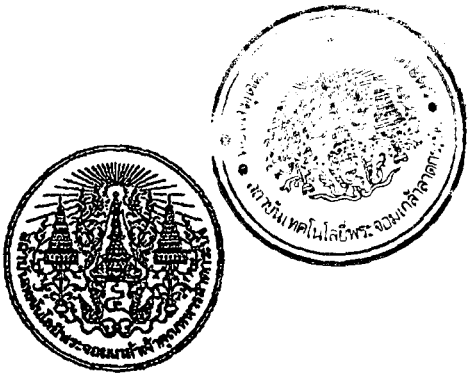


ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยใช้เอนไซม์ neutral protease

(Production of protein hydrolysate from chicken head by neutral protease)

โดย

นางสาวปรียาภรณ์ ทองประ รหัสประจำตัว 40044439

นายศิระ นาคะศิริ รหัสประจำตัว 40044458

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 15 ม.ค. 2544 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ดร.ประสันธ์ ฟื้นศิโรดม)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

( )

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17516

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนังไก่โดยใช้เอนไซม์ neutral protease

Production of protein hydrolysate from chicken head by neutral protease

T097032

นางสาวปรียาภรณ์ ทองประ

นายศิระ นาคะศิริ

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2544

ปฟ.
ป474ก
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 97032
วัน,เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรียาภรณ์ ทองประ และ ศิระ นาคะศิริ : การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยใช้เอนไซม์ neutral protease (Production of protein hydrolysate from chicken head by neutral protease) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม. 40 หน้า

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยใช้เอนไซม์ Neutral protease (Neutrase 0.5 L, Novo Industry A/S, Copenhegen)ในขั้นตอนการย่อยสลายได้ศึกษา อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ 3 ระดับ คือ 25 :75, 50 :50 และ 75 :25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นเอนไซม์ 4 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 5 ระดับ คือ 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 3 ระดับ คือ 6, 7 และ 8 และเวลาที่ใช่ในการย่อยสลาย 4 ระดับ คือ 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ในแต่ละสภาวะ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ 35.76 % คือใช้อัตราส่วนหัวไก่ต่อน้ำ 75 : 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 45 องศาเซลเซียส ระดับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และระยะเวลาในการย่อยสลาย 6 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 55.52 % โปรตีน 34.93 % ไขมัน 2.5 % เถ้า 5.7 % และมีปริมาณจุลินทรีย์น้อยกว่า 30 CFU/ml

ปรียาภรณ์ ทองประ

ศิระ นาคะศิริ

ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน เดือน ปี
		15 มี.ค. 44

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่อง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยใช้เอนไซม์ neutral protease สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ และอาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา ในฐานะที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้ความเอาใจใส่ ดูแล ให้ความรู้และคำปรึกษา อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานปัญหาพิเศษนี้มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ อาจารย์บุญเทียม พันธ์เพ็ง ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Neutrase 0.5 L เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท ฟาร์มเจริญศักดิ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์วัตถุดิบ หัวไก่ เพื่อใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกแก่คณะผู้จัดทำปัญหาพิเศษ

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจ คำปรึกษา และคอยดูแลห่วงใยเสมอมา

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ และน้อง ที่ให้กำลังใจ ความช่วยเหลือ และความปรารถนาดีตลอดมา

ปรียาภรณ์ ทองประ
ศิระ นาคะศิริ
มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทรรศน์	2
2.1 โปรตีนไฮโดรไลเซท	2
2.2 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท	2
2.3 เอนไซด์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน	3
2.4 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์	8
2.5 สารที่มีรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท	11
2.6 วิธีการกำจัดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท	14
3. การทดลอง	15
3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	15
3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	15
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	16
3.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่	18
3.5 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท	19
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	20
4.1 วัตถุดิบที่เตรียมได้	20
4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวไก่บด	20
4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่	21
4.4 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท	29
5. สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	31
5.1 สรุปผลการทดลอง	31
5.2 ข้อเสนอแนะ	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	36
ประวัติผู้เขียน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สมบัติของนิวทรัลโปรทิเอส และแอลคาไลโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis*	6
2.2	เปปไทด์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสขมซึ่งแยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซท	12
2.3	แสดงรสชาติ (Taste) ของ L – amino acid และ D – amino acid	13
4.1	แสดงองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ (หัวไก่บด)	21
4.2	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	22
4.3	ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ	24
4.4	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อควบ คุมอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน	25
4.5	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ	27
4.6	การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ	28
4.7	องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน	2
2.2	แสดงการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปทิเดส (1) และ เอนโดเปทิเดส (2)	4
2.3	ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Neutrase	7
2.4	ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Neutrase	7
2.5	ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Neutrase	8
3.1	ขั้นตอนการเตรียมหัวไก่บด	16
3.2	ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดไลเซทจากหัวไก่	17
4.1	หัวไก่บดที่เตรียมได้	20
4.2	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ	22
4.3	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อควบคุมอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ	26
4.4	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ	28
4.5	ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase	30
5.1	ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดไลเซทจากหัวไก่บดในสภาวะที่เหมาะสม	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันประเทศไทยมีการส่งออกไก่สดแช่แข็ง (Frozen chicken) ไปยังประเทศต่างๆเป็นปริมาณมาก โดยมีตลาดส่งออกที่สำคัญ คือ ประเทศญี่ปุ่น สิงคโปร์ ฮ่องกง เยอรมัน และเนเธอร์แลนด์ ทำให้ปริมาณการส่งออกของไก่สดแช่แข็งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในอนาคต และจากการขยายตัวของโรงงานชำแหละไก่ทำให้มีผลิตผลพลอยได้เกิดขึ้นมากมายหลายอย่าง หนึ่งในผลิตผลพลอยได้ที่สำคัญก็คือ หัวไก่ ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีเป็นโปรตีน 14.44 % ไขมัน 6.63 % น้ำ 74.19 % และเถ้า 3.87 % (Fix และ Surowka, 1992)ในปัจจุบันยังไม่มีการนำหัวไก่ดังกล่าวไปใช้ประโยชน์อย่างจริงจัง ส่วนมากจะนำไปเป็นอาหารปลา ซึ่งความต้องการใช้หัวไก่เพื่อประโยชน์ดังกล่าวมีอยู่ในขอบเขตจำกัด แนวทางหนึ่งที่จะนำโปรตีนจากหัวไก่มาใช้ประโยชน์ คือ การผลิตโปรตีนไฮโดไลเซท ในระดับอุตสาหกรรมทำได้ 2 วิธี คือ วิธีทางเคมีโดยการย่อยสลายด้วยกรด หรือด่าง และวิธีการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ วิธีทางเคมีมีข้อเสีย คือ ต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง อุณหภูมิสูง เวลานาน ซึ่งทำให้เกิดการกัดกร่อนเครื่องมือ ในขณะที่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีข้อได้เปรียบ คือ มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสูง ใช้เอนไซม์น้อย ในสภาวะที่ไม่รุนแรง (pH, อุณหภูมิ และความดันปกติ) ไม่เกิดการกัดกร่อนเครื่องมือ และไม่ทำลายกรดอะมิโนอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยมีดังนี้

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยใช้เอนไซม์ Neutral protease
2. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้
3. ศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์บางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทรรศน์

2.1 โปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้นๆ และโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง

พันธะเปปไทด์ของโปรตีนเป็นพันธะเอไมด์ (amide) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโน และถือเป็นพันธะที่สำคัญซึ่งเป็นตัวเชื่อมให้กรดอะมิโนมาประกอบกันเป็นสายของโปรตีนซึ่งโดยในธรรมชาติจะจับกันเป็นสายยาวนับร้อยโมเลกุล ในการย่อยสลายโปรตีนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทสามารถทำได้โดยใช้กรด ด่าง หรือเอนไซม์โปรติเอส

รูปที่ 2.1 แสดงพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน

2.2 ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.2.1 ใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัวในอาหาร (stabilizer) หรือใช้เป็นสารเชื่อม (binder) โปรตีนไฮโดรไลเซท มีสมบัติเป็น stabilizer, emulsifier และ binder ที่ดีจึงสามารถนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดได้

2.2.2 ใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ นิยมใช้ในอาหารสำหรับผู้สูงอายุที่มักมีปัญหาเกี่ยวกับทางเดินอาหาร และดูดซึมสารอาหารมีประสิทธิภาพต่ำ มีความอยากอาหารน้อย ใช้เป็นอาหารสำหรับนักกีฬา เพราะโปรตีนถูกนำมาใช้เป็นพลังงานและสะสมในรูปของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังใช้กับผู้คุมน้ำหนักได้อีกด้วย เนื่องจากผู้ที่ลดน้ำหนักจะเกิดการสูญเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมดุลไนโตรเจนไป ดังนั้นการบริโภคโปรตีนไฮโดรไลเซทจะสามารถรักษาสมดุลไนโตรเจนที่เสียไปและช่วยการลดความอยากอาหารได้อีกด้วย

2.2.3 ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารสามารถใช้ได้ 2 ลักษณะ คือ flavor donor และ flavor enhancer โดยที่ flavor donor เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารให้ได้กลิ่นรสตามต้องการ เช่นในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว ซุป ซอสต่างๆ สำหรับ Flavor enhancer เป็นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งเดิมมีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เช่น ผลิตภัณฑ์ครีม ซุป และไส้กรอก

2.2.4 ใช้เป็นอาหารทางการแพทย์

อาหารทางการแพทย์ คือ อาหารที่เสริมสารอาหารครบถ้วนเพียงพอกับความต้องการของผู้ป่วยซึ่งไม่สามารถรับประทานอาหารในรูปแบบปกติได้ ดังนั้นการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในการผลิตสูตรอาหารทางการแพทย์จึงมีความเหมาะสมเป็นอย่างยิ่ง เพราะมีคุณสมบัติที่สามารถตอบสนองความต้องการของผู้ป่วยได้เป็นอย่างดี ได้แก่ ร่างกายสามารถดูดซึม และนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็วมีสารอาหารครบถ้วน มีความสมดุลของกรดอะมิโน และมีคุณสมบัติเฉพาะ เช่น กลูตามีน (glutamine) เป็นแหล่งพลังงานของเซลล์เยื่อบุ (mucosal cell) หรืออาร์จีนีน (arginine) ช่วยสร้างเซลลิมโฟไซท์ (lymphocyte cell) ในระบบภูมิคุ้มกัน ผู้ป่วยที่สามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นอาหารได้แก่ ผู้ป่วยที่เป็นโรคลำไส้อักเสบ ลำไส้ใหญ่เป็นแผลเปื่อย กลุ่มอาการลำไส้สั้น ตับอ่อนอักเสบ และโรคภูมิแพ้อาหาร โดยผู้ป่วยเหล่านี้จะมีอาการ hypermetabolic มีการดูดซึมผิดปกติ เซลล์ถูกทำลาย อวัยวะที่เกี่ยวกับระบบย่อย และดูดซึมอาหาร เช่น ตับ ตับอ่อน ไต ผิดปกติ

2.3 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน

2.3.1 การจำแนกชนิดของโปรติเอสตามลักษณะการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน

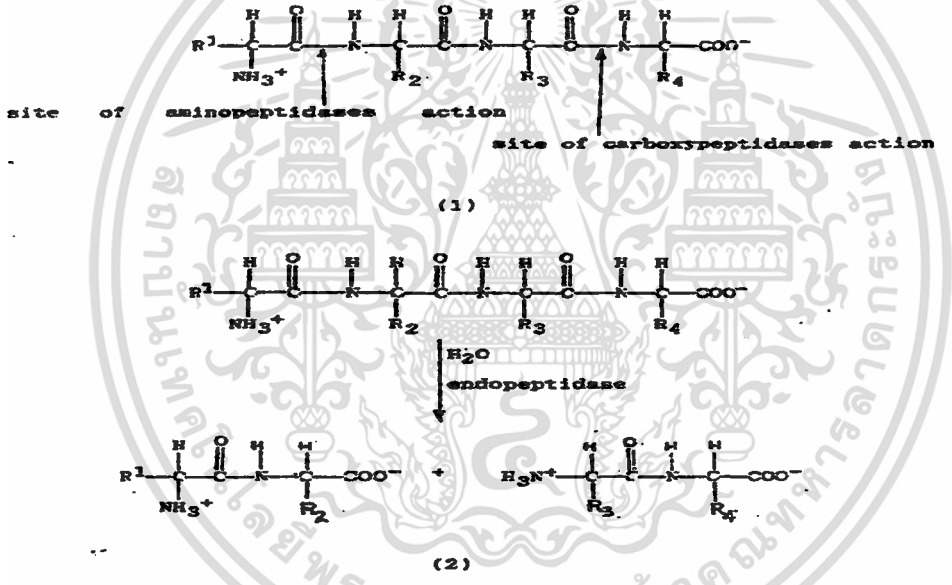
เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่เรียกว่า proteolytic enzyme ทำหน้าที่ในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ในโมเลกุลโปรตีนโปรติเอส สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทตามลักษณะการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ดังนี้

1) เอกโซเปปทิเดส (exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิลเท่านั้น ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้นี้ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส คาร์บอกซิลเปปทิเดส และไดเปปทิเดส (รูปที่ 2.2)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) เอนโดเปปทิเดส (endropeptidase) เป็นเอนไซน์ที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่ง ไม่เฉพาะปลายทั้งสองเท่านั้น (รูปที่2.2) ตัวอย่างของเอนไซน์กลุ่มนี้ได้แก่

- โปรติเอสในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เปปซิน (pepcin) ทริปซิน (trypsin) และ ไคโมทรีปซิน (chymotrypsis)
- โปรติเอสจากพืช เช่น ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromilain)
- โปรติเอสในเซลสัตว์ เช่น คาเธปซิน (cathepsins)
- โปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด เช่น นิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) จาก *Bacillus subtilis* เป็นต้น



รูปที่ 2.2 แสดงการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนไซม์เอกโซเปปทิเดส (1) และเอนโดเปทิเดส (2)

ที่มา : พรทิพย์ มีนพกิจ (2541)

2.3.2 การจำแนกชนิดของโปรติเอส ตามลักษณะของบริเวณเร่ง (active site)

โปรติเอสสามารถแบ่งเป็น 4 ประเภท ตามลักษณะเฉพาะของบริเวณเร่ง ดังต่อไปนี้

2.3.2.1 ไธออลโปรติเอส (thiol proteases) เป็นโปรตีนที่มีหน่วยเร่งปฏิกิริยาเป็นหมู่ไธออล ซึ่งอาจมีได้มากกว่า 1 หมู่ และถูกยับยั้งได้โดยสารประกอบที่สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไธออุลได้ เช่นไอออนของโลหะหนัก หรืออนุพันธ์ของไอออนโลหะหนัก สารที่มีสมบัติเติมหมู่อัลคิล (alkyl agent) และสารที่มีสมบัติเป็นตัวออกซิไดซ์ (oxidiaing agent) เป็นต้น ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้คือ ปาเปน ไฟซิน คาเธปซิน และโปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด

2.3.2.2 เมธอลโปรติเอส (metal proteases) เป็นโปรติเอสที่มีกลไกลการทำงานในบริเวณ catalytic site ที่ประกอบด้วย metal ion เช่น Mg^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} และ Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งอาจยึดติดกันอย่างหนาแน่นหรือจับกันอย่างหลวม ๆ ขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ เอกโซเปปทิเดสเป็นส่วนใหญ่ เช่น ลิวซีนอะมิโนเปปทิเดส (leucine aminopeptidases) โพรลิเดส (prolidases) เป็นต้น โปรติเอสกลุ่มนี้จะถูกยับยั้ง เมื่อไอออนของโลหะที่จับอยู่กับโมเลกุลของเอนไซม์ถูกกำจัดไป

2.3.2.3 แอซิดโปรติเอส (acid proteases) เป็นโปรติเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะที่มี pH ในช่วงเป็นกรด และที่หน่วยเร่งปฏิกิริยาจะประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ ตัวอย่างของโปรติเอสในกลุ่มนี้คือ เปปซิน และเรนนิน (rennin) เป็นต้น

2.3.2.4 เซอรีนโปรติเอส (serine proteases)เป็นโปรติเอสที่มีหน่วยเร่งปฏิกิริยาประกอบด้วยกรดอะมิโนเซอรีนซึ่งถูกยับยั้งโดยสารประกอบ organophosphorus เช่น disopropyl phosphofluoridate (DEP) ตัวอย่างของโปรติเอสที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ ทริปซิน และ ธรอมบิน (thrombin) เป็นต้น แหล่งของเอนไซม์เหล่านี้จะพบในตับอ่อนของสัตว์สูง เช่น วัว ควาย หมู รวมทั้งมนุษย์ ซึ่งมีกลไกการทำงานคล้ายคลึงกัน เอนไซม์นี้ทั้งหมดเป็น endopeptidase และ optimum pH ของเอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ในช่วง 6.7 – 9 จึงจัดเป็น alkaline protease

ปัจจุบันการย่อยสลายโปรตีนด้วยการใช้เอนไซม์ ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับการย่อยสลายวัตถุดิบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เพื่อใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สามารถเพิ่มผลผลิต ปรับปรุงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์หรือปรับปรุงวิธีในการผลิต นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน สามารถที่จะรักษาคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ได้ดีกว่าการย่อยสลายด้วยกรดและด่าง

2.3.3 โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

โดยทั่วไปเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ควรจะมีลักษณะที่สำคัญคือ สามารถใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย และ หากผลิตจากจุลินทรีย์ต้องไม่มีพิษซึ่งกำหนดโดย FAO/WHO

เอนไซม์ที่นิยมใช้ในปัจจุบันมี 2 ชนิดคือ Alkaline protease และ Neutral protease ซึ่งมีชื่อทางการค้าคือ Neutrase และ Acalase ผลิตโดยบริษัท NOVO industry A/S, Denmark

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Alcalase ผลิตจาก *Bacillus licheriformis* โดยวิธีหมักในอาหารเหลวมี pH ที่เหมาะสมคือ 7.5 – 9.5 และอุณหภูมิ 55 – 65 องศาเซลเซียส

Neutrase 0.5 L เตรียมได้จากการหมักอาหารเหลว ของ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์เฉพาะ pH ที่เหมาะสม 5.5 – 7.5 อุณหภูมิ 45 – 55 องศาเซลเซียสโดยทั่วไปโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis* จะมีเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ 2 ชนิด คือ Neutral protease และ Alkaline protease แต่ในกรณีของ Neutrase จะประกอบด้วย Neutral protease เท่านั้น สำหรับสมบัติของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด แสดงในตารางที่ 2.1จะเห็นว่าโปรติเอสทั้ง 2 ชนิด มีบริเวณเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ทำให้สมบัติทั่วๆไปของเอนไซม์ต่างกันไปด้วย

ตารางที่ 2.1 สมบัติของนิวทรัลโปรทิเอส และแอลคาไลโปรติเอสที่เตรียมได้จาก *Bacillus subtilis*

	นิวทรัลโปรทิเอส	แอลคาไลโปรติเอส
บริเวณเร่งปฏิกิริยา	Zn^{2+}	Serine
ผลของ Ca^{2+} ต่อการเพิ่มเสถียรภาพถูกยับยั้งโดย:	+	0
DEP[1] & PMSF[2]	0	+
EDTA[3] & Phosphate	+	0
Soybean tripsin inhibitor	0	0

[1]DEP : Diisopropyl phosphofluoride

[2]PMSF : Phenylmethane sulplhonylfluoride

[3]EDTA : Ethylene diamine tetraacetic acid

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

2.3.4 สมบัติของเอนไซม์ Neutrase

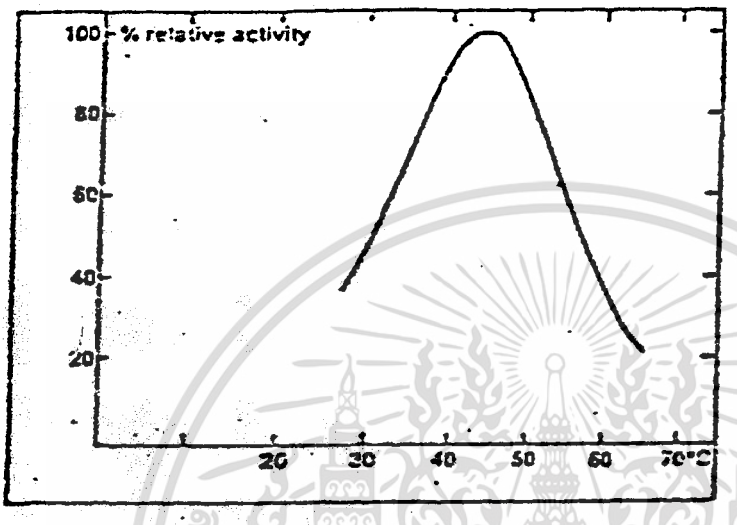
เอนไซม์ Neutrase ที่ผลิตโดยบริษัท Novo Industry นั้นจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้ม ละลายน้ำได้ มีความหนาแน่นประมาณ 1.25 กรัม/มิลลิลิตร และมีแอคติวิตี 0.5 Au/g โดยที่ 1 Au (Ason Unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (destroyed hemoglobin) ภายใต้สภาวะที่กำหนด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส pH เท่ากับ 7.5 เป็นเวลา 10 นาที ให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรแอซิด และเกิดสีกับฟีนอลรีเอเจนต์เท่ากับ 1 มิลลิอิควิวาเลนต์ (milliequivalent) ของไทโรซีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4.1 สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ Neutrase

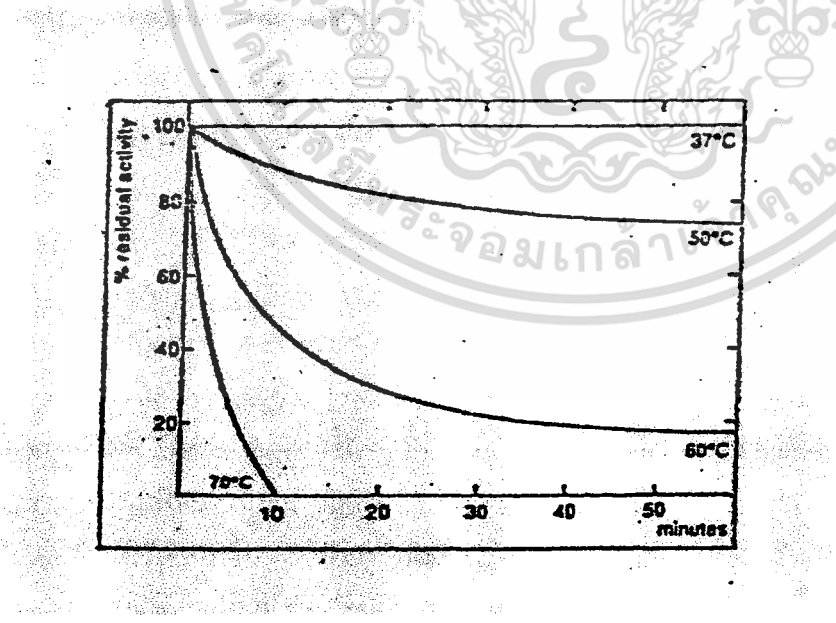
1) อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของ Neutrase คือ 45–55องศาเซลซียส (รูปที่ 2.3 และ 2.4) Neutral proteas การเก็บ Neutrase ที่ 5 องศาเซลเซียสจะทำให้อายุการเก็บนานขึ้น โดยไม่มีการสูญเสียแอคติวิตี อย่างน้อย 1 ปี



รูปที่ 2.3 ผลของอุณหภูมิต่อแอคติวิตีของ Neutrase

ที่มา : Novo Nordisk (1994)



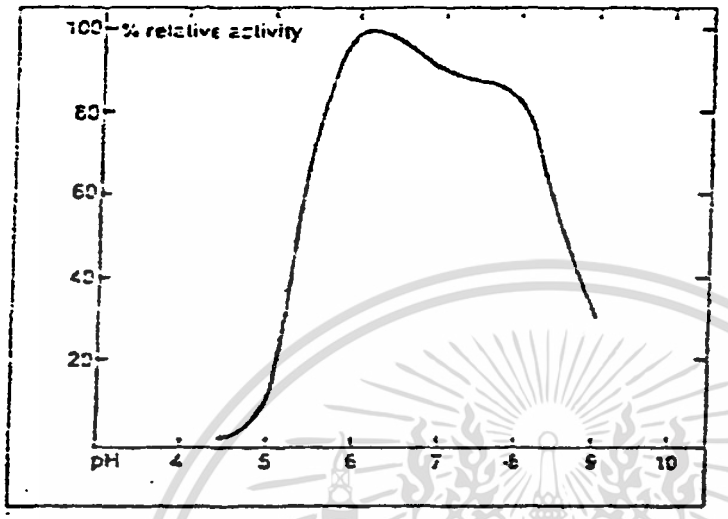
รูปที่ 2.4 ผลของอุณหภูมิต่อเสถียรภาพของ Neutrase

ที่มา : Novo Nordisk (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) ความเป็นกรดด่าง

ความเป็นกรดเป็นด่างที่เหมาะสมกับการทำงานของ Neutrase อยู่ในช่วง pH 5.5 – 7.5 ดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ผลของ pH ต่อแอคติวิตีของ Neutrase
ที่มา : Novo Nordisk (1994)

2.4 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์

2.4.1 แหล่งของโปรตีนและเอนไซม์

การเลือกวัตถุดิบที่นำใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท จะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ คุณค่าทางโภชนาการ ราคา รสชาติ ความสามารถของแอนติเจนที่จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าสงแอนติบอดีและสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

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

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการผลิต เอนไซม์โปรติดเอส ในการย่อยสลายสับสเตรทโดยทั่วไปไม่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอลบริสุทธิเพียงชนิดเดียว แต่นิยมใช้เอนไซม์เอกโซเปปติเดส และเอนโดเปปติเดสผสมกัน เพื่อให้ได้กรดอะมิโน เปปไทด์ และไตรเปปไทด์ ตามที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แพนเครียติน (pancreatin) ที่ผลิตในทางการค้าเป็นส่วนผสมของทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งจะมีความสามารถเป็นทั้งเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส โดยที่ไคโมทริปซินและทริปซินจะความจำเพาะในการตัดพันธะรหว่างอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) โดยปกติแล้วเอนไซม์ที่พบในพืชและสัตว์ เช่น ปาเปน (papain0 ฟีซิน (ficin) โบรมิเลน (bromilain) จะความจำเพาะต่อการตัดพันธะน้อยกว่า เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้านั้น ต้องอาศัยการพัฒนาหาส่วนผสมของเอนไซม์ที่พอเหมาะเพื่อให้ได้อัตราส่วนของกรดมิโน ไดเปปไทด์ ไตรเปปไทด์และโอลิโกเปปไดท์ (oligopeptides) ตามต้องการ ในการเลือกว่าจะใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือจะใช้อนไซม์ผสม จะพิจารณาได้จากความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ โดยอัตราการย่อยสลายสามารถวัดได้ด้วยอัตราส่วนของ AN (amino nitrogen) ต่อ TN (total nitrogen) คือปริมาณอะมิโนไนโตรเจนอะมิโนไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และอัตราส่วนของ AN/TN สามารถหาได้จากวิธี formal titration และการใช้วิธีของ kjeldahl ซึ่งถ้ามีอัตราการย่อยสลายมาก ค่า AN/TN จะมีค่าประมาณ 50 หรือมากกว่านี้ ในการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวเดียวจะมีผลทำให้เกิดการจำกัดความสามารถในการย่อยสลาย เช่น เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากพืช จะมีค่าระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุดประมาณ 35 เปอร์เซนต์เท่านั้น

2.4.2 การควบคุมกระบวนการย่อยสลาย

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้า จะทำในลักษณะของกระบวนการผลิตที่ไม่ต่อเนื่อง โดยกระบวนการย่อยสลายจะควบคุมปัจจัยการย่อยสลายต่าง ๆ คือ อุณหภูมิ เวลา pH และ AN/TN

สภาวะในการย่อยสลายจะถูกควบคุม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติตามต้องการ เช่น มีการกระจายตัวของกรดอะมิโน สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ และปริมาณโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อยสลาย (intact protein)

สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตนั้น จะพิจารณาจากอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ 32-50 องศาเซลเซียส ส่วน pH จะกำหนดให้อยู่ในช่วงที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด เช่นถ้าใช้แพนเครียติน ค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 7

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเลือกใช้เอนไซม์ จะพิจารณาจากประสิทธิภาพ และความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ดังนั้น ในภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ pH และความเข้มข้นของเอนไซม์ ปัจจัยทางเศรษฐกิจจะเป็นตัวกำหนดว่า ระหว่างการลงทุนที่มากขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สิ่งใดจะทำให้เกิดความคุ้มค่ามากที่สุด และในการผลิตบางครั้งอาจมีการใช้โคแฟกเตอร์ (cofactor) ร่วมด้วยก็ได้

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการควบคุมการย่อยสลายคือการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่สับสเตรทและเอนไซม์จะต้องเก็บในภาวะปลอดเชื้อ ก่อนนำมาเข้ากระบวนการ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการ อุณหภูมิที่ใช้ก็อาจมีผลทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์นี้สามารถแก้ไขได้ โดยการควบคุมกระบวนการต่าง ๆ อย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะอุณหภูมิ pH รวมทั้งการทำให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้ออย่างแท้จริง

ความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท จะถูกควบคุมระหว่างปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยสามารถควบคุมได้ใน 2 ลักษณะคือ

1. ระดับขั้นการย่อยสลาย จะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์สุดท้าย

2. การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย โดยโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยสลายและเอนไซม์จะถูกแยกออกโดยการกรองผ่าน DIATOMACEOUSR EARTH (DE), fiberglass depth filter, bacteria retention membrane filter และ cross flow filtration วิธีที่นิยมใช้ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายคือ การปรับ pH และอุณหภูมิอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสชนิดนั้นมีความไวต่อการ5 ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยการนำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มาผ่านอุณหภูมิสูง ซึ่งจะเป็นการทำลายแอคติวิตีของเอนไซม์ และหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย การยับยั้งปฏิกิริยาโดยการใช้กรดไม่เป็นที่นิยมในทางการค้า เนื่องจากเมื่อหยุดปฏิกิริยาโดยปรับ pH ให้เป็นกรดต้องปรับ pH ให้กลับมาเป็นกลางอีกครั้ง ทำให้เกิดเกลือขึ้นจำนวนมากในผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องมีการสกัดแยกเกลือออกอีกครั้ง การใช้ความร้อนสูง เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายอาจทำลายคุณค่าทางโภชนาการ และก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้ เช่น ปฏิกิริยาเมลลาร์ดหรือก่อให้เกิดสารชนิดอื่นในผลิตภัณฑ์ได้ การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่ง โดยการแยกเอาเอนไซม์ออกด้วยการกรองผ่าน diatomaceous earth (DE), fiberglass depth type, microporous หรือการใช้ ultrafiltration membrane

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สารที่มีรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์มักก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องความขม เป็นที่สังเกตว่าความขมมักเกิดกับอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง รสขมนี้เกิดจากเปปไทด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายด้วย proteolytic enzyme Mcarr และคณะ (1956) พบว่าความขมมีผลมาจากเปปไทด์มากกว่ากรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ที่มีรสขมโดยมากจะมีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิค Kirimura et al., (1969) พบว่าเปปไทด์มีหลายชนิดแต่มีบางชนิดเท่านั้นที่ให้รสขม กรดอะมิโนเดี่ยว ๆ จะมีรสหวาน ขม เปรี้ยว เค็ม หรือมีรสเหมือนผงชูรส แตกต่างไปตามชนิดของกรดอะมิโน ตัวอย่างของเปปไทด์ที่ก่อให้เกิดรสขม ซึ่งแยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทชนิดต่างๆ แสดงไว้ในตารางที่ 2.2

Metobe and Hata , (1972) รายงานว่ากรดอะมิโนที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ มักจะมีความขมมากกว่ากรดอะมิโนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้เปปไทด์ที่ไม่มีขั้ว ซึ่งมี side chain ที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic เป็นองค์ประกอบอยู่สูงมักจะมีรสขม จากการทดลองโดยใช้โมเลกุลโปรตีนแบบกลม (globular protein) ซึ่งส่วนที่เป็นไฮโดรโฟบิคจะซ่อนอยู่ภายในจึงไม่สัมผัสกับตุ่มรับรสบนลิ้น แต่เมื่อใดที่โปรตีนถูกย่อยสลาย ส่วนไฮโดรโฟบิคจะปรากฏออกมาทำให้เกิดการสัมผัสกับตุ่มรับรสได้ง่าย มีผลทำให้รู้สึกถึงรสขม และรสขมจะเกิดมากที่สุดเมื่อกรดอะมิโนมีส่วนที่เป็นที่เป็นไฮโดรโฟบิคทั้งสองด้าน รสขมจะลดต่ำลงเมื่อกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิคอยู่ในตำแหน่งด้านปลายของ C – terminal หรือ N – terminal และรสขมจะน้อยที่สุดเมื่อเป็นกรดอะมิโนอิสระ

มีสารประกอบหลายชนิดที่ให้รสขม โดยปกติระดับของความขมมักจะมีน้อยกว่าความหวาน รสเปรี้ยว และความเค็ม เป็นเรื่องยากที่จะอธิบายถึงความสัมพันธ์ของรสชาติเหล่านี้กับโครงสร้างของมัน อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของโครงสร้างกรดอะมิโนกับความขม พบว่า L – amino acid หลายตัวที่มีโมเลกุล side chain เป็น hydrophobic group จะมีรสขม ขณะที่ D – amino acid ที่มี side chain เป็น hydrophobic group เช่นเดียวกันจะมีรสหวาน ดังแสดงในตารางที่ 2.3 Wieser และ Belitz (1981) ได้ศึกษาและทดสอบรสชาติของกรดอะมิโนประมาณ 60 ชนิด เอสเทอร์ของกรดอะมิโน N – acetyl amino acid , aminde และสารประกอบให้รสขมอื่น ๆ ด้วย ปรากฏว่าผู้ทดสอบรับความขมได้ในระดับความขม 100 mole/L (L-2-amino butyric acid) โดยสามารถเรียงลำดับความขมของอนุพันธ์ L – amino acid ได้ดังนี้

$$H_3N^- - CH(R) - COO^- = H_3N^+ - CH(R) - CH_2OH > H_3N^+ - CH(R) - COOR > N_3H^+ - CH(R) - H$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 เปปไทด์บางชนิดที่ทำให้เกิดรสขมซึ่งแยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซท

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

ที่มา : Pedersen (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 แสดงรสชาติ (Taste) ของ L – amino acid และ D – amino acid

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

ที่มา : Kier และ Pharm , (1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 วิธีการกำจัดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

2.6.1 การสกัดแยกแบบจำเพาะ (Selective Seperation)

การกำจัดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยวิธีนี้ สามารถกระทำได้โดยใช้สารประกอบชนิดต่างๆ ช่วยในการสกัดแยกองค์ประกอบที่ให้รสขมออก ได้แก่

2.6.1.1 คาร์บอนกัมมันต์ (activated carbon)

ได้มีการทดลอง Murray และ Baker (1952) กำจัดรสขมออกจากโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้คาร์บอนกัมมันต์ 0.5 กรัมต่อกรัมโปรตีนไฮโดรไลเซท จากนั้นใช้การแยกคาร์บอนกัมมันต์ออก ซึ่งพบว่าวิธีนี้สามารถกำจัดรสขมได้เป็นอย่างดี โดยที่คาร์บอนกัมมันต์จะทำหน้าที่เป็นตัวดูดซับกรดอะมิโน หรือเปปไทด์ที่มีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิคที่ก่อให้เกิดรสขม แต่การใช้คาร์บอนกัมมันต์จะทำให้สูญเสียไนโตรเจนถึง 26% เนื่องจากมีการดูดซับทริปโตเฟนเฟนิลอะลานีน หรือเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้จึงมีผลต่อการผลิตและราคาของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท

2.6.1.2 azetropic mixture ของ 2^0 butanol และน้ำ

Lalasdis (1978) พบว่าเปปไทด์ที่แยกออกจาก 2^0 butanol มีรสขมอย่างมาก ดังนั้นการสกัดความขมด้วยวิธีนี้จึงมีประสิทธิภาพดี

2.6.2 การบดบัง

การเติมสารประกอบโพลีฟอสเฟต ระหว่างกระบวนการย่อยสลาย สามารถใช้บดบังรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทได้ (Tokita , 1969) นอกจากนี้เจลาตินก็สามารถใช้ได้เช่นเดียวกัน แม้ว่าจะไม่ดีเท่าไกลซีนก็ตาม โดย Stanlay (1981) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อไก่ถอดกระดูกโดยย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8 ความเข้มข้นเอนไซม์ 4.3% เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายที่เวลา 0 , 30 , 60 , 90 และ 120 นาทีตามลำดับมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่า เมื่อใช้เนื้อไก่ล้วน ๆ ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ผู้ทดสอบสามารถรับรสขมได้ตั้งแต่ที่เวลา 90 นาทีขึ้นไป โดยที่ระดับความขมเหนือควินิน 0.003% เมื่อเติม glycine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีรสหวาน และพบมากใน gelatin นอกจากนี้ยังมีการเติม proline และ hydroxy proline ร่วมกับ glycine ลงในโปรตีนไฮโดรไลเซทได้ ในขณะที่การเติม proline และ hydroxy proline เพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดความขมได้ อาจสรุปได้ว่ากลไกการลดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยการเติม geltain เกิดจาก กรดอะมิโนชนิด glycine ที่ไปบดบังความขมได้ นอกจากนี้ยังพบว่าไซโครเดกซตริน (cyclodextrin) ก็เป็นสารตัวหนึ่งที่ใช้ในการบดบังรสขม เนื่องจากสามารถห่อหุ้มกลุ่มที่เป็นไฮโดรโฟบิคของเปปไทด์ที่มีรสขมได้ (Tamura et . al , 1990) แต่ต้องใช้ปริมาณมากจึงจะให้ผลดี นอกจากนี้อาจใช้แป้งที่เจลาติไนซ์ในการทำให้โครงสร้างที่เกิดรสขมเข้าไปอยู่ในโครงร่างตาข่ายของโมเลกุลแป้ง เพื่อป้องกันการสัมผัสกับตุ่มรับรสบนลิ้น โดยวิธีนี้จะต้องใช้ความร้อนช่วยในการผสมด้วย (Tamura et. at,1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

Nuetral protease 0.5 L	: NOVO Indudtri A/S, Denmark
Boric acid	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Bromocresol green	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Copper sulphate	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Formaldehyde	: J.T. Baker, USA
Kieselguhr	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Magnesiumoxide	: Fluga Chemie AG., SwitZerland
Methy red	: May & Baker Ag. Darmstadt, Gemany
Potassium sulphate	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Petrolium ether	: J.T. Baker, USA
Sulfuric acid	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany
Sodium hydroxide	: E. Merck Ag. Darmstadt, Gemany

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ชุดวิเคราะห์โปรตีน Buchi 321 Switzerland

ชุดสกัดไขมัน Soxterm (Gerhardt) Belgium

Hot air oven (Jouan) Germany

Muffle Furance (Carbolite Furances CSF 1100)

Shaking water bath (GEL) Belgium

pH meter (DHM61) Denmark

เครื่องชั่งละเอียด (Mettler AE50) Belgium

เครื่องบด (chopper)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1. การเตรียมวัตถุดิบ

นำหัวไก่อายุประมาณ 1-2 เดือนมาต้มจนสุกประมาณ 25 นาที แล้วทำการลอกหนังและแยกตาออก จากนั้นนำไปบดละเอียดด้วยเครื่องบด และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ –10 องศาเซลเซียส โดยสรุปได้ดังแผนภูมิ (รูปที่ 3.1)

รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการเตรียมหัวไก่บด

3.3.2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวไก่บด

วิเคราะห์หาปริมาณความชื้นตามวิธี AOAC,1980

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธี AOAC,1995

วิเคราะห์หาปริมาณไขมันตามวิธี AOAC,1980

วิเคราะห์หาปริมาณเถ้าตามวิธี AOAC,1980

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่มีขั้นตอน คือ นำวัตถุดิบที่เตรียมได้จากข้อ1มาละลายน้ำแข็ง นำมาชั่งน้ำหนักตามต้องการ ผสมกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปิดปากขวดด้วย aluminium foil ตั้งไฟจนเดือดประมาณ 2 นาที ทำให้เย็นถึง 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมเอนไซม์ nuetral protease ตามอัตราส่วน และความเข้มข้นที่ต้องการ นำเข้าเครื่องเขย่า (3500 x g, 10 นาที) ควบคุมอุณหภูมิและเวลาตามต้องการ ยับยั้งเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90° ซ 15 นาที สารละลายที่ได้จะเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทตามต้องการ ขั้นตอนทั้งหมด แสดงดังแผนภูมิ (รูปที่ 3.2)

ผสมหัวไก่บดกับน้ำในอัตราส่วนที่เหมาะสม
ในขวดรูปชมพู่ ปิดปากขวดด้วย aluminium foil
⇩
ตั้งไฟให้เดือดประมาณ 2 นาที
⇩ ทิ้งไว้ให้เย็นถึง 50 องศาเซลเซียส
เติมเอนไซม์ nuetrase 0.5 L ความเข้มข้นตามต้องการ
⇩
นำเข้าเครื่องเขย่า (3500 x g, 10 นาที)
ควบคุมอุณหภูมิ และเวลาตามต้องการ
⇩
ยับยั้งเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที
⇩
ทำการเหวี่ยงแยกตะกอนออก
⇩
โปรตีนไฮโดรไลเซท

รูปที่ 3.2 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดไลเซทจากหัวไก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
97032

3.4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่

3.4.1 ศึกษาอัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำเป็น 3 ระดับคือ 25:75 , 50:50 และ75:25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ nuetrase 4 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 %โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกำหนดความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และอุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการย่อยสลาย 3 ชั่งโมง เลือกอัตราส่วนหัวไก่ต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ nuetrase ที่เหมาะสมโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟ่าอะมิโนไนโตรเจน และ ระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3 x 4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Ducan's new multiple range test

3.4.2 ศึกษาความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำและใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.4.1 แปรอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 5 ระดับ คือ 45, 50, 55,60 และ 65 องศาเซลเซียส และแปรค่า pH เป็น 3 ระดับ คือ 6, 7 และ 8 โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก กำหนดเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 3 ชั่วโมงเลือก pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟ่าอะมิโนไนโตรเจน และ ระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Factorial Completely Randomized Design ขนาด 3 x 4 ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Ducan's new multiple range test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.3 ศึกษาเวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสม

ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 3.4.1 ปรับค่าความเป็นกรดด่างและควบคุมอุณหภูมิในการย่อยสลายตามผลการทดลองข้อ 3.4.2 แปรค่าเวลาในการย่อยสลาย 4 ระดับคือ 1, 3, 6 และ 12 ชั่วโมงโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และ ระดับขั้นการย่อยสลายตามวิธีในภาคผนวก

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ผลเชิงสถิติแบบ Completely Randomized Design ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Ducan's new multiple range test

3.5. การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.4.1, 3.4.2 และ 3.4.3 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และทางจุลชีววิทยา ดังนี้

3.5.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

วิเคราะห์หาปริมาณความชื้นตามวิธีAOAC, 1980

วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนตามวิธีAOAC, 1995

วิเคราะห์หาปริมาณไขมันตามวิธีAOAC, 1980

วิเคราะห์หาปริมาณเถ้าตามวิธีAOAC, 1980

3.5.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา

ตรวจหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ตามวิธีในภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 วัตถุดิบที่เตรียมได้

หัวไก่บดที่เตรียมได้มีลักษณะคล้ายหมูบดแต่มีลักษณะร่วนกว่า มีกลิ่นคาวไก่ และมีสีค่อนข้างคล้ำเนื่องจากสีของกระดูกหัวไก่ แสดงดังรูปที่ 4.1

รูปที่ 4.1 หัวไก่บดที่เตรียมได้

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวไก่บด

นำหัวไก่บดที่ผ่านการลอกหนัง และแยกตาออกแล้ว มาบดด้วยเครื่องบด (chopper) จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17516

ตารางที่ 4.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ (หัวไก่บด)

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (%)
ความชื้น	73.07
โปรตีน	12.44
ไขมัน	7.21
เถ้า	4.85

4.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่

4.3.1 อัตราส่วนหัวไก่ต่อน้ำและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสม

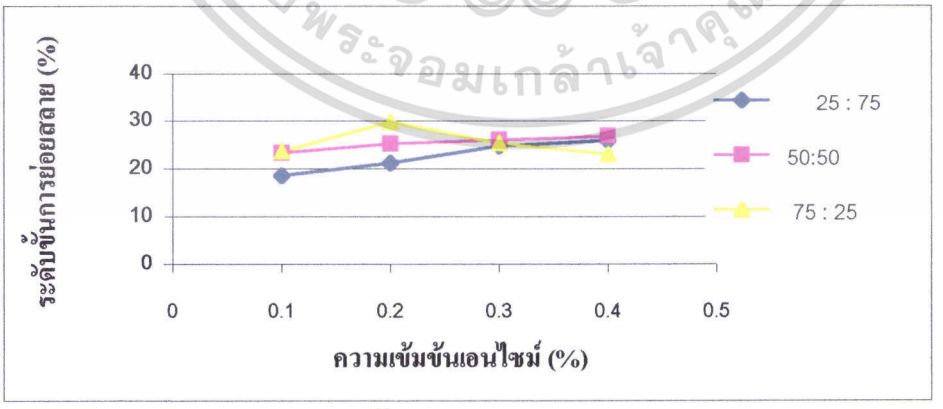
จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทตามวิธีการข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ 3 ระดับคือ 25:75 , 50:50 และ 75:25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ nuetral protease 4 ระดับ คือ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรกำหนดความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 และอุณหภูมิเท่ากับ 50 องศาเซลเซียสใช้เวลาในการย่อยสลาย 3 ชั่งโมง เลือกอัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ nuetral proteaseที่เหมาะสมโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และคำนวณหาค่าระดับขั้นการย่อยสลาย ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำและความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

อัตราส่วนหัวไก่ : น้ำ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (%)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับการย่อยสลาย (%)
25 :75	0.1	0.57	3.07	18.57
	0.2	0.72	3.40	21.18
	0.3	0.86	3.47	24.78
	0.4	0.93	3.58	25.98
50 : 50	0.1	0.86	3.68	23.37
	0.2	1.00	3.96	25.25
	0.3	1.15	4.42	26.02
	0.4	1.29	4.80	26.88
75 : 25	0.1	1.29	5.43	23.76
	0.2	1.72	5.77	29.81
	0.3	1.44	5.67	25.40
	0.4	1.44	6.21	23.19



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นเอนไซม์ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าอัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ไม่มีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงระดับขั้นการย่อยสลายจะเห็นว่าที่อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ 75:25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.2 % จะให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงสุด คือ 29.81 % (รูปที่ 4.2) นอกจากนี้อัตราส่วนหัวไก่ต่อน้ำ 75:25 จะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าสภาวะอื่นซึ่งจะช่วยประหยัดพลังงานในการทำผลิตภัณฑ์เข้มข้น จึงใช้สภาวะดังกล่าวสำหรับการทดลองขั้นต่อไป

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่ที่ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจสืบเนื่องมาจากเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองได้มีการเก็บรักษาเป็นเวลานานทำให้ activity ลดลง จึงส่งผลให้ระดับความแตกต่างที่ 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.4% ไม่มีความแตกต่างที่เห็นได้ชัด ดังนั้นควรจะตรวจวิเคราห์ activity ของเอนไซม์ก่อนนำมาใช้ และอาจจะต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณที่สูงขึ้น

4.3.2 ความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.1 แปรอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 5 ระดับ คือ 45, 50, 55, 60 และ 65 องศาเซลเซียส และแปรค่า pH เป็น 3 ระดับ คือ 6, 7 และ 8 โดยการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และกรดไฮโดรคลอริก กำหนดเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 3 ชั่วโมงเลือก pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และคำนวณหาค่าระดับขั้นการย่อยสลาย ให้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน ไนโตรเจนทั้งหมด และระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อใช้อุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ

อุณหภูมิ (°ซ)	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับการย่อยสลาย (%)
45	6	1.57	4.94	31.84
	7	1.86	5.21	35.64
	8	1.29	5.36	23.98
50	6	1.29	5.53	23.37
	7	1.72	5.80	29.69
	8	1.01	5.29	19.02
55	6	0.44	4.45	9.89
	7	0.87	4.53	19.13
	8	0.44	4.29	10.36
60	6	1.01	4.85	20.83
	7	0.87	5.48	15.92
	8	0.87	4.58	18.92
65	6	0.86	4.40	19.59
	7	1.00	4.59	21.87
	8	0.72	4.21	17.05

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้พบว่าอุณหภูมิและความเป็นกรดด่างมีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลลายโปรตีนไฮโดรไลเซทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายโดยวิธี Duncan's new multiple range test จึงพิจารณาร่วมกันทั้งสองปัจจัย ดังแสดงในตารางที่ 4.4

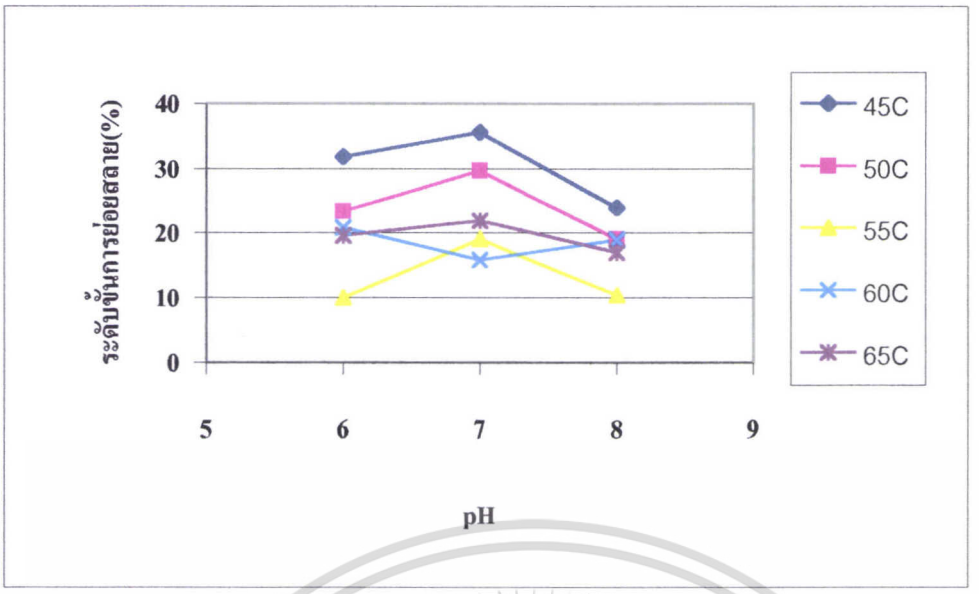
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ เมื่อควบคุมอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ กัน

อุณหภูมิ (°ซ)	ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	แอลฟ่าอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับการย่อยสลาย* (%)
45	6	1.57	4.94	31.84^{ab}
	7	1.86	5.21	35.64^{a}
	8	1.29	5.36	23.98^{bc}
50	6	1.29	5.53	23.37^{bc}
	7	1.72	5.80	29.69^{ab}
	8	1.01	5.29	19.02^{c}
55	6	0.44	4.45	9.89^{d}
	7	0.87	4.53	19.13^{c}
	8	0.44	4.29	10.36^{d}
60	6	1.01	4.85	20.83^{c}
	7	0.87	5.48	15.92^{cd}
	8	0.87	4.58	18.92^{c}
65	6	0.86	4.40	19.59^{c}
	7	1.00	4.59	21.87^{bc}
	8	0.72	4.21	17.05^{cd}

* ระดับขั้นการย่อยสลายที่มีอักษรกำกับต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อควบคุมอุณหภูมิ และความเป็นกรดด่างต่างๆ

จากตารางที่ 4.4 เมื่อพิจารณาถึงระดับขั้นการย่อยสลายที่อุณหภูมิ และ ความเป็นกรดด่างของปฏิกิริยาต่างๆ จะเห็นว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 และ 7 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่าง 7 จะมีระดับขั้นการย่อยสลายที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สถิติ ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 มีข้อได้เปรียบกว่าเนื่องจากเป็นการประหยัดพลังงานมากกว่า และความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Neutrase และยังเป็นความเป็นกรดด่างเริ่มต้นของหัวไก่บดอีกด้วย ดังนั้นจึงเลือกสภาวะ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7 สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 เวลาในการย่อยสลายที่เหมาะสม

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามวิธีในข้อ 3.3.3 โดยใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ และความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองในข้อ 4.1 ปรับ pH เริ่มต้นและควบคุมอุณหภูมิในการย่อยสลายตามผลการทดลองข้อ 4.2 แปรค่าเวลาในการย่อยสลาย 4 ระดับคือ 1, 3, 6 และ12ชั่วโมงโดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen) แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน และคำนวณหาค่าระดับขั้นการย่อยสลาย ให้ผลการทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ

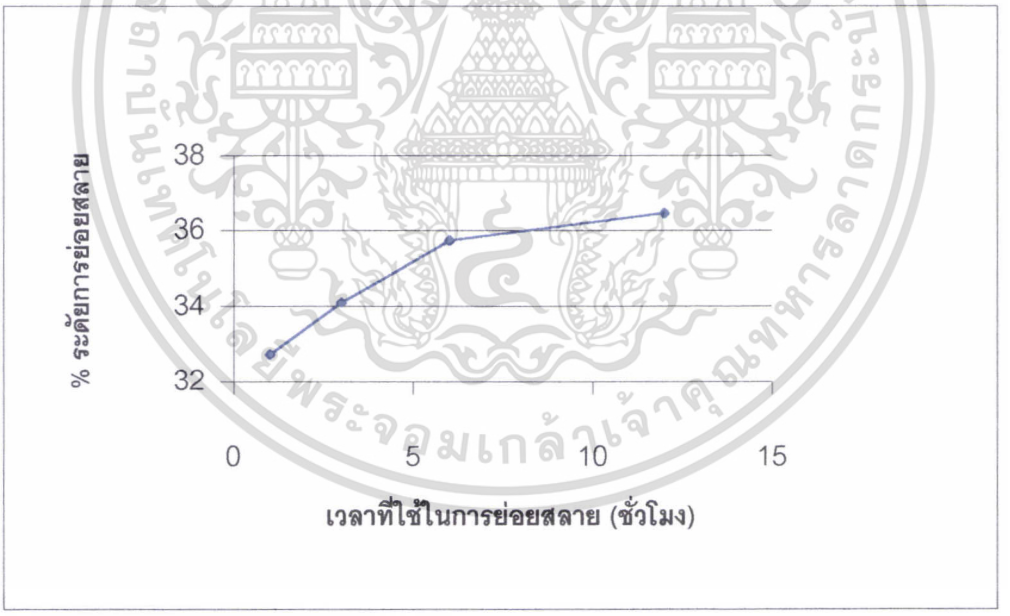
เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับการย่อยสลาย (%)
1	1.72	5.20	32.74
3	2.00	5.86	34.11
6	2.00	5.59	35.75
12	2.00	5.49	36.46

เมื่อวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลที่ได้ พบว่าเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายมีผลต่อระดับขั้นการย่อยสลลายโปรตีนไฮโดรไลเซทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังนั้นการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายโดยวิธี Duncan's new multiple range test ดังแสดงในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ

เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย (ชั่วโมง)	แอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (g/l)	ไนโตรเจนทั้งหมด (g/l)	ระดับการย่อยสลาย (%)
1	1.72	5.20	32.74[c]
3	2.00	5.86	34.11[b]
6	2.00	5.59	35.75[a]
12	2.00	5.49	36.46[a]



รูปที่ 4.4 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์ระดับขั้นการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้เมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลในตารางที่ 4.6 จะเห็นว่าที่ระยะเวลาในการย่อยสลาย 6 และ 12 ชั่วโมง ระดับขั้นการย่อยสลายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามการใช้เวลาในการย่อยสลายนานขึ้น จาก 6 ชั่วโมงเป็น 12 ชั่วโมง ระดับขั้นการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียง < 1 % นอกจากนี้ที่ระยะเวลานานถึง 12 ชั่วโมง อาจมีผลต่อการปนเปื้อน และการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ เวลาในการย่อยสลายที่ 6 ชั่วโมง เป็นเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่

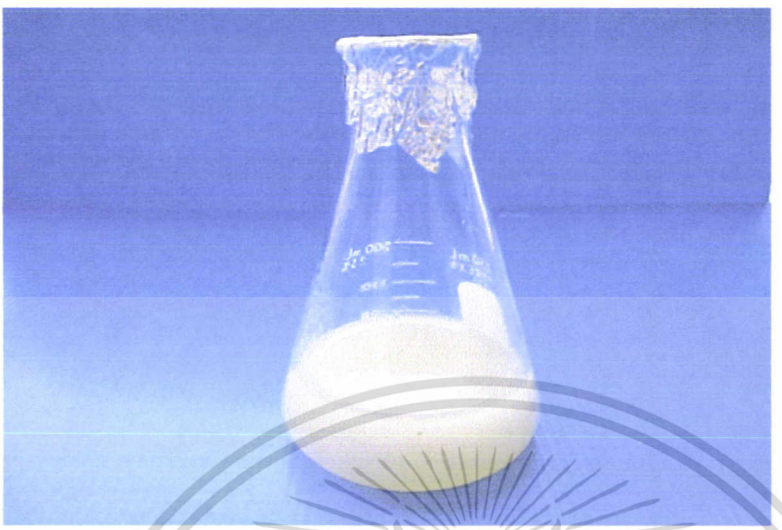
4.4 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและจุลชีววิทยาของโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จากการย่อยสลายหัวไก่บด ด้วยเอนไซม์ neutrase และนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ไปทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์	ปริมาณ
ความชื้น	55.52 %
โปรตีน	34.93 %
ไขมัน	2.50 %
เถ้า	5.70 %
Total plate count[b]	< 30 CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase
โดยใช้ อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ 75 : 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
ความเข้มข้นเอนไซม์ 0.2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร
อุณหภูมิในการย่อยสลาย 45 องศาเซลเซียส
ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7
เวลาในการย่อยสลาย 6 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบหัวไก่บด พบว่ามีองค์ประกอบดังนี้ ความชื้น 37.07 % โปรตีน 12.44 % ไขมัน 7.21 % และ เถ้า 4.85 %

เมื่อนำหัวไก่บดมาทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase พบว่าสภาวะที่เหมาะสม คือ ใช้อัตราส่วนหัวไก่บดต่อน้ำ คือ 75 : 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ คือ 0.2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการย่อยสลาย 45 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ใช้เวลาในการย่อยสลาย 6 ชั่วโมง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่าระดับการย่อยสลายเฉลี่ยเท่ากับ 35.64 % ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Neutrase ในภาวะที่เหมาะสม สรุปได้ดังรูปที่ 5.1

เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ดังกล่าว มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และทางจุลชีววิทยาพบว่าประกอบด้วย ความชื้น 55.52 % โปรตีน 34.93 % ไขมัน 2.50 % เถ้า 5.70 % และมีปริมาณจุลินทรีย์ < 30 CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวไก่บดผสมน้ำในอัตราส่วน 75 : 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

⇩

ปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7

⇩

ตั้งไฟให้เดือดประมาณ 2 นาที

⇩ ทิ้งไว้ให้เย็นถึง 50° ซ

เติมเอนไซม์ Neutrase 0.5 L ความเข้มข้น 0.2 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

⇩

นำเข้าเครื่องเขย่า (3500 x g, 10 นาที)

ควบคุมอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

⇩

ยับยั้งเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 ° ซ 15 นาที

⇩

เข้าเครื่องเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออก

⇩

โปรตีนไฮโดรไลเซท

รูปที่ 5.1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดไลเซทจากหัวไก่บดในสภาวะที่เหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายมีโปรตีนสูงและมีกลิ่นไก่แรง ดังนั้นอาจนำมาใช้ประโยชน์ คือ

- ใช้เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในอาหาร โดยใช้เป็นแหล่งโปรตีนอาหารมนุษย์ ทั้งในลักษณะทดแทนบางส่วนหรือเสริมโปรตีน

- ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นอาหาร การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีกลิ่นรสไก่ตามต้องการ ในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว ซุป และซอสต่าง ๆ หรืออาจใช้เป็นตัวเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซึ่งเดิมมีอยู่แล้วให้สูงขึ้น เช่นในผลิตภัณฑ์ครีมซุปไก่ ไส้กรอกไก่ เป็นต้น

2. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่ที่ได้จากการศึกษาข้างต้น มีระดับขั้นการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ คือ 35.76 % อาจมีการใช้เอนไซม์เอกโซเปติเดส ลงไปช่วยเอนไซม์ Neutrase ย่อยพันธะที่เหลือได้ อาจทำให้ระดับขั้นการย่อยสลายสูงขึ้นไปอีก และเพิ่มคุณค่าในด้านกลิ่นรสให้สูงขึ้น

3. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ มีลักษณะสุดท้ายเป็นของเหลว เพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ และสามารถเก็บได้นานขึ้น ควรนำไประเหยน้ำออก หรือทำให้แห้ง

4. ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเซทที่ได้มีรสขมเล็กน้อย อาจลดความขมได้โดยการเติมเจลลาติน หรือกรดอะมิโนไกลซีน หรือ นำไปปรุงรสโดยการเติมเครื่องเทศ เช่น กระเทียม พริกไท ซึ่งสามารถช่วยบดบังความขมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิราภา เสฐจินตนิน และดวงดี วิเชียรโหตุ. 2538. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยใช้แอลคาไลโปรติเอส. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

พรทิพย์ มีนพกิจ. 2541. การใช้เอนไซม์ในการผลิตโปรตีนไฮไลเซทจากกระดูกสัตว์. สัมมนาระดับปริญญาโท ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สมพร มะลิแก้ว และสุดา จินตธรรม. 2537. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษกระดูกไก่โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

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

The Association of Official Chemists. 1995. "kjeldahl method" Official Method of Analytical Chemists. Inc. Virginia : chapter 33, p.13.

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

Cordle, C.T. 1994. Control of food allergies using protein hydrolysates. Food Technol. 40(10) : 72-76.

Fix, M. and Surowka, K. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken Head. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. J. Sci. Food. 37: 445-454

Metoba, M. and Hata, T. 1972. Relationship between bitterness of peptides and their chemical Stucture. Arg. Biol. Chem. 36(8): 1423-1431.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

Pedersen, B. 1994. Removing Bitterness from Peotein Hydrolysates. Food Technol. 48(10) : 77-80.

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

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., Koyama, S., Lkhn, H., and Okai, H. 1990. Practical Debittering using Model peotoides and Related Compounds. Agric. Biol. Chem. 54:41-51

Tolita, F. 1969. Enzymatische and nicht Enzymatische Ausschaltungdes Bittergeschmacks bei enzymatischen Eieweisshydrolysaten. Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsh 138 :351-355.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. ความชื้น (AOAC, 1980)

ชั่งตัวอย่างในปริมาณที่แน่นอน โดยใช้เครื่องชั่งที่ละเอียดในภาชนะหาความชื้นที่อบแห้ง และทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำตัวอย่างไปอบในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิ 150° ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำตัวอย่างออกจากตู้อบแล้วนำไปใส่ภาชนะกันความชื้น (desicator) ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักทันที จากนั้นนำตัวอย่างไปอบต่ออีก 15-30 นาที จนน้ำหนักคงที่ คำนวณหาปริมาณความชื้น

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = 100 (W_1 - W_2) / W_1$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ เป็นกรัม

2. ไขมัน (AOAC, 1980)

ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบจนน้ำหนักคงที่ที่ทราบน้ำหนักแน่นอนประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ใส่ห่อตัวอย่างใน Thimble นำไปสกัดไขมันด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ปริมาณไขมันใช้เวลาสกัด 3 ชั่งโมง เมื่อครบกำหนดเวลาระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจากน้ำมันที่สกัดได้ นำน้ำมันที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในภาชนะกันความชื้น ชั่งน้ำหนัก และคำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = (W_2 \times 100) / W_1$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ เป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. โปรตีน (AOAC, 1995)

ชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 0.1 กรัม ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวใช้ 0.1-0.5 มล. ใส่ลงในขวด สำหรับย่อยโปรตีนเติมคะตะลิสต์ 7 กรัม (คะตะลิสต์ประกอบด้วย โปแตสเซียมซัลเฟต K_2SO_4 8 กรัม และ คอปเปอร์ซัลเฟต $CuSO_4 . 5H_2O$ 1 กรัม บดผสมให้เข้ากัน) และกรดซัลฟุริคเข้มข้น 15 มล. นำไปย่อยจนได้สารละลายสีฟ้าอ่อนหรือไม่มีสี ทิ้งให้เย็น นำมาประกอบเข้ากับเครื่องกลั่นโดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32 % ปริมาตร 60 มิลลิลิตร รองรับสารที่กลั่นได้ด้วยกรดบอริคเข้มข้น 2% ปริมาตร 50 มล. ซึ่งเติม mixed indicator (สารละลายเมธิลเรด และสารละลายโบรโมครีซอลกรีน ความเข้มข้น 0.1% ในแอลกอฮอล์อัตราส่วน 1:5) 3-4 หยด กลั่นจนขวดรองรับมีสารละลายปริมาตร 250 มล. จึงหยุดกลั่น นำสารละลายในขวดรองรับมาไทเทรตด้วยสารละลายกรดซัลฟุริคเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีแดง คำนวณหาปริมาตรไนโตรเจนและปริมาตรโปรตีน

$$\text{ปริมาตรไนโตรเจนทั้งหมด} = \frac{X \times N \times 14 \times 100}{W \times 1000}$$

เมื่อ X คือ ปริมาตรสารละลายกรดซัลฟุริคที่ใช้ไทเทรต เป็น มล.

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟุริค เป็น นอร์มอล

W คือ น้ำหนัก หรือปริมาตรของตัวอย่าง เป็น กรัม หรือ มล.

ปริมาณโปรตีน (%) = ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด x 6.25

3. เถ้า (AOAC, 1980)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2 กรัม ใส่ในครูซิเบิลที่เผาและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำไปเผาที่อุณหภูมิ 600° ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งได้เถ้าสีขาวหรือเทา นำออกมาทิ้งให้เย็นในภาชนะกันความชื้น และชั่งน้ำหนักคำนวณหาปริมาณเถ้า

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = W_2 \times 100 / W_1$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา เป็นกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2526)

ปริมาณแอลฟาอะมิโนไนโตรเจน คือ ผลต่างคิดเป็นกรัมระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน กับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน ในตัวอย่าง 1ลิตร

4.1 ฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 เท่า ปริมตร 10 มล. ปรับ pH เป็น 7 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เติมสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ ที่มีความเป็นกรดด่างเป็น 9 ปริมาตร 10 มล. ลงในตัวอย่างแล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนมีความเป็นกรดด่างเป็น 9 คำนวณหาปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน

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

เมื่อ X คือ ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนในตัวอย่าง 1 ลิตร เป็นกรัม

Y คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต เป็น มล.

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นโมลาร์

4.2 แอมโมเนียคัลไนโตรเจน

นำตัวอย่างที่เจือจาง 10 เท่า ปริมาตร 50 มล. ใส่ในขวดกลั่น เติมแมกนีเซียมออกไซด์ 3 กรัม และน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. กลั่นแอมโมเนียที่เกิดขึ้นลงในขวดแก้วที่มีสารละลายกรดบอริคเข้มข้น 4% ปริมาตร 50 มล. และมี mixed indicator (สารละลายเมธิลเรด และสารละลายโบรโมครีซอลกรีน ความเข้มข้น 0.1% ในแอลกอฮอล์ อัตราส่วน 1:5) หยด จนกระทั่งสารละลายในขวดกลั่นเหลือเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตรเดิม นำสารละลายที่กลั่นได้มาไทเทรตกับสารละลายกรดซัลฟูริคเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีฟ้าเป็นสีเทา คำนวณหาปริมาตรแอมโมเนียคัลไนโตรเจน

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

เมื่อ X คือ ปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนในตัวอย่าง 1 ลิตร เป็นกรัม

Y คือ ปริมาตรของสารละลายกรดซัลฟูริคที่ใช้ไทเทรต เป็น มล.

M คือ ความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริคที่ใช้ไทเทรตเป็นโมลาร์

5. ปริมาณของแข็งทั้งหมด

5.1 การเตรียม kieselguhr

ล้าง kieselguhr ด้วยกรดเกลือเข้มข้น 0.1% โดยปริมาตร โดยใช้กรวยบุชเนอร์ ล้างจนกระทั่งเมื่อทดสอบน้ำที่ผ่านออกมาด้วยกระดาษลิตมัสมีสมบัติเป็นกรด ใช้น้ำกลั่นล้างต่อไปจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระทั่ง pH ของน้ำที่ออกมามากกว่า หรือเท่ากับ 4 ทิ้งให้แห้งจากนั้นนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105° ซ เป็นเวลา 1 คืน เก็บในภาชนะที่ปิดสนิท

5.2 วิธีวิเคราะห์

ชั่ง kieselguhr ที่ล้างและอบแห้งแล้ว ประมาณ 5 กรัม ใส่ถ้วยกระเบื้อง นำไปอบพร้อมฝาปิดที่อุณหภูมิ 105° ซ จนน้ำหนักคงที่ จดน้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr ให้แน่นอน ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (m_1)

ชั่งตัวอย่างไฮโดรไลเซทประมาณ 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ที่แห้งจดน้ำหนัก (m_0) เติมน้ำร้อนไม่เกิน 5 มล. ใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันแล้วถ่ายลงถ้วยกระเบื้องคนจน kieselguhr เป็นเนื้อเดียวกัน นำถ้วยกระเบื้องที่บรรจุตัวอย่างพร้อมฝาปิดไปอบ 105° ซ เป็นเวลา 5-8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบดอบต่ออีก 8 ชั่วโมง นำออกมาใส่ desicator ทิ้งให้เย็น 1 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

5.3 วิธีคำนวณ

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

เมื่อ m_0 คือ น้ำหนักตัวอย่างไฮโดรไลเซท

m_1 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhr หลังจากอบจนคงที่

m_2 คือ น้ำหนักถ้วยกระเบื้องที่บรรจุ kieselguhrและตัวอย่างไฮโดรไลเซทหลังจากอบจนคงที่

<u>วิธีวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์</u>

1. วิธีวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (AOAC, 1980)

เจือจางตัวอย่างไฮโดรไลเซท 3 ระดับ คือ 1:10, $1:10^{-2}$ และ $1: 10^{-3}$ ตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี pour plate โดยปิเปตตัวอย่างแต่ละความเจือจางใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มล. ทำซ้ำ 3 จาน เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ลงในจานประมาณ 15-20 มล. หมุนจานไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง บ่มที่อุณหภูมิ 30-35° ซ เป็นเวลา 2-5 วัน นับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหาร เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับรวมทั้ง 3 จานหาค่าเฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวปรียาภรณ์ ทองประ เกิดวันที่ 15 พฤษภาคม 2522 จังหวัดน่าน สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนศรีสวัสดิ์วิทยาคาร จังหวัดน่าน และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

นายศิระ นาคะศิริ เกิดวันที่ 4 ธันวาคม 2523 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสันติราษฎ์วิทยาลัย จังหวัดกรุงเทพมหานคร และจบการศึกษาจากภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้