1285

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN BONE RESIDUE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

โดย

นางสาว สมพร มะสิแก้ว

นางสาว สุดา จินตนะธรรม

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 23/3/37 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(นายปกรณ์ ปิ่นศิริกุล)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

( )

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

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

ปพ.
ส265ก
2536

14491

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์

PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN BONE RESIDUE BY ENZYMATIC HYDROLYSIS

T096966

นางสาว สมพร มะลิแก้ว

นางสาว สุดา จินตนะธรรม

ปพ.
ส265ก
2537

เลขหมู่ 96966
เลขทะเบียน
วัน.เดือน.ปี - 5 JUN 2538

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2537

สมพร มะลิแก้ว และ สุดา จินตนะธรรม : **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์** (Production of Protien Hydrolysate from Chicken Bone Residue by Enzymatic Hydrolysis). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา: อ.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม . 51 หน้า.

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษกระดูกไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase 0.5 L ซึ่งใช้เศษกระดูกไก่อบแห้งที่สกัดไขมันออกบางส่วน ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน ในขั้นตอนการย่อยสลายได้ศึกษาอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 1:2,1:3 และ 1:4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และความเข้มข้นเอนไซม์ 6 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 0.9 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เมื่อวิเคราะห์ระดับขั้นการย่อยสลายของ โปรตีนไฮโดรไลเซท พบว่าภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเท่ากับ 1:3 และความเข้มข้นเอนไซม์ 0.7 % การศึกษาอุณหภูมิและและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 5 ระดับคือ 40, 45, 50, 55 และ 60 ^{o}C และที่ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 4 ระดับ คือ 5, 6, 7 และ 8 พบว่าอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 50 ^{o}C ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 สำหรับระยะเวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสมโดยศึกษาระยะเวลา 5 ระดับ คือ 1, 3, 5 , 7 และ 9 ชั่วโมง พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมคือ 1 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมข้างต้น มีระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ย 28.91 % เมื่อนำไประเหยน้ำจนมีปริมาณของแข็งประมาณ 31.73 % มีองค์ประกอบทางเคมีดังนี้ คือ ความชื้น 37.72 % โปรตีน 15.23 % ไขมัน 9.39 g/l และ เถ้า 3.06 % จากการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 80 CFU/ml โดยตรวจไม่พบ *Salmonella*

สมพร มะลิแก้ว สุดา จินตนะธรรม 23/3/37

ลายมือชื่อนักศึกษา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา วัน เดือน ปี

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้จัดทำปัญหาพิเศษ ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อ อาจารย์ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษา,ผศ.เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ ในฐานะอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และอาจารย์ รวิพิมพ์ ฉวีสุข ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำชี้แนะต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานปัญหาพิเศษมาโดยตลอดจนเป็นผลให้ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. สุมิตรา ภู่วโรดม อาจารย์หัวหน้าภาควิชาปฐพีวิทยา ที่ได้เอื้อเฟื้อให้ยืมเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

ขอขอบคุณ บริษัท ไก่สดศรีไทย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบ เศษกระดูกไก่บดละเอียด และ บริษัท อีสต์เอเชียติค (ประเทศไทย) จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Neutrase 0.5 L เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการและเจ้าหน้าที่ธุรการ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ความสะดวกแก่คณะผู้จัดทำปัญหาพิเศษ

ขอขอบคุณ พี่ เพื่อน และน้อง ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ทุกคนที่เป็นกำลังใจและยังมีส่วนช่วยให้ปัญหาพิเศษประสบความสำเร็จ

สุดท้ายนี้ผู้จัดทำ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ตลอดจนญาติพี่น้องทุก ๆ ท่าน ที่ให้ความสนับสนุนผู้จัดทำ จนประสบความสำเร็จในการศึกษา

สมพร มะลิแก้ว

สุดา จินตนะธรรม

มีนาคม 2537

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1.บทนำ	1
2.วารสารปริทรรศน์	
2.1 องค์ประกอบของเศษกระดูกไก่	5
2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซท	6
2.3 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท	7
2.4 การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท	7
2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน	10
2.6 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์	16
3.การทดลอง	
3.1 สารเคมี	19
3.2 อุปกรณ์	19
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	20
4.ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
5.สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	39
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	44
ภาคผนวก ข	51
ประวัติผู้เขียน	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ปริมาณและมูลค่าส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งปี 2520-2532	2
1.2	ปริมาณชิ้นส่วนต่าง ๆ ของไก่ที่แยกได้จากไก่ 1 ตัว โดยแยกเป็นส่วนที่จำหน่ายในประเทศ และส่วนที่ส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศ	3
2.1	องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้วจากเครื่องถอดกระดูก	5
2.2	แสดงรสชาติ (taste)ของ L-amino acid และ D-amino acid	9
2.3	สมบัติของนิวทรัลและแอลคาไลโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis*	13
4.1	องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่	24
4.2	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ	26
4.3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อใช้อัตราส่วนต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ	27
4.4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ	28
4.5	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ	30
4.6	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ	32
4.7	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่าระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อใช้อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ	33
4.8	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่าง ๆ	35
4.9	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เวลาในการย่อยสลายต่าง ๆ	36

4.10 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจน และระดับขั้นการย่อยสลาย โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อย่อยสลายซ้ำครั้งที่ 2 37

4.11 องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของไฮโดรไลเซทในรูปของเหลวข้น 38

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปทิเดส (1) และเอนโดเปปทิเดส (2) 11

2.2 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Neutrase 14

2.3 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Neutrase 15

2.4 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Neutrase 15

3.1 การอบแห้งเศษกระดูกไก่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 °C 20

3.2 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ 21

3.3 การให้ความร้อนเศษกระดูกไก่ผสมน้ำ ก่อนเติมเอนไซม์ 22

4.1 เศษกระดูกไก่บดละเอียดอบแห้งที่ผ่านการกำจัดไขมันออกบางส่วน 25

4.2 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ยเมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นต่าง ๆ 29

4.3 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ยที่อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ 31

4.4 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ยที่ระยะเวลาต่าง ๆ 35

4.5 ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ 38

4.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 51

บทที่ 1

บทนำ

ประเทศไทยเริ่มมีการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็ง (Frozen Chicken) ไปจำหน่ายยังต่างประเทศเป็นครั้งแรกในปี 2516 โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญคือ ประเทศ ญี่ปุ่น สิงคโปร์ ฮ่องกง เยอรมัน และ เนเธอร์แลนด์ เป็นต้น สำหรับปริมาณและมูลค่าการส่งออก เนื้อไก่แช่แข็งในช่วงปี 2520-2532 แสดงดังตารางที่ 1.1

จากตารางที่ 1.1 จะเห็นว่าปริมาณและมูลค่าการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งในช่วงปี 2520 - 2532 มีอัตราเพิ่มขึ้นเฉลี่ยของปริมาณ 26.42 เปอร์เซ็นต์ต่อปี และมีมูลค่า 30.64 เปอร์เซ็นต์ต่อปีตามลำดับ โดยเพิ่มขึ้นจากปริมาณ 4,250 ตันมูลค่า 158 ล้านบาทในปี 2520 เป็น 108,089 ตัน มูลค่า 5,884 ล้านบาท ในปี 2532 และคาดว่าจะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในปีต่อ ๆ ไปอย่างแน่นอน

ตารางที่ 1.1 ปริมาณและมูลค่าส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งปี 2520-2532

ปี	ปริมาณ (ตัน)	มูลค่า (พันบาท)
2520	4,254	157,515
2521	9,287	333,736
2522	14,158	516,955
2523	18,503	656,192
2524	26,769	1,186,607
2525	33,217	1,310,009
2526	22,926	946,348
2527	34,217	1,419,747
2528	37,840	1,468,063
2529	64,796	3,121,279
2530	81,905	4,019,939
2531	97,420	4,999,613
2532	108,089	5,883,712
อัตราการเพิ่มเฉลี่ยต่อปี(%)	26.42	30.46

ที่มา : กองนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร,2534

สำหรับเนื้อไก่แช่แข็งที่ส่งออกนั้นแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ ไก่ชำแหละแช่แข็งทั้งตัว (whole chicken) และเป็นชิ้นชำแหละไก่แช่แข็ง ได้แก่ เนื้ออก (boneless breast) เนื้อสันใน (fillet) ส่วนขา (leg) สะโพก (thigh) น่อง (drumstick) ปีก (wing) ปีกบน(wingstick) และปีกส่วนล่าง (tulip) อย่างไรก็ตามส่วนมากจะส่งออกในรูปของชิ้น

ส่วนชำแหละแช่แข็งมากกว่าไก่ชำแหละแช่แข็งทั้งตัว โดยในปี 2532 ประเทศไทยส่งออกไก่ชำแหละแช่แข็งทั้งตัวประมาณร้อยละ 1 และชิ้นส่วนชำแหละแช่แข็งประมาณ ร้อยละ 99 ของปริมาณส่งออกทั้งหมด นอกจากนี้เนื้อไก่ชำแหละที่ส่งออกนั้นมีทั้งชนิดเนื้อติดกระดูก (bone) และเนื้อถอดกระดูก (boneless) แต่ส่วนใหญ่จะเป็นชนิดเนื้อถอดกระดูก (กองนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร,2534)

ตารางที่ 1.2 ปริมาณชิ้นส่วนต่างๆ ของไก่ที่แยกได้จากไก่ 1 ตัว โดยแยกเป็นส่วนที่จำหน่ายในประเทศ และส่วนที่ส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศ

ส่วนที่ส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศ		ส่วนที่จำหน่ายภายในประเทศ	
ชิ้นส่วน	ปริมาณ(%)	ชิ้นส่วน	ปริมาณ (%)
เนื้อน่องและอก	43.0	เครื่องใน	11.5
สันใน	3.5	โครงกระดูก	21.0
ปีกบน	3.5	ขาและตีนไก่	7.0
ปีกส่วนกลาง	4.5	เศษเนื้อและเลือด	6.0
รวม	54.5	รวม	45.5

ที่มา : กองนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร,2534

จากตารางที่1.2 จะเห็นว่าในไก่ 1 ตัวจะมีส่วนที่ส่งออกสู่ตลาดต่างประเทศคิดเป็น 54.5 เปอร์เซ็นต์ และส่วนที่จำหน่ายในประเทศ 45.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในส่วนหลังนี้จะเป็นโครงกระดูกถึง 21.0 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นถ้าปริมาณการส่งออกเนื้อไก่แช่แข็งสูงขึ้น ย่อมทำให้มีปริมาณโครงกระดูกเพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

ปัจจุบัน โรงงานชำแหละไก่ส่วนใหญ่ จะแยกเศษเนื้อที่ติดโครงกระดูกออก โดยใช้เครื่องถอดกระดูก (deboner) ซึ่งพบว่าถ้าใช้โครงกระดูก 100 กิโลกรัม จะแยกได้เศษเนื้อที่รับประทานได้ 65 - 70 กิโลกรัม และมีเศษกระดูกที่เหลืออยู่ 30 - 35 กิโลกรัม เศษกระดูก

ดังกล่าว ส่วนมากจะนำไปใช้เป็นปุ๋ย หรืออาหารสัตว์ ซึ่งปริมาณความต้องการใช้ยังอยู่ในขอบเขตจำกัด เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูก พบว่ามีความชื้น 63.7 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนทั้งหมด 20.5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 9.9 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 6.9 เปอร์เซ็นต์ และรงควัตถุ 0.21 เปอร์เซ็นต์ (Kijowski และ Niewiarowice,1985)จะเห็นว่าเศษกระดูกมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูงถึง 20.5 เปอร์เซ็นต์ ถ้าสามารถนำโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารได้ นอกจากจะได้แหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพแล้วยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษกระดูกไก่ ซึ่งเป็นวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมชำแหละไก่อีกด้วย

แนวทางหนึ่งในการนำเศษกระดูกไก่มาใช้ประโยชน์คือการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน องค์ประกอบของไฮโดรไลเซทที่ได้เป็น กรดอะมิโน และ เปปไทด์สายสั้น ๆ รวมทั้งโปรตีนโมเลกุลเล็ก ๆ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในระดับอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ การย่อยสลายด้วยกรด การย่อยสลายด้วยด่าง และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

การใช้กรดหรือด่างในการย่อยสลายโปรตีนนั้น จะต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง คือ ใช้ความเข้มข้นของกรดหรือด่างสูง อุณหภูมิสูง ใช้เวลานาน ก่อให้เกิดการกัดกร่อนเครื่องมือ ในขณะที่การใช้เอนไซม์ มีข้อได้เปรียบกว่า เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับเสตรทสูง จึงใช้เอนไซม์ในปริมาณน้อย ย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง อุณหภูมิและความดันปกติ ไม่เกิดปัญหาการกัดกร่อนเครื่องมือ และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ทำให้กรดอะมิโนถูกทำลายอีกด้วย

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1.ศึกษาภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

2.ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซท

3.ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 องค์ประกอบของเศษกระดูกไก่

เศษกระดูกไก่ที่ได้ หลังจากแยกส่วนที่เป็นเนื้อติดกระดูก ด้วยเครื่องถอดกระดูก (deboner) แล้วยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์อยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง เศษกระดูกไก่ดังกล่าวโดยทั่วไปมีความชื้น 63.7 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนทั้งหมด 20.5 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 9.9 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 6.9 เปอร์เซ็นต์ และรงควัตถุ 0.21 เปอร์เซ็นต์ องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่ที่ได้จากเครื่องถอดกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้วแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่กระทงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้ว จากเครื่องถอดกระดูก หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

องค์ประกอบ	เศษกระดูกไก่	
	ไก่กระทง	แม่ไก่
Dry matter	36.6	36.1
Total protein (N X 6.25)	20.0	20.9
Total protein (N X 6.05)	19.2	19.9
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

จากข้อมูลในตารางจะเห็นว่าเศษกระดูกไก่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่สูง ซึ่งถ้าสามารถนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์โดยเฉพาะการใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากจะเป็นการนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ประโยชน์แล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารอีกด้วยการนำโปรตีนจากเศษกระดูกไก่ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ที่น่าสนใจวิธีหนึ่งคือ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.2 โปรตีนไฮโดรไลเซท (Protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ย่อยสลายแล้วจะประกอบด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์สายสั้น ๆรวมทั้งโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในระดับอุตสาหกรรมทำได้ 3 วิธี คือ

1. การย่อยสลายด้วยกรด
2. การย่อยสลายด้วยด่าง
3. การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Prendegast,1974)

การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้กรดหรือด่างมีข้อเสียหลายประการ คือ

1. จะต้องทำภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ใช้ความเข้มข้นของกรดหรือด่างสูง ภายใต้อุณหภูมิสูงมาก และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน

2. จึงก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการกัดกร่อนอุปกรณ์เครื่องมือ เนื่องจากกรดหรือด่าง

3. การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดหรือด่าง จะมีผลทำให้กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ทริปโทเฟน (trytophan) ซีสทีน (cystine) เซอรีน(serine) เป็นต้น ถูกทำลายได้

4.กรดอะมิโนบางชนิดอาจเกิดปฏิกิริยา racemization ซึ่งเป็นการเปลี่ยนจาก L - form เป็น D - form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Olcott และ Fraenkel,1974)

สำหรับการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสนั้นมีข้อได้เปรียบกว่า เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทสูง จึงสามารถใช้ปริมาณเอนไซม์เพียงเล็กน้อยย่อยสลายโปรตีนได้ภายใต้ภาวะที่ไม่รุนแรง กล่าวคือ อุณหภูมิและความดันปกติ ไม่เกิดปัญหาเรื่องการกัดกร่อน และที่สำคัญคือเอนไซม์โปรติเอสไม่มีผลทำให้กรดอะมิโนถูกทำลาย

แม้ว่าจะมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากวัตถุดิบต่าง ๆ มาหลายปีแล้ว แต่ก็มีการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการปรุงรสเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายด้วย Peptidase ทำ

ให้เกิดรสขม ซึ่งไม่เป็นที่ยอมรับ อย่างไรก็ตาม โปรตีนไฮโดรไลเซท ก็ยังได้รับความสนใจมากมาย เพราะมีศักยภาพในการเป็น food ingredient รวมทั้งคุณสมบัติที่ดีอื่น ๆ คือ ถูกย่อยสลายได้ง่าย มีความสามารถในการละลายสูง ไม่เสียสภาพง่ายเมื่อถูกความร้อน กรดหรือเบส มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบสูง สะดวกในการใช้ และมีอายุการเก็บนานเมื่อทำแห้ง มีความเป็นไปได้ในการเพิ่มสมดุลย์ของสารอาหารโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท ทั้งเป็นตัวเพิ่มกลิ่นรสอีกด้วย

Quaglia และ Massacci(1982) แนะนำให้ใช้การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง สายเปปไทด์ของโมเลกุลโปรตีนมีขนาดสั้นลงมากและปริมาณเถ้าโดยเฉพาะเกลือของโซเดียมน้อย

2.3 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

1.ใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร โปรตีนไฮโดรไลเซทสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ทั้งในลักษณะทดแทนบางส่วนหรือเสริมโปรตีน

2.ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหาร หรือใช้เป็นสารเชื่อม (binder) โปรตีนไฮโดรไลเซท มีสมบัติเป็น stabilizer emulsifier และ binder ที่ดี จึงสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดได้

3.ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร (food flavouring agent) การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารสามารถใช้ได้ 2 ลักษณะ คือ flavour donor และ flavour enhancer โดยที่ flavour donor เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อให้มีกลิ่นรสตามต้องการ เช่นในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว ซุป และ ซอสต่าง ๆ เป็นต้น สำหรับ flavour enhancer เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อเพิ่มหรือเสริมกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งเดิมมีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เช่น ในผลิตภัณฑ์ครีมซุป ไส้กรอก เป็นต้น

2.4 การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์มักก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องความขม เป็นที่สังเกตุว่าความขมมักเกิดกับอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง รสขมนี้เกิดจากเปปไทด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายด้วย proteolytic enzyme เปปไทด์มีหลายชนิดแต่มีบางชนิดเท่านั้นที่ให้รสขม กรดอะมิโนเดี่ยว ๆ ส่วนใหญ่จะมีรสหวาน ขม เค็ม เปรี้ยว หรือมีรส

เหมือนผงชูรส (Kirimura et al.,1969) แตกต่างไปตามชนิดของกรดอะมิโน กรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มักจะมีความขมมากกว่ากรดอะมิโนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้เปปไทด์ที่มีขั้วซึ่งมี side chain ที่มีสมบัติเป็น hydrophobicเป็นองค์ประกอบอยู่สูงมักจะมีรสขม (Metoba และ Hata ,1972)

การทดลองเติม gelatin ลงในระหว่างการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเกิดรสขมได้ โดยที่ Stanley (1981) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อไก่ถอดกระดูก โดยย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C pH 8 ความเข้มข้นเอนไซม์ 4.3 % เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายที่เวลา 0,30,60,90 และ 120 นาทีตามลำดับมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าเมื่อใช้เนื้อไก่ล้วน ๆ ทำปฏิกริยากับเอนไซม์ ผู้ทดสอบสามารถรับรสขมได้ตั้งแต่ ที่เวลาในการย่อยสลาย 90 นาทีขึ้นไป โดยมีระดับความขมเหมือน ควินิน 0.003 % เมื่อเติม glycine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีรสหวาน และพบมากใน gelatine proline และ hydroxy proline ลงในโปรตีนไฮโดรไลเซท พบว่า glycineสามารถลดความขมในไฮโดรไลเซทได้อย่างมีนัยสำคัญในขณะที่ proline หรือhydroxy proline ล้วน ๆ ไม่สามารถลดความขมได้ อาจสรุปได้ว่ากลไกการลดรสขมของไฮโดรไลเซทโดย gelatine เกิดจาก กรดอะมิโน glycine ไปบดบังความขม

มีสารประกอบหลายชนิดที่ให้รสขม โดยปกติระดับของความขมมักจะมีน้อยกว่าความหวาน เปรี้ยว และ เค็ม เป็นเรื่องยากที่จะอธิบายถึงความสัมพันธ์ของรสชาติเหล่านี้กับโครงสร้างของมัน อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของ โครงสร้างกรดอะมิโน กับความขมถูกค้นพบว่า L-amino acid หลายตัวที่มีโมเลกุล side chain เป็น hydrophobic group จะมีรสขม ขณะที่ D-amino acid ที่มี side chain เป็น hydrophobic groupเช่นเดียวกันกลับมีรสหวาน (ดังแสดงในตารางที่ 2.2) Wieser และ Belitz (1981)ได้ศึกษาและทดสอบรสชาติของกรดอะมิโนประมาณ 60 ชนิด เอสเทอร์ของกรดอะมิโน N-acetyl amino acid amide และสารประกอบให้รสขมอื่นๆด้วย ปรากฏว่าผู้ทดสอบจะรับรสขมได้ในระดับความขม 100 ไ mole/l (L-2-amino butyric acid) และ 0.8 ไ mole/l (benzamide) โครงสร้างของรสขมที่พบในขั้นสุดท้ายเป็นโมเลกุลมีขั้ว (electro phylic) และมีโมเลกุลกลุ่มที่แสดงรสขมเป็น hydrophilic

ตารางที่ 2.2 แสดงรสชาติ (Taste) ของ L-amino acid และ D-amino acid

	Taste (times sucrose)	
Amino acid	L-Isomer	D-Isomer
Tryptophan	Bitter	Sweet
Phynylalanine	Bitter	Sweet
Histidine	Bitter	Sweet
Tyrosine	Bitter	Sweet
Leucine	Bitter	Sweet
Alanine	Sweet	Bitter or Sweet
Glycine	Sweet	Sweet
Arginine	Flat or Bitter	Slightly sweet
Aspatic acid	Flat	Flat
Isolucine	Flat or Bitter	Flat or Sweet
Lysine	Flat or Bitter	Flat or Sweet
Proline	Flat	Flat
Serine	Flat or Sweet	Flat or Sweet
Threonine	Flat or Sweet	Flat or Sweet
Valine	Flat or Bitter	Flat or Sweet
Cysteine	Sulfurous	Sulfurouse
Glutamic acid	Unique	-
Methionine	Sulfurous or bitter	Sulfurous or sweet

ที่มา : Kier และ Pharm , (1972)

กลุ่มแอมโมเนียที่ปรากฏรสขมจะมีกลุ่ม neucleophilic ที่เป็นตัวรับรสขมในขณะที่กลุ่ม carboxylic ไม่มีความสำคัญต่อการเกิดรสขม สามารถเรียงลำดับความขมของอนุพันธ์ L - amino acid ได้ดังนี้

$$H_3N^+-CH(R)-COO^- = H_3N^+-CH(R)-CH_2OH > H_3N^+-CH(R)-COOR > H_3N^+-CH(R)-H$$

2.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme)

เอนไซม์ที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ

1. เอกโซเปปทิเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิลเท่านั้น (รูปที่ 2.1) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส,คาร์บอกซิลเปปทิเดส และไดเปปทิเดส

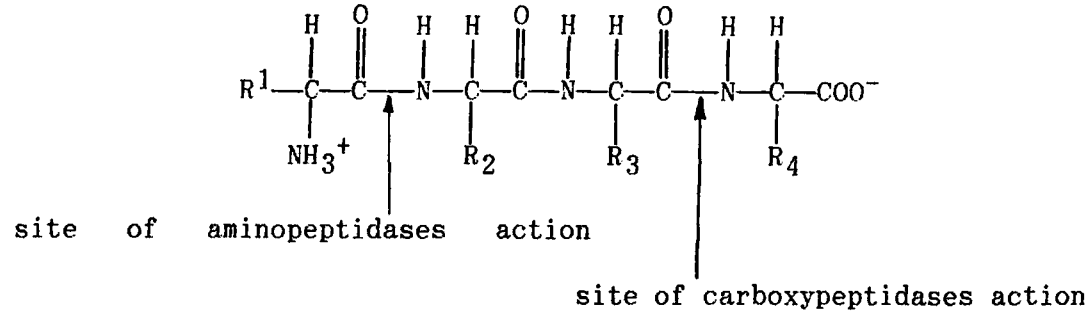
2. เอนโดเปปทิเดส (Endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่ง ไม่เฉพาะปลายด้านทั้งสองด้านเท่านั้น (รูปที่ 2.1) ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

-โปติเอสในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เปปซิน(pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน(chymotrypsin)

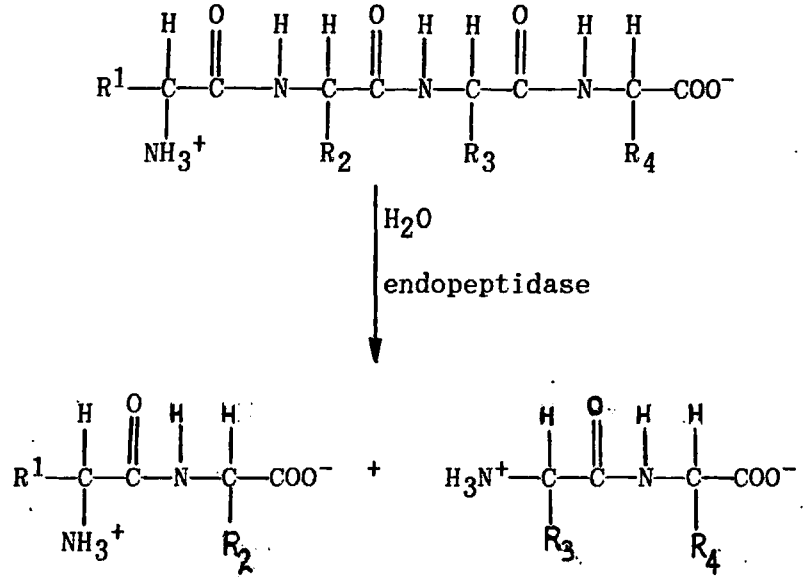
-โปรติเอสจากพืช เช่น ปาเปน(papain) โบรมิเลน(bromilain) และไฟซิน(ficin)

-โปรติเอสภายในเซลสัตว์ เช่น คาเธปซิน (cathepsins)

-โปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด เช่น ซับทิลิซิน(subtilisin) นิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) และแอลคาไลโปรติเอส(alkaline protiases) เป็นต้น



(1)



(2)

รูปที่ 2.1 การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปทิเดส(1) และเอนโดเปปทิเดส(2)

ในกรณีที่ใช้กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นเกณฑ์ จะจำแนกโปรติเอสออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ

1. ไธออลโปรติเอส(thaiol proteases) เป็นโปรติเอสที่มีหน่วยเร่งปฏิกิริยาเป็นหมู่ไธออล (thiol group) ซึ่งอาจมีมากกว่า 1 หมู่ และถูกยับยั้งได้โดยสารประกอบที่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไธออลได้ เช่นไอออนของโลหะหนักหรืออนุพันธ์ของไอออนโลหะหนักสารที่มีสมบัติเติมหมู่อัลคิล (alkyl agent)และสารที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์(oxidizing agent)

เป็นต้น ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ปาเปน ไฟซิน คาเธปซินและโปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด

2. เมธอลโปรติเอส(metal proteases)เป็นโปรติเอสที่มีกลไกการทำงานเกี่ยวข้องกับไอออนของโลหะ ที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ เช่น Mg^{2+},Mn^{2+},Co^{2+},Zn^{2+},Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งอาจยึดติดกันอย่างแน่นหนาหรือจับกันอย่างหลวม ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอกโซเปปทิเดสเป็นส่วนใหญ่ เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (leucine aminopeptidases) โพรลิเดส(prolidases) เป็นต้น โปรติเอสกลุ่มนี้จะถูกยับยั้งเมื่อไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ถูกกำจัดไป

3. แอซิดโปรติเอส (acid proteases) เป็นโปรติเอสที่สามารถที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในภาวะที่มี pHในช่วงที่เป็นกรดและที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ ตัวอย่างของโปรติเอสกลุ่มนี้คือ เปปซิน และเรนนิน (rennin) เป็นต้น

4. เซอรีนโปรติเอส (serine proteases) เป็นโปรติเอสที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีน ซึ่งถูกยับยั้งโดยสารประกอบ organophosphorus เช่น diisopropyl phosphofluoridate (DFP) ตัวอย่างของโปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ทริปซิน ชัยทิลิซิน และธรอมบิน (thrombin)เป็นต้น

ปัจจุบันการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มผลผลิต ปรับปรุงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์หรือปรับปรุงวิธีในการผลิต และการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน สามารถที่จะรักษาคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าการย่อยสลายด้วยกรดและด่าง

เอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ต้องมีลักษณะทั่ว ๆ ไป คือ

- สามารถใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย
- หากผลิตได้จากจุลินทรีย์ต้องไม่มีพิษ ซึ่งจะกำหนดโดย FAO/WHO

Neutrase 0.5 L เตรียมได้จากการหมักในอาหารเหลว (submerged fermentation) ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์เฉพาะ สำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีชื่อทางการค้า คือ Neutrase 0.5 L

โดยทั่วไปโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis* จะมีเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ 2 ชนิด คือ นิวทรัลโปรติเอสและแอลคาไลโปรติเอส แต่ในกรณีของ Neutrase จะประกอบด้วยนิวทรัลโปรติเอสเท่านั้น สำหรับสมบัติของนิวทรัลและแอลคาไลโปรติเอสแสดงในตารางที่ 2.3 จะเห็นว่าโปรติเอสทั้งสองชนิด มีบริเวณเร่งที่ต่างกันทำให้มีความจำเพาะของเอนไซม์ (enzyme specificity) ต่างกัน

ตารางที่ 2.3 สมบัติของนิวทรัลและแอลคาไลโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis*

	นิวทรัลโปรติเอส	แอลคาไลโปรติเอส
บริเวณเร่ง	Zn^{2+}	serine
ผลของ Ca^{2+}ต่อการเพิ่มเสถียรภาพ	+	0
ถูกยับยั้งโดย :		
DFP[1] & PMSF[2]	0	+
EDTA[3] & Phosphate	+	0
Soybean tripsin inhibitor	0	0

1.DFP : Diisopropylphosphofluoride

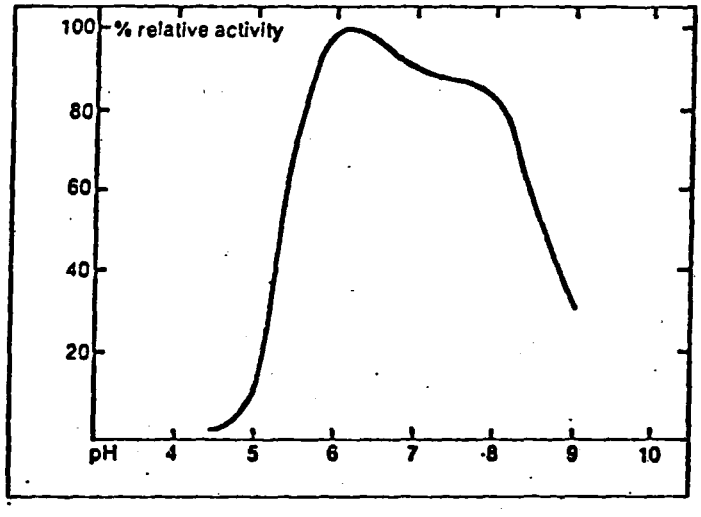
2.PMSF : Phynylmethanesulphonylfluorid

3.EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

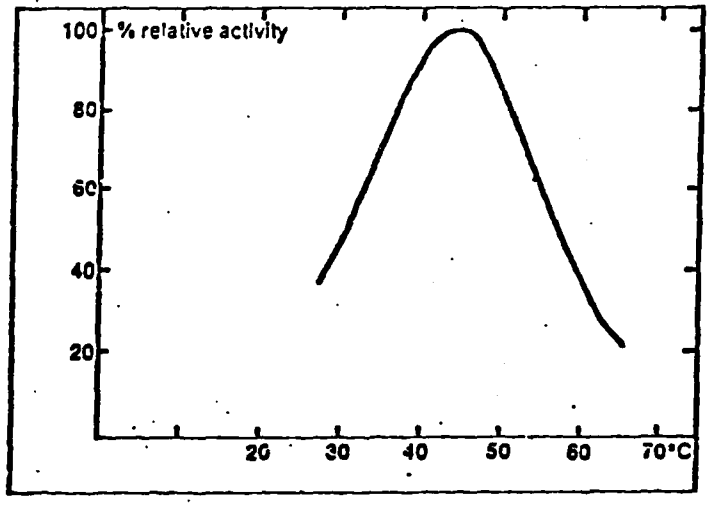
neutrase 0.5 L มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม ละลายน้ำได้ดี มีความหนาแน่นประมาณ 1.25 กรัม/มิลลิลิตร มีแอคติวิตี 0.5 AU/กรัม โดยที่ 1 AU (Ason Unit) หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายไมโอโกบิล (denatured hemogobin) ภายใต้ภาวะที่กำหนด (25 องศาเซลเซียส pH 7.5 10 นาที) ให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำได้ในกรดไตรคลอโรแอซิติกและเกิดสีกับ

ฟีนอลรีเอเจนต์เท่ากับ 1 มิลลิสมมูล (milliequivalent) ของไทโรซีนแอคติวิตีของ neutraseที่pH และอุณหภูมิต่าง ๆแสดงในรูปที่ 2.2 และ 2.3 ตามลำดับ จะเห็นว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการใช้งานของ neutrase คืออุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียสที่ pH 5.5-7.5

โดยทั่วไปการเก็บ neutrase ที่อุณหภูมิ 1-25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน จะไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี และหลังจากนั้น เอนไซม์จะมีแอคติวิตีลดลงร้อยละ 1 - 2 ต่อเดือน การเก็บ Neutrase ที่อุณหภูมิ 5 ^{o}C อายุการเก็บจะนานขึ้น โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตีอย่างน้อย 1 ปี

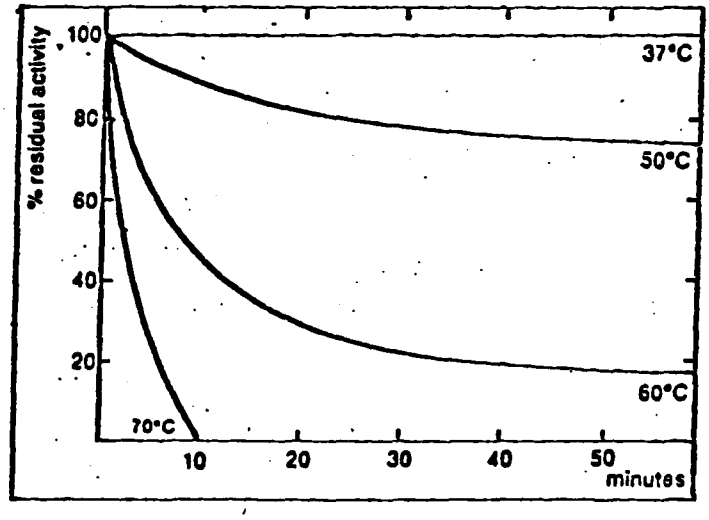


รูปที่ 2.2 ผลของ pH ต่อแอคติวิตี ของ Neutrase



รูปที่ 2.3 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Neutrase

เสถียรภาพของ Neutrase เมื่ออยู่ในรูปของสารละลายที่อุณหภูมิต่างๆแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Neutrase

ความเข้มข้น : 0.75 AU/100มิลลิลิตร

pH : 7.0 (ฟอสเฟตบัฟเฟอร์)

2.6 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์

เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้กรดหรือด่าง ดังกล่าวมาแล้ว ทำให้มีงานวิจัยที่ทดลองผลิต โปรตีนไฮโดรไลเซทจากแหล่งโปรตีนต่างๆ โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

Nissen (1977) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ alcalase พบว่าอัตราการย่อยสลายสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 °C และ pH 8.0

Chhuy และ Day (1978) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อไก่โดยใช้เนื้อไก่บดละเอียดผสมน้ำ จากนั้นเติมเอนไซม์โปรติเอสและควบคุมอุณหภูมิในการเกิดปฏิกริยาที่ 50°C pH 5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยปรับ pH ให้เป็น 7 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ผสมกับ cysteine hydrochloride thiamine และ น้ำ ในอัตราส่วน cysteine hydrochloride : น้ำ : โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ : thiamine เท่ากับ 44 : 600 : 70 : 22 แล้วนำไป reflux เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อพัฒนาให้เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสจากปฏิกริยาเคมี ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) แล้วนำมาทดลองใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ใน chicken noodle soup พบว่าเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

Kengo Ishida และคณะ (1979) ได้ศึกษาการผลิต โปรตีนไฮโดรไลเซท จากกระดูกไก่เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่าส่วนของโปรตีนจากกระดูกไก่ที่เป็นซาโคพลาสมิกโปรตีน (26 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด) ถูกย่อยสลายด้วยเอ็นโดเปปติเดสได้โดยง่าย และไฮโดรไลเซทที่ได้ไม่มีรสขม ในขณะที่ไฮโดรไลเซท ที่ได้จากไมโอไฟบริลโปรตีน (10 เปอร์เซ็นต์) มีรสขมอย่างแรง และส่วนของสโตรมาโปรตีน (56 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมด) จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ดังกล่าวได้ไม่ดีนัก ทำให้กลิ่นของไฮโดรไลเซทที่ได้ค่อนข้างอ่อน แม้ว่าอัตราส่วนการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นโดยการให้ความร้อนที่ 95 °C ก่อนก็ตาม

การให้ความร้อนโดยการต้มกระดูกไก่ ก่อนการย่อยสลายด้วยการใช้เอนไซม์เอนโดเปปติเดสและเอ็กโซเปปติเดสร่วมกัน จะทำให้ได้ ผลผลิตของ (yield) สารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์สูง ส่วนประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ คือ peptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5000 ซึ่งมีรสขมเล็กน้อย แต่สามารถทำให้รสขมหายไปได้โดยการผสมด้วยอัตราเร็วสูง

Stanley (1981)ทดลองย่อยสลายเนื้อไก่ถอดกระดูกที่กำจัดไขมันแล้ว (78 เปอร์เซ็นต์โปรตีน)ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสขม ซึ่งผู้ชิมที่ผ่านการฝึกหัดสามารถรับรสขมได้

Leiske และ Konrad (1988) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อไก่ โดยบดเนื้อไก่ให้ละเอียด จากนั้นเติมน้ำให้มีปริมาณโปรตีนในสารละลาย 3-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ย่อยสลายโปรตีนด้วยเซอรีนโปรติเอส(serine protease) ที่อุณหภูมิ 40-70 ^{o}C จนกระทั่งระดับขั้นการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) อยู่ในช่วง 25-35 เปอร์เซนต์ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไม่มีรสขม และให้กลิ่นรสที่ดี สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภทเช่น ซอส และ อาหารขบเคี้ยว เป็นต้น

Rebeca และคณะ (1991)ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลา โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจากจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ HT-200, protease N และ calase 560 พบว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนและให้ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ (soluble nitrogen) สูงสุด คือ Pescalase 560 โดยสภาวะที่เหมาะสมคือใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 1เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 ^{o} C pH 9.5

Sanguandeekulและคณะ (2535) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากน้ำนึ่งปลาทูน่า เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ neutrase พบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมคือใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 1.0-1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C pH 6.5 และเวลาในการทำปฏิกริยา 10 นาที โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารได้ดี

Krzysztof Surowka และ M. Fik (1992)ได้ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหัวไก่บด โดยใช้เอนไซม์ Neutrase สภาวะที่เหมาะสมคือเติมน้ำลงในหัวไก่บดละเอียด 75 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ปรับ pHให้เท่ากับ 7 เติมเอนไซม์ 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ควบคุมอุณหภูมิขณะเกิดปฏิกริยาย่อยสลายที่ 55 ^{o}C จากผลการทดลองพบว่าได้ผลผลิตค่อนข้างสูง กล่าวคือ เริ่มต้นด้วยหัวไก่บด 1 กิโลกรัม ย่อยสลาย 6 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตคือ ไฮโดรไลเซท 75 กรัม (dry hydrolysate) ซึ่งมีโปรตีน 78.1เปอร์เซ็นต์ (N x 6.25) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาดี มีสีน้ำตาล ไม่มีรสขม ละลายน้ำได้ดี แต่สมบัติการเป็น emulsier ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีของการทำแห้งมีผลต่อสีของผลิตภัณฑ์ กล่าวคือ ไฮโดรไลเซทแห้งที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freez drying) จะมีสีครีมอ่อน ในขณะที่ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการทำแห้ง โดยเครื่องอบแห้งแบบสูญญากาศ (vacuum drying) จะมีสีน้ำตาล

96966

บุศราภา สีละวัฒน์ และ ปราณี อ่านเปรื่อง (2536) ศึกษาภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้ปาเปนและนิวเตรสตรึงรูป พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ ประกอบด้วย ความชื้น 92.9 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 4.59 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.2 เปอร์เซ็นต์ เถ้า 1.73 เปอร์เซ็นต์ และเกลือ 1.37 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทดลองนำผลิตภัณฑ์สารสกัดจากปลาดังกล่าวที่ผ่านการทำให้เข้มข้น และทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้ง แบบพ่นฝอย (spray drying) มาใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสปลา (fish flavour enhancer) ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด พบว่า ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของยากิโทริ (บาบิคิวไก่) ที่ใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้น และ ซุปบะหมี่รสปลาที่ใช้สารสกัดจากปลาแบบแห้ง อยู่ในระดับดีทั้งลักษณะ สี กลิ่นรส และ การยอมรับรวม

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Neutrase 0.5 L	: NOVO Industri A/S, Denmark
Boric acid	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Bromocresol green	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Copper sulphate	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Formaldehyde	: J.T.Baker, USA
Haxane	: J.T.Baker, USA
Haptane	: BDH Limited Poole England
Kieselguhr	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Magnesiumoxide	: Fluka Chemie Ag., Switzerland
Methyl red	: May & Baker Ag.Dagenham,England
Potassium sulphate	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Petrolium ether	: J.T.Baker, USA
Sulfuric acid	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany
Sodium hydroxide	: E. Merck Ag. Darmstadt,Germany

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดวิเคราะห์โปรตีน Buchi 321 Switzerland

ชุดสกัดไขมัน Soxterm (Gerhardt) Belgium

Hot air oven (Jouan) Germany

Muffle Furnace (Carbolite Furnaces CSF 1100)

Shaking water bath (GEL) Belgium

pH meter (DHM61) Denmark

เครื่องชั่งละเอียด (Mettler AE50) Belgium

เครื่องชั่งหยาบ (AND EK 120 A) Belgium

เครื่องชั่งหยาบ(Mettler PE 3000) Belgium

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้คือ เศษกระดูกไก่ที่บดละเอียดซึ่งได้จากเครื่องถอดกระดูก deboner ได้รับความอนุเคราะห์ จากบริษัทไก่สดศรีไทย จำกัด

3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ของเศษกระดูกไก่บดละเอียดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ตามวิธี AOAC (1980)

3.3.2 การเตรียมวัตถุดิบโดยการกำจัดไขมันออกบางส่วน

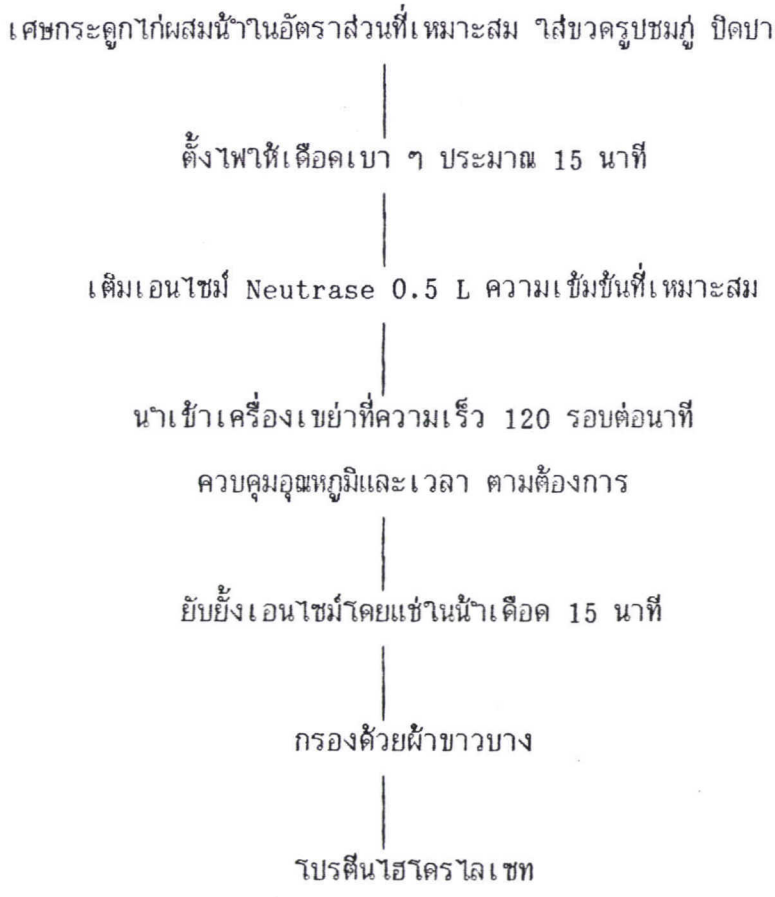
เตรียมวัตถุดิบ โดยแช่กระดูกไก่บดละเอียดในตัวทำละลายเฮกเซน ในอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อตัวทำละลาย 1:1 เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไขมันออกบางส่วน ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.1

รูปที่ 3.1 แสดงการอบแห้งเศษกระดูกไก่ในตู้อบที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C

14491

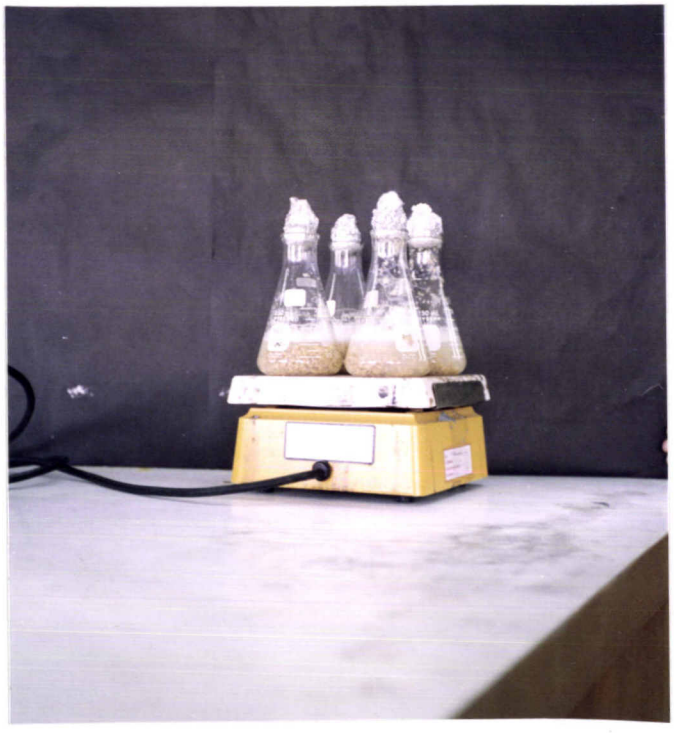
3.3.3 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

นำเศษกระดูกไก่บดละเอียดซึ่งสกัดไขมันและทำแห้งตามวิธีทดลองในข้อ 3.3.2 ผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปิดปากขวดด้วยฟอยล์จนแน่น ตั้งไฟจนเดือดเบา ๆ 15 นาที ทำให้เย็นถึง 50 ^{o}C จากนั้นเติมเอนไซม์ Neutrase 0.5 L ความเข้มข้นที่เหมาะสม นำเข้าเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิ และเวลา ตามต้องการ ครบระยะเวลายับยั้งเอนไซม์โดยแช่ในน้ำเดือด 15 นาที ขั้นตอนทั้งหมดดังกล่าวแสดงดังแผนภาพรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง



รูปที่ 3.3 การให้ความร้อนเศษกระดูกไก่ผสมน้ำ ก่อนเติมเอนไซม์

3.3.4 การศึกษาภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษกระดูกไก่

3.3.4.1 ศึกษาอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดย ใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 1:2 ,1:3 และ 1:4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 6 ระดับ คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร กำหนดความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิเท่ากับ 7 และ 50 ^{o}C ตามลำดับ ใช้เวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง เลือกอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3X6 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Rang test

3.3.4.2 ศึกษาความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยกำหนดอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4.1 และ แปรอุณหภูมิในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 40,45, 50, 55 และ 60 ^{o}C แปรค่าความเป็นกรดด่าง 4 ระดับคือ 5, 6, 7, และ 8 โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์หรือกรดไฮโดรคลอริก กำหนดระยะเวลาในการทำปฏิกริยา 1 ชั่วโมงเลือกอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจนและระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 5X4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New Multiple Rang test

3.3.4.3 ศึกษาเวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยกำหนดอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.3.4.1 ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้น และควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการย่อยสลายตามผลการทดลองข้อ 3.3.4.2 แปรเวลาในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 1, 3, 5, 7 และ 9 ชั่วโมง นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก ก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ซ้ำเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan 's New multiple Rang test ภาวะที่เหมาะสม เลือกจากเวลาที่น้อยที่สุดซึ่งมีค่าระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด

3.3.5 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.4.1,3.3.4.2,และ 3.3.4.3 นำไฮโดรไลเซทที่ได้มาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี คือ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ตามวิธี AOAC(1980) หาปริมาณของแข็งทั้งหมด และวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา โดยตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และหา *Salmonella* ตามวิธีในภาคผนวก ก

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองซึ่งได้แก่ เศษกระดูกไก่ที่ผ่านการบดจากเครื่อง deboner จากบริษัทไก่สดศรีไทย จำกัด นำมาบดด้วยเครื่องบด(chopper)อีกครั้ง ก่อนนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่ที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเศษกระดูกไก่

องค์ประกอบทางเคมี	% น้ำหนักเปียก	% น้ำหนักแห้ง
ความชื้น	61.74	-
โปรตีน	7.99	20.88
ไขมัน	3.29	8.61
เถ้า	13.31	34.79

4.2 การเตรียมวัตถุดิบเพื่อใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

เตรียมวัตถุดิบ โดยแช่เศษกระดูกไก่บดละเอียดในตัวทำละลาย haxane ในอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อเฮกเซนเป็น 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อกำจัดไขมันออกบางส่วน ก่อนนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 ^{o}C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้เศษกระดูกไก่บดละเอียดแห้ง ดังรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 เศษกระดูกไก่บดละเอียดอบแห้งที่ผ่านการกำจัดไขมันออกบางส่วน

4.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

4.3.1 อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีทดลองข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ 3 ระดับคือ 1:2, 1:3 และ 1:4 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ neutrase 6 ระดับคือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณหาค่าระดับขั้นการย่อยสลาย ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ

อัตราส่วนวัตถุดิบ:น้ำ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
	0	0.1	1.59	6.29
	0.1	0.63	6.41	9.83
1:2	0.3	0.62	6.45	9.61
	0.5	0.9	5.91	15.23
	0.7	1.20	6.14	17.96
	1.0	1.19	5.96	20.13
	0	0.1	1.231	8.12
	0.1	0.58	5.13	11.31
1:3	0.3	0.62	4.95	12.53
	0.5	0.99	4.69	21.11
	0.7	1.05	3.85	27.27
	1.0	0.95	4.33	21.94
	0	0.08	0.95	8.42
	0.1	0.45	4.01	11.22
1:4	0.3	0.50	3.52	14.20
	0.5	0.71	3.37	21.07
	0.7	0.66	2.96	22.30
	1.0	0.78	3.33	23.42

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าทั้งอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ของระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้ อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ต่าง ๆ

Source of Variance	df	ms	F_{cal}
Treatment	17	80.16	348.52*
A	2	56.05	234.70*
B	5	237.91	1043.39*
A x B	10	6.12	26.61
Error	18	0.23	

A : อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ

B : ความเข้มข้นของเอนไซม์

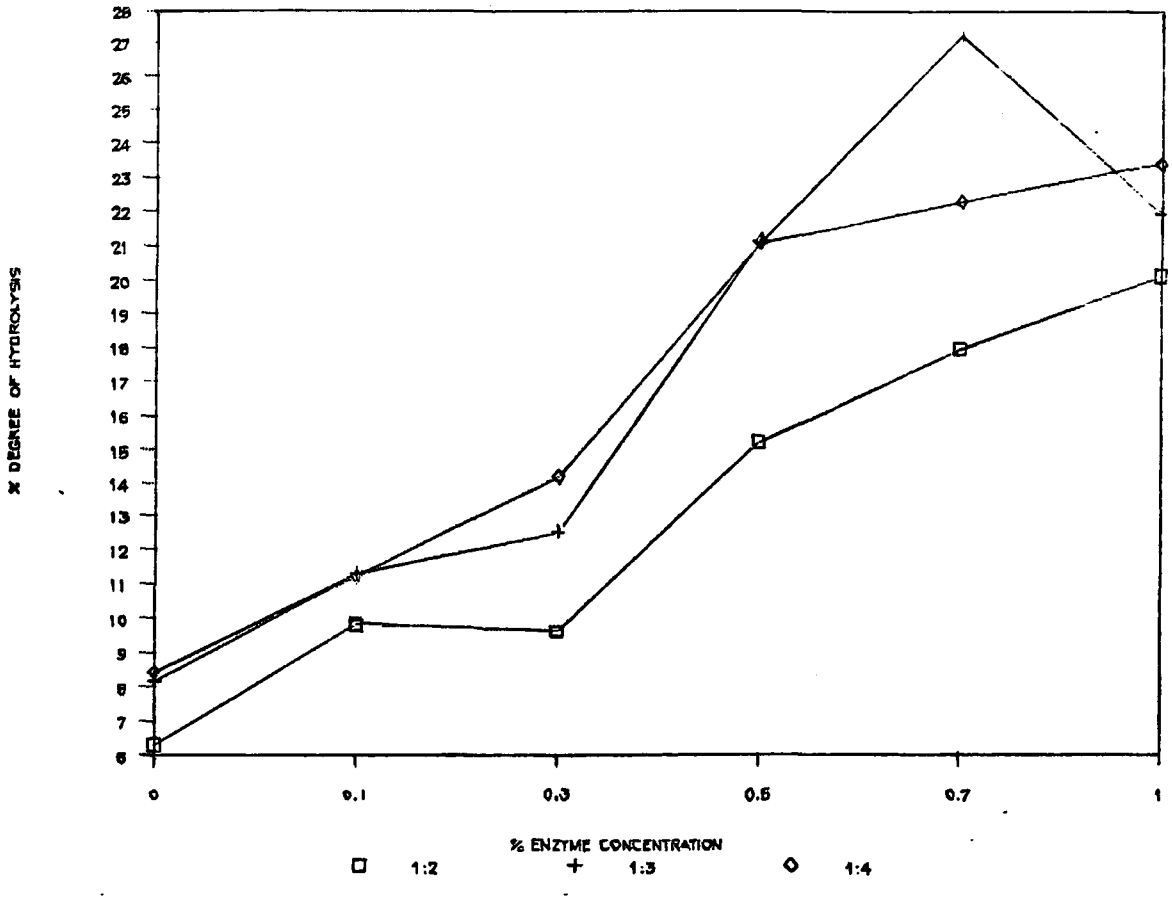
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากอัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าระดับขั้นการย่อยสลายโดยวิธี Duncant's new multiple range test จึงพิจารณาร่วมกันทั้งสองปัจจัยดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ

อัตราส่วนวัตถุดิบ:น้ำ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
	0	0.1	1.59	6.29^{j}
	0.1	0.63	6.41	9.83^{h}
1:2	0.3	0.62	6.45	9.61^{hi}
	0.5	0.9	5.91	15.23^{e}
	0.7	1.20	6.14	17.96^{d}
	1.0	1.19	5.96	20.13^{c}
	0	0.1	1.231	8.12^{i}
	0.1	0.58	5.13	11.31^{gh}
1:3	0.3	0.62	4.95	12.53^{fg}
	0.5	0.99	4.69	21.11^{bc}
	0.7	1.05	3.85	27.27^{a}
	1.0	0.95	4.33	21.94^{bc}
	0	0.08	0.95	8.42^{hi}
	0.1	0.45	4.01	11.22^{gh}
1:4	0.3	0.50	3.52	14.20^{e}
	0.5	0.71	3.37	21.07^{c}
	0.7	0.66	2.96	22.30^{bc}
	1.0	0.78	3.33	23.42^{b}

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



รูปที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายเศษกระดูกไก่เฉลี่ย ที่อัตราส่วนกระดูกไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่าง ๆ

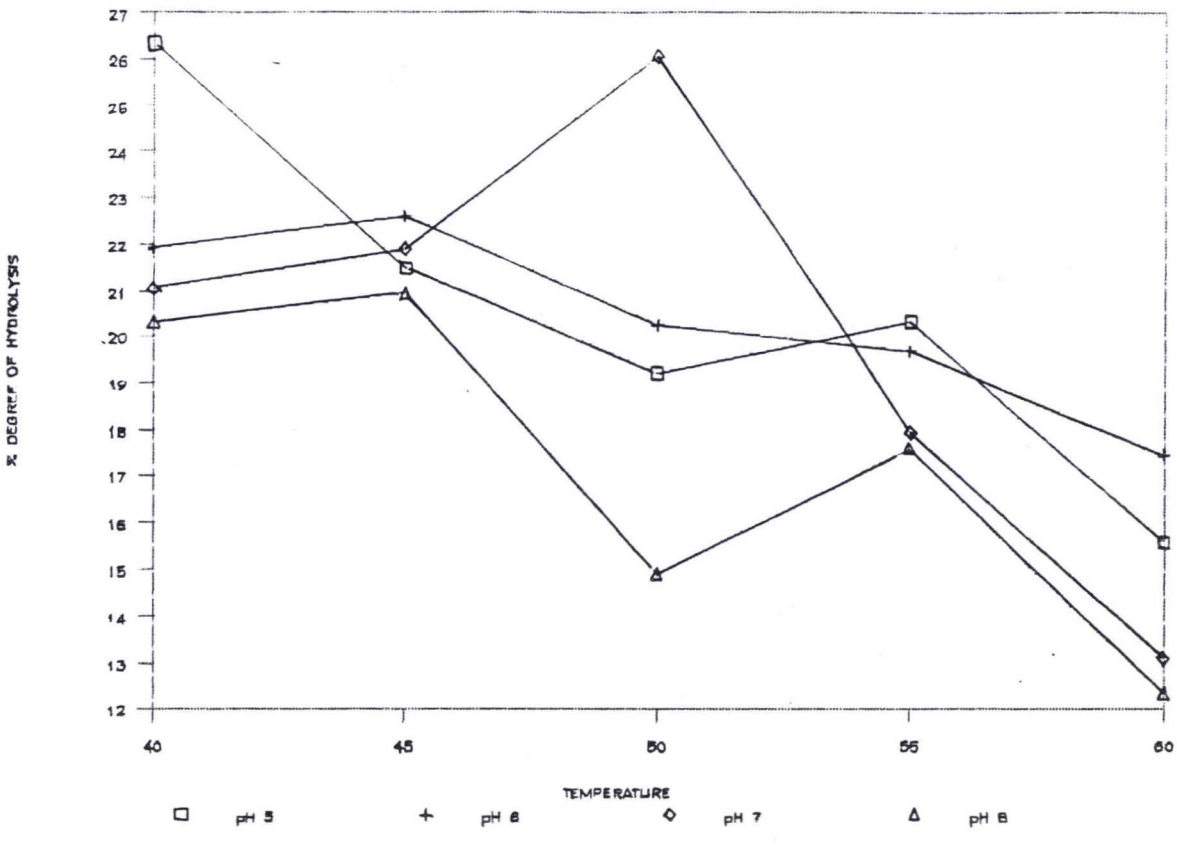
จากตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2 จะเห็นว่าที่อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำทุกระดับ ระดับขั้นการย่อยสลายมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของระดับขั้นการย่อยสลายที่แต่ละสภาวะ พบว่าที่อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเท่ากับ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรและความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.7 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุดคือ 27.27 % จึงเลือกใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการทดลองต่อไป

4.3.2 ความเป็นกรดด่าง (pH) และอุณหภูมิ ที่เหมาะสม

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 โดยแปรค่าอุณหภูมิ 5 ระดับคือ 40,45,50,55 และ 60 ^{o}C แปรความเป็นกรดด่าง 4 ระดับคือ 5,6,7 และ 8 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้แต่ละสภาวะการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณ แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมดและคำนวณหาระดับขั้นการย่อยสลาย โดยผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.5 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมดและระดับขั้นการย่อยสลาย เมื่อใช้อุณหภูมิและความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ

อุณหภูมิ ^{o}C	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
	5	0.68	2.58	26.35
	6	0.73	3.33	21.92
40	7	0.77	3.66	21.04
	8	0.75	3.69	20.33
	5	0.63	2.93	21.50
	6	0.85	3.76	22.61
45	7	0.92	4.20	21.90
	8	0.88	4.20	20.95
	5	0.63	3.28	19.21
	6	0.65	3.21	20.25
50	7	0.97	3.72	26.07
	8	0.68	4.56	14.91
	5	0.61	3.00	20.33
	6	0.70	3.55	19.69
55	7	0.87	4.84	17.97
	8	0.79	4.49	17.59
	5	0.60	3.85	15.58
	6	0.49	2.81	17.44
60	7	0.51	3.90	13.08
	8	0.48	3.89	12.34



รูปที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทเฉลี่ย ที่อุณหภูมิและความเป็นกรดค่างเริ่มต้นต่าง ๆ

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่าค่าความเป็นกรดค่าง และอุณหภูมิ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ของระดับขั้นการย่อยสลายเศษกระดูกไก่เมื่อใช้อุณหภูมิและค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่างๆ

Source of Variance	df	ms	Fcal
Treatment	19	27.49	9.78*
A (อุณหภูมิ)	4	76.56	27.23*
B (pH)	3	24.35	8.66*
A B	12	11.92	4.24
Error	20	2.81	

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

เนื่องจากค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิ มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลาย โดยวิธี Duncant's new multiple range test จึงพิจารณาร่วมกันทั้งสองปัจจัยดังตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อใช้อุณหภูมิ และ ความเป็นกรดด่างเริ่มต้นต่าง ๆ

อุณหภูมิ	ความเป็นกรดด่างเริ่มต้น	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน	ไนโตรเจนทั้งหมด	ระดับขั้นการย่อยสลาย
^{o}C		(g/l)	(g/l)	(%)
	5	0.68	2.58	26.35^{a}
	6	0.73	3.33	21.92^{ab}
40	7	0.77	3.66	21.04^{b}
	8	0.75	3.69	20.33^{bc}
	5	0.63	2.93	21.50^{ab}
	6	0.85	3.76	22.61^{ab}
45	7	0.92	4.20	21.90^{ab}
	8	0.88	4.20	20.95^{b}
	5	0.63	3.28	19.21^{bc}
	6	0.65	3.21	20.25^{bc}
50	7	0.97	3.72	26.07^{ab}
	8	0.68	4.56	14.91^{c}
	5	0.61	3.00	20.33^{bc}
	6	0.70	3.55	19.69^{bc}
55	7	0.87	4.84	17.97^{bc}
	8	0.79	4.49	17.59^{bc}
	5	0.60	3.85	15.58^{c}
	6	0.49	2.81	17.44^{bc}
60	7	0.51	3.90	13.08^{c}
	8	0.48	3.89	12.34^{c}

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

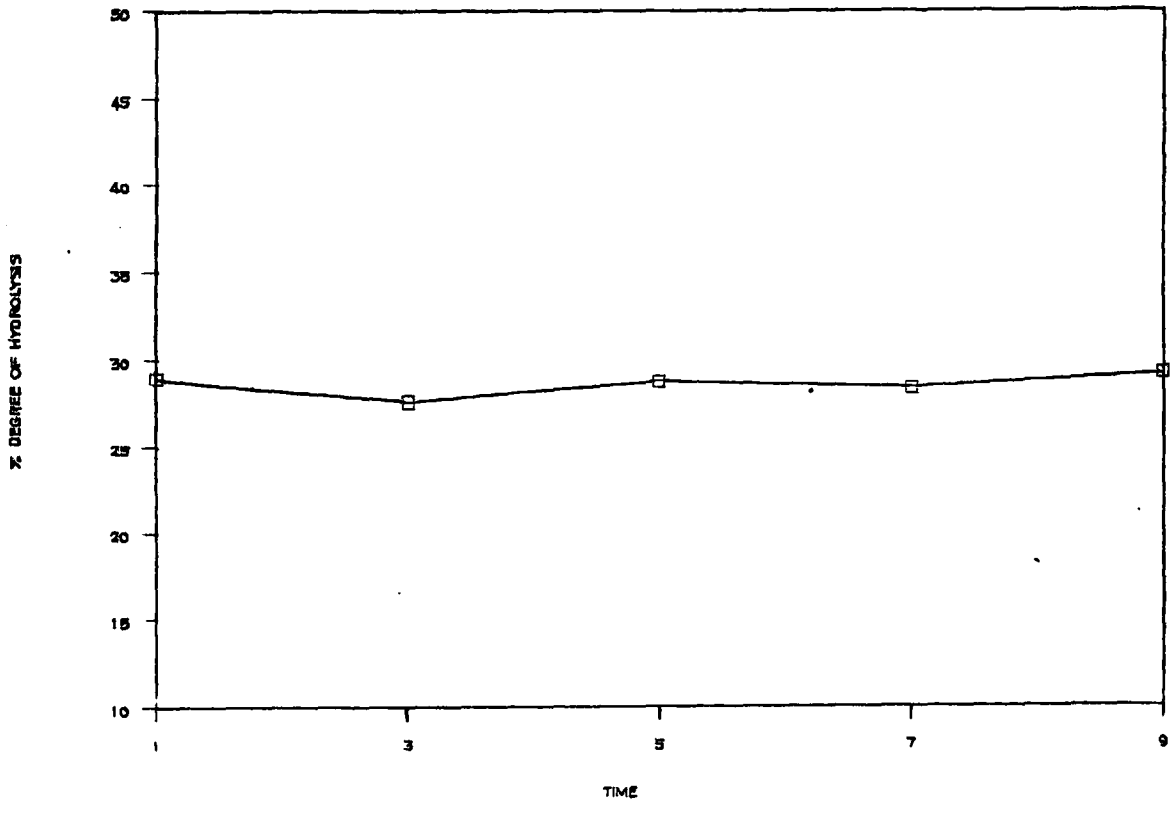
จากตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.3 จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C pH เริ่มต้น 5 และอุณหภูมิ 50 ^{o}C pH เริ่มต้น 7 ให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด คือ 26.35 และ 26.07 % ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.7) อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนซึ่งแสดงถึงปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดซึ่งแสดงถึงโปรตีนที่ถูกสกัดออกมา พบว่าอุณหภูมิ 50 ^{o}C และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 จะมีค่าสูงกว่าที่ อุณหภูมิ 40 ^{o}C และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 นอกจากนี้ที่ pH 7 ยังมีข้อได้เปรียบกว่าที่ pH 5 เนื่องจากเป็น pH ของเศษกระดูกไก่เริ่มต้น จึงไม่ต้องมีการปรับ pH ด้วยกรดหรือด่างอีก ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C และ pH เริ่มต้นของเศษกระดูกไก่เท่ากับ pH 7 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

4.3.3 เวลาในการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เหมาะสม

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีการทดลองข้อ 3.3.3 โดยแปรระยะเวลาในการย่อยสลายคือ 1,3,5,7และ 9 ชั่วโมงตามลำดับโดยใช้อัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อน้ำเป็น 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และควบคุมให้เกิดการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50^{o}C และความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 เมื่อโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้แต่ละสภาวะการทดลองไปวิเคราะห์หาปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณหาระดับขั้นการย่อยสลายโดย ผลการทดลองแสดงดังในตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.8 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลาย เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆกัน

เวลา (ชั่วโมง)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
1	1.18	4.11	28.91
3	1.24	4.49	27.57
5	1.27	4.43	28.74
7	1.36	4.81	28.38
9	1.27	4.38	29.16



รูปที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ย ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าระยะเวลาในการย่อยสลายกระดูกไก่ไม่มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$)ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายที่เวลาต่าง ๆ

Source of Variance	df	ss	ms	Fcal
เวลา	4	3.05	0.76	1.34
Error	5	2.84	0.57	

เนื่องจากระยะเวลาในการย่อยสลายเศษกระดูกไก่ ไม่มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.9) และเพื่อเป็นการประหยัดพลังงานและเวลาจึงเลือกใช้เวลาที่ 1 ชั่วโมงในการย่อยสลายโปรตีนจากเศษกระดูกไก่ ซึ่งให้ค่าระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ย 28.91 % ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

เมื่อพิจารณาระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ได้จากภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว น่าจะมีแนวโน้มทำให้เพิ่มสูงขึ้นอีกได้ จึงได้ทำการทดลองโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase 0.7 %เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมาย่อยสลายอีกครั้งหนึ่งโดยการเติมเอนไซม์ Neutrase เพิ่มอีก 0.7 % ของเศษกระดูกไก่เริ่มต้น ให้ผลดังตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.10 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อย่อยสลายซ้ำครั้งที่ 2

	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับขั้นการย่อยสลาย (%)
โปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนเพิ่มเอนไซม์	1.18	4.11	28.91
โปรตีนไฮโดรไลเซทหลังเพิ่มเอนไซม์	1.36	4.18	32.53

จากตารางที่ 4.10 จะเห็นได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทหลังเพิ่มเอนไซม์เป็น 2 เท่า มีระดับขั้นการย่อยสลายเป็น 32.51 % ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพียงครั้งเดียวเล็กน้อยคือเพิ่มขึ้น 3.62 % ดังนั้นจึงเป็นการสิ้นเปลืองหากเพิ่มเอนไซม์ในการย่อยสลาย แต่ระดับขั้นการย่อยสลายเพิ่มเพียงเล็กน้อย

สาเหตุที่เมื่อเติมเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่ระดับขั้นการย่อยสลายเปลี่ยนแปลงน้อยมากนั้นอาจเนื่องมาจาก เอนไซม์ Neutrase ซึ่งเป็นเอนไซม์เอนโดเปปติเดส มีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ที่ย่อยสลายบางพันธะเท่านั้นที่สภาวะที่เหมาะสม ในการทดลองดังกล่าวข้างต้น พันธะเปปไทด์ ในโปรตีนจากเศษกระดูกไก่ที่จำเพาะต่อเอนไซม์ถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์แล้ว ค่าระดับขั้นการย่อยสลายจึงไม่เพิ่มขึ้นอีก

4.4 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพทางจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ผลิตได้จากการย่อยสลาย เศษกระดูกไก่ ด้วยเอนไซม์ Neutrase ระเหยน้ำออกจนได้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะเป็นของเหลวข้น ที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมดประมาณ 31 % มีองค์ประกอบทางเคมี และคุณภาพทางจุลชีววิทยา ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทในรูปของเหลวข้น

องค์ประกอบ	ปริมาณ (%)
ความชื้น	36.72
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	31.73
โปรตีน	15.23
ไขมัน [1]	9.39
เถ้า	3.06
total plate count[2]	< 80
Salmonella	ไม่พบ

1. g/l

2. CFU/ml.

รูปที่ 4.7 แสดงผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของ เศษกระดูกไก่บดละเอียด พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ คือ โปรตีน 20.88 % ไขมัน 8.61 % เถ้า 34.79 % โดยน้ำหนักแห้ง และมี ความชื้น 61.74 %

เมื่อนำเศษกระดูกไก่บดละเอียดที่ สกัดไขมันออกบางส่วนโดยแช่ ในตัวทำละลาย hexane ในอัตราส่วนเศษกระดูกไก่ต่อเฮกเซนเท่ากับ 1: 1 มาทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase พบว่า ภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนของเศษกระดูกไก่ต่อน้ำ คือ 1:3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ คือ 0.7 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการย่อยสลาย 50 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 (ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของเศษกระดูกไก่อยู่แล้ว) ใช้เวลาในการย่อยสลาย 1 ชั่วโมง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่าระดับขั้นการย่อยสลายเฉลี่ยเท่ากับ 29.81 % แผนภาพการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เหมาะสมสรุปได้ดังนี้

เศษกระดูกไก่ผสมน้ำในอัตราส่วน 1:3

↓

ปรับความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

↓

ตั้งไฟจนเดือดเบา ๆ 15 นาที

↓

ทำให้เย็น อุณหภูมิประมาณ 50 - 60 องศาเซลเซียส

↓

เติมเอนไซม์ Neutrase เข้มข้น 0.7 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

↓

เข้าเครื่องเขย่า โดยควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

↓

เมื่อครบ 1 ชั่วโมง ยับยั้งเอนไซม์โดยแช่ในน้ำเดือด 15 นาที

↓

กรองด้วยผ้าขาวบาง

↓

ระเหยน้ำโดยการเคี่ยวจนมีปริมาณของแข็งประมาณ 31 %

↓

โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้จากข้างต้น มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่าประกอบด้วย ความชื้น 36.72 % โปรตีน 15.23 % ไขมัน 9.39 g/l และมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่า 80 CFU/ml. โดยไม่พบ *Salmonella*

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายมีโปรตีนสูง มีกลิ่นไก่ ดังนั้นอาจนำไปใช้ประโยชน์ได้คือ

- ใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ ทั้งในลักษณะทดแทนบางส่วนหรือเสริมโปรตีน

- ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร การใช้โปรตีนไฮโดรเซทใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อให้มีกลิ่นรสไก่ตามต้องการ ในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว ซุป และซอสต่าง ๆ หรืออาจใช้เป็นตัวเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซึ่งเดิมมีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เช่นในผลิตภัณฑ์ครีมซุปไก่ไส้กรอกไก่เป็นต้น

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่ ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น มีระดับขั้นการย่อยสลายค่อนข้างต่ำคือ 28.91 % อาจมีการใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดสลงไปช่วยเอนไซม์ Neutrase ย่อยพันธะที่เหลือได้ อาจทำให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงขึ้นได้อีก โดยทำให้เพิ่มผลิตภัณฑ์ (Yield) ได้

3. อาจสามารถปรับปรุงลักษณะของผลิตภัณฑ์สุดท้ายในลักษณะอื่น ๆ เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ เช่น นำไปทำแห้งโดยขบวนการอบแห้งแบบเยือกแข็ง , การอบแห้งแบบสุญญากาศ เป็นต้น

4. ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ มีรสขมเล็กน้อย อาจจะลดความขมได้โดยเติม เจลาติน หรือ กรดอะมิโนไกลซีน หรือนำไปปรุงรส โดยการเติม กระเทียม พริกไทย ช่วยบดบังความขมได้

เอกสารอ้างอิง

กองนโยบายและแผนพัฒนาการเกษตร. 2534. แนวทางพัฒนาการผลิต และการตลาดไก่เนื้อ. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ภูวดล สุกมลานันท์ และ สมศักดิ์ ศิริชัยเจริญ . 2536. การศึกษาเบื้องต้นในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากยีสต์ขนมปัง. ปัญหาพิเศษ ระดับปริญญาตรี. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.

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

Chhuy,C.L. and Day, A.E.1978. Edible Compositiions Having Meat Flavor and Processes for Making Same. US.Pat. 4,081, 565, March 28. 36:1423-1431.

Kengo Ishida.Yoshinobu kaji. and Atsushi Yamamoto. 1979.Enzymatic Hydrolytic of chicken bone Protein and flavor of the Hydrolysates. J.of Japanese Society of Food Science and Technology. 26 (4) : 168-174 .

Kijowski,J. and Niewiarowicz, A.1985. A Method of Protein Extraction form Chickenbone Residue and the Chemecal and Electrophoretic characteristics of the Extract.J. Food Technol.

Nissen,A.J. 1977.Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. Proc. Biochem. 12(6):18 - 23.

Olcott,H.S. and Fraenkel, H.C. 1947. Acid Hydrolysis of Food Protein. J.Biol.Chem.171.583 - 586.

Ouaglia,G.B. and Massacci,A.1982.Protiolysates from Slaughterhouse Blood. J.Sci.Food Agri. 33 : 634 - 638 .

Prendergast, K. 1974. Protein Hydrolysate : A Review. Food Trade. Rev. 44(1):14,16 - 21.

Rebeca, B.D., Pena - Vera, M.T. and Diaz-Castaneda,M.1991. Production of Fish Protein Hydrolysates with Bacterial Protease : Yield and Nutritional Value. J. Food Sci. 56 : 309 - 314.

Sanguandeekul,R. , Jantawat, P. 1992.Production of Protein Hydrolysate as Food Flavor from Tuna Precooking Water. The 8th NRCT, NUS, DOST-JSPS Joint Seminar on Biotechnology and The 4th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 29-31 October 1992, Saim City Hotel,Bangkok,Thailand.

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1.ความชื้น (AOAC 1980)

ชั่งตัวอย่างในปริมาณที่แน่นอน โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดในภาชนะหาความชื้นที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน (เศษกระดูกไก่ใช้ตัวอย่าง 2 กรัม)นำตัวอย่างไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 150 ^{o}C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา นำตัวอย่างออกจากตู้อบแล้วนำไปใส่ภาชนะกันความชื้น (desicator)ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นนำตัวอย่างไปอบต่ออีก 15-30 นาที จนได้น้ำหนักคงที่ คำนวนหาปริมาณความชื้น

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

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ เป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ เป็นกรัม

2.ไขมัน (AOAC 1980)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบจนได้น้ำหนักคงที่ให้ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง whatman No 1 ใส่ห่อตัวอย่างใน thimble นำไปสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ใช้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากน้ำมันที่สกัดได้ นำน้ำมันที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในภาชนะกันความชื้น ชั่งน้ำหนัก และคำนวนหาปริมาณไขมัน

ปริมาณไขมัน (%) = $100\ w_1/w_2$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ เป็นกรัม

3. ไขมัน (ตัวอย่างของเหลว)

วิธีทดลอง

1. ปิเปตตัวอย่างเหลว 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกไขมัน
2. ใส่ Extractant (ประกอบด้วย กรด 2% ,ไอโซโพพานอล 78% , เฮปเทน 20%) 25 มิลลิลิตร
3. เขย่า 10 นาที และตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น 5 นาที
4. ใส่น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (เพื่อให้แยกชั้นได้ดียิ่งขึ้น)
5. ใส่เฮปเทน 15 มิลลิลิตร เขย่า 20 วินาที ทำทั้งหมด 4 ครั้ง
6. ดูด Solvent ชั้นบน 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่อบแห้งดีแล้ว(ชั่งน้ำหนักแห้งแล้ว) นำไปชั่งน้ำหนัก
7. อบในตู้อบ 104 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง
8. นำออกมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณผล

Metyl lolcate (g/l) = (A-B) x 420

โดย A = น้ำหนักหลอดทดลองที่ใส่ตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรภายหลังอบ

B = น้ำหนักหลอดทดลอง

4.โปรตีน (AOAC 1980)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.1 กรัม ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวใช้ 0.1- 0.5 มล. ขึ้นอยู่กับปริมาณไนโตรเจน ใส่ลงในขวด สำหรับย่อยโปรตีน เติมคะตะลิสต์ 1 กรัม (คะตะลิสต์ประกอบด้วย โปแตสเซียมซัลเฟต(K_2SO_4) 10 กรัม และคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 0.5 กรัม บดผสมให้เข้ากัน) และกรดซัลฟุริคเข้มข้น 4 มล. นำไปย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าอ่อนหรือไม่มีสี ทิ้งให้เย็น นำมาประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น รองรับสารที่กลั่นได้ ด้วยกรดบอริคเข้มข้น 4 % ปริมาตร 50 มล. ซึ่งเติม mixed indicator (สารละลายเมทธิลเรด และสารละลายโบรโมครีซอลกรีน ความเข้มข้น 0.1 % ในแอลกอฮอล์อัตราส่วน 1:5) 3-4 หยดเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 % ปริมาตร 10 มล. ลงในตัวอย่างที่ย่อยแล้ว กลั่นจนขวดรองรับมีสารละลาย ปริมาตร 250 มล. จึงหยุดกลั่น

นำสารละลายในขวดรองรับมาไตเตรทด้วยสารละลายซัลฟุริคเข้มข้น 0.1 นอร์มอลจนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง คำนวนหาปริมาตรไนโตรเจนและปริมาตรโปรตีน

ปริมาตรไนโตรเจนทั้งหมด = X x N x 14 x 100 /W x1000

เมื่อ X คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟุริคที่ใช้ไตเตรต เป็น มล.

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดฟัลฟุริค เป็น นอร์มอล

W คือ น้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่าง เป็น กรัม หรือ มล.

ปริมาณโปรตีน(%) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด x 6.25

5.เถ้า (AOAC 1980)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแน่นอน ประมาณ 2 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่เผาและ ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำตัวอย่างไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา นำออกมาทิ้งให้เย็นในภาชนะกันความชื้นและชั่งน้ำหนัก คำนวนหาปริมาณเถ้า

ปริมาณเถ้า (%) = w_2 x 100/w_1

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา เป็นกรัม

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา เป็นกรัม

6.คาร์โบไฮเดรท (AOAC 1980)

คำนวนหาปริมาตรคาร์โบไฮเดรทโดยการหักลบ

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

+% ปริมาณโปรตีน+%ปริมาณเถ้า)

7.ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526)

ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน คือ ผลต่างคิดเป็นกรัม ระหว่าง ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน กับ แอมโมเนียคัลไนโตรเจน ในตัวอย่าง 1 ลิตร

7.1 ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า มา 10 มล. ปรับความเป็นกรดด่างเป็น 7 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ที่มีความเป็นกรดด่างเป็น 9 ปริมาตร 10 มล.ลงในตัวอย่างแล้วไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนมีความเป็นกรดด่างเป็น 9 คำนวณหาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

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

เมื่อ X คือ ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ ในตัวอย่าง 1 ลิตร เป็นกรัม

Y คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไตเตรตเป็น มล.

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นโมลาร์

7.2 แอมโมเนียคัลไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่ามา 50 มล. ใส่ในขวดกลั่น เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. กลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในขวดแก้วที่มีสารละลายกรดบอริคเข้มข้น 4 % ปริมาตร 50 มล. และมี mixed indicator (สารละลายเมธิลเรด และสารละลายโบรโมครีซอลกรีน ความเข้มข้น 0.1 % ในแอลกอฮอร์ อัตราส่วน 1: 5) 6-10 หยด จนกระทั่งสารละลายในขวดกลั่นเหลือเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม นำสารละลายที่กลั่นได้มาไตเตรทกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเทา คำนวณหาปริมาตรแอมโมเนียคัลไนโตรเจน

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

เมื่อ X คือ ปริมาณแอมโมเนียคัลไนโตรเจนในตัวอย่าง 1 ลิตร เป็นกรัม

Y คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริคที่ไตเตรท เป็น มล.

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริคที่ไตเตรท เป็นโมลาร์

8.วิธีวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมด

8.1 การเตรียม kieselguhr

ล้าง kieselguhr ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.1 % โดยปริมาตร โดยใช้กรวยบุชเนอร์ ล้างจนกระทั่งเมื่อทดสอบน้ำที่ผ่านออกมาด้วยกระดาษลิตมัสมีสมบัติเป็นกรด ใช้น้ำกลั่นล้างต่อไปจนกระทั่งวัด pH ของน้ำที่ผ่านออกมาได้มากกว่า หรือเท่ากับ 4 ทิ้งไว้ให้แห้งจากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 ^{o}C นาน 1 คืน เก็บไว้ในภาชนะที่ปิดสนิท

8.2 วิธีวิเคราะห์

ชั่ง kieselguhr ที่ล้างและอบแห้งแล้วประมาณ 5 กรัม ใส่ถ้วยกระเบื้อง นำไปอบพร้อมกับฝาปิดที่อุณหภูมิ 105 °C จนได้น้ำหนักคงที่ จดน้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr ให้แน่นอนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (m_1)

ชั่งตัวอย่างไฮโดรไลเซทประมาณ 2 กรัม ในบีกเกอร์ที่แห้งจดน้ำหนักถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง (m_0) เติมน้ำร้อนไม่เกิน 5 มล. ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันแล้วถ่ายลงในถ้วยกระเบื้องทั้งหมดคนจน kieselguhr เป็นเนื้อเดียวกัน นำถ้วยกระเบื้องบรรจุตัวอย่าง และฝาปิดไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 5-8 ชั่วโมง จากนั้นนำออกมาบด โดยใช้แท่งแก้วที่แห้งแล้วอบต่อไปอีกประมาณ 8 ชั่วโมง นำออกมาใส่ใน desicator ทิ้งไว้ให้เย็น 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักให้แน่นอนถึงทศนิยม 4 ตำแหน่ง ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (m_2)

8.3 วิธีคำนวณ

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

m_0 = น้ำหนักของตัวอย่างไฮโดรไลเซท

m_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr หลังจากอบจนคงที่

m_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr และตัวอย่างไฮโดรไลเซท หลังจากอบจนคงที่

วิธีตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. วิธีวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC,1984)

เจือจางตัวอย่างไฮโดรไลเซท 3 ระดับ คือ 1:10, $1:10^{-2}$, และ $1:10^{-3}$ ตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มล. แต่ละระดับความเจือจางทำ 3 จานเทอาหารเลี้ยงเชื้อ (PCA) ลงในจานประมาณ 15- 20 มล. เขย่าจานโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง และหมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30 - 35 °C เป็นเวลา 2-5 วัน

นับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30 - 300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย

2.วิธีวิเคราะห์จุลินทรีย์ *Samonella* (AOAC,1984)

2.1 การ pre-enrichment

ชั่งตัวอย่าง 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติกซึ่งบรรจุ Lactose broth หรือ buffered peptone water 225 มล. ใช้มือบีบถุงให้อาหารแตกละลาย สำหรับอาหารที่เป็นกรดจัด ควรปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 6.8-7.0 ด้วยสารละลาย NaOH 1N บ่มเชื้อที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 Enrichment medium

เมื่อเชื้อปรับตัวใน Lactose broth หรือ Buffered peptone water แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มล. จากข้อ 2.1 ใส่ลงในอาหารเพาะเชื้อสองชนิดคือ selenite cystine broth ปริมาตร 10 มล.และ tetrathionate broth ปริมาตร 10 มล.บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 การแยกเชื้อบนอาหารแข็ง

- ใช้ลูปแตะเชื้อจากข้อ 2.2 streak ให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บน BGA และ SS agar บ่มที่ 37 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- สังเกตโคโลนีของ *Samonella* ซึ่งโคโลนีจะไม่มีสีถึงสีชมพูอ่อน ๆ โคโลนีใสหรือทึบแสง โปร่งแสงหรือเป็นฝ้าก็ได้ *Samonella* บางสายพันธุ์อาจมีสีดำตรงกลางโคโลนี

2.4 การทดสอบปฏิกริยาทางชีวเคมีบางประการ

เขี่ยเชื้อจากโคโลนี ลักษณะดังกล่าวในข้อ 2.3 ลงในอาหารเพาะเชื้อต่อไปนี้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- TSI agar (slant และ stab) เชื้อ *Samonella* จะให้ผลบวกดังนี้

  Slant เปลี่ยนเป็นสีแดง (ด่าง)

  Stab เปลี่ยนเป็นสีเหลือง (กรด) และส่วนใหญ่จะสร้าง H_2S ให้สีดำมีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ไม่สร้าง H_2S

- Urea agar (slant) เชื้อ *Samonella* จะไม่สร้าง Urease อาหารจะไม่เปลี่ยนสี

- Lysine Iron Agar (LIA) ทำวิธีเดียวกับ TSI

ถ้าเป็น *Samonella* จะพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ LIAจะคงสีม่วงอย่างเดิมไว้ อาจมีสีดำถ้า *Samonella* นั้นสร้าง H_2S

- Tryptophan broth (ทดสอบ Indole) บ่มที่ 35-37 ^{o}C 24 ชั่วโมง หยด kovac ถ้าเป็น *Samonella* สีจะไม่เปลี่ยนแปลง

2.5 นำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบข้างบนแล้วไปทดสอบทาง Serological

-ถ่ายเชื้อลงบน NA slant บ่มที่ 37 ^{o}C ทำ suspention ด้วยน้ำเกลือปกติ ปริมาตร 1 มล.

- หยด suspention ลงบนสไลด์ 3 หยด ห่างกันพอสมควร

- หยด polyvalent "O" antiserum ลงใน suspention หยดแรก polyvalent "H" antiserum ลงในหยดที่สอง

- เอียงสไลด์ไปมา สังเกตุการตกตะกอน (agglutination)การตกตะกอนใน หยดซึ่งมี antiserum โดยที่ในหยดที่สามซึ่งไม่มี antiserum อยู่ ไม่มีตะกอนเกิดขึ้น แสดงว่า เกิดผลบวก ในกรณีที่เกิด suspention หยดที่ไม่ได้เติม antiserum แสดงว่าเกิด autoagglutination

- ในกรณีที่เกิดปฏิกริยาเฉพาะกับ "H" antiserum หยด "Vi"antigen ลงใน suspention หยดที่สาม หรือทดสอบกับ "O" antiserum ใหม่หลังต้ม suspention ประมาณ 1 นาที

2.6 การสรุปและรายงานผล

- เชื้อซึ่งให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีซึ่งแสดงว่าเป็น *Salmonella* และตกตะกอนกับ antiserum ถือว่าเป็น *Salmonella*

- เชื้อซึ่งให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีเพียงบางการทดสอบ แต่ไม่ตกตะกอนกับ antiserum ถือว่าไม่ใช่ *Salmonella*

- รายงานผลว่าตรวจพบ *Salmonella* หรือไม่ในตัวอย่างไฮโดรไลเซท 25 กรัม

ภาคผนวก ข

รูปที่ 4.6 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ

ประวัติผู้เขียน

นางสาว สมพร มะสิแก้ว เกิดวันที่ 7 กันยายน 2514 จังหวัดพังงา สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายเมื่อปี 2532 จากโรงเรียนภูเก็ตวิทยาลัย จังหวัดภูเก็ต และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

นางสาว สุดา จินตนะธรรม เกิดวันที่ 4 กันยายน 2514 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายเมื่อปี 2533 จากโรงเรียนสตรีวิทยา และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)