัลซิ-ไฟเออร์ (emulsifier) เพิ่มคุณสมบัติของการเกิดโฟมหรือการตกตะกอน มีโปรตีนเป็นองค์-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

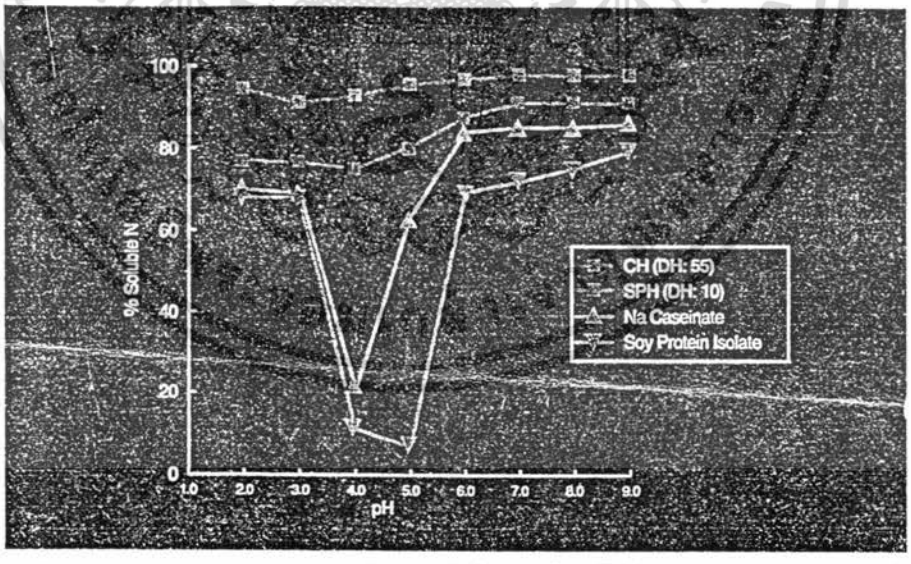
ประกอบสูง สะดวกในการใช้และเมื่อทำให้แห้งจะมีอายุการเก็บนาน มีความเป็นไปได้ในการใช้เพื่อปรับสมดุลของสารอาหาร

2.3 สมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท (Functional Properties of Protein Hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเซทส่วนใหญ่จะมีสมบัติทางหน้าที่ต่างๆดีขึ้น เมื่อเทียบกับโปรตีนที่ไม่ได้ย่อยสลาย

2.3.1 ความสามารถในการละลาย (Solubility)

สมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สำคัญ คือ ความสามารถในการละลายในช่วงpH อุณหภูมิ ความเข้มข้นของไนโตรเจน และภาวะของอิออนิกที่กว้าง การย่อยสลายโปรตีนเพียงบางส่วนจะเพิ่มการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่จุดไอโซอิเล็คตริก (pI) ของโปรตีน ดังตัวอย่างในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเคซีน ที่ระดับขั้นการย่อยสลายเท่ากับ 55 เปอร์เซนต์ และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองที่ระดับขั้นการย่อยสลาย 10 เปอร์เซนต์ที่ pH ต่างๆ

ที่มา : Phillips และ Beuchat(1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 2.1 การละลายของไฮโดรไลเซทจะเพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วง pH 4-5 เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ไม่ได้ย่อยสลาย การละลายที่เพิ่มขึ้นของไฮโดรไลเซทนี้เนื่องมาจากโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น ซึ่งหมู่คาร์บอกซิลจะเพิ่มสมบัติความเป็นไฮโดรฟิลิก (hydrophilicity) (Phillips และ Beuchat,1981)

ไฮโดรไลเซทที่มีความสามารถในการละลายได้ดีที่จุดไอโซอิเล็คตริก (pI) นิยมใช้เติมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำผลไม้ที่มีการเติมไนโตรเจนเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ในการผลิตสูตรอาหารสำหรับทารกที่มีอาการภูมิแพ้(hypoallergenic) และผลิตภัณฑ์อื่นๆที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซทแต่ในผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น มอลโตเดกซ์ตริน อยู่นั้น มีความจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดน้อยที่สุด

ผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้น มักจะมีการใช้อุณหภูมิสูงในระหว่างกระบวนการผลิตและการฆ่าเชื้อ ดังนั้นความคงตัวของไฮโดรไลเซทที่อุณหภูมิสูงจึงเป็นสิ่งสำคัญมาก ความคงตัวที่อุณหภูมิสูงก็คือ ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่จะยังคงละลายได้ โดยปราศจากการรวมตัวกัน หรือ ตกตะกอนภายหลังจากการผ่านกระบวนการผลิตและการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิสูง แม้ว่าอาจจะมีการรวมตัวกันเป็นอนุภาคเล็กๆเกิดขึ้น แต่อนุภาคเล็กๆเหล่านี้ก็จะยังคงละลายอยู่ได้ จากการศึกษาของ Hidalgo และ Gamper (1971) รายงานความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเวย์โปรตีน ที่มีระดับขั้นการย่อยสลาย 8 เปอร์เซนต์ ไฮโดรไลเซทมากกว่า 80 เปอร์เซนต์ยังคงละลายอยู่ ภายหลังจากการให้ความร้อนที่ 134 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที หรือแม้แต่ในภาวะที่มี 0.03 M $CaCl_2$ pH 3-11 ร่วมอยู่ด้วยก็ตาม

ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเซทมักมีการเติมแร่ธาตุ โซเดียม โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และคลอไรด์ เพื่อเพิ่มคุณค่าทางด้านโภชนาการ ดังนั้นความสามารถในการละลาย และความคงตัวของไฮโดรไลเซทร่วมกับแร่ธาตุต่างๆ โดยเฉพาะแร่ธาตุที่มีประจุสองบวก (Ca^{2+},Mg^{2+}) จึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากแร่ธาตุที่มีประจุสองบวกนี้ เป็นสาเหตุให้เกิดความไม่คงตัวของโปรตีนนม (Singh และ Creamer,1992)

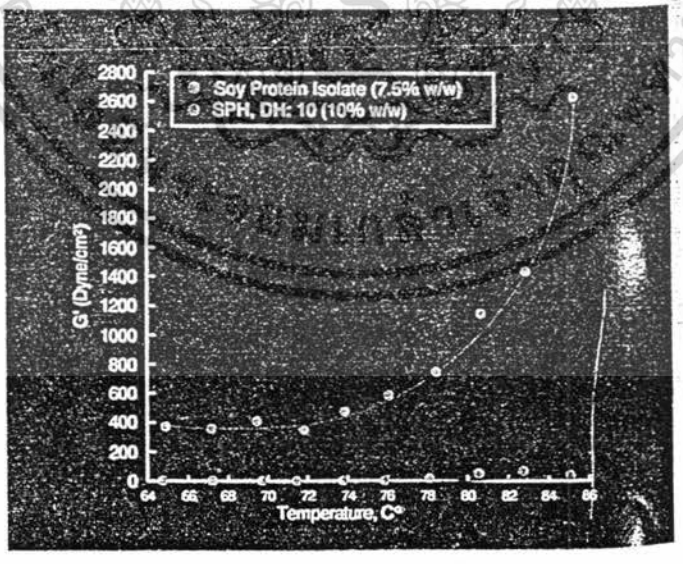
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์(Emulsifying Property)

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีความสำคัญมากในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารประเภทอิมัลชัน โดยสามารถวัดค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทง่ายๆได้ 2 วิธี คือวัดในรูปของค่า Emulsifying capacity โดยการหาน้ำหนักของน้ำมันเป็นกรัมต่อน้ำหนักโปรตีนที่ใช้เป็นกรัม และอีกวิธีหนึ่งจะวัดในรูปของค่า Emulsifying activity โดยการหาพื้นที่ที่มีความคงตัวต่อหน่วยน้ำหนักของโปรตีน (m^2/g) ความคงตัวของอิมัลชันปกติจะวัดเป็นค่าเปอร์เซนต์ของ total emulsified fat ที่แยกตัวอยู่ในชั้นของครีมโดยการหมุนเหวี่ยง หรือการเก็บรักษาไว้ตามระยะเวลาที่กำหนด ตามปกติสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจะเพิ่มขึ้นได้ โดยการควบคุมระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้เหมาะสม

2.3.3 สมบัติเกี่ยวกับการไหล (Rheological)

โดยทั่วไปเมื่อโปรตีนถูกย่อยสลายเพียงบางส่วน จะทำให้ความหนืดของสารละลายโปรตีนลดลงอย่างมาก สมบัติประการหนึ่งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความสำคัญต่อการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารโภชนาการ คือการไม่เกิดเจลที่อุณหภูมิสูง Adler-Nissen และ Olsen (1979) ศึกษาการเกิดเจลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลือง ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 Storage Modulus (G′)ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลือง และโปรตีนสกัดเมื่อได้รับความร้อน

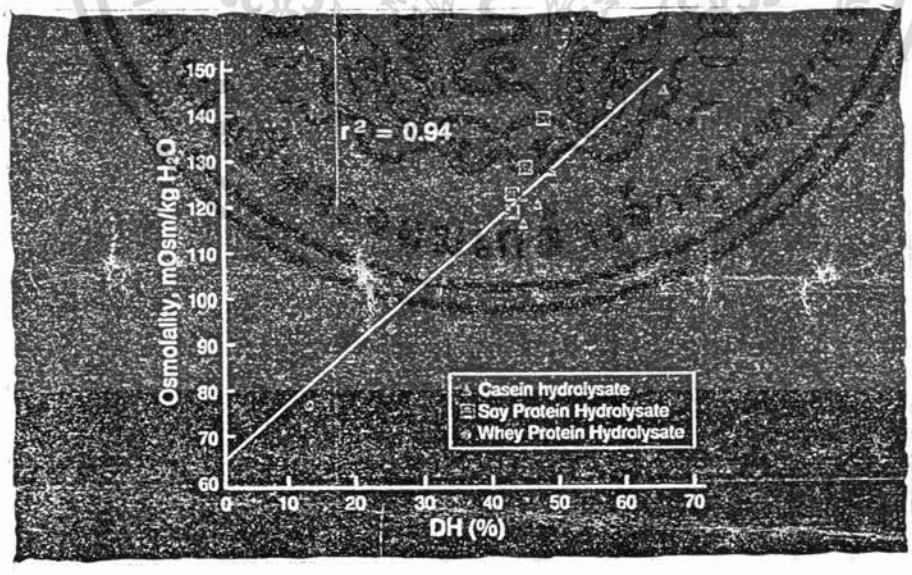
ที่มา : Olsen (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 2.2 จะเห็นว่า โปรตีนถั่วเหลืองที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 7.5 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก จะมีสมบัติการเกิดเจลที่ยืดหยุ่นได้เพิ่มขึ้นที่อุณหภูมิ 72-80 องศาเซลเซียส แต่โปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วเหลืองที่ความเข้มข้นของโปรตีน 10 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนัก ไม่สามารถเกิดเป็นเจลและไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงค่า G′ ระหว่างการให้ความร้อน การที่ไฮโดรไลเซทไม่มีสมบัติในการเกิดเจลอาจมีสาเหตุมาจาก การย่อยสลายโปรตีนบางส่วนมีผลทำให้ความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) ลดลง นอกจากนี้ยังเพิ่มประจุสุทธิของโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงทำให้เกิดความไม่สมดุลของประจุขึ้น

2.3.4 สมบัติของสารละลายที่ขึ้นอยู่กับ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายต่อหน่วยของตัวทำละลาย (Osmolality)

Osmolality คือ ปริมาณเป็นมิลลิโมลของอนุภาคตัวถูกละลายที่มีการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อบาง(membrane) ต่อตัวทำละลาย 1 กิโลกรัม (Webter,1985) ดังนั้นความสัมพันธ์ของจำนวน ขนาด และอนุภาคที่เป็นอิออนิกของกรดอะมิโนและเปปไทด์ จึงมีส่วนอย่างมากในการเพิ่มค่า Osmolality ของโปรตีนไฮโดรไลเซท และถ้ามีการย่อยสลายมากก็จะทำให้ค่า Osmolality สูงขึ้นด้วย ดังแสดงในภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 Osmolality ของโปรตีนไฮโดรไลเซทชนิดต่างๆ

ที่มา : Mahmoud (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Osmolality จะมีความสำคัญต่อคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีผลต่อระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า Osmolality สูง เมื่อรับประทานเข้าไปจะมีผลทำให้เกิดอาการ ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียนได้ เนื่องจากเกิดการเสียสมดุลของอิเล็คโตรไลท์ในร่างกาย

2.4 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.4.1 ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหารหรือใช้เป็นสารเชื่อม (binder) เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทมีสมบัติเป็น stabilizer emulsifier และ binder ที่ดี จึงสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดได้

2.4.2 ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร (Food Flavouring Agent)

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร สามารถใช้ได้ 2 ลักษณะ คือ flavour donor และ flavour enhancer โดยที่ flavour donor เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีกลิ่นรสตามต้องการ เช่น ในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว ซุป และซอสต่างๆ เป็นต้น สำหรับ flavour enhancer เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อเพิ่มหรือเสริมกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งเดิมมีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เช่น ในผลิตภัณฑ์ครีม ซุป ไส้กรอก เป็นต้น

2.4.3 ใช้เป็นอาหารทางการแพทย์ (Medical Food)

อาหารทางการแพทย์ คือ อาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนเพียงพอกับความต้องการของผู้ป่วยซึ่งไม่สามารถรับประทานอาหารในรูปแบบปกติได้ หรือใช้เป็นสารอาหารพิเศษสำหรับผู้ป่วยซึ่งมีความผิดปกติทางสรีระวิทยา ดังนั้นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในการผลิตสูตรอาหารทางการแพทย์นี้จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่ง เพราะมีคุณสมบัติที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้ป่วยได้เป็นอย่างดี ได้แก่ ร่างกายสามารถดูดซึม และนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว มีสารอาหารครบถ้วน มีความสมดุลของกรดอะมิโน และมีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีกลูตามีน (glutamine) ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานของเซลเยื่อบุ (mucosal cell) หรือมีอาร์จินีน (arginine) ซึ่งช่วยสร้างเซลลิมโฟไซท์ (lymphocyte cell) ในระบบภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่สามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นอาหารได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบ ลำไส้ใหญ่เป็นแผลเปื่อย กลุ่มอาการลำไส้สั้น ตับอ่อนอักเสบ และโรคภูมิแพ้อาหารโดยผู้ป่วยเหล่านี้มักมีอาการ hypermetabolic มีการดูดซึมผิดปกติเซลถูกทำลาย อวัยวะที่เกี่ยวกับระบบย่อยและดูดซึมอาหาร เช่น ตับ ตับอ่อน ไต ผิดปกติ

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิแพ้อาจมีปัญหาได้ เนื่องจากเคซีนที่ใช้ในการผลิตนั้นอาจก่อให้เกิดอาการแพ้ขึ้น ดังนั้นการใช้แหล่งโปรตีนอื่นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงน่าจะได้รับการยอมรับมากกว่า

2.4.4 ใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการนิยมใช้ในอาหารสำหรับผู้สูงอายุที่มักมีปัญหาในการเจ็บป่วย อวัยวะสำหรับย่อยและดูดซึมอาหารมีประสิทธิภาพต่ำ มีความอยากอาหารน้อย ทำให้การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อเสริมโปรตีนในผู้บริโภคกลุ่มนี้จึงมีความเหมาะสมอย่างยิ่ง และใช้เป็นอาหารสำหรับนักกีฬา เนื่องจากในการเล่นกีฬานั้นจะทำให้กล้ามเนื้อเกิดอาการเมื่อยล้า เพราะโปรตีนถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อเสริมเปปไทด์ระหว่างและหลังการออกกำลังกาย จะสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้และยังช่วยให้เกิดความสดชื่นอีกด้วย (Meredith,1989)

นอกจากนี้ยังใช้ในผู้ควบคุมน้ำหนักได้อีกด้วย เนื่องจากผู้ที่ลดน้ำหนักนี้จะเกิดการสูญเสียสมดุลของไนโตรเจนไป ดังนั้นการบริโภคโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีเปปไทด์ซึ่งมีค่า biological value สูง จะสามารถรักษาสมดุลไนโตรเจนที่เสียไป และช่วยลดความอยากอาหารได้อีกด้วย

2.5 การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

ในปัจจุบันมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทกันมากขึ้น โดยมีจุดประสงค์สำหรับการใช้แตกต่างกันไป เช่น สำหรับการปรับปรุงสมบัติทางหน้าที่ของผลิตภัณฑ์ ใช้ในผลิตภัณฑ์สำหรับโภชนาการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และใช้เป็นสารช่วยเพิ่มรสชาติ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อโปรตีนในอาหารถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นและรสขึ้น รวมทั้งอาจทำให้เกิดรสขมขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท

การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วย กรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีนขนาดเล็กมักจะทำให้เกิดรสขมขึ้น การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงทำให้เกิดข้อจำกัดในการใช้งาน เนื่องจากอาจทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ต้องการในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการศึกษาถึงการลด การป้องกัน และการกำจัดรสขมนี้จึงมีความสำคัญและเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก

จากการศึกษาของ Mcarr และคณะ (1956) พบว่า ความขมมีผลมาจากเปปไทด์มากกว่ากรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ที่มีรสขมโดยมากจะมีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิค นอกจากนั้นยังได้มีการพิจารณาถึงการเรียงลำดับของกรดอะมิโน (amino acid sequence) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนมีลักษณะเฉพาะต่อเปปไทด์ที่มีรสขม กล่าวคือ จะมีกรดอะมิโนที่เป็นพวกไฮโดรโฟบิคนั้นเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 เปปไทด์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสขมซึ่งแยกได้จากโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย

แหล่งโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย	เปปไทด์ที่ให้รสขม	แหล่งโปรตีนที่ถูกย่อยสลาย	เปปไทด์ที่ให้รสขม
Pepsin-hydrolyzed soybean	Phe-Leu	Trypsin-hydrolyzed casein	Gly-Pro-Phe-Pro-Ile-Val
	Leu-Phe		Phe-Ala-Leu-Pro-Gln-Tyr-Leu-Lys
	Leu-Lys		Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-
	Arg-Leu		Val-Phe-Gly-Lys
	Gly-Leu	Subtilisin-hydrolyzed casein	Leu-Val-Pro-Arg-Tyr-Phe-Gly
	Arg-Leu-Leu		Arg-Gly-Pro-Pro-Phe-Ile-Val
	Tyr-Phe-Leu		Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Pro-Gly-Ile-
	Gln-Tyr-Phe-Leu		Asn-His
	Ser-Lys-Gly-Leu	Isolated from cheese	Glu-Val-Leu-Asn
	Phe-Ile-Gln-Val		Asn-Glu-Asn-Leu-Leu
			Ala-Pro-Phe-Pro-Glu-Val-Phe

ที่มา: Pedersen (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งที่มีรสขมและไม่มีรสขมทำให้สรุปได้ว่ามีความสัมพันธ์กันระหว่างสมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิคของเปปไทด์และรสขม ดังนั้นจึงมีการเสนอสมมติฐานคิว (Q hypothesis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่มีรสขม

ค่า Q (Q-Value) คำนวณได้จาก พลังงานอิสระเฉลี่ยของการเปลี่ยนโซ่ข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนจากเอทานอลไปสู่น้ำ (Δf) หารด้วยจำนวนกรดอะมิโนที่ปรากฏอยู่

$$Q = \Sigma \Delta f/n$$

สำหรับการคำนวณนี้ Ney (1971) ใช้ค่าที่ได้รับการปรับปรุงโดย Tanford (1962) สำหรับหาค่าความเป็นไฮโดรโฟบิคของกรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีน

ตารางที่ 2.3 ค่าความเป็นไฮโดรโฟบิคของกรดอะมิโน

กรดอะมิโน	Δf-value (Kcal/mole)	กรดอะมิโน	Δf-value (Kcal/mole)
Glutamine	-100	Methionine	1,300
Asparagine	-10	Lysine	1,500
Glycine	0	Valine	1,690
Serine	40	Leucine	2,420
Threonine	440	Proline	2,620
Histidine	500	Phenylalanine	2,650
Aspartic acid	540	Tyrosine	2,870
Glutamic acid	550	Isoleucine	2,970
Arginine	730	Tryptophan	3,000
Alanine	730		

ที่มา : Tanford (1962)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากค่าคิว พบว่าเปปไทด์ที่มีรสขมจะมีค่าคิวมากกว่า 1400 กิโลแคลอรีต่อโมล ส่วนเปปไทด์ที่ไม่มีรสขมจะมีค่าคิวน้อยกว่า 1300 กิโลแคลอรีต่อโมล และถ้าค่าคิวอยู่ระหว่าง 1300-1400 กิโลแคลลอรีต่อโมล จะไม่สามารถบอกได้ว่าเปปไทด์นั้นมีรสขมหรือไม่ขม โดยค่าที่กำหนดนี้จะใช้ได้เมื่อน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์น้อยกว่า 600 ดาลตัน

Matoba และ Hata (1972) รายงานว่า ความเป็นไฮโดรโฟบิคของกรดอะมิโนมีผลต่อรสขมของเปปไทด์ และรสขมนั้นไม่ขึ้นกับการเรียงลำดับของกรดอะมิโน จากการทดลองโดยใช้โมเลกุลโปรตีนแบบกลม (globular protein) ซึ่งส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิคจะซ่อนอยู่ภายในจึงไม่สัมผัสกับตุ่มรับรสบนลิ้น แต่เมื่อใดที่โปรตีนถูกย่อยสลาย ส่วนไฮโดรโฟบิคจะปรากฏออกมาทำให้เกิดการสัมผัสกับตุ่มรับรสได้ง่ายมีผลทำให้รู้สึกถึงรสขม และรสขมจะเกิดมากที่สุดเมื่อกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิคเกิดพันธะเปปไทด์ทั้งสองด้าน รสขมจะลดต่ำลงเมื่อกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิคอยู่ในตำแหน่งด้านปลายของ C-terminal หรือ N-terminal และรสขมจะน้อยที่สุดเมื่อเป็นกรดอะมิโนอิสระ

จากสมมติฐานของ Ney (1971) กล่าวว่า สมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิคเป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญของรสขมของเปปไทด์ และใช้ค่าคิวบอกแนวโน้มการเกิดรสขมของไฮโดรไลเซท แต่ Alder และ Nissen (1986) กลับแสดงให้เห็นว่าค่าคิวนั้นเชื่อถือไม่ได้ เนื่องจากค่าคิวคำนวณโดยการใช้ค่าเฉลี่ยของเปปไทด์ทั้งหมดในส่วนผสมไฮโดรไลเซท แต่รสขมมีสาเหตุมาจากเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิคทซึ่งมีค่าคิวสูง และความเข้มข้นของเปปไทด์เหล่านี้ไม่สามารถทำนายได้จากค่าคิวเฉลี่ย ถ้าไม่ทราบการกระจายของค่าคิวในไฮโดรไลเซท ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยในเรื่องการเกิดรสขมในไฮโดรไลเซทกันต่อไป

2.6 วิธีการกำจัดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.6.1 การสกัดแยกแบบจำเพาะ (Selective Seperation)

การกำจัดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยวิธีนี้ สามารถกระทำได้โดยใช้สารประกอบชนิดต่างๆ ช่วยในการสกัดแยกองค์ประกอบที่ให้รสขมออก ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1.1 คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon)

Murray และ Baker (1952) ได้ทดลองกำจัดรสขมออกจากโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้คาร์บอนกัมมันต์ 0.5 กรัมต่อกรัมโปรตีนไฮโดรไลเซท จากนั้นใช้การกรองแยกคาร์บอนกัมมันต์ออก ซึ่งพบว่าวิธีนี้สามารถกำจัดรสขมได้เป็นอย่างดี โดยที่คาร์บอนกัมมันต์จะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับกรดอะมิโน หรือเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิค ซึ่งก่อให้เกิดรสขม แต่การใช้คาร์บอนกัมมันต์ก็จะทำให้เกิดการสูญเสียไนโตรเจนถึง 26 เปอร์เซนต์ เนื่องจากมีการดูดซับทริปโตเฟน (tryptophan) เฟนิลอะลานีน (phenylalanine) หรือเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้ จึงมีผลต่อการผลิต และราคาของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท

2.6.1.2 วิธีโครมาโตกราฟี โดยใช้ hexylseparose, hexylepoxy cellulose ,phenolic formaldehyde resin

2.6.1.3 soft glass fiber, flint glass powder, micro fiber paper สามารถใช้ลดความขมของ skim milk hydrolysate ได้

2.6.1.4 azeotropic mixture ของ 2° butanol และน้ำ (Lalasidis,1978) พบว่า เปปไทด์ที่แยกออกจาก 2° butanol มีรสขมอย่างมาก ดังนั้นการสกัดความขมด้วยวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพดี

2.6.2 การบดบัง (masking)

การเติมสารประกอบโพลีฟอสเฟต (polyphosphate) ระหว่างกระบวนการย่อยสลาย สามารถใช้บดบังรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนได้ (Tokita,1969) นอกจากนี้เจลาติน (gelatin) ก็สามารถใช้ได้เช่นเดียวกัน แม้ว่าจะไม่ดีเท่ากับไกลซีน (glycine) ก็ตาม (Stanley,1981) ไซโคลเด็กซ์ตริน (cyclodextrin) ก็เป็นสารตัวหนึ่งที่ใช้ในการบดบังรสขม เนื่องจากสามารถห่อหุ้มกลุ่มที่เป็นไฮโดรโฟบิคของเปปไทด์ที่มีรสขมได้ (Tamura et.al,1990) แต่ต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะให้ผลดี หรือจะใช้แป้งที่เจลาติไนซ์ (gelatinized starch) ในการทำให้โครงสร้างที่เกิดรสขมเข้าไปอยู่ในโครงร่างตาข่ายของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โมเลกุลแป้ง เพื่อป้องกันการสัมผัสกับตุ่มรับรสบนลิ้น โดยวิธีนี้จะต้องใช้ความร้อนช่วยในการผสมด้วย (Tamura et.al,1990)

ความขมจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด จึงมีการใช้กรดกลูตามิค (glutamic acid) และ กรดแอสปาติก (aspartic acid) ในผลิตภัณฑ์ แต่มีข้อสียคือ กรดเหล่านี้จะทำให้เกิดรสเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์ได้ จึงมีการปรับปรุงโดยใช้ทอรีน (taurine) ในสารละลายกรด เพื่อลดความขมและไม่ทำให้เกิดรสเปรี้ยวขึ้น ซึ่งพบว่ามีประสิทธิภาพดีเทียบเท่ากับการใช้กรดกลูตามิคและกรดแอสปาติค

2.6.3 การใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดส

การย่อยสลายโปรตีนบางส่วนด้วยเอนไซม์โปรติเอส จะทำให้เกิดพลาสติน (plastein) ซึ่งเป็นสารคล้ายโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มีคุณสมบัติแตกต่างจากโปรตีนเริ่มต้น และไม่มีส่วนที่ให้กลิ่นรส โดยปฏิกิริยาการเกิดพลาสตินนี้สามารถนำมาใช้ในการลดความขมได้เป็นอย่างดี (Nakai และ Li Chan,1988)

ความขมจะมีค่ามากที่สุดเมื่อกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟบิคอยู่ในตำแหน่งที่ไม่ใช่ปลายทั้งสองของเปปไทด์ ดังนั้นกรดอะมิโนอิสระจึงมีความขมน้อยกว่าเปปไทด์ ทำให้เกิดการใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดสในการลดความขมของผลิตภัณฑ์ขึ้น ดังผลงานวิจัยของ Glegg (1973) ที่ใช้โปรติเอสจากไตหมูในการย่อยสลายเปปไทด์ที่มีรสขม จนได้ไฮโดรไลเซทที่มีรสขมน้อยและมีกรดอะมิโนอิสระมากกว่า 50 เปอร์เซนต์

การลดความขมโดยใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดสนี้มีข้อจำกัด คือ เอนไซม์เหล่านี้จะทำให้มีกรดอะมิโนอิสระประเภทไฮโดรโฟบิคมากขึ้น ซึ่งจะมีผลต่อรสชาติของผลิตภัณฑ์ และการใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดสทำให้มีระดับขั้นการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) สูงขึ้น อาจเป็นผลให้มีสมบัติของสารละลายที่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของตัวถูกละลายต่อหน่วยของตัวทำละลายสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายกับผู้บริโภคได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic Enzyme)

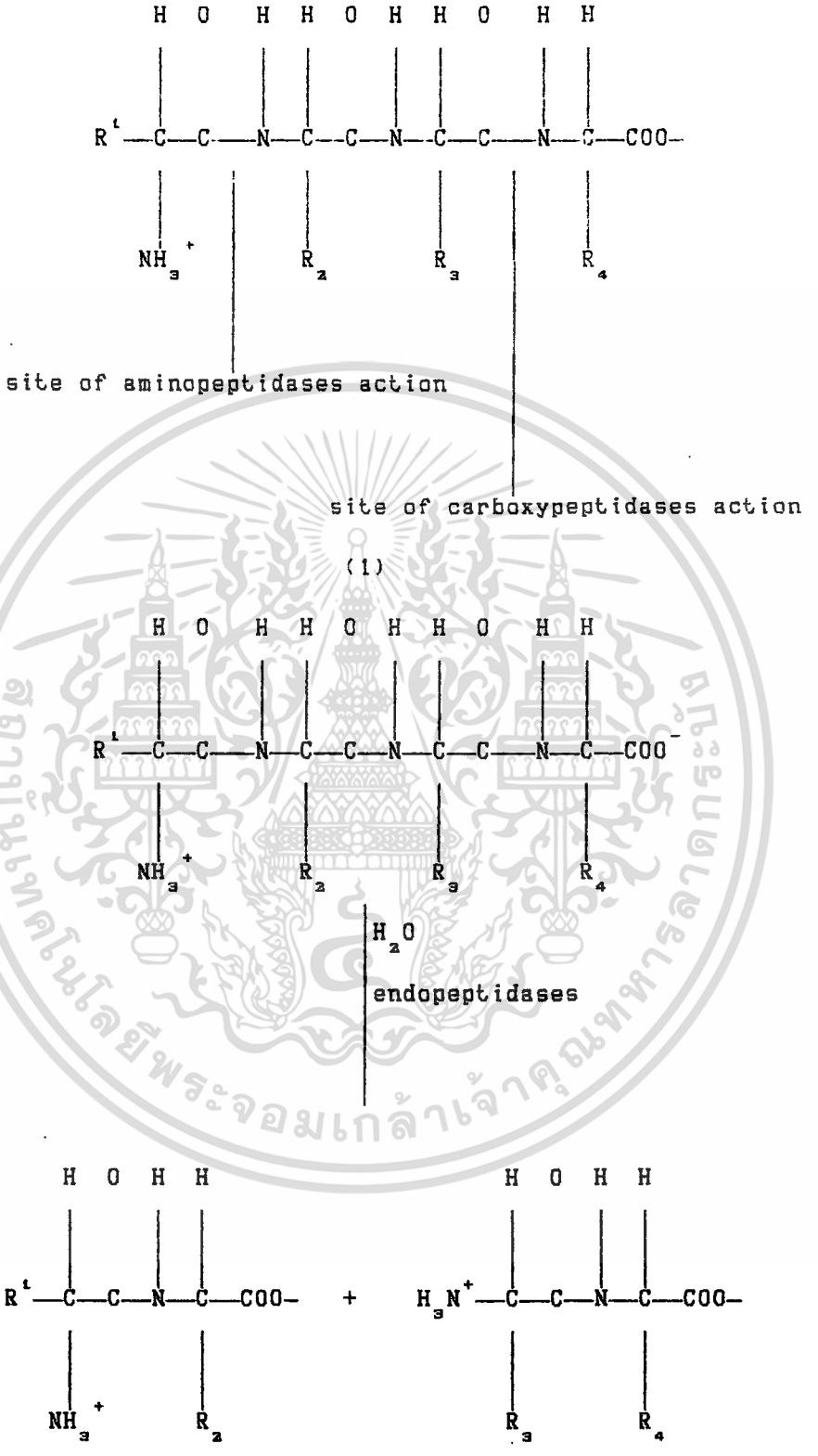
เอนไซม์ที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ

1. เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิลเท่านั้น (ภาพที่ 2.4)ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส คาร์บอกซิลเปปทิเดส และไดเปปทิเดส

2. เอนโดเปปทิเดส (Endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่งไม่เฉพาะปลายด้านทั้งสองด้านเท่านั้น(ภาพที่ 2.4) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

- โปรติเอสในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)
- โปรติเอสจากพืช เช่น ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromilain) และพิซิน (ficin)
- โปรติเอสภายในเซลล์สัตว์ เช่น คาเธปซิน (cathepsins)
- โปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด เช่น ซับทิลิซิน (subtilisin) นิวทรัลโปรติเอส(neutral proteases) และแอลคาไลโปรติเอส (alkaline proteases) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>ภาพที่ 2.4</u> การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปทิเดส (1) และเอนโดเปปทิเดส (2)

ที่มา : สมพรและสุดา (2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97048

ในกรณีที่ใช้กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเกณฑ์ จะจำแนกโปรติเอสออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ

1. ไธออลโปรติเอส (Thaiol Proteases) เป็นโปรติเอสที่มีหน่วยเร่งปฏิกิริยาเป็นหน่วยไธออล (thiol group) ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 หมู่ และถูกยับยั้งได้โดยสารประกอบที่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไธออลได้ เช่น ไอออนของโลหะหนักหรืออนุพันธ์ของไอออนโลหะหนัก สารที่มีสมบัติเติมหมู่อัลคิล (alkyl agent) และสารที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidizing agent) เป็นต้น ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ปาเปน ฟิซิน คาเธปซิน และโปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด

2. เมทัลโปรติเอส (Metal Proteases) เป็นโปรติเอสที่มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ เช่น Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งอาจยึดติดกันอย่างแน่นหนาหรือจับกันอย่างหลวมๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่เอกโซเปปติเดสเป็นส่วนใหญ่ เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปติเดส (leucine aminopeptidases) โพรลิเดส (prolidases) เป็นต้น โปรติเอสกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งเมื่อไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ถูกกำจัดไป

3. แอซิดโปรติเอส (Acid Proteases) เป็นโปรติเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในภาวะที่มี pH ในช่วงที่เป็นกรด และที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ ตัวอย่างของโปรติเอสกลุ่มนี้คือ เปปซิน และเรนนิน (renin) เป็นต้น

4. เซอรีนโปรติเอส (Serine Proteases) เป็นโปรติเอสที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีน ซึ่งถูกยับยั้งโดยสารประกอบ organophosphorus เช่น diisopropyl fluorophosphate (DFP) ตัวอย่างของโปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ทริปซิน ซับทิลิซิน และธรอมบิน (thrombin) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบันการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) นำมาประยุกต์ใช้กับการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มผลผลิต ปรับปรุงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์หรือปรับปรุงวิธีในการผลิต และการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน สามารถที่จะรักษาคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าการย่อยสลายด้วยกรดและด่าง

เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ต้องมีลักษณะทั่ว ๆ ไป คือ

- สามารถใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย
- หากผลิตได้จากจุลินทรีย์ต้องไม่มีพิษ ซึ่งจะกำหนดโดย FAO/WHO

Alcalase 2.4 L เตรียมได้จากการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) ของ *Bacillus licheniformis* สายพันธุ์เฉพาะ สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีชื่อทางการค้า คือ Alcalase 2.4 L

ตารางที่ 2.4 สมบัติทางชีวเคมีของ Alcalase ที่เตรียมได้จาก *Bacillus licheniformis*

	Alcalase
บริเวณเร่ง	serine
ถูกยับยั้งโดย	
DFP[1] & PMSF[2]	+
EDTA[3]& Phosphate	0
Soybean trypsin inhibitor	0
น้ำหนักโมเลกุล	27300

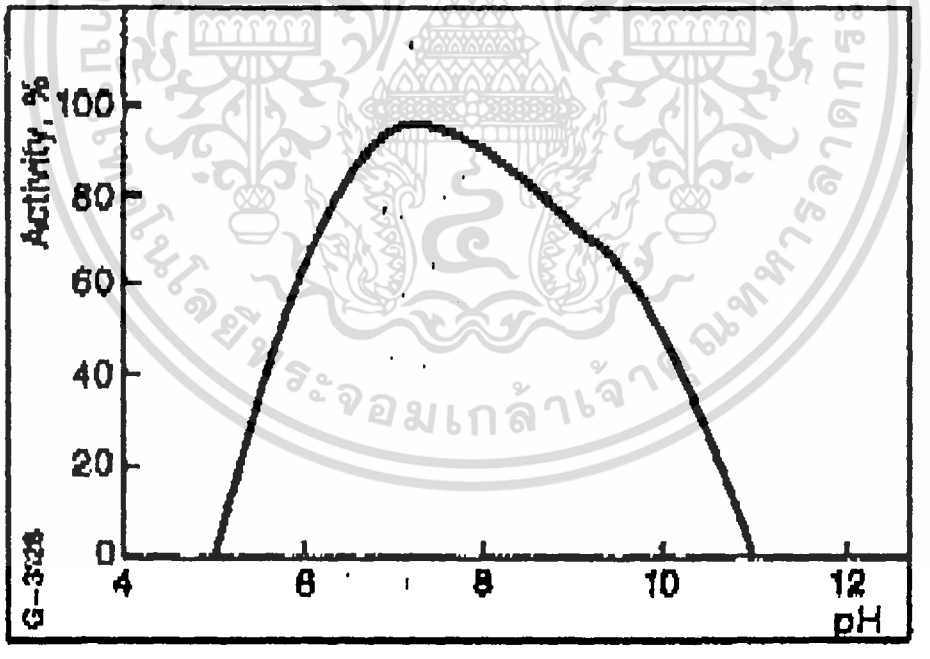
1. DFP : Diisopropyl fluorophosphate
2. PMSF : Phenylmethylsulphonylfluoride
3. EDTA : Ethylenediamine tetra-acetic acid

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alcalase 2.4 L มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีน้ำตาลอมแดง ละลายน้ำได้ดี มีความหนาแน่นประมาณ 1.18 กรัม/มิลลิลิตร มีแอคติวิตี 2.4 AU/กรัม โดยที่ 1 AU (Anson Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายฮีโมโกบิล (denatured hemoglobin) ภายใต้ภาวะที่กำหนด (25 องศาเซลเซียส pH 7.5 10 นาที) ให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ในกรดไตรคลอโรแอซิติกและเกิดสีกับฟีนอลรีเอเจนต์เท่ากับ 1 มิลลิสมมูล (milliequivalent) ของไทโรซีน แอคติวิตีของ Alcalase ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆแสดงในภาพที่ 2.5 และ 2.6 ตามลำดับ จะเห็นว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานของ Alcalase คือ อุณหภูมิ 55-70 องศาเซลเซียส ที่ pH 6.5-8.5

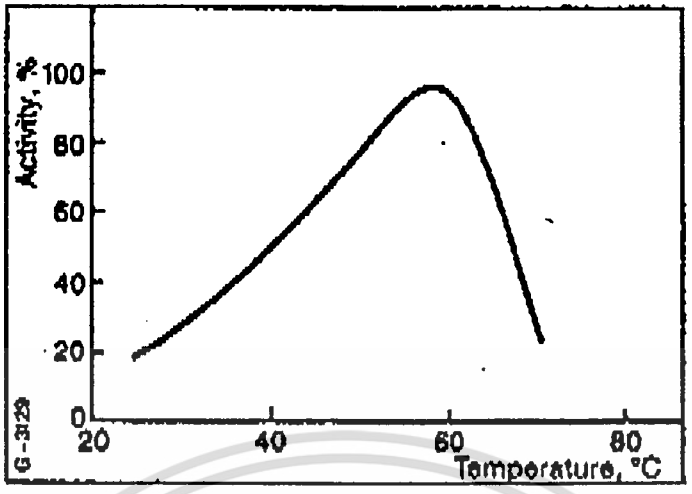
โดยทั่วไปการเก็บ Alcalase ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือนจะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี และหลังจากนั้นเอนไซม์จะมีแอคติวิตีลดลง แต่การเก็บ Alcalase ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส อายุการเก็บจะนานขึ้น โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีอย่างน้อย 1 ปี



ภาพที่ 2.5 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.06 AU/ลิตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

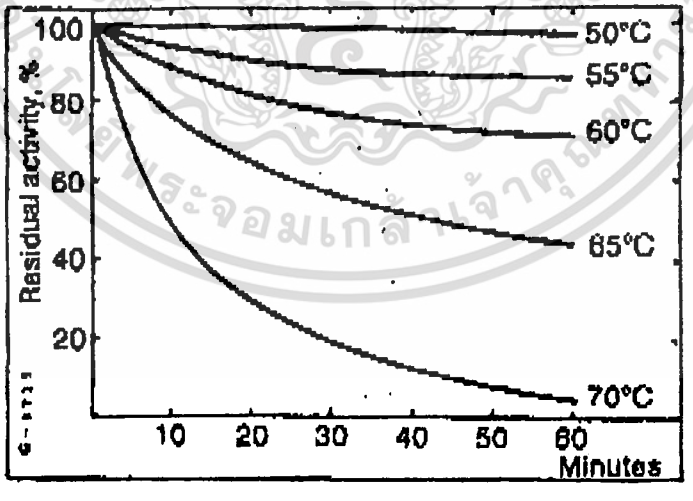
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.06 AU/ลิตร ที่ pH เท่ากับ 8

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

เสถียรภาพของ Alcalase เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆแสดงดังในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Alcalase โดยใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 2.3 AU/ลิตร ที่ pH เท่ากับ 8.5

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์

2.8.1 วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิต

การเลือกวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท จะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ คุณค่าทางโภชนาการ ราคา รสชาติ ความสามารถของแอนติเจนที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดีและสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

วัตถุดิบหรือแหล่งโปรตีนที่ใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ เคซีน เวย์โปรตีน และโปรตีนจากถั่วเหลือง นอกจากนี้อาจจะใช้เจลาติน เนื้อปลา และอัลบูมิน เป็นแหล่งวัตถุดิบก็ได้ แต่จากเหตุผลในด้านเศรษฐกิจ คุณค่าทางโภชนาการ และความเหมาะสมในเชิงปฏิบัติ การใช้เคซีน เวย์โปรตีน และโปรตีนจากถั่วเหลืองจะคุ้มค่ามากกว่า

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต คือ เอนไซม์โปรติเอส ในการย่อยสลายสับสเตรทโดยทั่วไปไม่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว แต่นิยมใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดสและเอนโดเปปติเดสผสมกัน เพื่อให้ได้กรดอะมิโน เปปไทด์ และไตรเปปไทด์ตามที่ต้องการ

แพนเครียติน (pancreatin) ที่ผลิตในทางการค้าเป็นส่วนผสมของทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งจะมีความสามารถเป็นทั้งเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส โดยที่ไคโมทริปซินและทริปซินจะมีความจำเพาะในการตัดพันธะระหว่างอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) โดยปกติแล้วเอนไซม์ที่พบในพืชและสัตว์ เช่น ปาเปน (papain) ฟิซิน (ficin) โบรมิเลน (bromilain) จะมีความจำเพาะต่อการตัดพันธะน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเอนไซที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้านั้น ต้องอาศัยการพัฒนาหาส่วนผสมของเอนไซม์ที่พอเหมาะ เพื่อให้ได้อัตราส่วนของกรดอะมิโน ไดเปปไทด์ ไตรเปปไทด์ และโอลิโกเปปไทด์ (oligopeptides) ตามต้องการ ในการเลือกว่าจะใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือจะใช้เอนไซม์ผสม จะพิจารณาได้จากความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ โดยอัตราการย่อยสลายสามารถวัดได้ด้วยอัตราส่วนของ AN (amino nitrogen) ต่อ TN (total nitrogen) คือปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และอัตราส่วนของ AN/TN สามารถหาได้จากวิธี formal

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

titration และการใช้วิธีของ kjeldahl ซึ่งถ้ามีอัตราการย่อยสลายมาก ค่า AN/TN จะมีค่าประมาณ 50 หรือมากกว่านี้ ในการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวจะมีผลทำให้เกิดการจำกัดความสามารถในการย่อยสลาย เช่น เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากพืช จะมีค่าระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุดประมาณ 35 เปอร์เซนต์เท่านั้น

The Code of Federal Regulation กำหนดให้การผลิต partially hydrolyzed protein (PHPs) จะต้องระบุทั้งแหล่งโปรตีนที่นำมาใช้ และระดับขั้นการย่อยสลาย สำหรับผลิตภัณฑ์ทุกชนิดที่ขายในรูปอาหารเสริมสุขภาพ โดยในการผลิต PHPs นี้จะต้องมีค่า AN/TN อยู่ในช่วง 2-67 เปอร์เซนต์

2.8.2 การควบคุมกระบวนการย่อยสลาย

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้า จะทำในลักษณะของกระบวนการผลิตที่ไม่ต่อเนื่อง โดยกระบวนการย่อยสลายจะควบคุมปัจจัยการย่อยสลายต่างๆ คือ อุณหภูมิ เวลา pH และ AN/TN

ภาวะในการย่อยสลายจะถูกควบคุม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติตามต้องการ เช่น มีการกระจายตัวของกรดอะมิโน สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ และปริมาณโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อยสลาย (intact protein)

อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิต จะพิจารณาจากอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 32 - 50 องศาเซลเซียส ส่วน pH จะกำหนดให้อยู่ในช่วงที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด เช่น ถ้าใช้แพนเครียติน ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 7

เวลาในการย่อยสลายจะแปรผันโดยตรงกับอัตราส่วน AN/TN ที่ต้องการ คือ ถ้าเวลาในการย่อยสลายมาก ค่า AN/TN จะมีค่าสูงมากขึ้นด้วย ดังนั้นในการผลิตจึงต้องหาความสัมพันธ์ของเวลา อุณหภูมิ อัตราส่วน AN/TN ที่เหมาะสม เพื่อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการและคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

การเลือกใช้เอนไซม์ จะพิจารณาจากประสิทธิภาพ และความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ดังนั้นในภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเอนไซม์ ปัจจัยทางเศรษฐกิจจะเป็นตัวกำหนดว่า ระหว่างการลงทุนที่มากขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สิ่งใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำให้เกิดความคุ้มค่ามากที่สุด และในการผลิตบางครั้งอาจมีการใช้โคแฟกเตอร์(cofactor) ร่วมด้วยก็ได้

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการควบคุมการย่อยสลาย คือ การควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่สับสเตรทและเอนไซม์จะต้องเก็บในภาวะปลอดเชื้อ ก่อนนำมาเข้ากระบวนการ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการ อุณหภูมิที่ใช้ก็อาจมีผลทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้สามารถแก้ไขได้ โดยการควบคุมกระบวนการต่างๆอย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะอุณหภูมิ pH รวมทั้งการทำให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้ออย่างแท้จริง

ความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท จะถูกควบคุมระหว่างปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยถูกควบคุมใน 2 ลักษณะคือ

1. ระดับขั้นการย่อยสลาย จะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยสลายและเอนไซม์จะถูกแยกออกโดยการกรองผ่าน diatomaceousr earth (DE), fiberglass depth filter, bacteria retention membrane filter และ cross flow filtratio วิธีที่นิยมใช้ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย คือ การปรับ pH และอุณหภูมิอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสชนิดนั้นมีความไวต่อการทำลายด้วยความร้อน โดยการนำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มาผ่านอุณหภูมิสูง ซึ่งจะเป็นการทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ และหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย การยับยั้งปฏิกิริยาโดยการใช้กรดไม่เป็นที่นิยมในทางการค้า เนื่องจากเมื่อหยุดปฏิกิริยาโดยปรับ pH ให้เป็นกรดต้องปรับ pH ให้กลับมาเป็นกลางอีกครั้ง ทำให้เกิดเกลือขึ้นจำนวนมากในผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องมีการสกัดแยกเกลือออกอีกครั้ง การใช้ความร้อนสูงเพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถทำลายคุณค่าทางโภชนาการ และอาจก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ เช่น ปฏิกิริยาเมลลาร์ดหรือก่อให้เกิดสารชนิดอื่นในผลิตภัณฑ์ได้ การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่ง โดยการแยกเอาเอนไซม์ออกด้วยการกรองผ่าน diatomaceous earth (DE),fiberglass depth type, microporous หรือการใช้ ultrafiltration membrane การยืนยันผลการหยุดแอคติวิตีของเอนไซม์ สามารถทำได้โดยใช้วิธี dye-gelatin test โดยใช้ปริมาณสีของเจลาตินที่เหลืออยู่ในสารละลายเป็นตัวตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือโดยตรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.3 กระบวนการผลิต

กระบวนการผลิต เช่น การใช้ผงถ่าน(charcoal treatment) การกรองโดยใช้ ultrafiltration และการทำแห้งจะมีผลต่อคุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซท รวมทั้ง กลิ่น สี รสชาติ ปริมาณกรดอะมิโน และการกระจายตัวของสารที่มีมวลโมเลกุลต่างๆ (molecular weight distribution)

2.8.3.1 การใช้ผงถ่าน

กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ในขั้นตอนการใช้ผงถ่านนี้จะทำหน้าที่แยกเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลสูง เศษโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยสลาย และสารกระตุ้นที่ทำให้เกิดอาการแพ้ออก โดยนำมาผสมกับคาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon) แล้วแยกออกโดยใช้การกรอง

คาร์บอนกัมมันต์จะดูดซับสารอินทรีย์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและสูงอย่างไม่จำเพาะ ทำให้เกิดปัญหาว่าจะมีการจับกันของพันธะอย่างไม่จำเพาะระหว่างกรดอะมิโนอิสระที่ต้องการกับเปปไทด์สายสั้นๆ จากโปรตีนไฮโดรไลเซท อย่างไรก็ตามหลังการตรวจวัดโปรตีนไฮโดรไลเซททั้งก่อนและหลังการใช้คาร์บอนกัมมันต์ สรุปได้ว่า คาร์บอนกัมมันต์ก่อให้เกิดผลเสียกับปริมาณกรดอะมิโนเพียงเล็กน้อยเท่านั้น การใช้คาร์บอนกัมมันต์ยังช่วยให้สารต่างๆเกิดการกระจายตัวอย่างเหมาะสม เนื่องจากมีการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกไป นอกจากนี้คาร์บอนกัมมันต์ยังช่วยฟอกสี ฟอกกลิ่น และช่วยกำจัดรสขมได้เล็กน้อยอีกด้วย

2.8.3.2 การกรอง (filtration/ultrafiltration)

การกรองเป็นการทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซท มีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยการแยกสารที่ไม่ละลายและเอนไซม์ที่เหลือออก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความใส สามารถทำได้โดยการแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงออกไปด้วย microsporous membrane filtration , ultrafiltration หรือ diatomaceous earth filtration และถ้าต้องการกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ก็จะใช้การกรองผ่าน bacteria retentive membrane filter

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกรองแบบ ultrafiltration เป็นที่นิยมมาก เพราะสามารถหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ เนื่องจากเป็นการแยกเอนไซม์โปรติเอสออกมา และยังช่วยให้เกิดการกระจายตัวของกรดอะมิโน และเปปไทด์สายสั้นๆ โดยไม่ต้องใช้การย่อยสลายของเอนไซม์ที่ระดับสูง โดยที่เมื่ออัตราส่วนระหว่างกรดอะมิโนอิสระ ไดเปปไทด์ ไตรเปปไทด์ มีความเหมาะสมก็จะผ่าน ultrafiltration ซึ่งใช้แยกอนุภาคในช่วง 5,000-10,000 ดาลตัน

เทคโนโลยีเมมเบรนแบบอื่นๆ ที่ใช้ควบคุมผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ reverse osmosis (RO) โดย Nakamura et al.(1993) ซึ่งใช้ RO เพื่อลดปริมาณกรดอะมิโนที่อยู่ในเคซีนไฮโดรไลเซท แต่การใช้ RO นิยมใช้ในการวิจัยมากกว่าทางการค้า

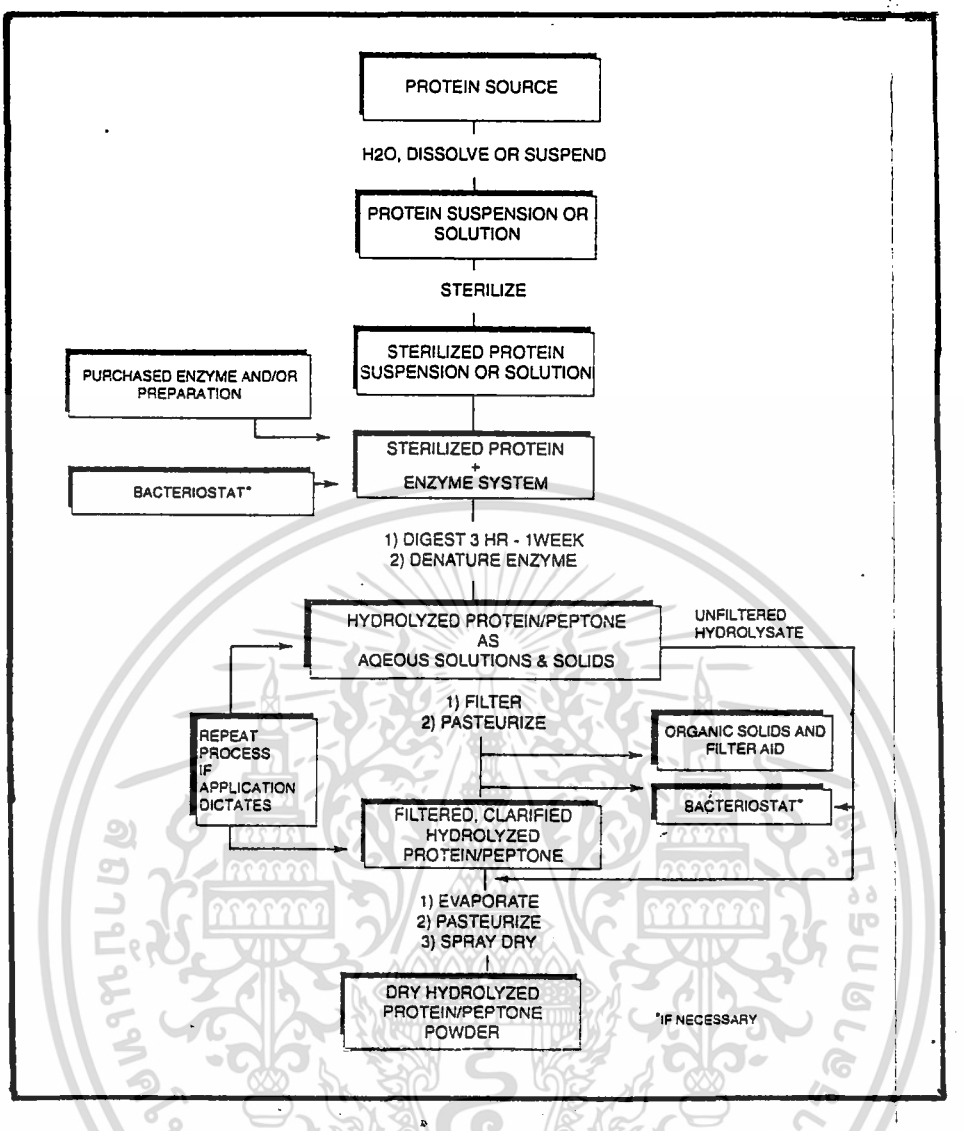
2.8.3.3 การทำแห้ง (drying)

โปรตีนไฮโดรไลเซทโดยทั่วไปนิยมผลิตในลักษณะผงแห้ง เนื่องจากผ่านการทำแห้งด้วยวิธีต่างๆ เช่น การใช้การทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) ทำแห้งแบบลูกกลิ้ง (drum/roller drying) หรือการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งแต่ละวิธีนั้นสามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นลดลงตามต้องการ

ในทางการค้านิยมใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอยมากกว่าวิธีอื่น เนื่องจากมีประสิทธิภาพและความคุ้มทุนสูง ปัจจัยสำคัญในการใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอย คือ อุณหภูมิที่ต้องมีการควบคุมให้เหมาะสม เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน(caramelization และปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard) ในการใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยทั่วไปอุณหภูมิที่เหมาะสมจะไม่ถึงอุณหภูมิพาสเจอไรส์ และไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาคาราเมลไลเซชัน และปฏิกิริยาเมลลาร์ด ถ้าผลิตภัณฑ์ถูกทำให้เย็นทันทีหลังการทำแห้ง

กระบวนการผลิตโดยสรุปของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพแสดงดังในภาพที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.8 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ

ที่มา : Lahl และ Braun (1994)

2.8.4 การประกันคุณภาพ

ปัจจัยในการควบคุมคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ จุลินทรีย์ ลักษณะทางเคมี กายภาพ ชีวเคมี และภูมิคุ้มกันวิทยา โดยจุลินทรีย์จะตรวจวัดได้จากปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทสุดท้าย ซึ่งถ้าในกระบวนการผลิตมีการควบคุมต่างๆ เช่น ขั้นตอนการกรองด้วย diatomaceous earth การใช้คาร์บอนกัมมันต์ การกรองด้วย bacteria retentive membrane filter และการบรรจุอย่างถูกสุขลักษณะ ก็จะทำให้จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์มีปริมาณลดลง นอกจากนี้การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทก็ต้องมีการควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณเอนโดทอกซินให้มีค่าน้อยที่สุด โดยการตรวจสอบด้วยวิธี Limulus Amoebocyte Assay (LAL) ซึ่งจากการทดสอบด้วยวิธี LAL นี้ พบว่าการกรองผ่าน diatomaceous earth เพียงครั้งเดียวสามารถลดระดับ pyrogen จาก 100 LAL units จนเหลือ 25 LAL units ซึ่งเป็นระดับที่ยอมรับได้ในการหมักทางเภสัชวิทยา แต่ในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทต้องมีการกรองอีกครั้ง โดยอาจจะใช้ diatomaceous earth คาร์บอนกัมมันต์ หรือใช้การกรองแบบ ultrafiltration ก็ได้

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้น สามารถใช้วัตถุดิบได้จากหลายๆแหล่ง เช่น จากเคซีน เวย์ ถั่วเหลือง หรืออาจจะใช้ร่วมกันก็ได้ จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้มีค่าคงที่เสมอ เช่น มีการเติมเหล็กหรือแคลเซียม เพื่อรักษาความสม่ำเสมอของแร่ธาตุในผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

องค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเซทก็คือ กรดอะมิโน เนื่องจากกรดอะมิโนเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะการย่อยสลาย และกระบวนการผลิตว่ามีความเหมาะสมเพียงใด โดยการใช้ High-performance liquid chromatography (HPLC) ในการติดตามปริมาณกรดอะมิโนว่ามีเพียงพอกับความต้องการของร่างกายหรือไม่ และควรจะมีการติดตามปริมาณกรดอะมิโนในทุกๆแบทช์ (batch) ที่ผลิตอีกด้วย นอกจากนี้ ปริมาณแอมโมเนียก็จะมีการตรวจวัดในรูปของค่าระดับขั้นการย่อยสลาย (DH) ส่วนการกำหนดน้ำหนักและขนาดของโมเลกุลสามารถทำได้โดยการใช้ Size-exclusion chromatography หรือ Gel-permeation chromatography ก็ได้

ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นผลิตขึ้นสำหรับผู้เป็นโรคภูมิแพ้ จะมีการติดตามค่าความสามารถของแอนติเจนที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างแอนติบอดี (antigenicity) โดยวิธี Enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี Elisa นี้สามารถใช้แสดงค่า epitopes (antigenic determinant) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทระหว่างการผลิต และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ โดยที่ผลการทดสอบจะแสดงในรูปค่า antigenic equivalent นอกจากวิธี Elisa นี้แล้ว การหาค่าความสามารถในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกัน(immunogenicity) ยังทำได้โดยการทดสอบกับหนูตะเภาโดยใช้วิธีทดสอบด้วยเปปโตน (peptone test) ได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Alcalase 2.4 L

Neutrase 0.5 L

Bromocresol green

Copper sulphate

Formaldehyde

Hexane

Kieselguhr

Magnesiumoxide

Methylred

Potassium sulphate

Petrolium ether

Sulfuric acid

Sodium hydroxide

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Buchi 321)

ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus)

ตู้อบ (Hot air oven)

เตาเผา (Muffle furnace)

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่องวัด pH (pH meter)

เครื่องชั่งละเอียด

เครื่องชั่งหยาบ

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ คือ เศษกระดูกไก่ที่บดละเอียดซึ่งได้จากเครื่องถอดกระดูก (Deboner) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทไก่สดศรีไทย จำกัด

3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้าของเศษกระดูกไก่บดละเอียดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ตามวิธี AOAC (1980) ดังแสดงในภาคผนวก ก

3.3.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบ

3.3.2.1 การหาปริมาณไขมันที่สกัดได้

นำเศษกระดูกไก่บดละเอียดมาแช่ในตัวทำละลายเฮกเซน ในอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อเฮกเซน ตามอัตราส่วนที่ต้องการในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดปากขวดด้วยจุกยาง นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ควบคุมเวลาตามต้องการ รินตัวทำละลายเฮกเซนออก ใส่ถ้วยอะลูมิเนียมที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน ล้างเศษกระดูกไก่ด้วยตัวทำละลายเฮกเซนเล็กน้อย รินรวมลงในถ้วยอะลูมิเนียม ระเหยตัวทำละลายเฮกเซนออกและนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นภายในภาชนะกันความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณไขมันที่สกัดได้

3.3.2.2 ศึกษาอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน และเวลาในการสกัดที่เหมาะสม

ทดลองสกัดไขมันจากเศษกระดูกไก่ตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 โดยแช่กระดูกไก่บดละเอียดในตัวทำละลายเฮกเซน ด้วยอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฮกเซน 3 ระดับ คือ 1:1 , 1:1.5 และ 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้เวลาในการสกัด 4 ระดับ คือ 5, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง เลือกอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน และเวลาในการสกัดที่เหมาะสม โดยวิเคราะห์ผลจากเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3x4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

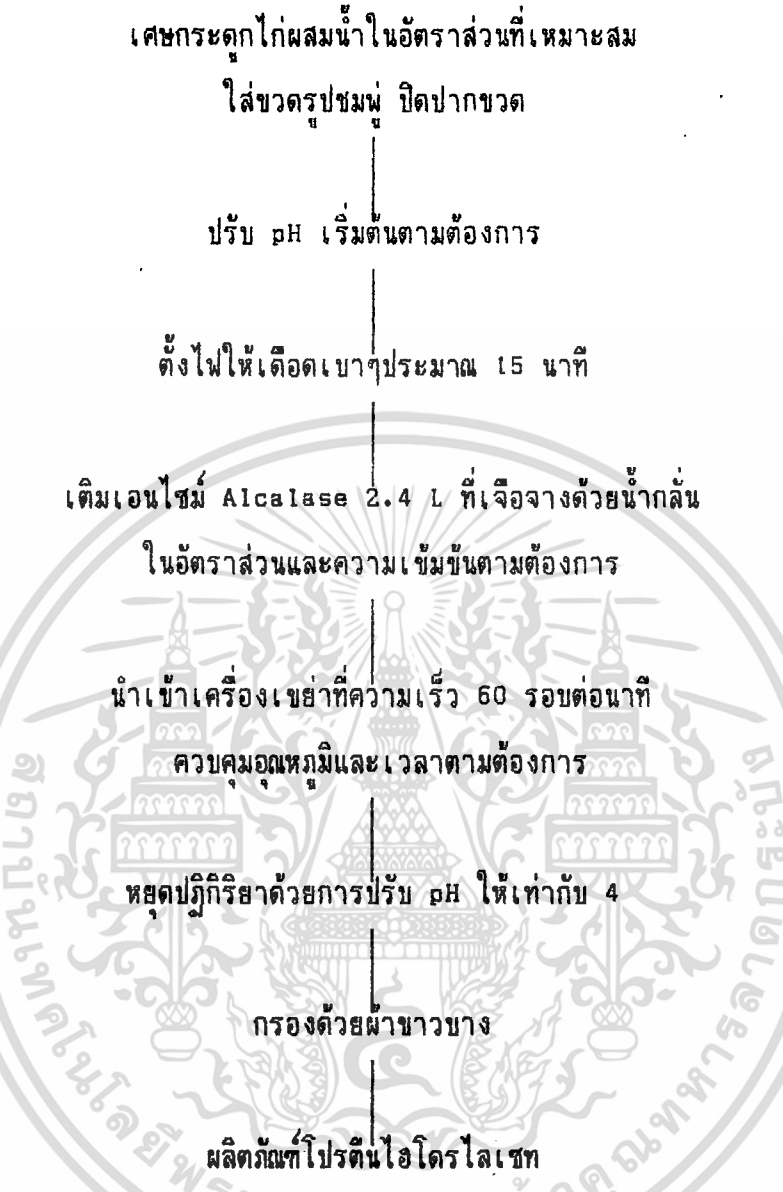
3.3.2.3 การเตรียมวัตถุดิบ

นำเศษกระดูกไก่ที่ขจัดไขมันออกได้มากที่สุดจากข้อ 3.3.2.2 ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.3.3 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

นำเศษกระดูกไก่บดละเอียดซึ่งสกัดไขมันออกบางส่วน และทำแห้งตามวิธีทดลองในข้อ 3.3.2.3 ผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นตามต้องการ ปิดปากขวดด้วยอะลูมิเนียมฟอยล์จนแน่น ตั้งไฟจนเดือดเบาๆ 15 นาที ทำให้เย็นถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นเติมเอนไซม์ Alcalase 2.4 L ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:8 ความเข้มข้นที่ต้องการ นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 60 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามต้องการ หยุดปฏิกิริยาโดยการปรับ pH ให้เท่ากับ 4 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลาร์ ขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวแสดงดังภาพที่ 3.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3.1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้เอนไซม์ Alcalase

3.3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

3.3.4.1 ศึกษาอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้เอนไซม์ Alcalase 2.4 L ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กำหนด pH และอุณหภูมิเท่ากับ 7 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ใช้เวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง เลือกอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3x5 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.3.4.2 ศึกษา pH และอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยกำหนดอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4.1 และแปรอุณหภูมิในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส แปรค่า pH 4 ระดับ คือ 7, 8, 9 และ 10 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริก กำหนดระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา 1 ชั่วโมง เลือกอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอลฟาอะมิโนไนโตรเจนและระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 5x4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

3.3.4.3 ศึกษาเวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยกำหนดอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4.1 ปรับ pH เริ่มต้น และควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการย่อยสลาย ตามผลการทดลองในข้อ 3.3.4.2 แปรเวลาในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 30, 60, 90, 120 และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

150 นาที โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด แอลฟา-อะมิโนไนโตรเจนและระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ภาวะที่เหมาะสม เลือกจากเวลาที่น้อยที่สุด แต่มีค่าระดับขั้นการย่อยสลายมากที่สุด

3.3.5 การวิเคราะห์วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.1,3.3.4.2 และ 3.3.4.3 แล้วนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาวิคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ตามวิธี AOAC(1980) หาปริมาณของแข็งทั้งหมด และวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Plate Count) และหา *salmonella* ตามวิธีในภาคผนวก ก

3.3.6 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 15 คน ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านรสเค็มและรสขมโดยใช้วิธี Scoring Test แบบ 6 ระดับคะแนน ดังต่อไปนี้

ไม่ ขม/เค็ม เลย	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	0
ขม/เค็ม น้อยมาก	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	1
ขม/เค็ม เล็กน้อย	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	2
ขม/เค็ม ปานกลาง	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	3
ขม/เค็ม มาก	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	4
ขม/เค็ม มากที่สุด	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7 การเปรียบเทียบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบ ที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L

ทดลองผลิตข้าวเกรียบโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L กับ Neutrase 0.5 L เป็นส่วนผสม และข้าวเกรียบที่เป็นตัวอย่างควบคุม โดยมีส่วนผสมดังตารางที่ 3.1 และวิธีทำดังข้อ 3.3.7.1

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมในการผลิตข้าวเกรียบปรุงรส

ตัวอย่าง	ส่วนผสม (g)						
	แป้งมันสำปะหลัง	น้ำตาล	เกลือ	พริกไทย	กระเทียม	น้ำ	โปรตีนไฮโดรไลเซท
A	150.0	4.5	4.5	3.6	4.2	87.5	-
B	150.0	4.5	4.5	3.6	4.2	50.0	52.5[1]
C	150.0	4.5	4.5	3.6	4.2	50.0	52.5[1]

1. A หมายถึง ข้าวเกรียบที่เป็นตัวอย่างควบคุม
   B หมายถึง ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase
   C หมายถึง ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Neutrase
2. สัญลักษณ์ 1 หมายถึง ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ใช้เป็น 35 เปอร์เซนต์ของน้ำหนักแป้ง

3.3.7.1 วิธีทำข้าวเกรียบปรุงรส

ชั่งส่วนผสมตามตารางที่ 3.1 หลังจากนั้นแบ่งแป้งมา 30 กรัม ผสมกับกระเทียม พริกไทยที่โขลกละเอียด น้ำตาล เกลือ เติมน้ำเล็กน้อย นำไปตั้งไฟอ่อนๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันจนรวมตัวเป็นมวลเหนียว ต่อจากนั้นนวดผสมกับแป้งที่เหลือ น้ำ และโปรตีนไฮโดรไลเซท จนเนื้อแป้งมีลักษณะเนียน ไม่ติดมือ ปั้นตามขนาดที่ต้องการ นำไปนึ่ง 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แล้วพักทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน นำแป้งที่ได้มาหั่นเป็นชิ้นบางๆ อบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ก็จะได้ข้าวเกรียบปรุงรสตามต้องการ

ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 15 คน ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นไก่ รสชาติ และการยอมรับโดยรวม โดยใช้ Hedonic Scale แบบ 7 ระดับคะแนน ดังนี้

ชอบมาก	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	7
ชอบปานกลาง	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	6
ชอบเล็กน้อย	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	5
เฉยๆ	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	4
ไม่ชอบเล็กน้อย	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	3
ไม่ชอบปานกลาง	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	2
ไม่ชอบเลย	ให้ระดับคะแนนเท่ากับ	1

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง คือ เศษกระดูกไก่จากเครื่องถอดกระดูก จาก บริษัทไก่สดศรีไทย จำกัด นำมาบดด้วยเครื่องบด (chopper) อีกครั้ง ก่อนนำมาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่

องค์ประกอบทางเคมี	% น้ำหนักเปียก	% น้ำหนักแห้ง
ความชื้น	48.22	-
โปรตีน	18.94	36.58
ไขมัน	17.08	32.98
เถ้า	5.82	11.39

4.2 การเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

จากการทดลองสกัดไขมันออกจากเศษกระดูกไก่ตามวิธีทดลองในข้อ 3.3.2.1 โดยใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน 3 ระดับ คือ 1:1, 1:1.5 และ 1:2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้เวลาในการสกัด 4 ระดับ คือ 5, 15, 25 และ 35 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ผลจากเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้ ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้ เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซนและเวลาในการสกัดต่างๆ

อัตราส่วนเศษกระดูกไก่:เฮกเซน (% W/V)	เวลาในการสกัด (ชั่วโมง)	เปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้
1:1	5	1.89
	15	2.20
	25	3.10
	35	3.41
1:1.5	5	1.84
	15	2.43
	25	2.99
	35	3.37
1:2	5	1.94
	15	2.59
	25	2.96
	35	3.65

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซนไม่มีผลต่อเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้ แต่เวลาที่ใช้ในการสกัดไขมัน มีผลต่อเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้

Source of Variance	df	MS	Fcal
A	2	0.04	1.00
B	3	2.89	79.80*
A x B	6	0.04	1.00
Error	12	0.04	

1. A หมายถึง อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน
   B หมายถึง เวลาในการสกัด
2. สัญลักษณ์ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

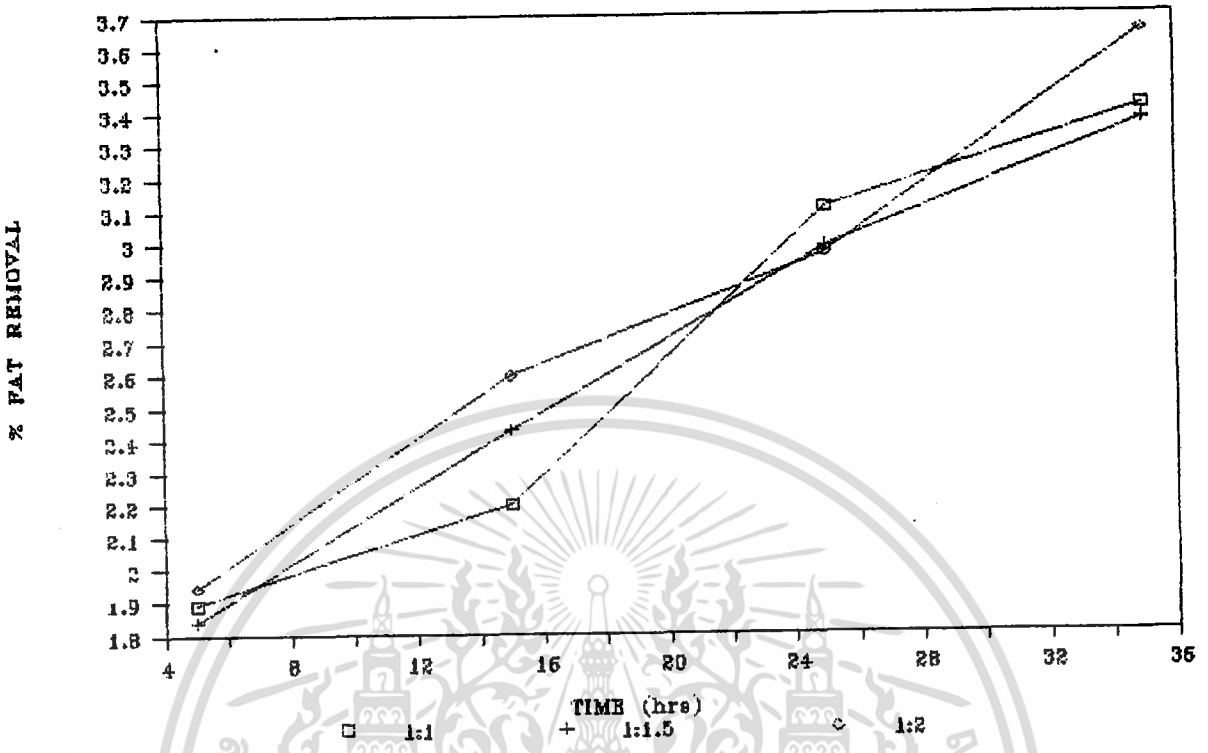
เนื่องจากเวลาในการสกัดไขมัน มีผลต่อเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบปริมาณไขมันที่สกัดได้เฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test จึงพิจารณาเพียงปัจจัยเดียว ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์ไขมันที่สกัดได้ เมื่อใช้เวลาในการสกัดไขมันต่างๆ

เวลาในการสกัดไขมัน(ชั่วโมง)	ไขมัน(%)
5	1.89[d]
15	2.41[c]
25	3.02[b]
35	3.48[a]

a,b,c,d ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p \leq 0.05$)

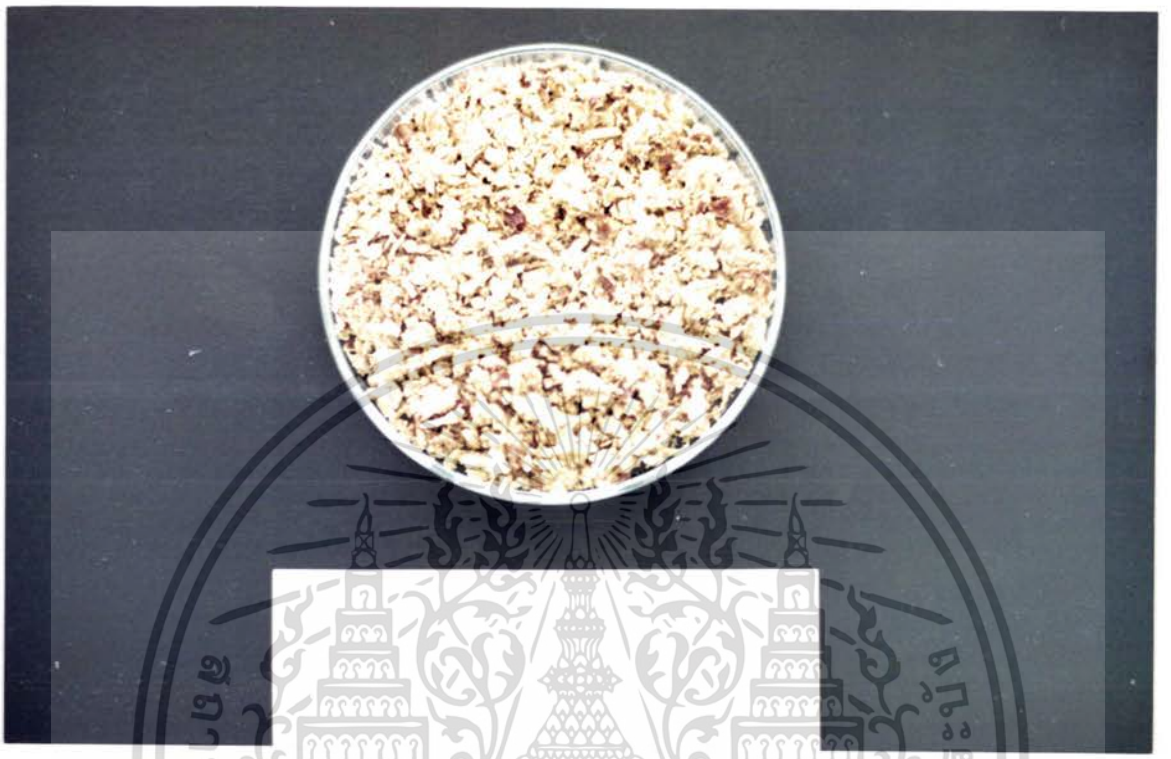
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 ปริมาณไขมันเฉลี่ยที่สกัดได้จากเศษกระดูกไก่ เมื่อใช้อัตราส่วนระหว่างเศษกระดูกไก่ต่อเฮกเซนและเวลาในการสกัดต่างๆ

จากตารางที่ 4.4 และภาพที่ 4.1 จะเห็นว่าที่เวลาในการสกัดเท่ากับ 35 ชั่วโมง จะสามารถสกัดไขมันจากเศษกระดูกไก่ได้สูงสุดคือ 3.42 เปอร์เซนต์และจากการที่อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน ไม่มีผลต่อปริมาณไขมันที่สกัดได้ จึงเลือกอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน ในสภาวะที่ต่ำสุด คือ 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมวัตถุดิบ โดยสกัดไขมันออกบางส่วน คืออัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซนที่ 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและเวลาในการสกัด 35 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 เศษกระดูกไก่บดละเอียดอบแห้งที่ผ่านการกำจัดไขมันออกบางส่วน

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

4.3.1 อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีทดลองข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 1:3, 1:4 และ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้เอนไซม์ Alcalase 2.4 L ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 ที่มีความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาวิเคราะห์หา ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณค่าระดับขั้นการย่อยสลาย ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

อัตราส่วนเศษกระดูกไก่:น้ำ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (%)	ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
1:3	0.1	1.47	8.48	17.33
	0.3	1.78	9.70	18.41
	0.5	1.68	9.70	17.30
	0.7	1.61	7.54	21.88
	1.0	1.77	8.69	20.37
1:4	0.1	1.59	5.43	29.51
	0.3	1.81	6.78	26.76
	0.5	1.92	7.28	26.39
	0.7	1.67	6.78	24.67
	1.0	2.01	7.28	27.65
1:5	0.1	1.45	4.85	30.04
	0.3	1.60	5.36	29.82
	0.5	1.72	5.75	30.00
	0.7	1.98	6.27	31.61
	1.0	1.93	7.03	27.44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลาย แต่อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่างๆ

Source of Variance	df	MS	Fcal
A	2	309.59	40.81*
B	4	1.63	0.21
A x B	8	8.61	1.13
Error	15	7.58	

1. A หมายถึง อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ
   B หมายถึง ความเข้มข้นของเอนไซม์
2. สัญลักษณ์ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ($P \leq 0.05$)

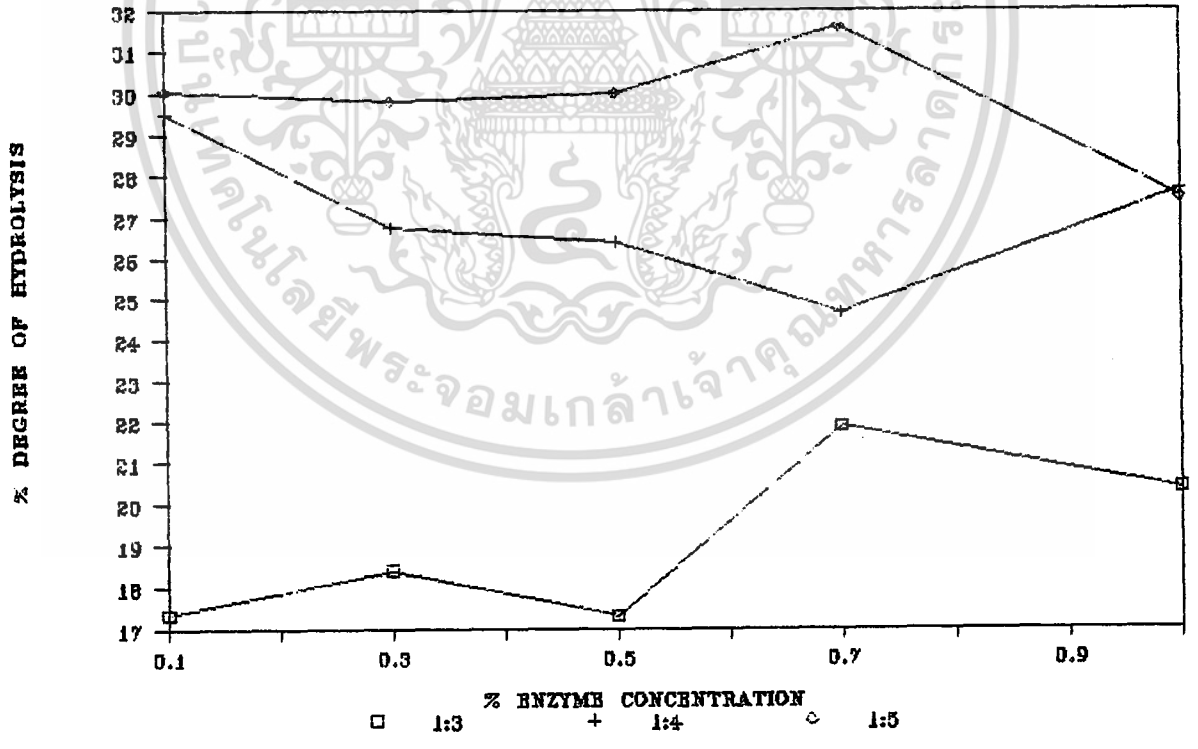
เนื่องจากอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test จึงพิจารณาเพียงปัจจัยเดียว ดังตารางที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำต่างๆกัน

อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ (% W/V)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
1:3	19.05[c]
1:4	27.00[b]
1:5	29.78[a]

a,b,c ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.3 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเศษกระดูกไก่เฉลี่ยที่อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

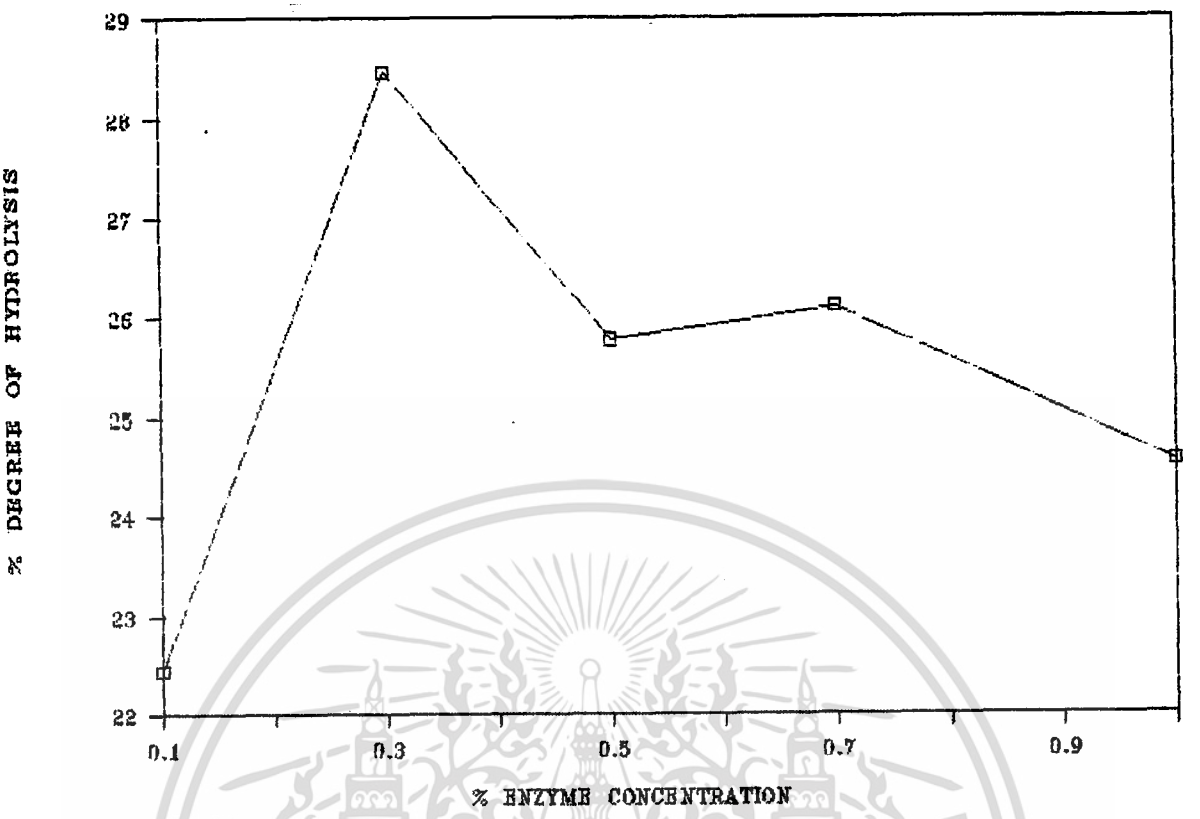
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.3 จะเห็นว่าอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเท่ากับ 1:5 จะให้ระดับการย่อยสลายเฉลี่ยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ พบว่าค่าระดับขั้นการย่อยสลายมีแนวโน้มคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากการเจือจางเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 และแปรความเข้มข้นในการย่อยสลายเศษกระดูกไก่ 6 ระดับ คือ 0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรนั้น เอนไซม์ยังคงมีความเข้มข้นสูงเกินพอจึงให้ค่าระดับการย่อยสลายไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการทดลองหาความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสมอีกครั้ง จึงเลือกใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเท่ากับ 1:5 และทำการเจือจางเอนไซม์ Alcalase 2.4 L ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:8 โดยแปรค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ 5 ระดับ คือ 0.1,0.3,0.5,0.7 และ 1.0 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แสดงผลดังตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.4

ตารางที่ 4.8 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

อัตราส่วนเศษกระดูกไก่:น้ำ (%W/V)	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (%)	ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
1:5	0.1	1.52	6.77	22.44
	0.3	1.70	5.88	28.45
	0.5	1.81	7.03	25.77
	0.7	1.90	7.03	27.09
	1.0	1.84	7.47	24.56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ย ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) แสดงผลดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำต่างๆกัน

Source of Variance	df	SS	MS	Fcal
ความเข้มข้นของเอนไซม์	4	42.93	10.73	2.01
Within Treatment	5	26.63	5.34	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากภาพที่ 4.4 และตารางที่ 4.9 จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.3 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีแนวโน้มให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase 2.4 L (เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:8) ที่ 0.3 เปอร์เซนต์ ในการทดลองต่อไป

4.3.2 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสม

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 โดยแปรค่าอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 40, 45, 50, 55 และ 60 องศาเซลเซียส แปรค่า pH 4 ระดับ คือ 7, 8, 9 และ 10 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้แต่ละสภาวะการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณหาระดับขั้นการย่อยสลาย โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.10

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าทั้งค่า pH เริ่มต้นและอุณหภูมิ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและ pH เริ่มต้นต่างๆ

อุณหภูมิ	pH	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน(g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด(g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
40	7	1.50	4.09	36.83
	8	1.50	4.15	36.24
	9	1.57	4.98	31.55
	10	1.57	4.60	34.16
45	7	1.47	3.96	37.20
	8	1.47	4.21	34.94
	9	1.44	4.47	29.30
	10	1.57	4.60	31.31
50	7	1.50	4.85	31.02
	8	1.57	4.85	32.36
	9	1.64	4.98	32.83
	10	1.64	5.49	29.78
55	7	1.50	5.11	29.40
	8	1.64	5.30	30.82
	9	1.50	5.43	27.72
	10	1.57	5.24	30.01
60	7	1.28	5.56	22.97
	8	1.57	6.00	26.16
	9	1.64	6.26	26.13
	10	1.64	5.75	28.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

Source of Variance	df	MS	Fcal
A	4	93.29	92.70*
B	3	12.54	12.47*
A x B	12	10.37	10.31*
Error	2	1.00	

1. A หมายถึง อุณหภูมิ
   B หมายถึง pH เริ่มต้น
2. สัญลักษณ์ * หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

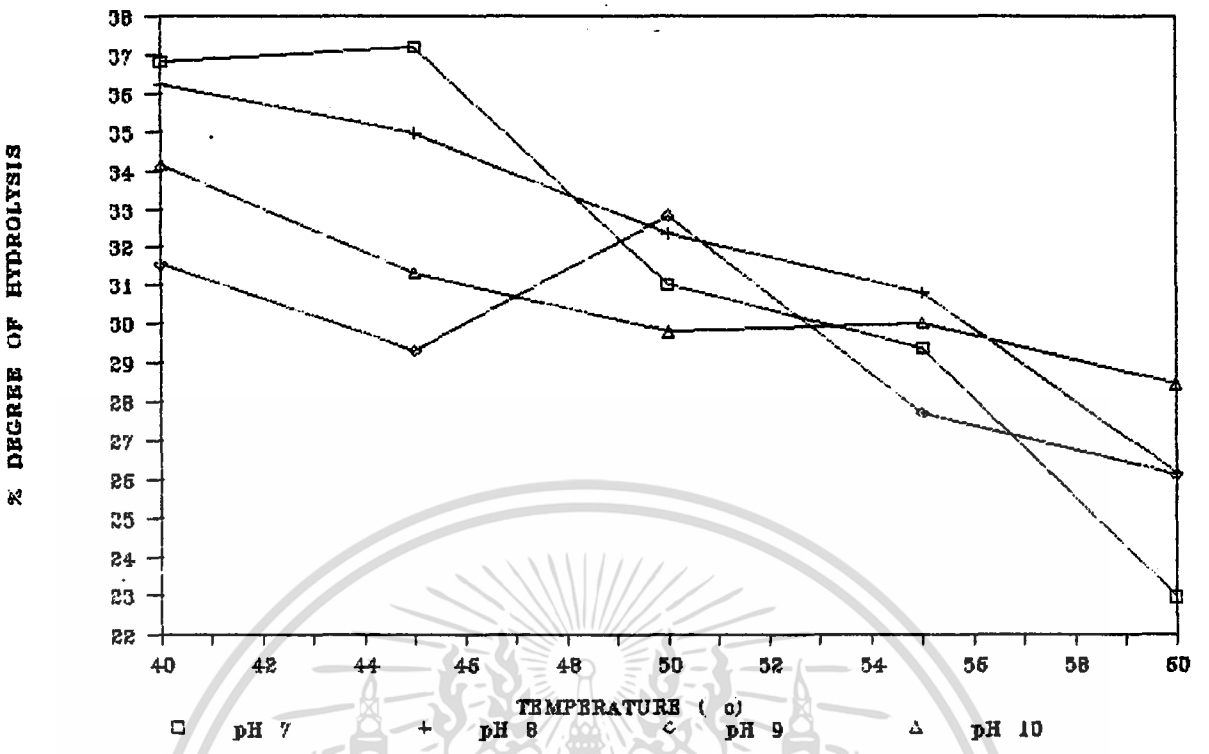
เนื่องจากอุณหภูมิและ pH มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test จึงพิจารณาร่วมกันทั้งสองปัจจัย ดังตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อุณหภูมิและค่า pH เริ่มต้นต่างๆ

อุณหภูมิ	pH	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
40	7	1.50	4.09	36.83^{ab}
	8	1.50	4.15	36.24^{bc}
	9	1.57	4.98	31.55^{fg}
	10	1.57	4.60	34.16^{cde}
45	7	1.47	3.96	37.20^{a}
	8	1.47	4.21	34.94^{bcd}
	9	1.44	4.47	29.30^{gh}
	10	1.57	4.60	31.31^{fg}
50	7	1.50	4.85	31.02^{fg}
	8	1.57	4.85	32.36^{ef}
	9	1.64	4.98	32.83^{def}
	10	1.64	5.49	29.78^{gh}
55	7	1.50	5.11	29.40^{gh}
	8	1.64	5.30	30.82^{fg}
	9	1.50	5.43	27.72^{hi}
	10	1.57	5.24	30.01^{gh}
60	7	1.28	5.56	22.97^{j}
	8	1.57	6.00	26.16^{i}
	9	1.64	6.26	26.13^{i}
	10	1.64	5.75	28.45^{h}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิและ pH เริ่มต้นต่างๆ

จากตารางที่ 4.12 และภาพที่ 4.5 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด คือ 37.20 และ 36.83 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณา ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ซึ่งแสดงถึงปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งแสดงถึงโปรตีนที่ถูกสกัดออกมา พบว่าอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และpHเริ่มต้นเท่ากับ 7 จะมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และpHเริ่มต้นเท่ากับ 7 นอกจากนี้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยังมีข้อได้เปรียบกว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นการประหยัดพลังงาน ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และpHเริ่มต้นของเศษกระดูกไก่เท่ากับ 7 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.3.3 เวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสม

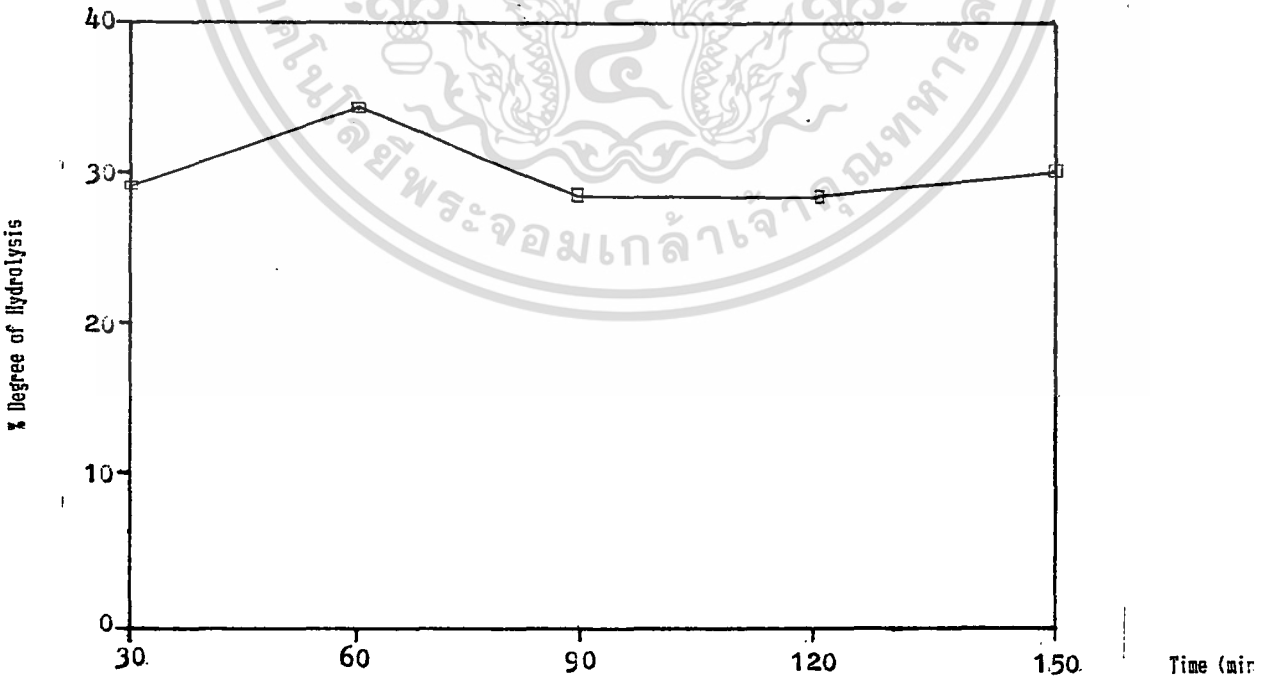
จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 โดยแปรระยะเวลาในการย่อยสลาย คือ 30,60,90,120 และ 150 นาทีตามลำดับ โดยใช้อัตรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเท่ากับ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และควบคุมให้เกิดการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้แต่ละสภาวะการทดลองไปวิเคราะห์หา ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณหาระดับขั้นการย่อยสลาย โดยผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.13 และภาพที่ 4.6

ตารางที่ 4.13 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆกัน

เวลา (นาที)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
30	0.95	3.19	29.71
60	1.34	3.96	34.69
90	1.21	4.21	28.72
120	1.24	4.34	28.63
150	1.24	4.21	30.12



ภาพที่ 4.6 เปอร์เซนต์ระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยที่ระยะเวลาต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายเศษกระดูกไก่ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายที่เวลาต่างๆ

Source of Variance	df	MS	Fcal
เวลา	4	12.43	8.63*
Within Treatment	5	1.44	

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆกัน โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.15

ตารางที่ 4.15 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ

เวลา (นาที)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
30	0.95	3.19	29.71[b]
60	1.34	3.96	34.69[a]
90	1.21	4.21	28.72[b]
120	1.24	4.34	28.63[b]
150	1.24	4.21	30.12[b]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.15 และภาพที่ 4.6 พบว่าเวลาในการย่อยสลาย 60 นาที จะให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด คือ 34.69 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจึงเลือกสภาวะดังกล่าวในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

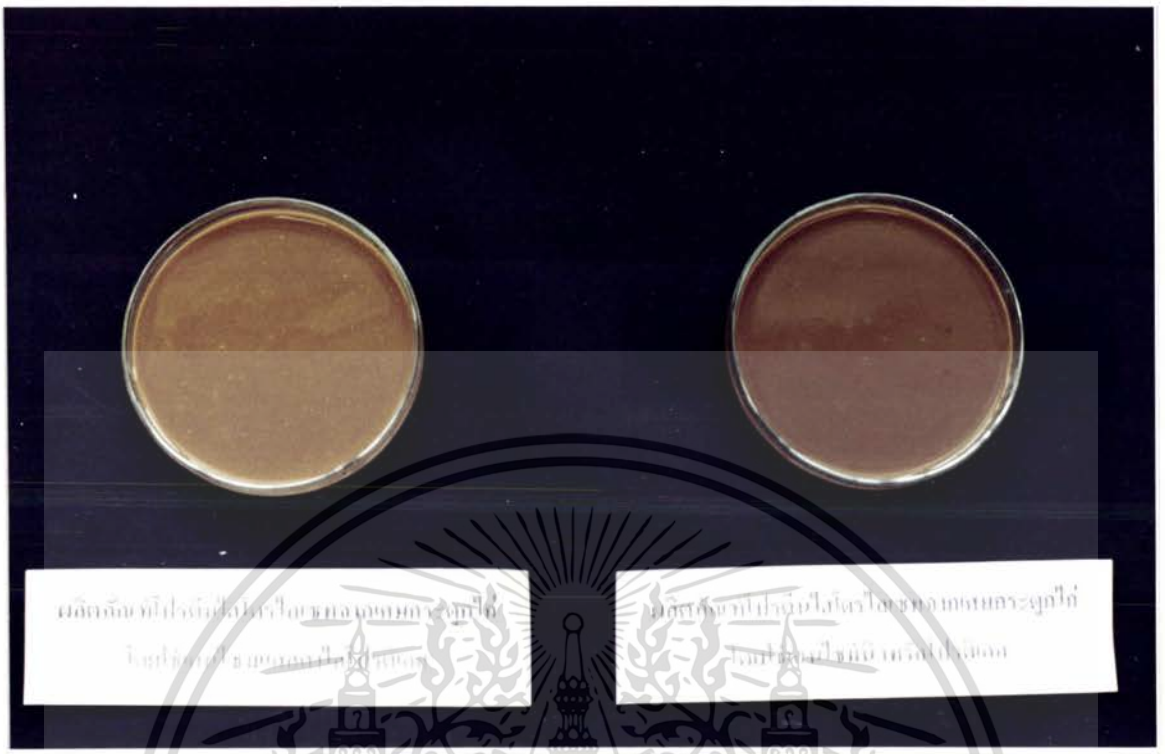
4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จากการย่อยสลายเศษกระดูกไก่ด้วยเอนไซม์ Alcalase ระเหยน้ำออก จนได้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของเหลวข้น ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด 38.40 เปอร์เซนต์ มีองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาดังแสดงในตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทในรูปของเหลวข้น

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	48 22
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	38.40
โปรตีน	32.98
ไขมัน	11.39
เถ้า	36.58
Total plate count	< 10 CFU/ml
Salmonella	ไม่พบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทในรูปของเหลวข้นที่ผลิตจากเศษกระดูกไก่โดยใช้เอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

4.5 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ของโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ผลิตได้จากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

จากการทดลองในข้อ 3.3.6 โดยทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase ในด้านรสเค็มและรสขม โดยใช้วิธี Scoring Test แบบ 6 ระดับคะแนน ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.17 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

โปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ผลิตจากเอนไซม์	คะแนนเฉลี่ย	
	รสเค็ม	รสขม
Alcalase 2.4 L	3.1[a]	2.8[a]
Neutrase 0.5 L	1.2[b]	2.3[a]

a,b คะแนนเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) ในด้านรสขม แต่ในด้านรสเค็ม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) โดยที่โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase จะมีรสเค็มมากกว่าที่ผลิตจากเอนไซม์ Neutrase ทั้งนี้เนื่องจากในการยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ Neutrase สามารถทำได้โดยใช้อุณหภูมิสูงแต่เอนไซม์ Alcalase เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนสูงจึงต้องยับยั้งปฏิกิริยา โดยการปรับ pH เป็นกรด ทำให้ต้องปรับ pH ให้เป็นกลางกลับคืนโดยใช้ HCl ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยใช้ NaOH จึงเกิดปฏิกิริยาสะเทินระหว่าง NaOH และ HCl ดังสมการ $NaOH+HCl \text{ ---- } NaCl+H_2O$ เป็นผลทำให้เกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งให้รสเค็มในผลิตภัณฑ์

4.6 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบ ที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

จากการทดลองในข้อ 3.3.7 โดยทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่นไก่ รสชาติ และการยอมรับโดยรวม โดยใช้ Hedonic scale แบบ 7 ระดับคะแนน ให้ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.18

ตารางที่ 4.18 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบ ที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

ข้าวเกรียบ	คะแนนเฉลี่ย				
	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่นไก่	รสชาติ	การยอมรับโดยรวม
A	4.5[a]	4.0[a]	4.1[b]	4.7[a]	4.7[a]
B	5.2[a]	5.0[a]	5.4[a]	5.3[a]	5.3[a]
C	3.9[a]	4.8[a]	5.3[a]	5.7[a]	5.4[a]

1. A หมายถึง ข้าวเกรียบที่เป็นตัวอย่างควบคุม
   B หมายถึง ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase
   C หมายถึง ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Neutrase
2. a,b คะแนนเฉลี่ยตามแนวตั้งที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.18 จะเห็นได้ว่า ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และเอนไซม์ Neutrase ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ข้าวเกรียบที่มีส่วนผสมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีคุณภาพในด้านกลิ่นไก่มากกว่า แต่คุณภาพด้านอื่นไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 ข้าวเกรียบปรุงรสที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่บดละเอียดพบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ คือ โปรตีน 32.98 เปอร์เซนต์ ไขมัน 11.39 เปอร์เซนต์ เถ้า 36.58 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนักแห้ง และมีความชื้น 48.22 เปอร์เซนต์

ในการเตรียมวัตถุดิบขั้นต้น โดยสกัดไขมันออกบางส่วนด้วยตัวทำละลายเฮกเซน พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลายเฮกเซน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้เวลาในการสกัด 35 ชั่วโมง ซึ่งสามารถสกัดไขมันออกได้เท่ากับ 3.42 เปอร์เซนต์ และเศษกระดูกไก่ที่ได้มีไขมันเป็นองค์ประกอบเท่ากับ 2.45 เปอร์เซนต์

เมื่อนำวัตถุดิบที่ได้มาทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase 2.4 L พบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 1:5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:8 ที่ความเข้มข้น 0.3เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการย่อยสลาย 40 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่าระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยเท่ากับ 34.69 เปอร์เซนต์ แผนภาพการผลิตโปรตีนที่เหมาะสมสรุปได้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เศษกระดูกไก่อบแห้งที่ผ่านการสกัดไขมันแล้ว

ผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:5

ปรับpHเริ่มต้นเท่ากับ 7

ตั้งไฟจนเดือดเบาๆ 15 นาที

ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เติมเอนไซม์ Alcalase 2.4 L ที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:8

ที่ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

เข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

ความเร็วรอบ 60 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง

หยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไฮโดรคลอริกโดย

ปรับpHเท่ากับ 4

กรองด้วยผ้าขาวบาง

ระเหยน้ำจนมีปริมาณของแข็งประมาณ 38.40 เปอร์เซนต์

โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้ข้างต้น มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าประกอบด้วย ความชื้น 37.87 เปอร์เซนต์ โปรตีน 22.34 เปอร์เซนต์ เถ้า 8.59 เปอร์เซนต์ ไขมัน 2.7 เปอร์เซนต์ ปริมาณของแข็งทั้งหมด 38.40 เปอร์เซนต์ และมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 10 CFU/ml โดยตรวจไม่พบ *Salmonella*

ในการทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase 2.4 L และ Neutrase 0.5 L เกี่ยวกับรสขมและรสเค็ม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านรสเค็ม แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านรสขม โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase จะมีรสเค็มมากกว่า และเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของข้าวเกรียบปรุงรส ที่มีองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซททั้งสองชนิดดังกล่าว พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในด้านลักษณะปรากฏ สี รสชาติ การยอมรับโดยรวม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม พบว่ามีความแตกต่างในด้านกลิ่นไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยข้าวเกรียบปรุงรสที่มีองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซททั้งสองชนิดจะมีกลิ่นไก่มากกว่าตัวอย่างควบคุม

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทสามารถเก็บไว้ได้นานขึ้น ถ้าเก็บในรูปของผลิตภัณฑ์แบบผงแห้ง โดยผ่านขบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง หรือใช้การทำแห้งแบบพ่นฝอย

2. อาจใช้เอนไซม์ผสมระหว่างเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส ในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อปรับปรุงระดับขั้นการย่อยสลายของผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเซทที่ได้ให้สูงขึ้น และแก้ไขปัญหาเรื่องรสขมได้ด้วย

3. อาจใช้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ เป็นอาหารเสริมสำหรับผู้เป็นโรคภูมิแพ้ แทนการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนนมซึ่งทำให้เกิดการแพ้อาหารได้

4. ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ มีรสขมเล็กน้อย การลดความขมสามารถทำได้โดยการเติมเจลาติน การใช้วิธีแยกด้วยคาร์บอนกัมมันต์ หรือการนำไปปรุงรส โดยใช้เครื่องเทศช่วยบดบังความขม

5. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ได้ดี น่าจะมีการศึกษาการนำไปใช้ในการปรุงรส หรือเพิ่มโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม. 2534. เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพไนลอนโปรติเอสติงรูปสำหรับป้องกันการเกิดตะกอนในเบียร์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีการอาหาร บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมพร มะลิแก้ว และ สุดา จินตนธรรม. 2537. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Adler-Nissen, J. 1986. A Review of Food Protein Hydrolysis-Specific Areas. Chpt. 4 In : Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. pp. 57-74. New York. : Elsevier Appl. Sci. Publ.

Adler-Nissen, J. and Olsen, H.S. 1979. The Influence of Peptide Chain Length on Taste and Functional Properties of Enzymatically Mcdified Soy Protein. Chpt.7 In : Functionality and Protein Structure. A. Pour El. (ed.), pp. 125-146. Washington, D.C. : American Chemical Society Symposium Series 92.

A.O.A.C. 1980. Official Method of Analysis. 13 th ed. Washington, D.C.: Association of Official Analytical Chemists.

Carr, J.W., Loughheed, T.C., and Baker, B.E. 1956. Studies on Protein Hydrolysis IV. Further observations on the Taste of Enzymic Protein Hydrolysates. J. Sci. Food. Agric. 7 : 629-637.

Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., and Nicolas, M.G. 1988a. Solubility and Emulsifying Properties of Caseins and Whey Proteins Modified Enzymatically by Trypsin. J. Agric. Food Chem. 36 : 883-892.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Chobert, J.M., Sitohy, M.Z., and Whitaker, J. 1988b. Solubility and Emulsifying Properties of Caseins Modified Enzymatically by *Staphylococcus aureus* V8 Protease. J. Agric. Food Chem. 36 : 220-224.

Clegg.K.M. 1973. Improvements in or Relating to the Production of Pre-Digested Forms of Protien. British patent 1,338,936.

Cordle, C.T. 1994. Control of Food Allergies Using Protein Hydrolysates. Food Technology 48(10) : 72-76.

Frakjaer, S. 1994. Use of Hydrolysates for Protein Supplementation. Food Technology 48(10) : 86-88.

Haque, Z.U. and Mozaffer, Z. 1992. Casein Hydrolysate II. Functional Properties of Peptides. Food Hydrocolloids. 5 : 559-571.

Hidalgo ,J. and Gamper, E. 1977. Solubility and Heat Stability of Whey Protein Concentrates. J. Dairy Sci. 60 : 1515-1518.

Lahl, W.J., and Braun, S.D. 1994. Enzymatic Production of Protein Hydrolysates for Food Use. Food Technology 48(10) : 68-71.

Kijowski,J.,and Niewiarawicz,A. 1978. A Method of Protein Extraction from Chickenbone Residue and the Chemical and Electrophoretic Characteristics of the Extract. J. Food Technol.

Lalasidis, G. 1978. Four New Methods of Debittering Proteins Hydrolysates and a Fraction of Hydrolysates with High Content of Essential Amino Acids. Ann. Nutr. Alim. 32 : 709-723.

MacBurney, M.M., and Young, L.S. 1984. Formulas. Chpt.10 In : Enteral and Tube Feeding. J.L. Rombeau and M.D. Caldwell (ed.), pp. 171-198. Philadelphia : W.B. Saunder Co.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mahmoud, M.I. 1994. Physiochemical and Functional Properties of Protein Hydrolysates in Nutritional Products. Food Technology 48(10) : 89-94.

Matoba, T. and Hata, T. 1972. Relationship between Bitterness of Peptides and their Chemical Structures. Agric. Biol. Chem. 36: 1423-1431.

Meredith, C.N., Zackin, M.J., Frontera, W.R., and Evans, W.J. 1989. Dietary Protein Requirements and Body Protein Metabolism in Endurance-Trained men. J. App. Physiol. 66:2850-2856.

Monti, J.C. and Jost, R. 1978. Enzymatic Solubilization of Heat-Denatured Cheese Whey Protein. J. Dairy Sci. 61:1233-1237.

Murray, T.K. and Baker , B.E. 1952. Studies on Protein Hydrolysis I. Preliminary Observations on the Taste of Enzymic Protein Hydrolysates. J. Sci. Food. Agric. 3 : 470-475.

Nakai, S. and Li-Chan, E. 1988. Importance of Hydrophobic Interactions in Modification of Structure and Function of Food Proteins. In : Hydrophobic Interactions in Food Systems. Boca Raton : CRC Press,Inc.

Nakamura, T., Syukunobe, N., Sakurai, T., and Idota, T. 1993. Enzymaitc Production of Hypoallergenic Peptides from Casein. Milchwissenschaft 48(1) : 11-14.

Ney, K.H. 1971. Voraussage der Bitterkeit von Peptiden aus deren Aminosaurezuammensetzung. Z.Lebensm.-Untersuch. Forsch. 149 : 321-323.

Novo Nordisk . 1994. Alcalase Food Grade. East Asiatic Co. Ltd. Bangkok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Olcott, H.S., and Fraenkel, H.C. 1947. Acid Hydrolysis of Food Protein. J. Biol. Chem. 171 : 583-586.

Paulson, A.T. and Tung, M.A. 1989. Thermally Induced Gelatin of Succinylated Canola Protein Isolate. J. Agric. Food Chem. 37 : 319-326.

Pedersen, B. 1994. Removing Bitterness from Protein Hydrolysates. Food Technology 48(10) : 96-98.

Philips, R.D. and Beuchat, L.R. 1981. Enzyme Modification of Proteins. Chpt.13 In : Protein Functionality in Foods. J.P. Cherry(ed.), pp. 275-298. Washington, D.C. : American Chemical Society Symposium Series 147.

Schmidl, M.K., Taylor, S.L., and Nordlee, J.A. 1994. Use of Hydrolysated-Based Products in Special Medical Diets. Food Technology 48(10) : 77-80.

Singh, H. and Creamer, L.K. 1992. Heat Stability of Milk. Chpt.5 In : Advanced Dairy Chemistry. Vol.1. Proteins. P.F. Fox (ed.), pp. 621-656. London : Elsevier Appl. Sci. Publ.

Stanley, D.W. 1981. Non-Bitter Protein Hydrolysate. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 14 : 49-52.

Tamura, M., Mori, N., Miyoshi, T., Koyama, S., Kohri, H., and Okai, H. 1990. Practical Debittering using Model Peptides and Related Compounds. Agric. Biol. Chem. 54 : 41-51.

Tanford, C. 1962. Contribution of Hydrophobic Interactions to the Stability of the Globular Conformation of Proteins. J. Am. Chem. Soc. 84 : 4240-4247.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tokita, F. 1969. Enzymatische und nicht Enzymatische Ausschaltung des Bittergeschmacks bei enzymatischen Eieweisshydrolysaten. Z. Lebensm. - Untersuch. - Forsh 138 : 351-355.

Turgeon, S.L., Gauther, S.F., and Paquin, P. 1992a. Emulsifying Property of Whey Peptide Fractions as a Function of pH and Ionic Strength. J. Food. Sci. 57 : 601-604,634.

Webster, H.L. 1985. Osmolality of Fluids. Chpt.45 In : Biotechnology Application and Research. P.N. Cheremisinoff and R.P. Quellett (ed.), pp. 607-622. Lancaster : Technomic Publishing Co.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. ความชื้น (AOAC 1980)

ชั่งตัวอย่างในปริมาณที่แน่นอน โดยใช้เครื่องชั่งละเอียด ในภาชนะหาความชื้นที่อบแห้งและทราบน้ำหนักที่แน่นอน (เศษกระดูกไก่ใช้ตัวอย่าง 2 กรัม) นำตัวอย่างไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา นำตัวอย่างออกจากตู้อบแล้วนำไปใส่ภาชนะกันความชื้น (desiccator) ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นนำตัวอย่างไปอบต่ออีก 15-30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = 100(w_1 - w_2)/w_1$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบเป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบเป็นกรัม

2. ไขมัน (AOAC 1980)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบจนได้น้ำหนักคงที่ ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 ใส่ห่อตัวอย่างลงใน thimble นำไปสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (Soxhlet apparatus) ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ระเหยปิโตรเลียมอีเธอร์ออกจากน้ำมันที่สกัดได้ นำน้ำมันที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นภายในภาชนะกันความชื้น ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = 100\ w_1/w_2$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้เป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. โปรตีน

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.1 กรัม ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลว ใช้ 0.1-0.5 มิลลิลิตร ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจน ใส่ลงในขวดสำหรับย่อยโปรตีน เติมคะตะลิสท์ 7 กรัม (คะตะลิสท์ประกอบด้วย โปแตสเซียมซัลเฟต(K_2SO_4) 8 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต($Cu_2SO_4.H_2O$) 1 กรัม ผสมให้เข้ากัน) แล้วใส่กรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร นำไปย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าอ่อนหรือไม่มีสี ทิ้งไว้ให้เย็น ต่อจากนั้นนำมาเข้าเครื่องกลั่นโปรตีน (Buchi) โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 % ปริมาตร 70 มิลลิลิตร (จนกระทั่งตัวอย่างมีสีดำ) รองรับสารที่กลั่นได้ด้วยกรดบอริกเข้มข้น 2 % ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งเติม mixed indicator (สารละลาย methyl red และสารละลาย bromocresol green ความเข้มข้น 0.1 % ใน แอลกอฮอล์อัตราส่วน 1:5) ประมาณ 6 หยด กลั่นจนไม่มีแอมโมเนียเหลือ (ทดสอบโดยการใช้กระดาษลิตมัสแตะที่ปลายท่อของเครื่องกลั่น กระดาษลิตมัสจะต้องเป็นสีแดง) ใช้เวลาประมาณ 5 นาที นำสารละลายในขวดรองรับมาไตเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีม่วง นำมาคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน และปริมาณโปรตีน

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (\%)} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times f \times 1400}{E \text{ mg}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \% N_2 \times 6.25$$

เมื่อ V_1 คือ ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท (ตัวอย่าง)

V_2 คือ ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการไตเตรท (blank)

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเป็นนอร์มอล

f คือ แฟคเตอร์ของกรดไฮโดรคลอริก

E คือ ปริมาณตัวอย่างเป็นมิลลิกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหาค่า f จากการใช้ tris buffer

ชั่ง tris (hydroxy methyl amino methane) มา 120 มิลลิกรัม (กรณีใช้ความเข้มข้น = 0.1 นอร์มอล) ละลายน้ำ 200 มิลลิลิตร ใส่ mixed indicator แล้วไตเตรทกับกรดไฮโดรคลอริกจน tris buffer เปลี่ยนสี นำปริมาตรที่ได้มาคำนวณหาค่า f จากสูตร

$$f = \frac{E}{121.14 \times N \times V}$$

เมื่อ f คือ แฟคเตอร์ของกรดไฮโดรคลอริก

E คือ น้ำหนักของ tris buffer ที่มีทศนิยม 4 ตำแหน่ง

N คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกเป็นนอร์มอล

V คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้เป็น มิลลิลิตร

121.14 คือ มวลโมเลกุลของ tris

4. เถ้า (AOAC 1980)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแน่นอน 2 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่เผาและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำตัวอย่างไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา นำออกมาทิ้งให้เย็นในภาชนะกันความชื้น และชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = w_2 \times 100/w_1$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผาเป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผาเป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. คาร์โบไฮเดรท (AOAC 1980)

คำนวณหาปริมาณคาร์โบไฮเดรทจากสูตร

ปริมาณคาร์โบไฮเดรท(%) = 100 - (%ปริมาณความชื้น + %ปริมาณไขมัน + %ปริมาณโปรตีน + %ปริมาณเถ้า)

6. ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน(สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม 2526)

ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน คือ ผลต่างคิดเป็นกรัมระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนกับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน ในตัวอย่าง 1 ลิตร

6.1 ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า มา 10 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 7 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ เติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ pH 9 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง แล้วไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จน pH 9. คำนวณหาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

$$X = 14 \times Y \times M$$

เมื่อ X คือ ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ในตัวอย่าง 1 ลิตร

Y คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรทเป็น มิลลิลิตร

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นโมลาร์

6.2 แอมโมเนียคัลไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า มา 50 มิลลิลิตร ใส่ในขวดกลั่น เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร กลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และหยด mixed indicator (สารละลาย methyl red และสารละลาย bromocresol green ความเข้มข้น 0.1 % ในอัตราส่วน 1:5) 6 -10 หยด จนกระทั่งไม่มีแอมโมเนียเหลือ นำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้ามาเป็นสีเทา คำนวณหาปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$X = 5.6 \times Y \times M$$

เมื่อ X คือ ปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในตัวอย่าง 1 ลิตร เป็นกรัม

Y คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ไตเตรท เป็นมิลลิลิตร

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริกที่ไตเตรทเป็นโมลาร์

7. วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด

7.1 การเตรียม kieselguhr

ล้าง kieselguhr ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.1 % โดยปริมาตร โดยใช้กรวยบุชเนอร์ ล้างจนกระทั่งเมื่อทดสอบน้ำที่ผ่านออกมาด้วยกระดาษลิตมัสมีสมบัติเป็นกรด ใช้น้ำกลั่นล้างต่อไปจนกระทั่งวัด pH ของน้ำที่ผ่านออกมาได้มากกว่าหรือเท่ากับ 4 ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท

7.2 วิธีวิเคราะห์

ชั่ง kieselguhr ที่ล้างและอบแห้งแล้วประมาณ 5 กรัมใส่ถ้วยกระเบื้อง นำไปอบพร้อมกับฝาปิดที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ จดน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr ให้แน่นอนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง(m_1)

ชั่งตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทประมาณ 2 กรัม ในบีกเกอร์ที่แห้งจดน้ำหนักถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง(m_0) เติมน้ำร้อนไม่เกิน 5 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในถ้วยกระเบื้องทั้งหมด คนจน kieselguhr เป็นเนื้อเดียวกัน นำถ้วยกระเบื้องบรรจุตัวอย่างและฝาปิดไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-8 ชั่วโมง นำออกมาใส่ใน desiccator ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักให้แน่นอนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (m_2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.3 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (\%)} = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{m_0}$$

เมื่อ m_0 คือ น้ำหนักของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท

m_1 คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kiesselguhr หลังจากอบจนคงที่

m_2 คือ น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kiesselguhr และตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทหลังจากอบจนคงที่

วิธีตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

1. วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC 1984)

เจือจางตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท 3 ระดับ คือ 1:10 , $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$ ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร แต่ละระดับความเจือจางทำ 3 จาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง และหมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-5 วัน นับจำนวนโคโลนีทั้งที่อยู่บนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อ เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย

2. วิธีวิเคราะห์จุลินทรีย์ *Salmonella* (AOAC 1984)

2.1 การ Pre-enrichment

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกซึ่งบรรจุ Lactose broth หรือ buffered peptone water 225 มิลลิลิตร ใช้มือบีบถุงให้แตกละลาย สำหรับอาหารที่เป็นกรดจัด ควรปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.0 ด้วยสารละลาย NaOH 1 นอร์มอล บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Enrichment medium

เมื่อเชื้อปรับตัวใน Lactose broth หรือ buffered peptone water แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากข้อ 2.1 ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อ 2 ชนิด คือ Selenite cystine broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ Tetrathionate broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 การแยกเชื้อบนอาหารแข็ง

- ใช้ loop แตะเชื้อจากข้อ 2.2 streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆบน Brilliant Green Agar (BGA) และ Salmonella Shigella Agar (SS) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

- สังเกตโคโลนีของ *Salmonella* ซึ่งโคโลนีจะไม่มีสีถึงสีชมพูอ่อนๆ โคโลนีใสหรือทึบแสง โปร่งแสงหรือเป็นฝ้าก็ได้ *Salmonella* บางสายพันธุ์อาจมีสีดำตรงกลางโคโลนี

2.4 การทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางประการ

เขี่ยเชื้อจากโคโลนีลักษณะดังกล่าวในข้อ 2.3 ลงในอาหารเพาะเชื้อต่อไปนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- Triple Sugar Iron Agar (TSI) โดยทำการ slant และ stab

เชื้อ *Salmonella* จะให้ผลบวกดังนี้ slant เปลี่ยนเป็นสีแดง (ด่าง) stab เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (กรด) และส่วนใหญ่จะสร้าง H_2S ให้สีดำ มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่สร้าง H_2S

- Urea agar โดยทำการ slant

เชื้อ *Salmonella* จะไม่สร้าง Urease อาหารจะไม่เปลี่ยนสี

- Lysine Iron Agar (LIA) ทำวิธีเดียวกับ TSI

ถ้าเป็น *Salmonella* จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LIA จะคงสีม่วงอย่างเดิมไว้ อาจมีสีดำถ้า *Salmonella* นั้นสร้าง H_2S

- Tryptophan broth (ทดสอบ Indole) บ่มที่ 35-37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หยด kovac ถ้าเป็น *Salmonella* สีจะไม่เปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบข้างบนแล้วไปทดสอบทาง Serological

- ถ่ายเชื้อลงบน NA slant บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ทำ suspension ด้วยน้ำเกลือปกติปริมาตร 1 มิลลิลิตร

- หยด suspension ลงบนสไลด์ 3 หยด ห่างกันพอสมควร

- หยด polyvalent "O" antiserum ลงใน suspension หยดแรก polyvalent "H" antiserum ลงในหยดที่ 2

- เอียงสไลด์ไปมา สังเกตการตกตะกอน(agglutination) การตกตะกอนในหยดซึ่งมี antiserum โดยที่ในหยดที่ 3 ซึ่งไม่มี antiserum อยู่ ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น แสดงว่าเกิดผลบวก ในกรณีที่เกิด suspension หยดที่ไม่ได้เติม antiserum แสดงว่าเกิด autoagglutination

- ในกรณีที่เกิดปฏิกิริยาเฉพาะกับ "H" antiserum หยด "Vi" antigen ลงใน suspension หยดที่ 3 หรือทดสอบกับ "O" antiserum ใหม่หลังต้ม suspension ประมาณ 1 นาที

2.6 การสรุปและรายงานผล

- เชื้อซึ่งให้ผลการทดสอบทางชีวเคมี ซึ่งแสดงว่าเป็น *Salmonella* และตกตะกอนกับ antiserum ถือว่าเป็น *Salmonella*

- เชื้อซึ่งให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพียงบางการทดสอบ แต่ไม่ตกตะกอนกับ antiserum ถือว่าไม่ใช่ *Salmonella*

- รายงานผลว่าตรวจพบ *Salmonella* หรือไม่ ในตัวอย่างโปรตีนไฮโดร-ไลเซท 25 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการวิเคราะห์และคำนวณข้อมูล

ข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

ทำได้โดยใช้วิธีคำนวณ ดังตารางที่ ข-1

ตารางที่ ข-1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอด สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

SOV	df	SS	MS	Fcal	Ftable
A	(a-1)	$\sum_{i=1}^{a} (Y_{i..}^2/br) - CT$	SS_A/df_A	MS_A/MS_E	$f(\%sig, df_A, df_E)$
B	(b-1)	$\sum_{j=1}^{b} (Y_{.j.}^2/ar) - CT$	SS_B/df_{AB}	MS_B/Ms_E	$f(\%sig, df_B, df_E)$
AB	(a-1)(b-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b} (Y_{ij.}^2/r) - CT - SS_A - SS_B$	SS_{AB}/df_{AB}	MS_{AB}/MS_E	$f(\%sig, df_{AB}, df_E)$
Error	ab(r-1)	$\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} (Y_{ijk}^2/br) - CT - SS_A - SS_B - SS_{AB}$	SS_E/df_E		
Total	abr-1				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยที่ $CT = \left(\sum_{i=1}^{a}\sum_{j=1}^{b}\sum_{k=1}^{r} Y_{ijk}\right)^2/n$

เมื่อ A และ B คือ ปัจจัยที่ศึกษา

a และ b คือ จำนวนระดับทั้งหมดของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

r คือ จำนวนของการทำซ้ำในแต่ละทรีทเมนต์

n คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด = abr

Y_{ijk} คือ แต่ละระดับของปัจจัย A และ B ตามลำดับ

k คือ แต่ละค่าของการทำซ้ำ

. คือ การรวมค่าของข้อมูลตามแนวอักษรนั้นๆ ในทุกระดับของปัจจัยที่เหลือ เช่น $Y_{ij.}$ หมายถึง การรวมค่าของข้อมูลที่ได้จากการทำซ้ำในแต่ละทรีทเมนต์คอมบิเนชัน (treatment combination) ของปัจจัย A และ B

ข-2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล

หาค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้ ในแต่ละทรีทเมนต์คอมบิเนชัน แล้วเรียงลำดับค่าเฉลี่ยจากมากไปหาน้อย จากนั้นคำนวณค่า $S_N = (MS_E/r)^{1/2}$ เมื่อ r คือ จำนวนการทำซ้ำ เปิดตารางหาค่า Significant Studentized Range (SSR) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ ตั้งแต่ค่า p=2 ถึง p=n-1 ที่ df_E (n คือ จำนวนค่าเฉลี่ยทั้งหมดที่ต้องการเปรียบเทียบ) แล้วคำนวณค่า $LSR = S_N \times SSR$ จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่กับค่า LSR ตามค่า p ถ้าผลต่างของค่าเฉลี่ยดังกล่าวมีค่ามากกว่า LSR แสดงว่าค่าเฉลี่ยคู่นั้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข-3 ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอด และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test สำหรับการทดลองแบบแฟคทอเรียล 2 ปัจจัย

จากการทดลองในข้อ 3.3.4.2 ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่ใช้ในการย่อยสลายที่เหมาะสม โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลขนาด 5x4 ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

เมื่อ A คือ อุณหภูมิที่ในการย่อยสลาย มี 5 ระดับ คือ 40,45,50,55 และ 60 องศาเซลเซียส

B คือ pH เริ่มต้นที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลายมี 4 ระดับ คือ 7,8,9 และ 10

ข้อมูลจากการทดลองแสดงดังตารางที่ ข-2 และการคำนวณแสดงดังต่อไปนี้

$CT = [(38.43+35.23+35.23+...+28.96)^2]/40 = 38346.44$

$SS_A = [(38.43+35.23+35.23+...+34.16)^2 + (36.82+...+31.31)^2 + (31.31+...+29.28)^2 + (28.18+...+30.74)^2 + (23.29+...+28.96)^2]/8 - 38346.44 = 373.18$

$SS_B = [(38.43+35.23+36.82+...+22.64)^2 + (35.23+...+26.16)^2 + (32.36+...+25.62)^2 + (34.16+...+28.96)^2]/10 - 38346.44 = 37.64$

$SS_{AB} = [(38.43+35.23)^2+(35.23+37.26)^2+...+(27.95+28.96)^2]/2 - 38346.44 - 373.18 - 37.64 = 124.53$

$SS_E = [(38.43)^2 + (35.23)^2 + (35.23)^2 + (28.96)^2] - 38346.44 - 373.18 - 37.64 - 124.53 = 20.13$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-2 ข้อมูลจากการทดลองแปรค่าอุณหภูมิและ pH ที่ใช้ในการย่อยสลาย

A	B	Replications		ค่าเฉลี่ยทรีทเมนต์
		1	2	
a_1 = 40	b_1 = 7	28.43	35.23	36.83
	b_2 = 8	35.23	37.26	36.24
	b_3 = 9	32.36	30.74	31.55
	b_4 = 10	34.16	34.16	34.16
a_2 = 45	b_1 = 7	36.82	37.57	37.20
	b_2 = 8	35.22	34.66	34.94
	b_3 = 9	28.46	30.13	29.30
	b_4 = 10	31.31	31.31	31.31
a_3 = 50	b_1 = 7	31.31	30.74	31.02
	b_2 = 8	32.36	32.36	32.36
	b_3 = 9	32.36	33.30	32.83
	b_4 = 10	30.28	29.28	29.87
a_4 = 55	b_1 = 7	28.18	30.74	29.40
	b_2 = 8	29.94	31.71	30.82
	b_3 = 9	28.60	26.84	27.72
	b_4 = 10	29.28	30.74	30.01
a_5 = 60	b_1 = 7	23.29	22.64	22.97
	b_2 = 8	26.16	26.16	26.16
	b_3 = 9	26.64	25.62	26.13
	b_4 = 10	27.95	28.96	28.45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบสุ่มตลอดโดยใช้การคำนวณ

SOV	df	SS	MS	F_{cal}	F_{table}
A	4	373.18	93.29	92.70	2.87*
B	3	37.64	12.55	12.47	3.10*
AxB	12	124.53	10.38	10.31	2.28*
Error	20	20.13	1.01		

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan's new multiple range test ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$LSR = SSR\ (MS_E/r)^{1/2}$$

$$= SSR\ (1.01/2)^{1/2}$$

$$= SSR \times 0.71$$

P	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SSR	2.95	3.10	3.18	3.25	3.30	3.34	3.36	3.38	3.40	3.42
LSR	2.09	2.20	2.26	2.31	2.34	2.37	2.38	2.40	2.41	2.42

P	12	13	14	15	16	17	18	19	20
SSR	3.43	3.44	3.44	3.45	3.46	3.46	3.46	3.47	3.47
LSR	2.43	2.44	2.44	2.45	2.45	2.45	2.45	2.46	2.46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียงลำดับค่าเฉลี่ยแต่ละทรีทเมนต์จากมากไปหาน้อย

37.20^{a}	36.83^{ab}	36.24^{bc}	34.94^{bcd}	34.16^{cde}	32.83^{def}	32.36^{ef}
31.53^{fg}	31.31^{fg}	31.02^{fg}	30.82^{fg}	30.01^{gh}	29.78^{gh}	29.40^{gh}
29.30^{gh}	28.45^{h}	27.72^{hi}	26.16^{i}	26.13^{i}	22.97^{j}	

ข-4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธี Scoring Test

ตารางที่ ข-4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบ Randomized Block Design

Blocks (Judges) (i)	Sample(j) 1	2	...	t	Row total
1	X_{11}	X_{12}	...	X_{1t}	$X_{1.} = \sum_{j=1}^{t} X_{1j}$
2	X_{21}	X_{22}	...	X_{2t}	$X_{2.} = \sum_{j=1}^{t} X_{2j}$
.	.	.	.	.	.
.	.	.	.	.	.
b	X_{b1}	X_{b2}	...	X_{bt}	$X_{b.} = \sum_{j=1}^{t} X_{bj}$
Column total	$X_{.1} = \sum_{i=1}^{b} X_{i1}$	$X_{.2} = \sum_{i=1}^{b} X_{i2}$	...	$X_{.t} = \sum_{i=1}^{b} X_{it}$	$X_{..} = \sum_{i=1}^{b}\sum_{j=1}^{t} X_{ij}$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SOV	df	SS	MS	Fcal
Total	bt-1	$SS_T = \sum_{i=1}^{b}\sum_{j=1}^{t} X^2_{ij} - CF$		
Blocks (Judges)	b-1	$SS_B = \sum_{i=1}^{b} X^2_{i.}/t - CF$	$MS_B = SS_B/(b-1)$	MS_B/MS_E
Samples	t-1	$SS_S = \sum_{j=1}^{t} X^2_{.j}/b - CF$	$MS_S = SS_S/(t-1)$	MS_S/MS_E
Error	(b-1)(t-1)	$SS_E = SS_t - SS_B - SS_S$	$MS_E = SS_E/(b-1)(t-1)$	

โดยที่ Correction factor (CF) = $X^2_{..}/bt$

ข-5 การวิเคราะห์ข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase โดยใช้วิธี Scoring Test และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test

จากการทดลองในข้อ 4.4 ทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ในด้านรสเค็มและรสขม โดยในที่นี้จะแสดงตัวอย่างในการวิเคราะห์คุณภาพด้านรสเค็ม

กำหนดให้ Sample คือ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจากเอนไซม์ Alcalase และ Neutrase

Judge คือ ผู้ทดสอบทางประสาทสัมผัสจำนวน 15 คน

ข้อมูลจากการทดลองแสดงดังตารางที่ ข-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-5 ข้อมูลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในด้านรสเค็ม

คะแนนจากผู้ทดสอบคนที่	ตัวอย่าง		คะแนนรวม
	778	561	
1	4	3	7
2	2	1	3
3	3	1	4
4	4	1	5
5	4	2	6
7	4	0	4
8	4	0	4
9	3	2	5
10	4	2	6
11	0	0	0
12	4	1	5
13	3	2	5
14	2	1	3
15	2	1	3
รวม	47	18	65

$CF = 65^2/30 = 140.83$

$SS_{ตัวอย่าง} = 2533/15 - 140.83 = 28.04$

$SS_{ผู้ทดสอบ} = 321/2 - 140.83 = 19.67$

$SS_{ความคลาดเคลื่อน} = 1999 - 140.83 = 58.17$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ข-6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้การคำนวณ

SOV	df	SS	MS	Fcal	Ftable
Sample	1	28.04	28.04	6.75	4.60
Judge	14	19.67	1.41	0.34	2.50
Error	14	58.17	4.16		

การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$LSR = (MS_E/b)^{1/2}$$

$$= (4.16/15)^{1/2}$$

$$= 0.53$$

P	2	3
SSR	3.03	3.18
LSR	1.60	1.68

เรียงลำดับค่าเฉลี่ยของแต่ละตัวอย่างจากมากไปหาน้อย

3.1^{a} 1.2^{b}

(778) (561)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

ชื่อ-นามสกุล _____ เพศ _____ อายุ_____

วันที่ _____

กรุณาชิมตัวอย่างอาหารตามหมายเลขที่จัดเรียงไว้ตามลำดับ แล้วพิจารณาเปรียบเทียบคุณภาพด้านต่างๆ ที่กำหนดไว้ โดยใส่ X หน้าข้อความที่ต้องการ

ความขม

778		561	
___	ไม่ขมเลย	___	ไม่ขมเลย
___	ขมน้อยมาก	___	ขมน้อยมาก
___	ขมเล็กน้อย	___	ขมเล็กน้อย
___	ขมปานกลาง	___	ขมปานกลาง
___	ขมมาก	___	ขมมาก
___	ขมมากที่สุด	___	ขมมากที่สุด

ความเค็ม

778		561	
___	ไม่เค็มเลย	___	ไม่เค็มเลย
___	เค็มน้อยมาก	___	เค็มน้อยมาก
___	เค็มเล็กน้อย	___	เค็มเล็กน้อย
___	เค็มปานกลาง	___	เค็มปานกลาง
___	เค็มมาก	___	เค็มมาก
___	เค็มมากที่สุด	___	เค็มมากที่สุด

ข้อเสนอแนะ _____

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบ

ชื่อ-นามสกุล _____ เพศ _____ อายุ_____

วันที่ _____

กรุณาชิมข้าวเกรียบตามหมายเลขที่จัดเรียงไว้ตามลำดับ ให้ชิมเปรียบเทียบคุณภาพด้านต่างๆที่กำหนดไว้ของแต่ละตัวอย่าง โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

7	=	ชอบมาก	3	=	ไม่ชอบเล็กน้อย
6	=	ชอบปานกลาง	2	=	ไม่ชอบปานกลาง
5	=	ชอบเล็กน้อย	1	=	ไม่ชอบมาก
4	=	เฉยๆ			

ตัวอย่าง	ลักษณะปรากฏ	สี	กลิ่นไก่	รสชาติ	การยอมรับ
841					
763					
529					

ข้อเสนอแนะ _____

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ภาพที่ ค-1 เครื่องเชย่าควบคุมอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ ค-2 เครื่องกลั่นโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาว จิราภา เสฐจินตนิน เกิดวันที่ 6 ธันวาคม 2515 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายเมื่อปี 2532 จากโรงเรียนสตรีวิทยา จังหวัดกรุงเทพมหานคร และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

นางสาว ดวงดี วิเชียรโหตุ เกิดวันที่ 26 มิถุนายน 2517 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมตอนปลายเมื่อปี 2533 จากโรงเรียนสตรีวิทยา จังหวัดกรุงเทพมหานคร และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้