การสกัดโปรตีนจากดักแด้หนอนไหมด้วยสารละลายด่างร่วมกับการใช้เอนไซม์

Protein extraction from silkworm pupae by enzymatic and alkaline treatment

นางสาวประภาพร ญาณปัญญา รหัสนักศึกษา 59080033
นางสาวปัณฑารีย์ ชุติมาโยธินกูล รหัสนักศึกษา 59080034
นางสาวอภิชญา เลิศกุลธรรม รหัสนักศึกษา 59080055

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การสกัดโปรตีนจากดักแด้หนอนไหมด้วยสารละลายด่างร่วมกับการใช้เอนไซม์
Protein extraction from silkworm pupae by enzymatic and alkaline treatment

จัดทำโดย

ประภาพร	ญาณปัญญา	รหัสนักศึกษา	59080033
ปัณฑารีย์	ชุติมาโยธินกูล	รหัสนักศึกษา	59080034
อภิชญา	เลิศกุลธรรม	รหัสนักศึกษา	59080055

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 27 / พ.ค. / 63

(ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การสกัดโปรตีนจากดักแด้หนอนไหมด้วยสารละลายด่างร่วมกับการใช้เอนไซม์	
ชื่อนักศึกษา	ประภาพร ญาณปัญญา	รหัสนักศึกษา 59080033
	ปัณฑารีย์ ชุติมาโยธินกูล	รหัสนักศึกษา 59080034
	อภิชญา เลิศกุลธรรม	รหัสนักศึกษา 59080055
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร	
พ.ศ.	2563	
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร	

บทคัดย่อ

แมลงกินได้ ที่นิยมในประเทศไทยได้แก่ ตั๊กแตน, จิ้งหรีด, ด้วง, ดักแด้หนอนไหม และหนอนไม้ไผ่ เป็นต้น โดยแมลงกินได้มีสัดส่วนปริมาณโปรตีนสูง ดักแด้หนอนไหมพบได้ทั่วไปในประเทศไทย เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสิ่งทอ ประกอบด้วยปริมาณโปรตีนร้อยละ 47-48 ต่อน้ำหนักแห้ง ในการศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อสกัดโปรตีนออกจากดักแด้หนอนไหมโดยใช้การสกัดด้วยด่างร่วมกับการใช้เอนไซม์แอลคาเลส พบว่าการสกัดร่วมกับการใช้เอนไซม์สามารถเพิ่มปริมาณผลผลิต ประสิทธิภาพในการสกัด และปริมาณโปรตีนได้ โดยพบว่าการใช้เอนไซม์แอลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ทำให้ปริมาณผลผลิตของโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7.38 ไปเป็นร้อยละ 9-10 และเมื่อเวลาที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น ทำให้ร้อยละระดับการย่อยเพิ่มขึ้น โดยเมื่อความเข้มข้นของแอลคาเลสอยู่ในช่วงร้อยละ 0.5-3 ระดับการย่อยสูงสุดที่วิเคราะห์ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 36-37 โปรตีนสกัดไฮโดรไลเสตจากดักแด้หนอนไหม เมื่อนำมาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะได้เป็นผงละเอียดที่มีค่าสี L* เท่ากับ 36.47, a* เท่ากับ 1.02 และ b* เท่ากับ 3.51 และยังคงมีกลิ่นของดักแด้หนอนไหม ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบย่อยด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟลิซิส พบว่าโปรตีนที่สกัดได้จากดักแด้หนอนไหมด้วยสารละลายด่าง ประกอบด้วยโมเลกุลของโปรตีนขนาด 79 kDa, ขนาดโมเลกุลระหว่าง 69-79 kDa, 57 kDa และ 27 kDa

คำสำคัญ: ดักแด้หนอนไหม เอนไซม์แอลคาเลส โปรตีนไฮโดรไลเซท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Protein extraction from silkworm pupae by enzymatic and alkaline treatment	
Student name	Prapaporn Yarnpunya	Student ID 59080033
	Pantaree Chutimayotinkul	Student ID 59080034
	Apichaya Lertkultham	Student ID 59080055
Program	Brachelor of Science in Food Science and Technology	
Year	2020	
Advisor	Assist.Prof.Dr. Yuporn Puechkamut	

ABSTRACT

The popular edible insects in Thailand are grasshoppers, crickets, beetles, silkworm pupae and bamboo worms. Edible insects contain high crude protein content. Silkworm pupae is commonly found in Thailand. It is a by-product of the silk industry and contains 47-48% of protein on dry weight basis. The purpose of this study is to extract the protein from silkworm pupae by alcalase enzyme and alkaline treatment. The result found that the enzyme enhanced the yield , extraction efficiency and protein content. Adding alkalase of 1.5 %w/w increased the yield from 7.38% to 9-10% . As the incubation time increased, the degree of hydrolysate increased. When the alkalase concentration was in the range of 0.5-3%, the highest degree of hydrolysate was 36-37%. The colors of hydrolysate protein powder expressed as L* , a* and b* values were 36.47, 1.02 and 3.51, respectively and that still having the smell of silkworms pupae. The results of SDS-PAGE that show 4 major groups of protein bands were found to be79 kDa ,69-79 kDa , 57 kDa and 27 kDa.

Keywords: Silkworm pupae, Alcalase, Protein hydrolasate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงลงได้ถ้าไม่ได้ ผศ.ดร. ยุพร พืชกมุทร, ผศ.ดร.สิทธิพงศ์ นลินานนท์, ผศ.ดร. สุพัตรา กาญจนประทุม, ดร. สุพีรยา อาษาและ ดร.เพ็ญศิริ แก้วทอง ที่ได้ให้คำปรึกษาและชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหา สนับสนุนข้อมูลในด้านต่าง ๆ ในการทำปัญหาพิเศษนี้ รวมถึงความรู้ข้อคิดต่าง ๆ ที่นอกเหนือจากการทำปัญหาพิเศษได้เป็นอย่างดียิ่ง นอกจากนี้ขอขอบคุณ นางสาววันทนีย์ ช้างน้อย, นางสาวกัลป์ยกร เจริญกุล, นางฉวี ยิ้มยนต์และ นางสาวน้ำฝน มโนธรรมรักษา ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเครื่องมือในการวิเคราะห์ผล สารเคมีต่างๆ คอยช่วยเหลือให้คำปรึกษา และคอยเป็นกำลังใจเป็นอย่างดี

นอกจากนี้คณะผู้จัดทำขอขอบคุณครอบครัว ที่ได้สนับสนุนในทุก ๆ เรื่องรวมถึงค่าเล่าเรียน รวมทั้งต้องขอขอบคุณอีกหลายๆ ท่านที่ไม่ได้เอ่ยนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ได้ช่วยเหลือมาโดยตลอด หากหนังสือปัญหาพิเศษเล่มนี้มีข้อผิดพลาดประการใดเกิดขึ้น คณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ด้วยความยินดี

ประภาพร ญาณปัญญา
ปัณฑารีย์ ชุติมาโยธินกูล
อภิชญา เลิศกุลธรรม
15 พฤษภาคม 2563

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 ดักแด้หนอนไหม (Silkworm pupae)	3
2.2 คุณค่าทางอาหารของแมลงกินได้	3
2.3 เอนไซม์	4
2.4 โปรตีน	7
2.5 SDS-PAGE	10
2.6 Degree of hydrolysis	11
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	13
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	13
3.2 อุปกรณ์	14
3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	14
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
4.1 ผลการศึกษาระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซท	19
4.2 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต	21
4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซท	22
4.4 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน	24
บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ	26
5.1 สรุปผล	26
5.2 ข้อเสนอแนะ	26
บรรณานุกรม	27
ภาคผนวก	29
ภาคผนวก ก. การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซท	30
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ระดับการย่อย	34
ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์ผลผลิต และองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซท	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก ง. การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท..... 51

ประวัติผู้เขียน..... 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางอาหารของแมลง 18 ชนิด..... 4
ตารางที่ 4.1 ค่าระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะการทดลองที่ต่างกัน..... 20
ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน..... 21
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ปริมาณผลผลิตฐานแห้งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน..... 22
ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซท และประสิทธิภาพในการสกัดที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน..... 22
ตารางที่ 4.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท..... 24
ตารางที่ ค.1 การคำนวณปริมาณโปรตีน..... 44
ตารางที่ ค.2 การปรับปริมาณโปรตีนให้ได้ 6 mg/mL..... 44
ตารางที่ ค.3 การผสม Sample buffer..... 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 การเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน..... 8
รูปที่ 2.2 การเป็นอิมัลซิไฟเออร์..... 9
รูปที่ 2.3 การเกิดโฟม..... 10
รูปที่ 2.4 SDS-PAGE..... 11
รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการ Freeze dry..... 19
รูปที่ 4.2 แสดงค่าระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะการทดลองที่ต่างกัน..... 20
รูปที่ 4.3 แสดงผล SDS – PAGE ที่สภาวะ Reducing และ Non-Reducing..... 23
รูปที่ ก.1 ปรับ pH สารละลายดักแด้หนอนไหมด้วย Phosphate Buffer..... 31
รูปที่ ก.2 ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ Alcalase..... 31
รูปที่ ก.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ Alcalase ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส..... 32
รูปที่ ก.4 หมุนเหวี่ยงสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท..... 32
รูปที่ ก.5 ตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนและหลังการหมุนเหวี่ยง..... 32
รูปที่ ก.6 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทส่วนใสจากการหมุนเหวี่ยง..... 33
รูปที่ ก.7 โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง..... 33
รูปที่ ข.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ระดับการย่อยด้วยวิธี TNBS โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส..... 35
รูปที่ ข.2 ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์ โดยมีการเติมผงถ่านเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายใส..... 37
รูปที่ ค.1 ตัวอย่างที่วิเคราะห์หาความชื้นอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส..... 39
รูปที่ ค.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ซึ่งตัวอย่างผ่านการย่อยโปรตีนโดยสมบูรณ์จนได้สารละลายใส..... 40
รูปที่ ค.3 การไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 1M HCl สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง..... 41
รูปที่ ค.4 กราฟมาตรฐาน..... 42
รูปที่ ค.5 ขั้นตอนการรันเจล SDS-PAGE หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท..... 50
รูปที่ ง.1 การละลายผงโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยน้ำกลั่น..... 52
รูปที่ 15 การวิเคราะห์ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index)..... 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมลง เป็นอาหารทางเลือกใหม่ที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization: FAO) แนะนำให้เป็นอาหารสำหรับประชากรในอนาคต แมลงเป็นอาหารที่มีโภชนาการสูง ซึ่งประเทศไทยเป็นหนึ่งในประเทศที่มีความได้เปรียบในฐานะแหล่งผลิตและส่งออกสินค้าอาหารจากแมลงอันดับต้นๆ ของโลก เนื่องจากภูมิประเทศอยู่ในเขตร้อนชื้น ทำให้เป็นแหล่งอาศัยของแมลงจำนวนมาก และมีแมลงที่รับประทานได้มากกว่า 300 สายพันธุ์ เช่น ตั๊กแตน จิ้งหรีด หนอนไม้ไผ่ หนอนดักแด้ และด้วงสาคู เป็นต้น พบว่าแมลงกินได้เป็นแหล่งโปรตีนสำคัญ โดยเฉพาะกับประชากรที่มีฐานะยากจน ขาดแคลนเงินในการหาซื้อเนื้อสัตว์ที่มีราคาแพง (Bukkens, 2005) ปัจจุบันแมลงบางชนิดยังสามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ เช่น ดักแด้หนอนไหม จิ้งหรีด แมลงสะดิ้ง เป็นต้น โดยการศึกษาในครั้งนี้คณะผู้ทดลองได้เลือกใช้ดักแด้หนอนไหม เนื่องจากดักแด้หนอนไหมเป็นส่วนที่เหลือจากการเพาะเลี้ยงเพื่อเอารังไหม หาซื้อได้ง่ายซึ่งนิยมเพาะเลี้ยงบริเวณภาคตะวันออกเฉียงเหนือและมีองค์ประกอบทางเคมีที่น่าสนใจ ในปัจจุบันมีการสกัดโปรตีนจากแมลงซึ่งเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของแมลง โดยมีการนำเอนไซม์มาช่วยในการสกัดโปรตีนจากแมลง

Alcalase® เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด Bacillus licheniformis ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นพวก Alkalli protease จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8 - 8.5 บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ แอสปาร์เตท เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986)

คณะผู้ทดลองจึงสนใจนำดักแด้หนอนไหมมาศึกษาในเรื่องของโปรตีน เนื่องจากปริมาณโปรตีนโดยสภาพทั่วไปที่ได้จากแมลงนั้นน้อย และมีสมบัติด้านหน้าที่จำกัด ทางคณะผู้วิจัยจึงต้องการที่จะปรับปรุง โดยการสกัดโปรตีนร่วมกับการใช้เอนไซม์ ติดตามปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ รวมทั้งสมบัติทางเคมีและกายภาพ ซึ่งการดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหม ซึ่งอาจเป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของแมลงกินได้

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับสารละลายด่างต่อการสกัดโปรตีนจากดักแด้หนอนไหม

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหม

1.2.2 เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบคุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหม

1.3.2 ทราบสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดักแด้หนอนไหม (Silkworm pupae)

ไหม เป็นผีเสื้อกลางคืนชนิด Bombyx mori อยู่ในวงศ์ Bombycidae ตัวอ่อนเรียกว่า ตัวไหม หรือ หนอนไหม มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในการปลูกหม่อนเลี้ยงไหม เนื่องจากมันสามารถให้เส้นใยเป็นเส้นไหม ผีเสื้อไหมไม่ปรากฏในป่าตามธรรมชาติ การสืบพันธุ์และดำรงชีวิตขึ้นอยู่กับการดูแลของมนุษย์เท่านั้น อาหารที่มันชอบก็คือใบหม่อนขาว (Morus alba) แต่อาจกินใบของพืชชนิดอื่นได้ด้วย เช่น Osage Orange หรือ Tree of Heaven เดิมเป็นสัตว์พื้นเมืองของจีน ดักแด้หนอนไหมเป็นวัตถุดิบที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการสาวเส้นไหม ในการสาวไหมเพื่อนำเอาเส้นไหมจากรังไหมมาทอเป็นผืนผ้า ทำให้ได้ดักแด้หนอนไหม โดยหลังจากที่หนอนไหมเติบโตเต็มที่แล้ว มันก็จะเริ่มพ่นใยพันรอบตัวเองก่อนจะลอกคราบเป็นดักแด้ และกลายเป็นผีเสื้อในที่สุด เราจะนำรังไหมนั้นมาต้มและสาวเอาเส้นไหมออกมาจนหมดเส้นใยเพื่อไปถักทอต่อไป และส่วนที่เหลืออยู่ก็คือตัวดักแด้ ที่ชาวอีสานนิยมนำมาทำเป็นอาหาร ดักแด้ตัวเล็กๆ ที่หลายคนก็ไม่กล้าบริโภคนี้ ถือเป็นแหล่งคุณค่าอาหารอีกอย่างหนึ่ง เพราะในดักแด้นั้นให้โปรตีนสูง แหล่งเลี้ยงไหมที่สำคัญของประเทศไทย ส่วนใหญ่อยู่ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ จังหวัดขอนแก่น ร้อยเอ็ด บุรีรัมย์ นครราชสีมา สุรินทร์ อุบลราชธานี หนองคาย ชัยภูมิ ศรีสะเกษ นครพนม มหาสารคาม สกลนคร และกาฬสินธุ์ ส่วนในภาคอื่นๆ ที่มีการเลี้ยงไหมเหมือนกัน เช่น ภาคเหนือที่จังหวัดเพชรบูรณ์ ภาคตะวันออกที่จังหวัดระยอง ภาคตะวันตกที่จังหวัดกาญจนบุรี และภาคใต้ที่จังหวัดชุมพร (กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2556)

2.2 คุณค่าทางอาหารของแมลงกินได้

แมลงจัดได้ว่าเป็นแหล่งอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีสารอาหารประเภทโปรตีนสูง สามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีน ปัจจุบันสามารถเลี้ยงแมลงบางชนิดเป็นอาชีพ และใช้เป็นอาหารเสริมให้แก่ชาวบ้านได้โดยไม่จำเป็นต้องเสียเงินจำนวนมาก ไม่ต้องซื้อเนื้อสัตว์ที่มีราคาแพงมารับประทาน นอกจากนี้ แมลงยังให้พลังงาน ไขมัน แร่ธาตุต่างๆ และวิตามิน หลายหน่วยงานและกลุ่มวิจัยทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศได้วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของแมลงกินได้ ซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกันตามแหล่งแมลงที่ได้ ช่วงเวลาที่ได้แมลง ตลอดจนวิธีการวิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางอาหารของแมลง 18 ชนิด คุณค่าทางอาหารคิดเป็นกรัมต่อน้ำหนักสด 100กรัม

ชื่อแมลง	**ความชื้น** (กรัม)	**โปรตีน** (กรัม)	**ไขมัน** (กรัม)	**สารประกอบจำพวกแป้งและน้ำตาล** (กรัม)	**กาก** (กรัม)	**เถ้า** (กรัม)	**พลังงาน** (กิโลแคลอรี่)
แมลงกระชอน	71.2	15.4	6.3	1.7	2.7	2.7	125.1
แมลงกินูน	74.1	13.4	1.4	2.9	5	3.2	77.8
แมลงกุดจี่	68.4	17.2	4.3	0.2	7	2.9	108.3
จิโป่ม	73.3	12.8	5.7	2.6	3.1	2.5	112.9
จิ้งหรีด	71.4	12.9	5.5	5.1	3	2.1	121.5
แมลงดานา	63.2	19.8	8.3	2.1	5	1.6	162.3
ดักแด้ไหม	80.6	9.6	5.6	2.3	1	0.9	98
ตั๊กแตนเล็ก	61.1	20.6	6.1	3.9	4	4.3	152.9
ตั๊กแตนใหญ่	76.7	14.3	3.3	2.2	2.4	1.1	95.7
แมลงตับเต่า	61.2	21	7.1	0.3	7.6	2.8	149.1
มดแดง	74	13.9	3.5	2.9	4	1.7	98.7
ตัวเป้ง	66.1	12.7	12.5	4.9	2.8	1	182.9
ไข่มดแดง	81.9	7	3.2	6.5	0.8	0.6	82.8

ที่มา: กัณฑ์วีร์ (2542)

2.3 เอนไซม์

2.3.1 การดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

การดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน หมายถึงการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนโดยวิธีต่างๆ ซึ่งการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจะส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำไปใช้งานในอาหาร เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดโฟมและสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจะช่วย เพิ่มความหลากหลายในการนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ใน ด้านต่างๆ การดัดแปรสมบัติของโปรตีนโดยทั่วไปมี 2 วิธีคือ การดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์และการดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยไม่ใช้เอนไซม์ (ทิพย์วลี จุลมัญลิก และ ศศิธร คงเรือง, 2562)

2.3.1.1 การดัดแปรคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

ในกระบวนการแปรรูประดับอุตสาหกรรมนิยมใช้เอนไซม์กันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถย่อยสลายโปรตีนได้ในสภาวะไม่รุนแรงและไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณมาก เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสับสเตรทสูง จึงส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ในการย่อยสลายที่แตกต่างกัน และไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ การเลือกใช้เอนไซม์จะเลือกจากการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดซึ่งจะมีกลไกการดัดแปรโปรตีนแตกต่างกันไป

2.3.1.1.1 การดัดแปรโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส

แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์ แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ 2 ประเภท คือ เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases) และเอ็นโดเปปติเดส (Endopeptidase) (ปราณี, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) เอกซ์โซเปปติเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ซึ่งถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิลเรียกว่า Carboxypeptidase ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน จะเรียกว่า Aminopeptidase

2) เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และเอนไซม์ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว

เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) แบ่งตามกลไกการทำงานได้เป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. โปรติเอสเซรีน (Serine protease)

เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นพวก Alkalli protease มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง pH 7.0 – 11.0 (ปราณี, 2547) เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส จะมีความจำเพาะต่อสับสเตรทที่มีอนุมูลซีรีล (Seryl residue) และหมู่อมิดาโซล (Imidazole) อยู่ที่บริเวณเร่งถูกยับยั้งโดย DEP (Di-isopropyl-phosphofluoride) ซึ่งทำปฏิกิริยากับ หมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Elastase, Thrombin, และ Trypsin เป็นต้น (กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์, 2540)

2. โปรติเอสซัลไฟดริล (Sulfydryl protease หรือ Cysteine protease)

เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น Neutral protease มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 6.0 -7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซัลไฟดริลอยู่ที่บริเวณเร่งถูกยับยั้งโดยสารที่ เรียกว่า Sulfhydryl reagents ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและอาจสูญเสียแอคติวิตีไปในที่สุด เอนไซม์กลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ Bromelain สกัดได้จากสับปะรด และ Papain สกัดได้จากมะละกอ เป็นต้น (กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์, 2540)

3. โปรติเอสเมทัล (Metal-containing protease)

เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น Neutral protease มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ pH 7.8 เป็นพวกเอนโดเปปติเดส เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอิออนและโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนโดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ Carboxypeptidase A, Carboxypeptidase B, Carnosinase และ Prolidase เป็นต้น (กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์, 2540)

4. โปรติเอสกรด (Aspartic protease)

เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น Carboxyl protease และ Acid protease มี pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 2.0 - 4.0 จากการพิจารณา pH activity profile ของเอนไซม์กลุ่มนี้ ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาติค 2 อนุมูลอยู่ในบริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ Pepsin และ Rennin เป็นต้น (ธันยพร, 2550)

ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าที่ในอุตสาหกรรมนิยมใช้ย่อยโปรตีน (Anonymous, 2000) เช่น

1) Alcalase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformis* ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นพวก Alkalli protease จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8 - 8.5 บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโนเซรีน ฮิสติดีน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอสปาร์เตท เอนไซม์ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อสับสเตรทค่อนข้างกว้าง สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก (Adler-Nissen, 1986)

2) Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่ เป็นทั้งเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิ ที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5-7

3) Neutrase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus amyloliquefaciens* จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนจากพืชและสัตว์ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆหรือกรดอะมิโน เอนไซม์นิวเทรสเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีไอออนของโลหะร่วมในปฏิกิริยาโดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส และมี pH ที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ในช่วง 5.5-7

2.3.1.1.2 การดัดแปรโปรตีนโดนการใช้เอนไซม์ทรานซ์กลูตามิเนส

ทรานส์กลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิล (actyl transfer) ระหว่างหมู่แกมมาคาร์บอกซิเอไมด์ของกรดอะมิโนกลูตามีนของสายเพปไทด์ หรือโปรตีน และสารประกอบอะมีน ถ้าหมู่อะมีน เป็นหมู่แอบซิลอนอะมิโนของไลซีนในสายเพปไทด์ TGase จะทำให้เกิดการเชื่อมโดยพันธะโควาเลนท์ของเพป ไทด์ 2 สายเกิดเป็นพันธะใหม่เรียกว่า เอพซิลอนแกมมากลูตามิลไลซีน ในสภาวะที่ไม่มีเอมีน TGase จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยหมู่แกมมาคาร์บอกซิเอไมด์ของกลูตามีน โดยทำปฏิกิริยากับน้ำได้เป็น กรดกลูตามิก และแอมโมเมีย (deamidation) TGase มีหมู่ซิลเตอีนอยู่ในบริเวณเร่งเพื่อทำปฏิกิริยา เกิดปฏิกิริยาที่หมู่แกมมาคาร์บอกซิเอไมด์ของกลูตามีนได้เป็นแกมมากลูตามิลไทโอเอสเทอร์ และแอมโมเนีย ต่อมาจะทำปฏิกิริยากับหมู่อะมีนเกิดเป็นพันธะดไอโซเพปไทด์ ถ้าไม่มีหมู่ไพรมารีเอมีน น้ำจะเป็นตัวรับหมู่เอซีลทำให้กลูตามีนเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิก นอกจากนี้ สายเพปไทด์ที่มีไลซีนก็สามารถทำปฏิกิริยากับส่วนของกลูตามีนได้ เกิดเป็นพันธะ G-L ระหว่าง โปรตีน จัดเป็นโปรตีน จัดเป็นพันธะโควาเลนท์ ซึ่งมีความแข็งแรง ซึ่งอาจเกิดในสายเพปไทด์หรือระหว่างสาย เพปไทด์จึงมีการใช้ TGase ดัดแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น การละลาย การเกิดอิมัลชัน และเพิ่ม คุณค่าทางอาหารโดยป้องกันการสูญเสียไลซีน (วราภรณ์ กาพันสิทธิ์, นพพล เล็กสวัสดิ์, 2556)

2.3.1.1.3 การดัดแปรโปรตีนโดนการใช้เอนไซม์เปปทิโดกลูตามิเนส

เปปทิโดกลูตามิเนส (Peptidoglutaminase, Pgase) เร่งปฏิกิริยาในการย่อยสลายกลูตามีนออกจากสายโพลิเปปไทด์ที่ตำแหน่งเอมีน การทำงานของเอนไซม์สามารถย่อยได้ตั้งแต่โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่นโปรตีนไข่ขาว จนถึงโมเลกุลขนาดเล็ดของโปรตีนถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการ deamidation แล้ว ดังนั้นในการทำปฏิกิริยาจึงควรใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีนในระดับหนึ่งก่อนที่จะมีการใช้ Pgase จะช่วยในการย่อยสลายกลูตามีนได้มากขึ้น (J.S. Hamada, 1992)

2.3.1.2 การดัดแปรคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยไม่ใช้เอนไซม์

การดัดแปรโปรตีนคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนโดยไม่ใช้เอนไซม์เป็นวิธีการดัดแปรที่ใช้สารเคมีหรือความร้อนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยอาจเกิดการจับตัวกันใหม่หรือเกิดการคลายตัวของพันธะเคมีต่างๆทำให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.2.1 การดัดแปรโปรตีนโดยใช้สารเคมี

เป็นการทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนแตกออกโดยใช้สารละลายกรดหรือเบส ซึ่ง เป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีนได้ยาก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มี คุณภาพไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารการย่อยสลายโปรตีน ด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ สามารถย่อยสลายโปรตีนได้รวดเร็วและ ให้กลิ่นรสที่ดีแต่จะทำให้ทริปโตเฟน (Tryptophan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลายไป สารละลายที่นิยมในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก โปรตีน ไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้มีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (Neutralization) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยในการย่อยสลายโปรตีน ด้วยกรดซัลฟิวริกนั้น จะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต และการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริก นั้นจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดร คลอริกในการย่อยสลายโปรตีน เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นในกระบวนการนั้นเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไปจึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์มากนัก นอกจากนั้นการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดที่มีความเข้มข้นสูงร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงก่อให้เกิดสาร 3- monochloro-propanediols (3-MCPD) ซึ่งเป็นสารพิษที่เป็นสารก่อมะเร็ง (ณัฐวุฒิ, 2550)

การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายด่าง สารละลายด่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ซึ่งหากย่อยสลายในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา Racemization ของกรดอะมิโน โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก Lform ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังจะทำให้เกิดปฏิกิริยา β – elimination ของ Serine และ Cysteine ทำให้เกิด 27 สารประกอบ Dehydroalanine ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ เกิดเป็นสารประกอบต่างๆ หลายชนิด เช่น Lysinoalanine, Ornithinoalanine และ Lanthionine เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่ สำคัญและสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้ เกิดสารพิษในอาหารอีก ด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000)

2.3.1.2.2 การดัดแปรโปรตีนโดยใช้ความร้อน

การใช้ความร้อนเป็นวิธีทางกายภาพที่นิยมในการดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหาร การดัดแปรโดยใช้ความร้อนจะขึ้นกับความสามารถในการทนความร้อนของโปรตีน และสภาวะความร้อนที่ใช้เพื่อให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วนหรือเกิดโดยสมบูรณ์ ในบางครั้งอาจเกิดการรวมตัวกันของโปรตีน ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่เปลี่ยนแปลงไป (Petruccelli และ Anon, 1995)

2.4 โปรตีน

โปรตีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ ซึ่งเป็นพอลิเมอร์สายยาวของกรดแอมิโน (amino acid) ในแง่โภชนาการ โปรตีนเป็นสารอาหารที่ให้พลังงาน คือโปรตีน 1 กรัมให้พลังงาน 4 แคลอรี (calorie) โปรตีนเป็นส่วนประกอบของร่างกาย ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากน้ำ โดยเป็นส่วนประกอบพื้นฐานของเซลล์ของสิ่งที่มีชีวิตทุกชนิด เช่น เอนไซม์ (enzyme) ฮอร์โมน ซึ่งจำเป็นต่อการทำงานและการดำรงชีวิต มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการเสริมสร้างเนื้อเยื่อส่วนที่สึกหรอของสัตว์ เมื่อรับประทานอาหารที่มีโปรตีน ร่างกายจะย่อยสลายโปรตีนได้เป็นกรดแอมิโนและกรดแอมิโนที่ร่างกายได้รับจากอาหารจะนำไปใช้ประโยชน์ต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นโครงสร้างต่างๆ ขึ้นใหม่ตามที่ร่างกายต้องการ เช่น สร้างกล้ามเนื้อโครงกระดูก

2. สังเคราะห์สารอื่น เช่น เป็นสารตั้งต้นของการสร้างสารส่งสัญญาณประสาท (Neurotransmitter)

สังเคราะห์ฮอร์โมนไทรอกซิน (thyroxine) และเอนไซม์เป็นต้น

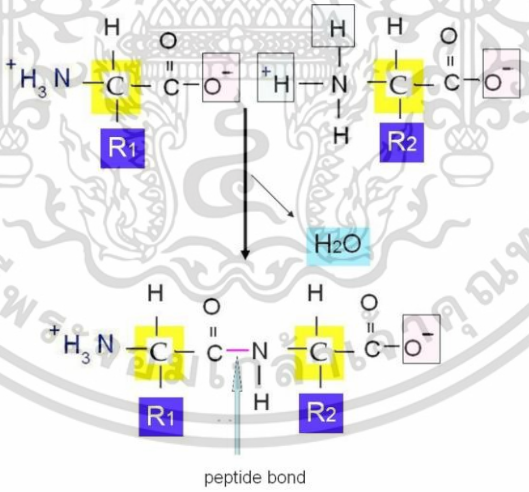
3. เป็นสารตั้งต้นหรือตัวกลางในการสังเคราะห์กรดแอมิโนชนิดอื่น ๆ

4. ช่วยเพิ่มการสะสมไกลโคเจน (glycogenesis) และไขมัน

5. สร้างน้ำตาลกลูโคสในยามที่ร่างกายขาดแคลนน้ำตาลกลูโคส (gluconeogenesis)

6. ให้พลังงานแก่ร่างกาย เมื่อร่างกายขาดคาร์โบไฮเดรตและไขมัน

แหล่งของโปรตีนในอาหาร พืชสังเคราะห์โปรตีนได้จากไนโตรเจน ส่วนคนและสัตว์ชั้นสูงอาศัยกรดอะมิโนที่ได้รับจากอาหาร แหล่งอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพดีและสำคัญของมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ เนื้อสัตว์ (meat) น้ำนม (milk) ไข่ (egg) ถั่ว (legume) เช่น ถั่วเหลือง เมล็ดธัญพืช (cereal grain) นอกจากนี้ จุลินทรีย์ เช่น ยีสต์ สาหร่ายเห็ด หนอน แมลงที่กินได้ก็เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีโมเลกุลของกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของโปรตีน ประกอบด้วยธาตุหลักคือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และกำมะถัน ภายในโมเลกุลของกรดอะมิโนทุกชนิด มีหมู่แอมิโน ($-NH_2$) และหมู่กรดคาร์บอกซิล (COOH) อย่างละ 1 หมู่ กรดอะมิโนแต่ละชนิดแตกต่างกันที่หมู่ R (side chain) ซึ่งมีกรดอะมิโนที่แตกต่างกันประมาณ 20 ชนิด โมเลกุลของกรดอะมิโน เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ (peptide bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์ ได้เป็นสายยาวของกรดอะมิโน เรียกว่าพอลิเพปไทด์ (polypeptide)



รูปที่ 2.1 การเชื่อมต่อกันของกรดอะมิโน
ที่มา: ผศ.ดร. พิมพ์เพ็ญ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา (2010)

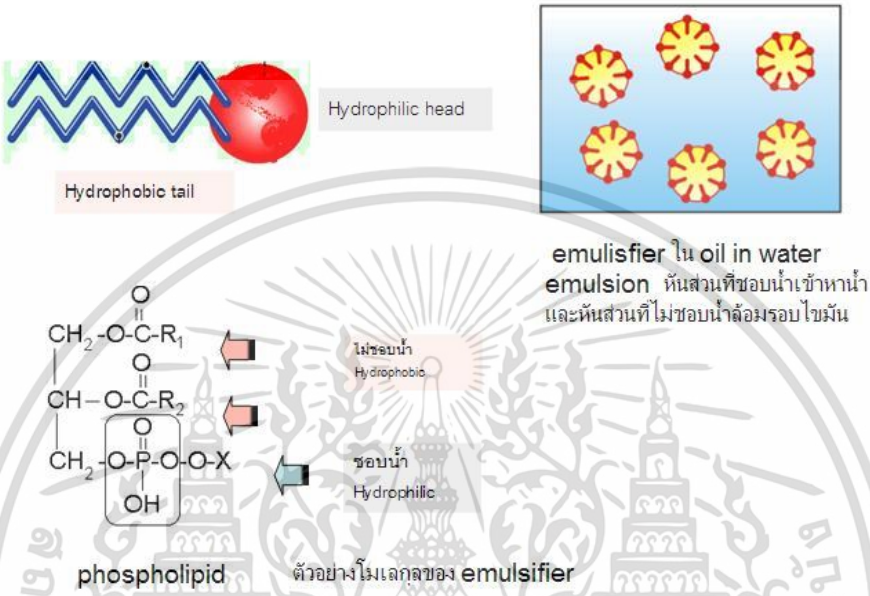
2.4.1 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (functional properties of protein) เป็นสมบัติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการนำไปใช้งานในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier)

โปรตีน ช่วยให้อิมัลชัน (emulsion) คงตัว ด้วยการลดแรงตึงผิว (surface tension) ของของเหลว โดยช่วยป้องกันอิมัลชันไม่ให้แยกเป็นชั้น ซึ่งในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acid) หลายชนิด มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophillic) และไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ในสายพอลิเพปไทด์ โดยจะหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาน้ำ และหันส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาไขมัน



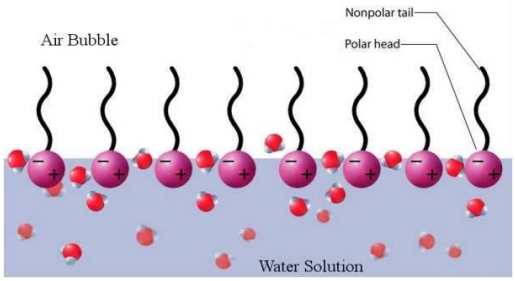
รูปที่ 2.2 การเป็นอิมัลซิไฟเออร์

ที่มา : ผศ.ดร. พิมพ์เพ็ญ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา (2010)

2. การเกิดโฟม (foaming ability)

โฟมเป็นฟองอากาศขนาดเล็กที่แขวนลอยอยู่ในของเหลว หรือของแข็ง โดยมีฟิมส์บางๆ ล้อมรอบอากาศไว้ เกิดจากการตี หรือปั่น (beating or whipping) อย่างรุนแรง การเกิดโฟมของโปรตีนจะเกิดได้ดี โปรตีนต้องมีความยืดหยุ่นสูง และสามารถเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ และแข็งแรงที่สามารถกักเก็บอากาศได้ โปรตีนที่มีความหยืดหยุ่นที่สามารถเกิดโฟมได้ดีต้องมี suface hydrophobicity สูงๆ ซึ่งในระหว่างการตีหรือการทำให้เกิดโฟม เช่น โปรตีนในไข่ขาว และน้ำนม เป็นสารที่ทำให้เกิดโฟม (foaming agent) แรงกลจากการตี หรือปั่นอย่างรุนแรง ทำให้พันธะระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ (protein denaturation) เกิดการคลายตัว (unfolding) ของโครงสร้างโปรตีน เกิดเป็นฟิล์มและจับกับน้ำซึ่งอยู่รอบๆได้ โดยหันด้านที่เป็น hydrophobic ที่อยู่ด้านในโครงสร้าง ออกมาด้านนอก ซึ่งเป็นส่วนที่ทำให้เกิดโครงสร้างของโฟม โดยเกิดเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ที่สามารถกักเก็บอากาศไว้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 การเกิดโฟม

ที่มา : ผศ.ดร. พิมพ์เพ็ญ และ ศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา (2010)

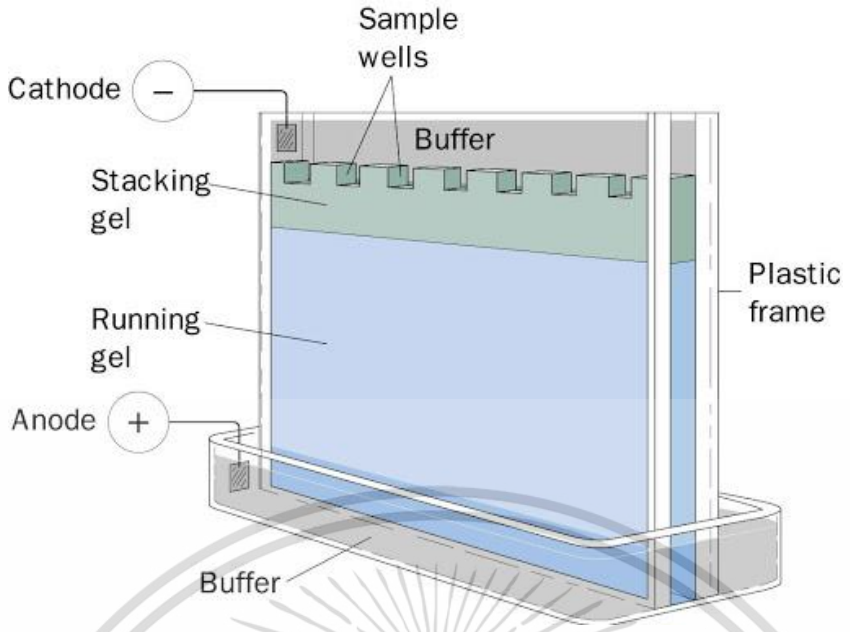
ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมจากโปรตีน ได้แก่ ความสามารถในการละลายของโปรตีน ความเข้มข้มของโปรตีน โดยโปรตีนที่ละลายได้ดี และมีความเข้มข้นสูงๆ จะเกิดโฟมได้ดี และค่าพีเอชที่ทำให้เกิดโฟมที่ดีจะมีค่าใกล้เคียงกับค่า pI ของโปรตีนโฟม จะคงตัวดีที่สุดที่จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point)

2.5 SDS-PAGE

Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยวและดูความบริสุทธิ์ของโปรตีน โดยอาศัยการเชื่อมต่อของ acrylamide monomer จนเป็นสายโซ่ยาวประกอบกันเป็นแผ่นเจล โดยมี TEMED เป็น catalyst และมี ammonium persulfate เป็น initiator

โปรตีนอยู่ในบัฟเฟอร์ที่เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent โดย SDS จะจับพอลิเพปไทด์ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS/กรัมโปรตีน โดยมีmercaptoethanol หรือ dithiotreithol เป็น reducing agent เพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide โปรตีนที่จับกับ SDS จะมีประจุลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้า โมเลกุลที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก ซึ่งอัตราการเคลื่อนที่ของโปรตีนจะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดน้ำหนักโมเลกุลและขนาดของรูพรุนของเจล (โมเลกุลขนาดใหญ่เคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก) โดยขนาดของรูพรุนสามารถปรับได้ตามความเข้นข้นของ acrylamide ความเข้มข้นของอะคริลาไมด์เพิ่มขึ้น ขนาดของรูพรุนจะเล็กลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ข้อมูล (ENZMART BIOTECH, 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 SDS-PAGE
ที่มา: Prof. Dr. W. Lambert และ Prof. Dr. C. Stove (2012)

2.6 Degree of hydrolysis

ระดับการแยกสลายด้วยน้ำของโปรตีน ระดับการแยกสลายด้วยน้ำ (degree of hydrolysis, DH) ของโปรตีน ในที่นี้จะเรียกวา “ระดับการย่อย” เป็นดัชนีที่ใชอธิบายปฏิกิริยาการแยกสลาย โปรตีนดวยเอนไซม การติดตามคาระดับการยอยอาศัยหลักการที่แตกตางกัน เชน อาศัยหลักการเกิดขึ้นของหมูอะมิโนอิสระ อาศัยหลักการของความเปนกรดที่เพิ่มขึ้น และ อาศัยการติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติดานอื่น ๆ ของ โปรตีนเมื่อสายพอลิเพปไทดถูกตัดใหสั้นลง (Nielsen, 1997) วิธีการในการวิเคราะหคาระดับการยอยนั้นจะ แตกตางกันขึ้นกับหลักการที่ใชในการติดตาม การใช้ Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) 2, 4, 6-Trinitrobenzenesulfonic acid ทำปฏิกิริยากับหมูอะมิโน เกิดสารประกอบที่มีสีที่ ตรวจสอบไดที่ความยาวคลื่น 340 nm (Adler-Nissen, 1979)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Hall, Felicia และคณะ (2017) ดำเนินทำการทดลองเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทของจิ้งหรีดในตระกูล tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์ Alcalase ที่สภาวะการทดลองต่างๆ โดยมีปัจจัยที่ควบคุม ปัจจัย คือความ 2 เข้มข้นของเอนไซม์ และ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการย่อย แล้วจึงนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซทและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท ผลการวิเคราะห์พบว่า ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซทอยู่ในช่วง 5.2 - 11.7%, ความสามารถในการเกิดอิมัลชันอยู่ในช่วง 7 – 32 m2/g, ความสามารถในการเกิดโฟมอยู่ในช่วง 100 - 155 %, การปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากแมลง tropical banded cricket จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้เหมาะกับสภาวะpHต่างๆ ในอาหารได้โดยเฉพาะในอาหารกลุ่ม acidic food

Firmansyah, Mochamad และ Abduh, Muhammad Yusuf (2019) ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเซทของแมลงวันในตระกูล Black soldier fly (*Hermetia illucens*) โดยใช้เป็นตัวอ่อนของ Black soldier

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

fly มาผ่านขั้นตอนการสกัดที่มีขั้นตอนหลักอยู่ ขั้นตอน 2 กระบวนการเอาไขมันออก จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสโดยใช้เอนไซม์ bromelain ที่สภาวะการทดลองต่างๆโดยมีปัจจัยที่ควบคุม 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์, pH และ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการย่อย แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซทและสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH พบว่าผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตเท่ากับ 10.7%, productivity 21 mg/mL/batch มีความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ได้มากถึง 77% ที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่า IC50 0.84% v/v

Niphattha C. และคณะ (2018) ได้ทำการศึกษาคุณลักษณะและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำจากแมลงที่เป็นที่นิยมในประเทศไทยคือ ดักแด้หนอนไหม (*Bombyx mori Linn*.) พบว่าโปรตีนที่สกัดจากดักแด้หนอนไหมด้วยน้ำมีปริมาณผลผลิตต่ำ (3.96±0.14%) แต่ถึงอย่างไรก็ตามโปรตีนที่ได้จากดักแด้หนอนไหมมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระสูงและมีค่า Foam stability ที่สูงกว่า Bovine serum albumin (BSA) ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

ดักแด้หนอนไหมสด จากตลาดแมลง

Alcalase ความเข้มข้น 0.5 % จาก suppliers Sigma Aldrich, USA

น้ำมันถั่วเหลือ ตราศรทอง

3.1.2 สารเคมี

Sodium hydroxide, CARLO ERBA, Italy

Potassium dihydrogen phosphate, CARLO ERBA, Italy

Disodiumphosphate, Sigma Aldrich, U.S.A.

Sodium sulfite, Sigma Aldrich, U.S.A

2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS), Sigma Aldrich, U.S.A.

Hydrochloric, RCI Labscan, Bangkok

Boric acid, CARLO ERBA, Italy

Copper (II) sulfate, CARLO ERBA, Italy

Potassium sulfate, CARLO ERBA, Italy

Sulfuric acid, RCI Labscan, Bangkok

Methylene blue, CARLO ERBA, Italy

Methyl red, CARLO ERBA, Italy

Tris (hydroxymethyl) aminometane, Vivantis, Malaysia

Copper (II) sulfate pentahydrate, Merck, Germany

Sodium potassium tartrate, Ajax Finechem, Australia

Glycerol, RCI Labscan, Bangkok

Bromophenol blue, Merck, Germany

β – Mercaptoethanol, Bioscience, U.S.A.

Sodium lauryl sulphate (SDS), Ajax Finechem, Australia

Glycine, Merck, Germany

Acetic acid, RCI Labscan, Bangkok

Methanol, Merck, Germany

Coomassie brilliant blue, Solarbio, China

Acrylamide foe electrophoresi, Sigma Aldrich, U.S.A.

N,N-methylene-bis-acrylamide for electrophoresis, fisher scientific, Canada

Ammonium persulfate, Sigma Aldrich, U.S.A.

Tetramethylethylenediamine, Thermo Scientific, U.S.A.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์

ปิเปต (Pipette, Mettler-Tolede, Switzerland)
เครื่องสับผสม (Bowl cutter, Rewebo, C99V, Italy)
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Eppendrof 5804R, Germany)
เครื่องฮอโมจีไนซ์ (Homogenizer, IKA T 25 digital Malaysia,)
เครื่องวัดสี (Spectrophotometer, Mettler-Tolede, Switzerland)
เครื่องวัดค่า pH (PH meter, Mettler-Tolede, Switzerland)
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath shaker, Daihan MaXturdy, Korea)
เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer, coolsafe, Denmark)
แท่งแก้วคนสาร (Glass Stirring Rod, Duran, Germany)
แมกเนติกบาร์ (Magnetic Stirring Bar)
บีกเกอร์ ขนาด 600 มิลลิลิตร (Beaker size 600 ml, Duran, Germany)
เครื่องกวนสารด้วยแท่งแม่เหล็ก (Magnetic Stirrer)
บีกเกอร์ (Beaker, Duran, Germany)
กระบอกตวง (Cylinder, Duran, Germany)
เครื่องชั่งน้ำหนักทศนิยม 4 ตำแหน่ง
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask, PYREX, Germany)
บิวเรต (Burette Glass, FAVORIT, Malaysia)
ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask, PYREX, Germany)
กระบอกน้ำกลั่น (Wash bottle, NALGENE, U.S.A)
ขวดลดความดัน (Büchner flask, PYREX, Germany)
กรวยกรองบุชเนอร์ (Porcelain Büchner funnel, KENIS, Japan)
กระดาษกรอง (Filter paper, Whatman, UK)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex, Genie2, U.S.A)
เครื่องวัดค่าสี (Konica Minolta, CR400, United Kingdom)
อุปกรณ์ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldahl apparatus)

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.3.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำดักแด้หนอนไหมสดมาล้างทำความสะอาด แบ่งใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 100 กรัม แล้วนำไปบรรจุแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

3.3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

ดัดแปลงจาก Hall, Felicia et al., (2017) นำดักแด้หนอนไหมแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วปั่นผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 5 ด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 นาที ปรับ pH ด้วยสารละลาย Phosphate Buffer pH 8.2 จนกระทั่ง pH เท่ากับ 8.0 และทำการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส โดย water bath shaker หลังจากนั้นทำการเติมเอนไซม์ alcalase ความเข้มข้น 1.5 %w/w โดยบ่มเป็นเวลา 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการหยุดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำงานของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น (4 องศาเซลเซียส) และทำการหมุนเหวี่ยงที่ 11200 g เป็นเวลา 15 นาที (4 องศาเซลเซียส) หลังการหมุนเหวี่ยงตัวอย่างจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นตะกอน(กากแมลง) และ ส่วนที่เป็นของเหลว หลังจากนั้นทำการเก็บส่วนที่เป็นของเหลวโดยการใช้ผ้าขาวบางกรองเพื่อแยกส่วนที่ไม่ต้องการออก ก่อนนำไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่แข็ง เก็บรักษาผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ที่ 4 องศาเซลเซียล

3.3.3 การวิเคราะห์ระดับการย่อย ใช้วิธีการของ Nalinanon et al., (2011) โดยคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \times 100$$

โดยที่ L_t = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท

L_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

L_{max} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์

1.) ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำส่วนของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่แบ่งมาจากข้อ 3.3.2 ที่บ่มในเวลา 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง มาทำการเจือจาง 20 เท่าด้วย Phosphate Buffer pH 8.2 ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 20 เท่า ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Phosphate Buffer pH 8.2 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และ 0.01 %w/v TNBS 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดย water bath shaker บ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M Sodium sulfite 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

2.) ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์

นำดักแด้หนอนไหมแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง แล้วบดผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1 : 5 ในเครื่องปั่นเป็นเวลา 10 นาที ดูดสารละลายดักแด้หนอนไหม 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 6M HCl ปริมาณ 9 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส โดย oil bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมผงถ่านปริมาณเล็กน้อย เขย่าให้เข้ากัน ทำการกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์1 ล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 2 มิลลิลิตร เติม 6M NaOH ปริมาณ 9 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ด้วย HCl จนกระทั่ง pH เท่ากับ 7 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้มาทำการเจือจาง 5 เท่าด้วย Phosphate Buffer pH 8.2 ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 5 เท่า ปริมาณ 125 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติม Phosphate Buffer pH 8.2 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร และ 0.01 %w/v TNBS 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดย water bath shaker บ่มเป็นเวลา 30 นาที ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 M Sodium sulfite 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

3.3.4 การวิเคราะห์ผลผลิต การวัดค่าสีและองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้อ 3.3.2 ที่มีระดับการย่อยต่างๆมาวิเคราะห์ดังนี้

1.) ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ร้อยละผลผลิตสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ร้อยละผลผลิต} = \frac{\text{น้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเซท}}{\text{น้ำหนักดักแด้หนอนไหมแห้ง}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) การวัดค่าสี

วัดค่าสีในระบบ CIE ด้วยค่า L*, a* และ b* ตามวิธีของ AOAC (2000)

ทำการสอบเทียบเครื่อง Konica Minolta ด้วย Calibration plate จากนั้นจึงนำตัวอย่าง 3 กรัม มาวัดโดยใช้ probe วางลงไปที่ตัวอย่าง จากนั้นเครื่อง Konica Minolta จะทำการประมวลผลซึ่งจะแสดงค่า L*, a* และ b* บนหน้าจอแสดงผล

3.) การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี วิเคราะห์หา ความชื้น โปรตีน โดยใช้วิธีตาม AOAC (2000)

ก.) การวิเคราะห์หาความชื้น (ดัดแปลงมาจาก AOAC, 1990)

ทำการอบถ้วยอลูมิเนียมสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนเย็น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้น 1 กรัม ลงในถ้วยอลูมิเนียมแล้วทำการบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน (w1) จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-6 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ก่อนนำมาชั่งน้ำหนัก อบซ้ำอีกครั้ง ครั้งละครึ่งชั่วโมง จนน้ำหนักคงที่ หรือผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ 2 ครั้งต้องต่างกันไม่เกิน 0.003-0.005 กรัม (w2)การหาเปอร์เซ็นต์ความชื้น สามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น } (\mathbf{w-w1}) - \text{ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ } (\mathbf{w-w2})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น } (\mathbf{w-w1})} \times 100$$

ข.) การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี kjeldahl (ดัดแปลงมาจาก AOAC, 1990)

ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัม ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง เติม catalyst 10 กรัม เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาณ 25 มิลลิลิตร หลังจากนั้นวางหลอดย่อยในเครื่องย่อย เริ่มทำการย่อยโดยค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิ จนเกิดการย่อยได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นลง นำไปเข้าชุดกลั่นโปรตีนต่อ โดยทำการกลั่นล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่นก่อนใช้งาน นำขวดย่อยโปรตีนต่อเข้ากับเครื่องกลั่น นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการเติม 2 %w/v boric acid ปริมาตร 60 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ไปรองรับของเหลวที่กลั่นออกมา นำของเหลวที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ไปทำการไตเตรท กับ 1M HCl โดยสีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนในตัวอย่าง ได้จากสมการ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\mathbf{(a-b)\ x\ N\ x\ 14\ x\ 100}}{\mathbf{w\ x\ 1000}} \times 100$$

โดยที่ a = ปริมาณของสารละลายไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง
b = ปริมาณของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทกับ blank
N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ (normal)
W = น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

การคำนวณเปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีน ได้จากสมการ

ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน x 6.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค.) ประสิทธิภาพในการสกัด

ประสิทธิภาพในการสกัดสามารถคำนวณได้จาก

$$\text{ประสิทธิภาพในการสกัด} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสต}}{\text{ปริมาณโปรตีนดักแด้สด}} \times 100$$

ง.) การวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซส ด้วย SDS – PAGE

การเตรียมเจล

ทำวามสะอาดอุปกรณ์ให้สะอาดและแห้งด้วย 70%v/v Ethanol เช็ดด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ในทิศทางเดียวกัน ทำการประกอบกระจก 2 แผ่นให้เข้ากัน ใส่ปะเก็นกันรั่ว ใช้คลิปหนีบปลายกระจก ทำการเตรียม Running gel แล้วโหลดลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจก โดยต้องระวังอย่าให้เกิดฟอง โหลดเจลจนกระทั่งมีความสูงเท่ากับระยะที่กำหนดไว้ เติมน้ำกลั่นไปเบาๆบนหน้าเจล เพื่อทำให้ผิวหน้าเจลเรียบ ตั้งทิ้งไว้ให้เจลเซ็ตตัว 45 นาที จากนั้นเติม Stacking gel ลงไปในช่องว่าง อย่าให้เกิดฟอง แล้วใส่หวีลงไป รอเจลเซ็ตตัว

การรันเจล

นำเจลประกอบลงใน Chamber เท Running buffer ลงไป จนท่วมเส้นรั้วเงิน โดยไม่ให้เกิดฟอง ดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ (5 ไมโครลิตร) ใน well ที่มี Runnning buffer ท่วม ทำการต่อขั้วไฟฟ้าให้สีถูกต้อง เปิดเครื่อง power supply ที่ 220 V 120 MA สังเกตสี tracking dye เคลื่อนห่างปลายล่างสุดของเจล 0.5 – 1 เซนติเมตร การแกะ ย้อม และทำแห้งเจล

นำเจลออกจากแผ่นกระจก โดยใช้ specular ใช้น้ำช่วยนำเจลออก ทำการ Fixing 45 นาที Staining 45 นาที และ Destaining จนกระทั่งเห็น band ที่ชัดเจน หลังจากนั้นนำกระดาษแก้วตรึงเจลที่ได้ไว้ แล้วฉีด 20%v/v Glycerol

3.3.5 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากข้อ 8.3.2 ที่มีระดับการย่อยต่างๆมาทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่ดังนี้

1.) ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index, EAI) และดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index, ESI)

ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella (1978) เตรียมตัวอย่างมา 6 mL (5 mg/mL) ใส่ในน้ำมันถั่วเหลือง 2 mL นำไปHomogenize 20,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปิเปตสารละลายส่วนล่างสุด (ที่ตั้งทิ้งไว้เวลา 0 และ 10 นาที)มา 50 µL ใส่ในหลอดทดลอง นำไปเจือจาง 100 เท่า โดยใช้ 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate solution แล้วนำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที วัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 500 nm นำค่าที่ได้ไปคำนวณดังนี้

$$\text{EAI } (m^2/g) = \frac{(2 \times 2.303 \times A \times DF)}{1 \emptyset C}$$

โดยที่ A = ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm

DF = dilution factor (100)

1 = ความกว้างของ cuvette (m)

Ø = สัดส่วนของปริมาตรน้ำมันพืช

C = ความเข้มข้นของโปรตีน (g/m^3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\text{ESI (min)} = \frac{(A_0 \times t)}{\Delta A}$$

โดยที่ $\Delta A = A_0 - A_{10}$ และ t = 10 นาที

2.) ความสามารถในการก่อโฟม Foam (Foaming capacity, FC) และความเสถียรของโฟม (Foam stability, FS)

ดัดแปลงจาก Nalinanon et al. (2018) เตรียมตัวอย่างมา 35 mL (5 mg/mL) ใส่กระบอกตวง 100 mL นำสารละลายไป Homogenize 16,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตั้งตัวอย่างทิ้งไว้ที่ 0 และ 60 นาที แล้วนำมาคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{FC (\%)} = \frac{V_t}{V_0} \times 100$$

$$\text{FS (\%)} = \frac{V_{60}}{V_0} \times 100$$

โดยที่ V_t = ปริมาตรหลังการปั่น (mL)

V_o = ปริมาตรก่อนปั่น (mL)

V_{60} = ปริมาตรหลังการปั่นเมื่อทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที (mL)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

ในการศึกษาได้นำดักแด้หนอนไหมมาทำการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะเปปไทด์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนไม่มีขั้วเป็นหลัก ในการศึกษาได้ทำการกำหนดความเข้มข้นของเอนไซม์ ดังนี้ คือ 1, 1.5, 2 และ 3 %w/w และทำการบ่มด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้ คือ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลของโปรตีนที่ผ่านการไฮโดรไลเซทในสภาวะที่ต่างกัน ในด้านผลผลิต องค์ประกอบ และสมบัติเชิงหน้าที่ โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหมที่สกัดได้มีลักษณะปรากฏแสดงดังภาพที่ 4.1 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเหลืองอ่อน มีค่าสีดังนี้ L* เท่ากับ 36.47, a* เท่ากับ 1.02 และ b* เท่ากับ 3.51 ซึ่งผงดักแด้หนอนไหมยังคงมีกลิ่นของดักแด้หนอนไหม

รูปที่ 4.1 แสดงลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการ Freeze dry

4.1 ผลการศึกษาระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำดักแด้หนอนไหมมาทำการสกัดโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสโดยผลิตได้จาก Bacillus licheniformis สามารถทำงานได้ดีในสภาวะด่าง และมีความสามารถในการตัดสายของพอลิเปปไทด์ได้หลายตำแหน่งทั้งภายนอกและภายในสายพอลิเปปไทด์ เพื่อศึกษาผลของระดับการย่อย โดยตัวแปรที่ใช้คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการบ่ม ซึ่งในการวิเคราะห์ใช้วิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Nalinanon et al., (2011) โดยใช้ TNBS ในการวิเคราะห์ระดับการย่อย

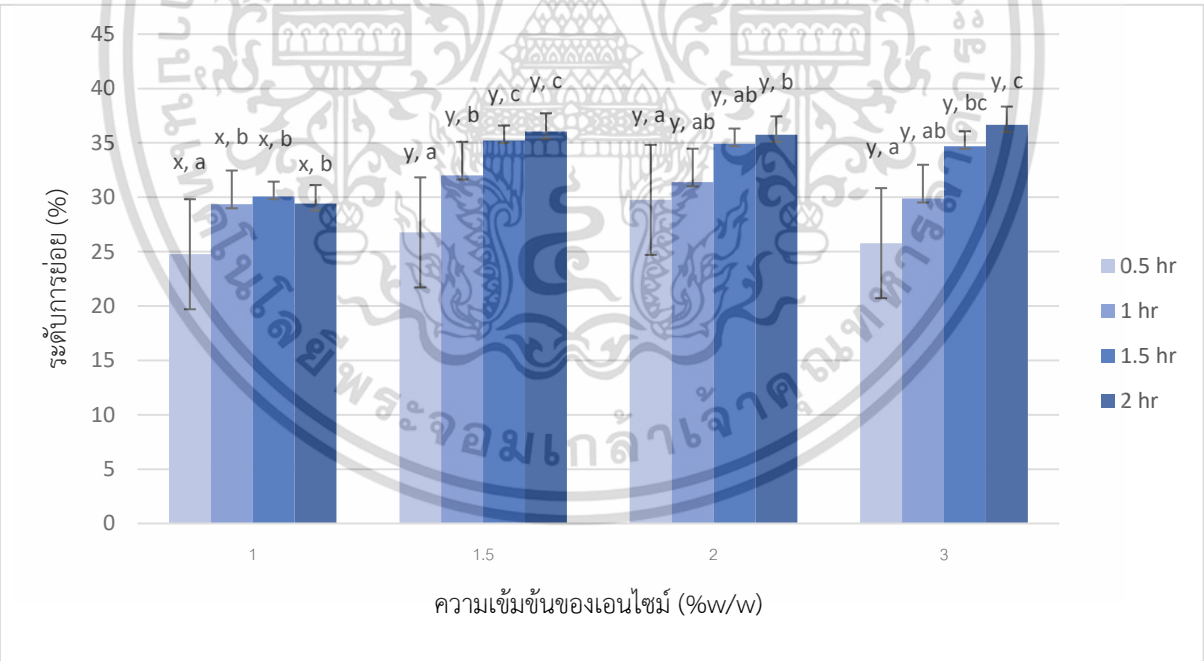
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะการทดลองที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (% w/w)	ระดับการย่อย(%) เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)			
	0.5	1	1.5	2
1	24.76 ± 0.67[a]	29.37 ± 0.55[b]	30.06 ± 0.24[b]	29.43 ± 1.69[b]
1.5	26.77 ± 0.70[a]	32.01 ± 0.38[b]	35.22 ± 1.26[c]	36.03 ± 1.30[c]
2	29.76 ± 5.06[a]	31.38 ± 1.19[ab]	34.94 ± 1.05[ab]	35.75 ± 1.27[b]
3	25.78 ± 2.12[a]	29.90 ± 3.09[ab]	34.69 ± 1.38[bc]	36.65 ± 0.65[c]

[a, b, c] คือตัวอักษรที่กำกับในแนวนอนเพื่อแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

จากตารางที่ 4.1 ถ้าพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่เท่ากัน โดยใช้เวลาในบ่มที่แตกต่างกัน พบว่า เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ระดับการย่อยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และเริ่มมีเปอร์เซ็นต์ระดับการย่อยที่คงที่ ในช่วงระยะเวลาในการบ่มตั้งแต่ 1.5 ชั่วโมงขึ้นไป โดยสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ระดับการย่อยที่ใช้เวลาในการบ่ม 1.5 และ 2 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในทุกระดับความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase โดยมีระดับการย่อยที่สูงสุดอยู่ในช่วง 36-37 เปอร์เซ็นต์



a, b และ c คือตัวอักษรที่กำกับเพื่อแสดงว่าระยะเวลาในการบ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)
x และ y คือตัวอักษรที่กำกับเพื่อแสดงว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

รูปที่ 4.2 แสดงค่าระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะการทดลองที่ต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถ้าพิจารณาจากระยะเวลาในการบ่มเดียวกัน โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่แตกต่างกัน พบว่า เมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น ทำให้เปอร์เซ็นต์ระดับการย่อยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่ 1.5 %w/w มีเปอร์เซ็นต์ระดับการย่อย ที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) จากความเข้มข้น 2 และ 3 %w/w แต่แตกต่างจากความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่ 1 %w/w อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

ดังนั้น การคัดเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ เลือกได้จาก เปอร์เซ็นต์ระดับการย่อย ซึ่งกำหนดความเข้มข้นที่แตกต่างกันของเอนไซม์ Alcalase ทำให้สามารถเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่เหมาะสม คือ 1.5 %w/w เนื่องจากมีค่าไม่แตกต่างจาก 2 และ 3 %w/w เพื่อไปใช้ในการวิเคราะห์ในด้านผลผลิต องค์ประกอบ และสมบัติเชิงหน้าที่ ของโปรตีนไฮโดรไลเซท ต่อไป

4.2 ผลการวิเคราะห์ผลผลิต

หลังจากได้ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ที่เหมาะสม คือ ที่ระดับความเข้มข้น 1.5 %w/w โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง และมีตัวอย่างควบคุม โดยที่ตัวอย่างควบคุมไม่มีการใช้เอนไซม์ Alcalase ในการย่อย เป็นเพียงการสกัดด้วยด่าง นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหมที่เตรียมได้มาทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น พบว่ามีผลดังต่อไปนี้

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ปริมาณความชื้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ความชื้น(%)
ดักแด้หนอนไหมสด	75.25 ± 0.61^{a}
0	97.21 ± 0.00^{c}
0.5	96.26 ± 0.02^{b}
1	96.75 ± 0.07^{b}
1.5	96.66 ± 0.18^{b}
2	96.41 ± 0.35^{b}

$^{a, b, c, d}$ คือตัวอักษรที่กำกับในแนวตั้งเพื่อแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

จากตารางที่ 4.2 แสดงให้เห็นถึงเปอร์เซ็นต์ความชื้นของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ระดับความเข้มข้น 1.5 %w/w ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นที่มีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ทุกระยะเวลาในการบ่ม มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นแตกต่างจากตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) และเมื่อนำไปทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ผลผลิตฐานแห้งแบบหยาบ พบว่าได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์ปริมาณผลผลิตฐานแห้งของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ผลผลิตฐานแห้ง(%w/w)
0	7.3783[a]
0.5	9.4101[b]
1	10.1137[d]
1.5	9.7158[c]
2	10.7163[e]

[a, b, c, d, e] คือตัวอักษรที่กำกับในแนวตั้งเพื่อแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

จากตารางที่ 4.3 พบว่า เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตฐานแห้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) ในทุกระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ความเข้ม 1.5%w/w ที่ระยะเวลาการบ่ม โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง และมีตัวอย่างควบคุม โดยที่ตัวอย่างควบคุมไม่มีการใช้เอนไซม์ Alcalase ในการย่อย เป็นเพียงการสกัดด้วยด่าง มาทำการวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์โปรตีนโดยวิธีเจลดาห์ล ซึ่งจะวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่มีอยู่ในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท

ตารางที่ 4.4 เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซท และประสิทธิภาพในการสกัดที่ได้จากระยะเวลาในการบ่มที่ต่างกัน

เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)	ปริมาณโปรตีน(%)	ประสิทธิภาพในการสกัด(%)
0	14.79 ± 0.01[a]	30.81
0.5	25.09 ± 0.10[b]	52.27
1	27.90 ± 0.04[c]	58.13
1.5	27.92 ± 0.23[c]	58.17
2	29.33 ± 0.23[d]	61.10

[a, b, c, d] คือตัวอักษรที่กำกับในแนวตั้งเพื่อแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

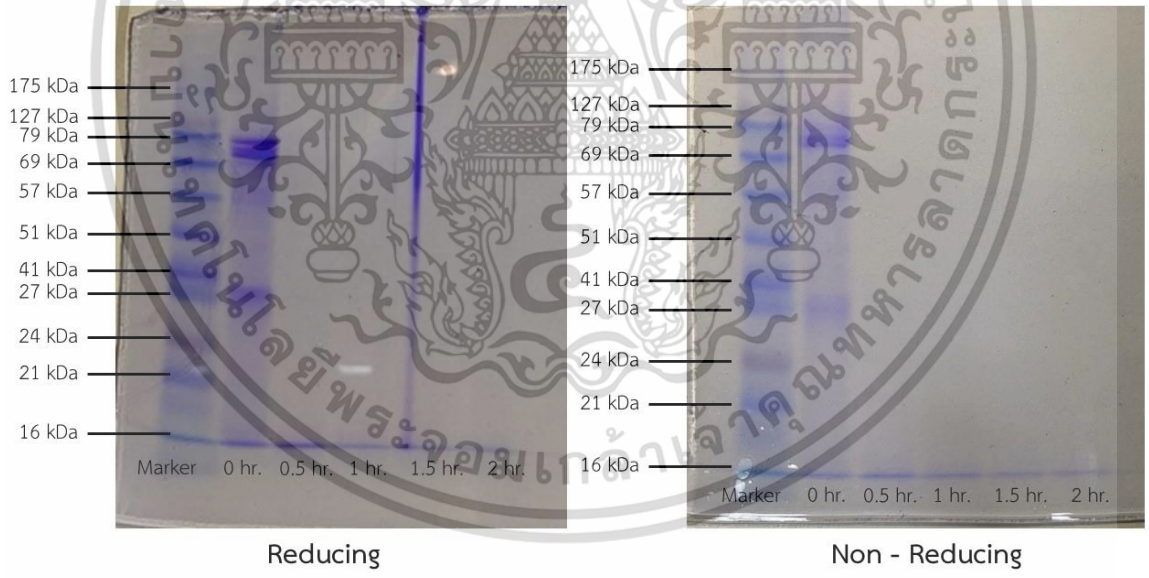
ตารางที่ 4.4 แสดงเปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ระดับความเข้มข้น 1.5 %w/w ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นจะทำให้ เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) แต่ที่ระยะเวลาในการบ่ม 1 และ 1.5 ชั่วโมงมีเปอร์เซ็นต์โปรตีนที่ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) เมื่อทำการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase และไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนที่แตกต่างกันมากอย่างเห็นได้ชัดเจน ในส่วนของประสิทธิภาพในการสกัดพบว่าโปรตีนที่ผ่านการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase มีประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase โดยประสิทธิภาพในการสกัดสามารถคำนวณหาได้โดยการนำปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนทั้งหมดในดักแด้หนอนไหมสด (48 %dry basis)

พบว่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณผลผลิตฐานแห้ง เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีน และประสิทธิภาพในการสกัดของโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase มีค่าสูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเอนไซม์เข้าไปตัดพันธะภายในโครงสร้างโปรตีนทำให้ โปรตีนไฮโดรไลเซทมีสมบัติการละลายที่ดีขึ้น ส่งผลให้ค่าเปอร์เซ็นต์ปริมาณผลผลิตฐานแห้ง เปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีน และประสิทธิภาพในการสกัดของโปรตีน มีค่าสูงขึ้น

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากดักแด้หนอนไหมมาทำการวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีน โดยใช้วิธี SDS-PAGE ซึ่งต้องทำการปรับความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการบ่มในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ให้มีความเข้มข้นที่เท่ากันก่อนจะนำไปหาขนาดโมเลกุลของโปรตีน ดังตารางที่ 4.5 ทำการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโปรตีน 2 สภาวะ คือ Reducing และ Non-Reducing ซึ่งใช้ AccuProtein Chroma ที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 16 ถึง 250 kDa เป็น Protein marker โดยมีผลวิเคราะห์ดังต่อไปนี้



รูปที่ 4.3 แสดงผล SDS – PAGE ที่สภาวะ Reducing และ Non-Reducing

จากรูปที่ 4.3 แสดงถึงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเปรียบเทียบสภาวะ Reducing และ Non reducing พบว่า มีเพียงแถบของตัวอย่างควบคุม ที่ไม่มีการใช้เอนไซม์ Alcalase ในการย่อย เป็นเพียงการสกัดด้วยด่าง สังเกตเห็นเส้น band และสามารถอ่านค่าขนาดของโปรตีนได้ทั้ง 2 สภาวะ โดยในสภาวะ Reducing และ Non-Reducing พบขนาดโมเลกุลโปรตีนระหว่าง 69-79 kDa, 57 kDa และ 27 kDa แต่ในสภาวะ Reducing เส้น band ของโปรตีนมีการกระจายตัวมากกว่าในสภาวะ Non-Reducing ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang และคณะ (2008) ได้ทำการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนจากดักแด้

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หนอนไหม ซึ่งพบว่าโปรตีนหลัก 4 ชนิดที่พบ ได้แก่ อัลบูมิน (97.4 kDa, 61.4 kDa, 44.4 kDa และ 26.7 kDa), กลูเตลิน (200 kDa และ 15-60 kDa), โกลบูลิน (130.0 kDa และ 26.8 kDa) และ โพรลามิน (15.3-46 kDa) และงานวิจัยของ Felicia G. Hall และคณะ (2017) ที่ทำการวิเคราะห์ขนาดของโมเลกุลโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการใช้เอนไซม์ Alcalase เช่นเดียวกันแต่ใช้กับจิ้งหรีด (*Gryllodes sigillatus*) ที่พบขนาดของโมเลกุลโปรตีนส่วนใหญ่ อยู่ในช่วงต่ำกว่า 14.4 kDa แต่เนื่องจากคณะผู้ทดลองได้ใช้ Protein marker ในช่วงขนาดโมเลกุลโปรตีนเล็กที่สุดเพียง 16 kDa จึงทำให้ไม่สามารถเห็น Band ขนาดโมเลกุลโปรตีนไฮโดไลเซทได้ และที่ไม่สามารถเห็น band นั้นเนื่องจากโปรตีนถูกย่อยจนมีขนาดเล็กกว่า 16 kDa

4.4 การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ความเข้ม 1.5%w/w ที่ระยะเวลาการบ่ม โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มที่ 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง และมีตัวอย่างควบคุม โดยที่ตัวอย่างควบคุมไม่มีการใช้เอนไซม์ Alcalase ในการย่อย เป็นเพียงการสกัดด้วยด่าง มาทำการวิเคราะห์ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index) โดยการนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทใส่ในน้ำมันถั่วเหลือง นำไป Homoginize ที่ความเร็วรอบ 20,000 รอบ/นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 nm และทำการวิเคราะห์ความสามารถในการก่อโฟม (Foam capacity) และความเสถียรของโฟม (Foam stability) โดยการนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทมา Homoginize ที่ความเร็วรอบ16,000 รอบ/นาที แล้ววัดปริมาณโฟมที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 4.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

Functional properties	เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)				
	0	0.5	1	1.5	2
Emulsion activity index (EAI) (m^2/g)	8.39 ± 0.57^{c}	5.70 ± 0.28^{b}	4.99 ± 0.35^{a}	4.54 ± 0.06^{a}	4.43 ± 0.08^{a}
Emulsion stability index (ESI) (min)	17.83±0.36^{d}	9.94 ± 0.28^{c}	7.59 ± 0.17^{b}	6.23 ± 0.43^{a}	5.98 ± 0.15^{a}
Foam capacity (FC) (%)	0	0	0	0	0
Foam stability (FS) (%)	0	0	0	0	0

$^{a, b, c, d}$ คือตัวอักษรที่กำกับในแนวนอนเพื่อแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.3 ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index) ของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ระดับความเข้มข้น 1.5 %w/w ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง และตัวอย่างควบคุม เมื่อระยะเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นจะทำให้ ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index) มีแนวโน้มลดลง แต่ตัวอย่างควบคุมมีค่ามากกว่าตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์ Alcalase เนื่องจากโปรตีนถูกย่อยจนมีขนาดเล็กลง ส่งผลต่อค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index) ความสามารถในการก่อโฟม (Foam capacity) และความเสถียรของโฟม (Foam stability) ของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ระดับความเข้มข้น 1.5 %w/w ที่ใช้ระยะเวลาในการบ่ม 0.5, 1, 1.5 และ 2 ชั่วโมง และตัวอย่างควบคุม ไม่มีความสามารถในการก่อโฟม ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Felicia G. Hall (2017) ที่นำโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเอนไซม์ Alcalase แต่ใช้แมลงชนิดอื่น มาหาความสามารถในการก่อโฟม และความเสถียรของโฟม โดยมีการใช้ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซส 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เช่นเดียวกัน แต่มีความสามารถในการก่อโฟม และความเสถียรของโฟม เป็นผลมาจากโปรตีนไฮโดรไลเซทของ Felicia G. Hall (2017) มีเปอร์เซ็นต์ปริมาณโปรตีนถึง 59.1% ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซทของคณะผู้ทดลอง มีปริมาณเปอร์เซ็นต์โปรตีนเพียง 27-29 % ที่ระดับความเข้มเข้ม 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เท่ากัน จึงอาจทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีความเข้มไม่เพียงพอในการก่อโฟม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

1. การใช้เอนไซม์แอลคาเลสร่วมกับด่างสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากดักแด้หนอนไหมได้ โดยประสิทธิภาพในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 29% เป็น 50-58%

2. ขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทในสภาวะ Reducing และ Non-Reducing พบโมเลกุลโปรตีนขนาดระหว่าง 69-79 kDa, 57 kDa และ 27 kDa

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทในด้านปริมาณไขมัน เส้นใยอาหาร และเถ้า เพื่อปรับปรุงวิธีการสกัดโปรตีนดักแด้หนอนไหมให้มีปริมาณผลผลิต และปริมาณโปรตีนที่สูงขึ้น

5.2.2 ในการวิเคราะห์ความสามารถในการก่อโฟม (Foam capacity) และความเสถียรของโฟม (Foam stability) ควรทำการทดลองซ้ำ โดยเพิ่มความเข้มข้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทให้มีความสามารถในการก่อโฟม (Foam capacity) และความเสถียรของโฟม (Foam stability)

5.2.3 ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านอื่นๆ เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน และสมบัติในการดูดซับไขมันของโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมหม่อนไหม กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. ภูมิปัญญาการผลิตเส้นไหมไทยพื้นบ้าน. 2556. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: https://qsds.go.th/newosrd/เอกสารเผยแพร่. 15 ตุลาคม 2562

กัณฑ์วีร์ วิวัฒน์พาณิชย์, บรรณาธิการ. 2542. แมลงอาหารมนุษย์ในอนาคต. กรุงเทพฯ: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

ณัฐวุฒิ ส่งแสง. 2550. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเสตกากถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ทิพย์วลี จุลมัญลิก และศศิธร คงเรือง. 2562. สมบัติเชิงหน้าที่และการประยุกต์ใช้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเซท. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. 14: 69-87.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4 ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์. 2010. โปรตีน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1189/protein. 15 ตุลาคม 2562.

ผศ.ดร.พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และศาสตราจารย์เกียรติคุณ ดร.นิธิยา รัตนาปนนท์. 2010. อิมัลชัน. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0674/emulsion. 15 ตุลาคม 2562.

วราภรณ์ กาพันสิทธิ์ และนพพล เล็กสวัสดิ์. 2566. เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก: http://www.agro.cmu.ac.th/absc/data/57/57-027.pdf. 15 ตุลาคม 2562.

Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 27(6), 1256-1262.

Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.

Bukkens SGF. 2005. nutritional aspects. 545-577. InPaoletti MG. Insect in the human diet. Science Publishers. Enfield.

Chatsuwan N., Nalinanon S., Puechkamut Y., Lamsal Buddhi P. and Pinsirodom P. 2018. Characteristics, Functional Properties, and Antioxidant Activities of Water-Soluble Proteins Extracted from Grasshoppers, *Patanga succincta* and *Chondracris roseapbrunner*. Chemistry. 2018.

Chatsuwan N., Puechkamut Y. and Pinsirodom P. 2018. Characterization, Functionality and Antioxidant Activity of Water-Soluble Proteins Extracted from *Bombyx mori* Linn. Current Applied Science and Technology. 18 No. 2.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enzmart Biotech. 2012. SDS-PAGE. [Online]. Available: https://www.enzmart.com/about.php. 15 October 2019.

Firmansyah M. and Abduh, Muhammad Y. 2019. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. Heliyon. 5.

Hall, Felicia G., Jones, Owen G., O'Haire, Marguerite E. and Liceaga, Andrea M. 2017. Functional properties of tropical banded cricket (Gryllodes sigillatus) protein hydrolysates. Food Chemistry. 224: 414-422.

Hamada, J.S. 1992. Effects of heat and proteolysis on deamidation of food proteins using peptidoglutaminase. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(5): 719-723.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 657-666.

Nalinanon S., Benjakul S., Kimshimura H. and Shahidi F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chemistry. 124: 1354-1362.

Pearce, Kevin N. and Kinsella, John E. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. Food Chem. 28 No. 3.

Petruccelli, S. and Anon, M. 1995. Thermal Aggregation of Soy Protein Isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 3035-3041.

Tilak Nagodawithana and Gerald Reed., editor. 2013. Enzymes in Food Processing. 3rd ed. San Diego: ACADEMIC PRESS.

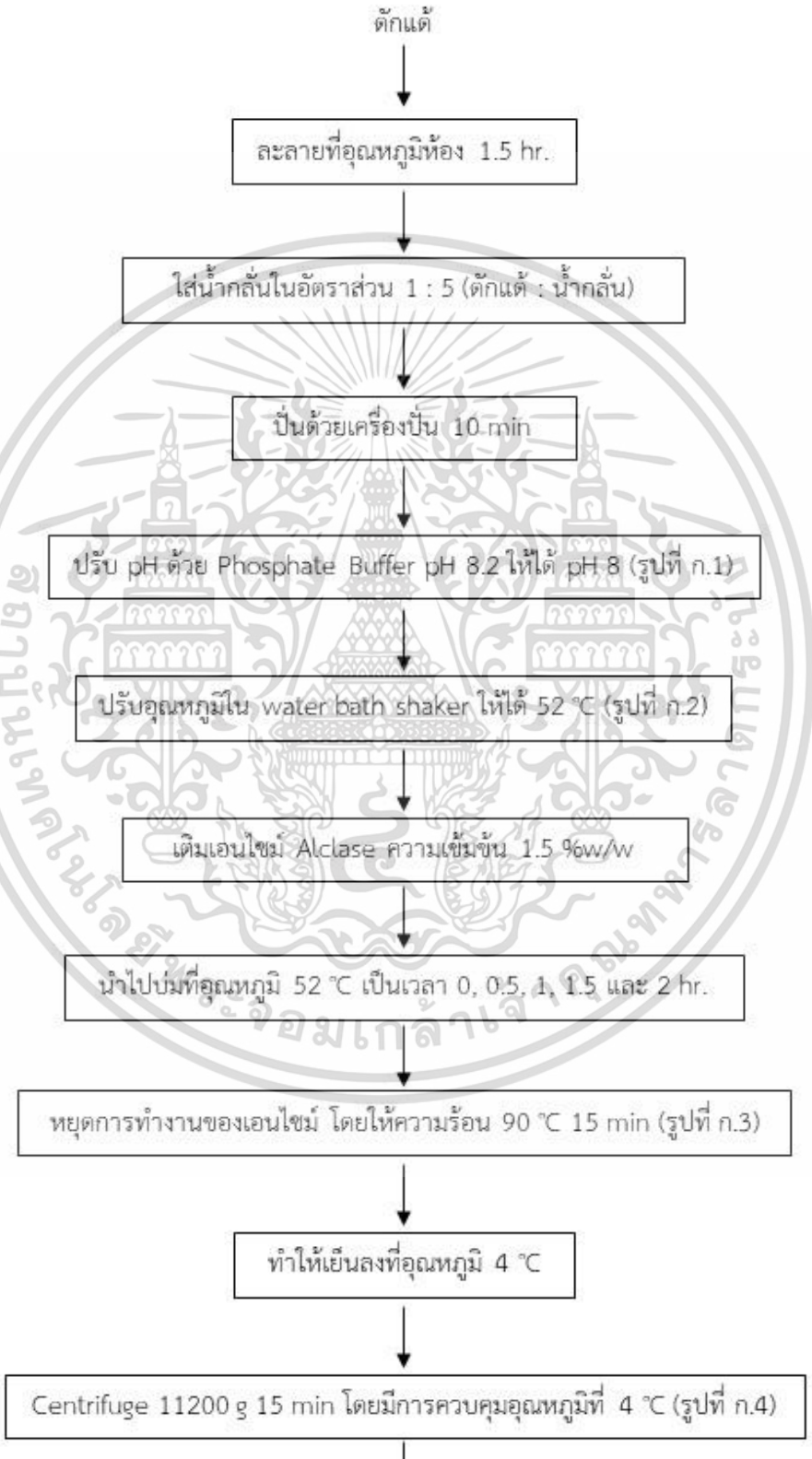
Wang W., Shen S., Chen Q., Tang B., He G., Ruan H. and Das U. 2008. Hydrolyzates of Silkworm Pupae (*Bombyx Mori*) Protein is a New Source of Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides (ACEIP). Current Pharmaceutical Biotechnology. 9: 307-314.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซท



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

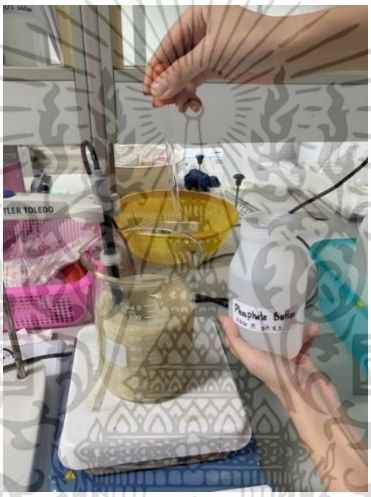
เก็บส่วนที่เป็นของเหลว โดยกรองผ่านผ้าขาวบาง (รูปที่ ก.5 และ ก.6)

↓

Freeze drying (รูปที่ ก.7)

↓

ผงโปรตีนไฮโดรเซท



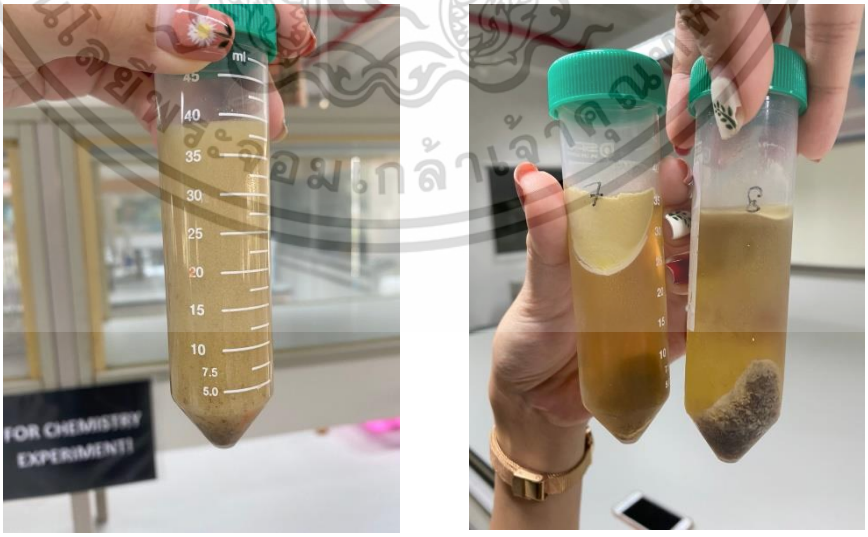
รูปที่ ก.1 ปรับ pH สารละลายดักแด้หนอนไหมด้วย Phosphate Buffer

รูปที่ ก.2 ปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์Alcalase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ก.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ Alcalase ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส

รูปที่ ก.4 หมุนเหวี่ยงสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท

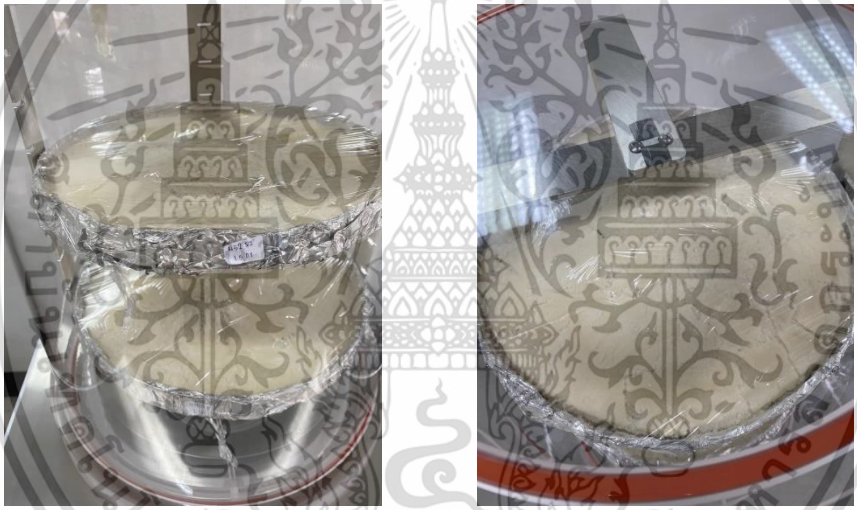


ก่อนหมุนเหวี่ยง หลังหมุนเหวี่ยง

รูปที่ ก.5 ตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนและหลังการหมุนเหวี่ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ก.6 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทส่วนใสจากการหมุนเหวี่ยง



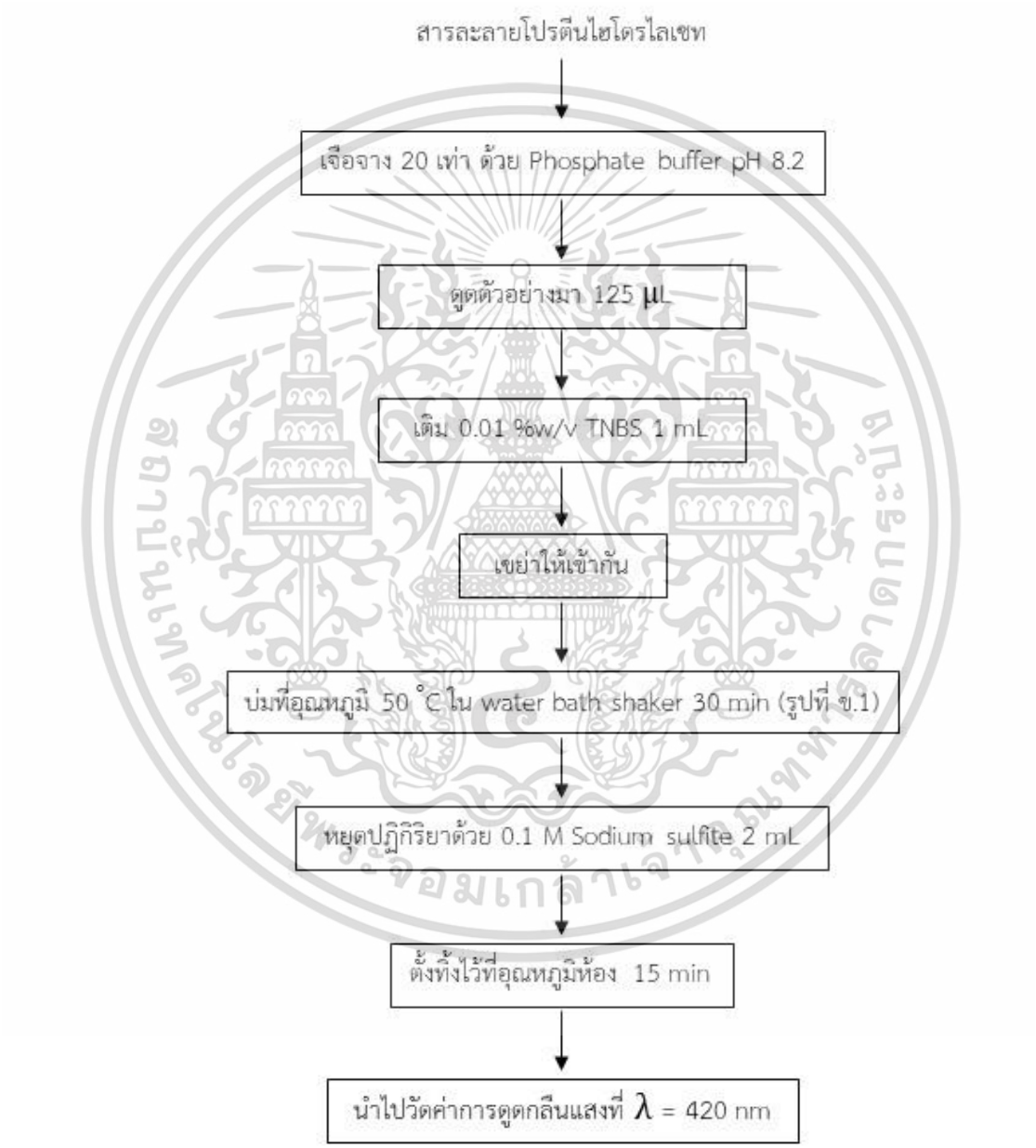
รูปที่ ก.7 โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

.

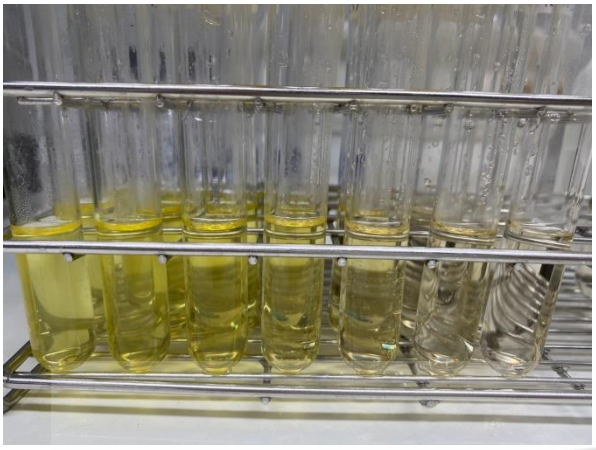
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
การวิเคราะห์ระดับการย่อย

ข.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก่อนบ่ม

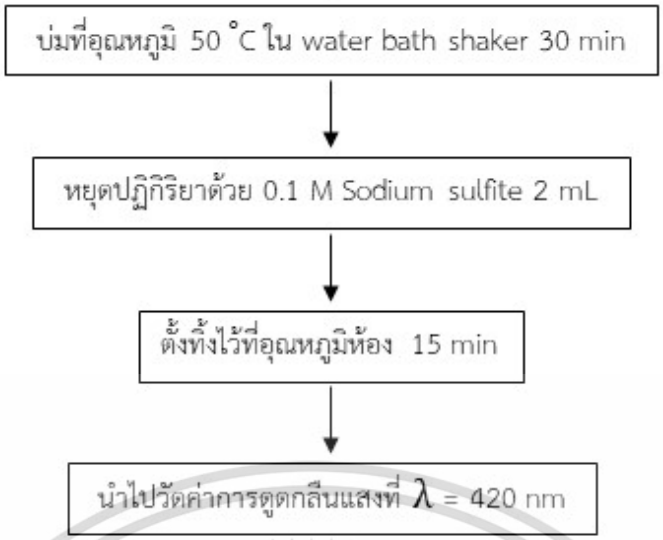
หลังบ่ม

รูปที่ ข.1 ตัวอย่างการวิเคราะห์ระดับการย่อยด้วยวิธี TNBS โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ข.2 วิเคราะห์ระดับการย่อยของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



การวิเคราะห์ระดับการย่อย ใช้วิธีการของ Nalinanon et al., (2011) โดยคำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \times 100$$

โดยที่ L_t = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท

L_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของ Blank

L_{max} = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์

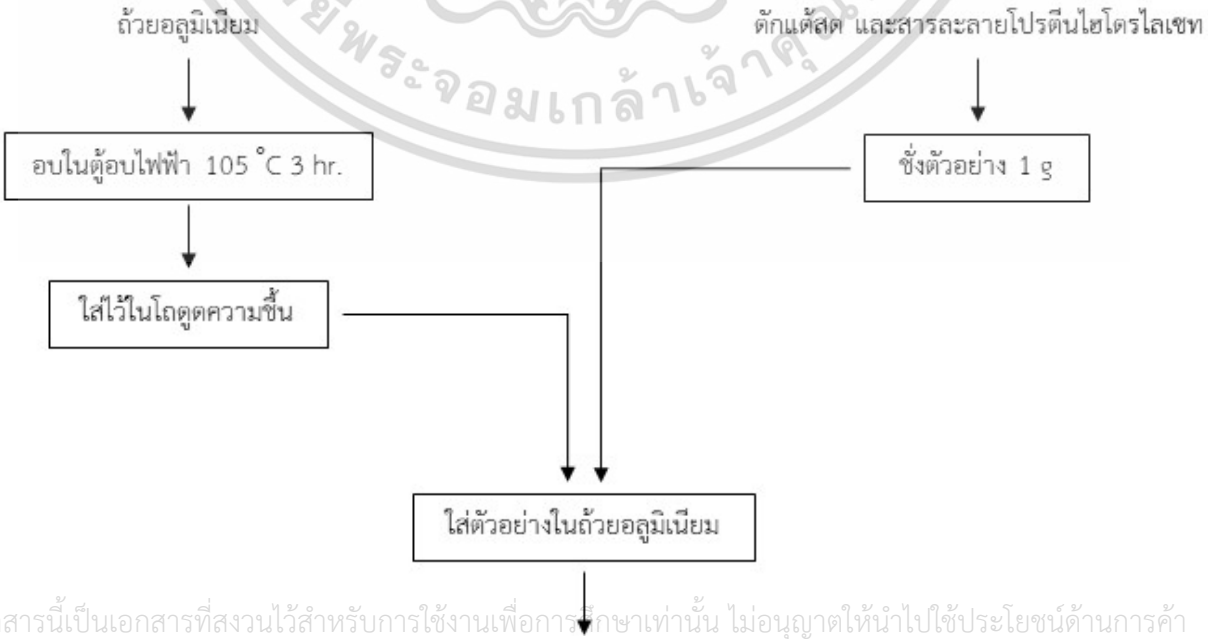
รูปที่ ข.2 ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์ โดยมีการเติมผงถ่านเล็กน้อยเพื่อให้สารละลายใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.
การวิเคราะห์ผลผลิต และองค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ค.1 การวิเคราะห์ค่าสี

ค.2 การวิเคราะห์หาความชื้น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

↓

อบในตู้อบไฟฟ้า 105 °C 5-6 hr.

↓

ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น (รูปที่ ค.1)

↓

บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน

รูปที่ ค.1 ตัวอย่างที่วิเคราะห์หาความชื้นอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส

ค.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี kjeldahl

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซท

↓

ชั่งตัวอย่าง 0.5 g ใส่บนกระดาษกรอง

↓

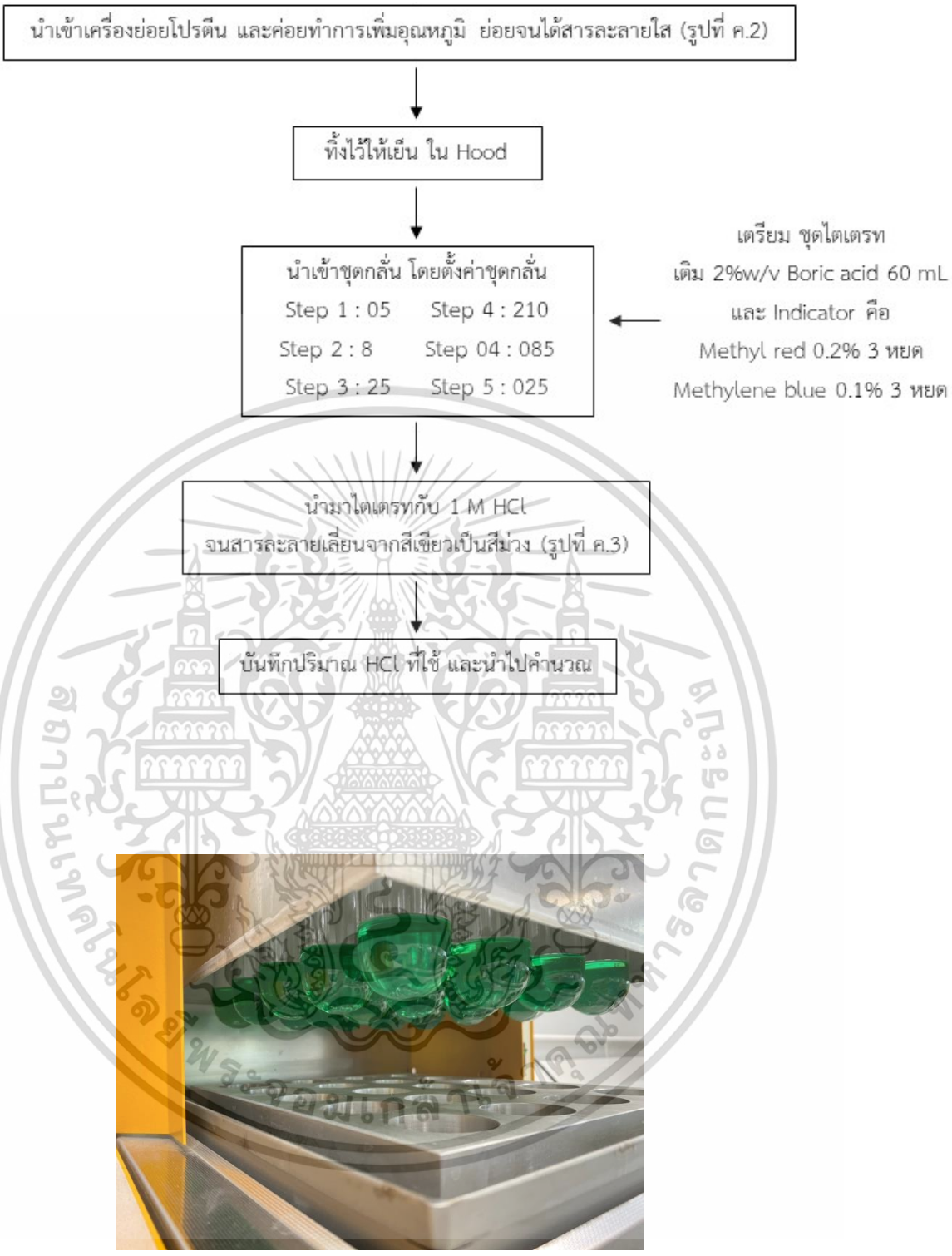
เตรียม catalyst
Copper II sulfate และ
Potassium sulfate
ในอัตราส่วน 1 : 10

→

นำตัวอย่างใส่หลอดย่อย
แล้วใส่ ลูกแก้วหลอดละ 3 ลูก
เติม catalyst 10 g
และ conc. Sulfuric Acid 25 mL

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



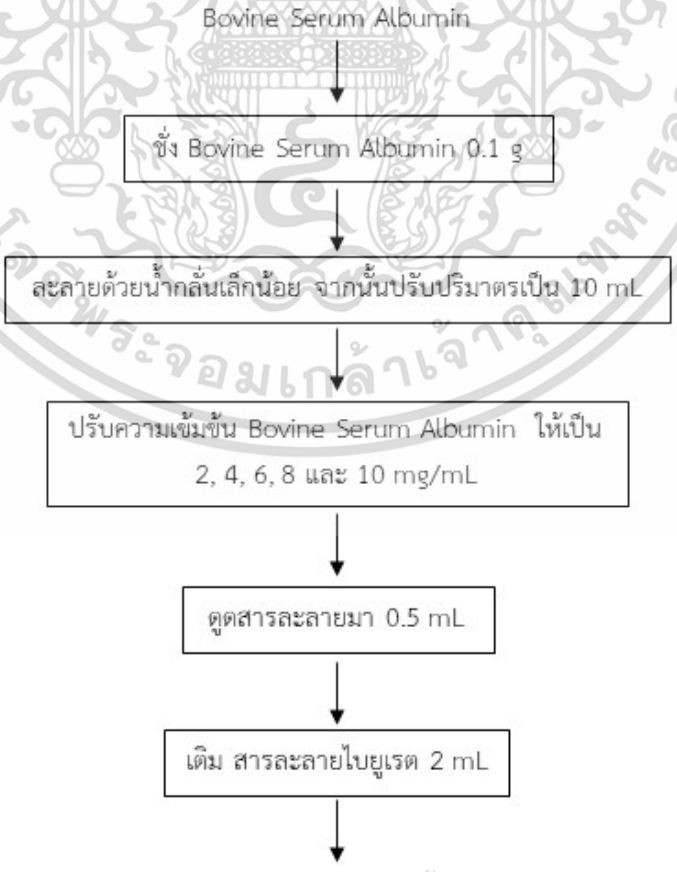
รูปที่ ค.2 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ซึ่งตัวอย่างผ่านการย่อยโปรตีนโดยสมบูรณ์ จนได้สารละลายใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ค.3 การไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วย 1M HCl สีของสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

ค.4 การวิเคราะห์หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซส ด้วย SDS – PAGE

1. การทำกราฟมาตรฐาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

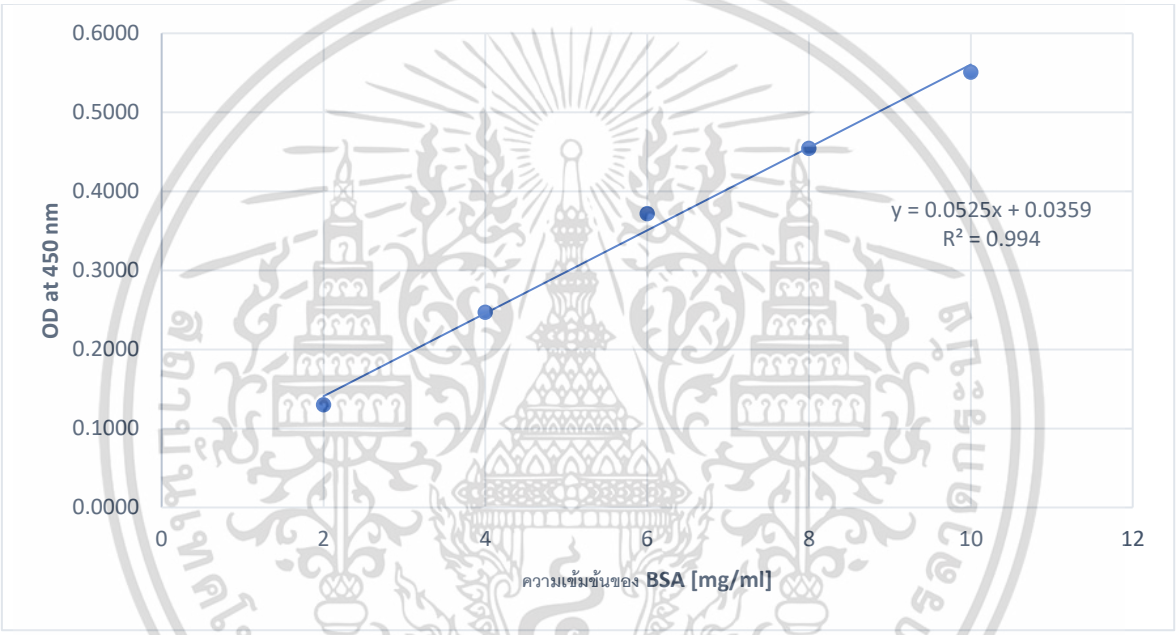
ตั้งทิ้งไว้ 30 min

↓

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ λ = 540 nm

↓

นำค่าที่ได้ไป plot กราฟด้วยโปรแกรม Excel
เพื่อหาค่าสมการ y = ax + b (รูปที่ ค.4)



รูปที่ ค. 4 กราฟมาตรฐาน

2. การเตรียมตัวอย่างก่อน run gel

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซท

↓

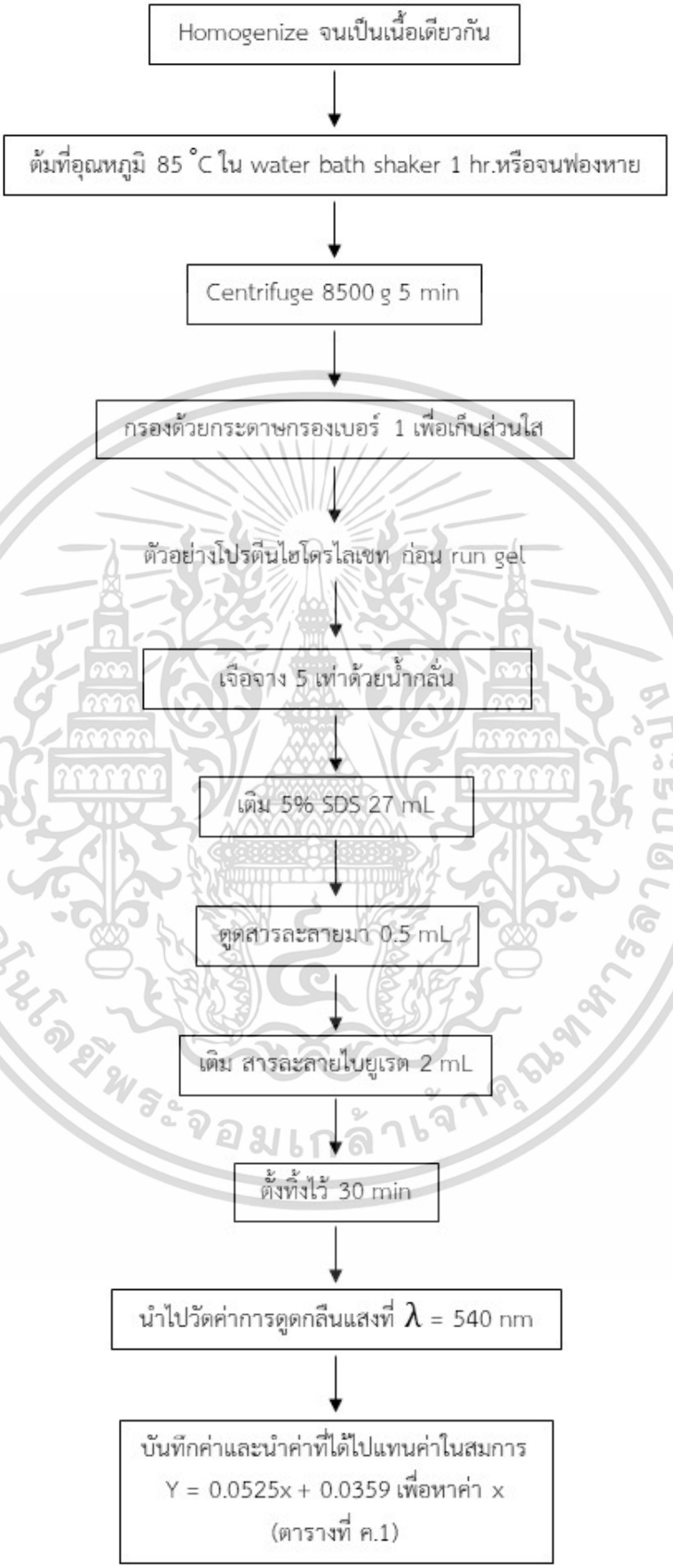
ชั่งผงโปรตีนไฮโดรไลเซท 3 g

↓

เติม 5% SDS 27 mL

↓

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 การคำนวณปริมาณโปรตีน

ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท	ระดับเจือจาง	ซ้ำที่	ค่าการดูดกลืนแสง	แทนค่าสมการหาค่า x	เฉลี่ย (mg/mL)
Control	5	1	0.237	3.83	3.84
		2	0.238	3.85	
		3	0.238	3.85	
0.5	5	1	0.404	7.01	6.90
		2	0.416	7.24	
		3	0.375	6.46	
1	5	1	0.383	6.61	6.31
		2	0.359	6.15	
		3	0.359	6.15	
1.5	5	1	0.381	6.57	6.95
		2	0.408	7.09	
		3	0.413	7.18	
2	5	1	0.393	6.80	6.73
		2	0.391	6.76	
		3	0.383	6.6	

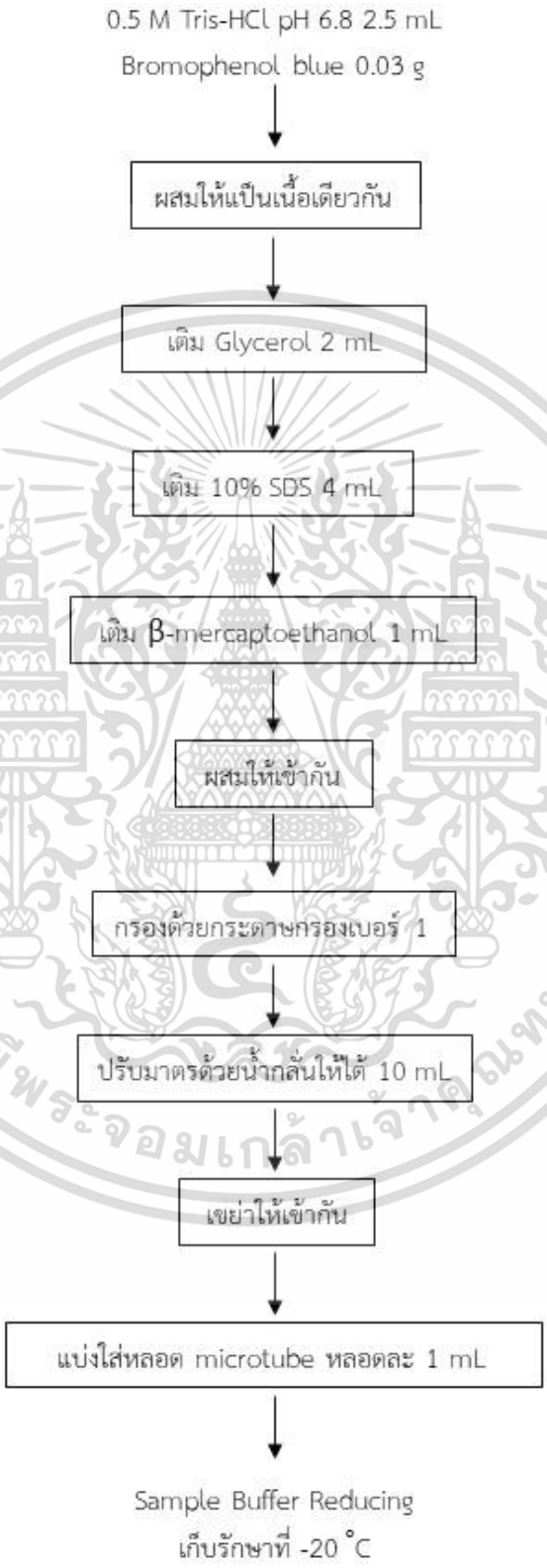
ตารางที่ ค.2 การปรับปริมาณโปรตีนให้ได้ 6 mg/mL

ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท	ปริมาณโปรตีน (mg/mL)	ปรับความเข้มข้น (mg/mL)	การเตรียม	
			ตัวอย่าง (µL)	น้ำกลั่น (µL)
Control	3.84	3	390.3	-
0.5	6.90	6	434.6	65.4
1	6.31	6	475.7	24.3
1.5	6.95	6	431.8	68.2
2	6.73	6	446.0	54.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

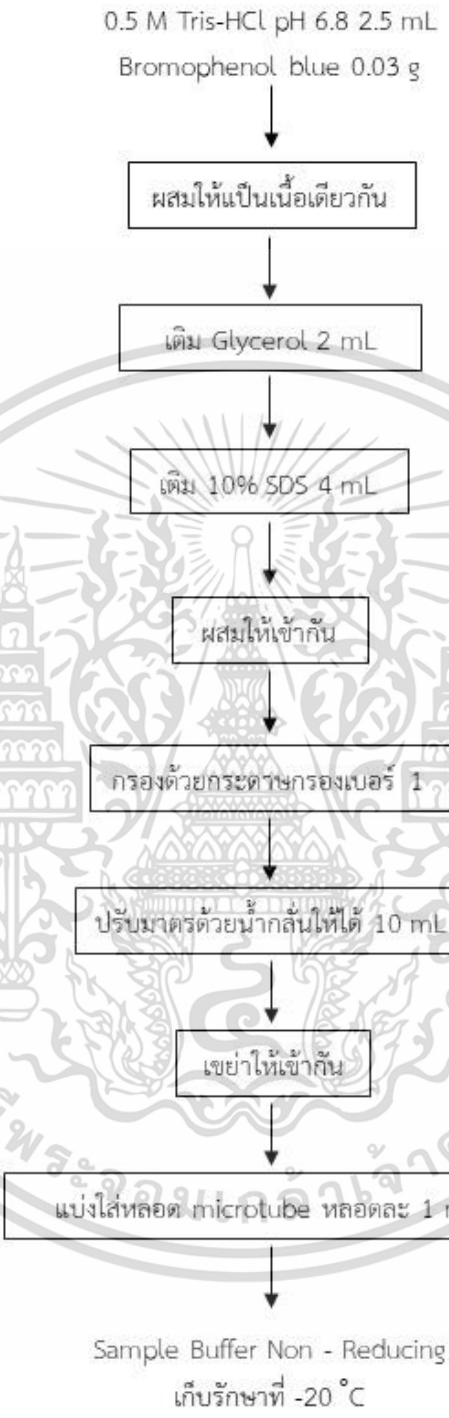
3. การเตรียม Sample buffer

3.1 Reducing buffer



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 Non-reducing buffer



จากนั้นทำการผสม ตัวอย่างที่ผ่านการปรับความเข้มข้นแล้วกับ Sample buffer สัดส่วน 1 : 1 เนื่องจากต้องการ ให้มีความเข้มข้น 3 µL/mL แสดงดังตารางที่ ค.3

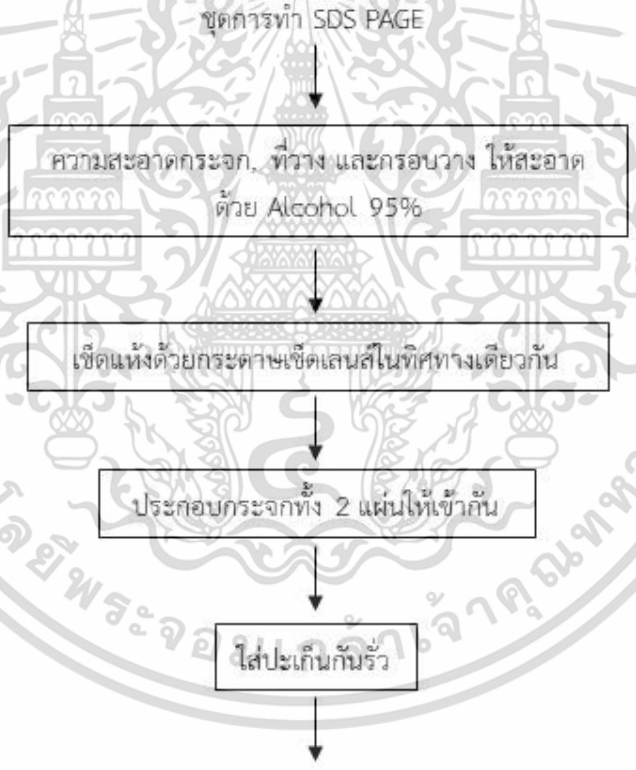
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.3 การผสม Sample buffer

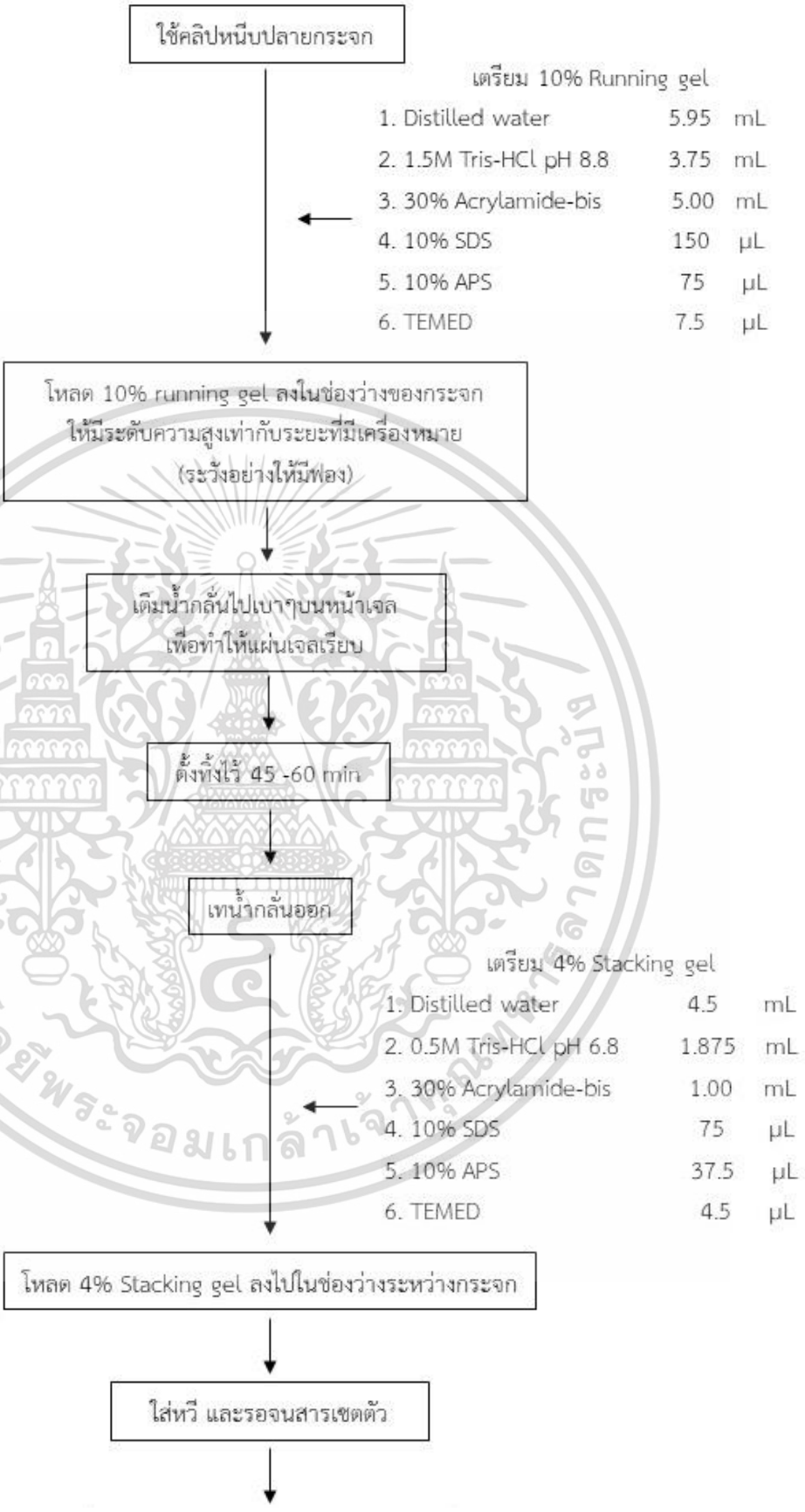
ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท	ตัวอย่างที่ผ่านการปรับความเข้มข้น (µL)	Sample buffer (µL)
Control	-	109.7
0.5	50	50
1	50	50
1.5	50	50
2	50	50

* หมายเหตุ ในกรณีที่ ตัวอย่างที่มีการปรับความเข้มข้นเป็น 3 mg/mL สามารถนำตัวอย่างมาผสมกับ Sample buffer ได้เลย

4. การ Run gel

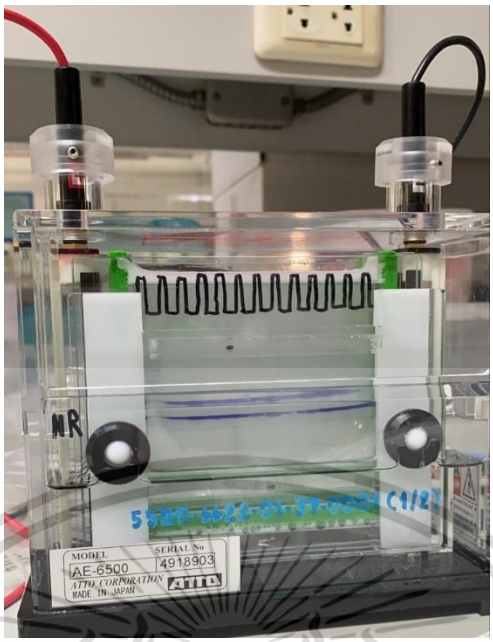


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

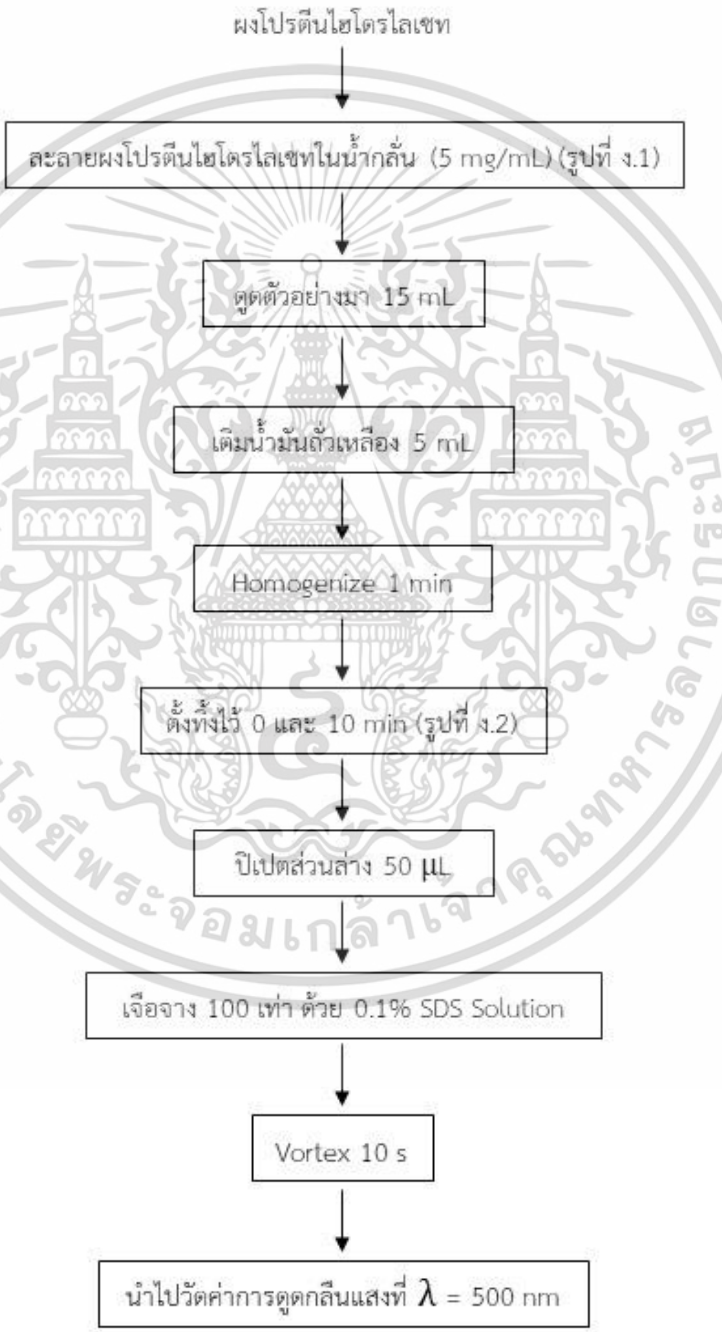


รูปที่ ค.5 ขั้นตอนการรันเจล SDS-PAGE หาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท

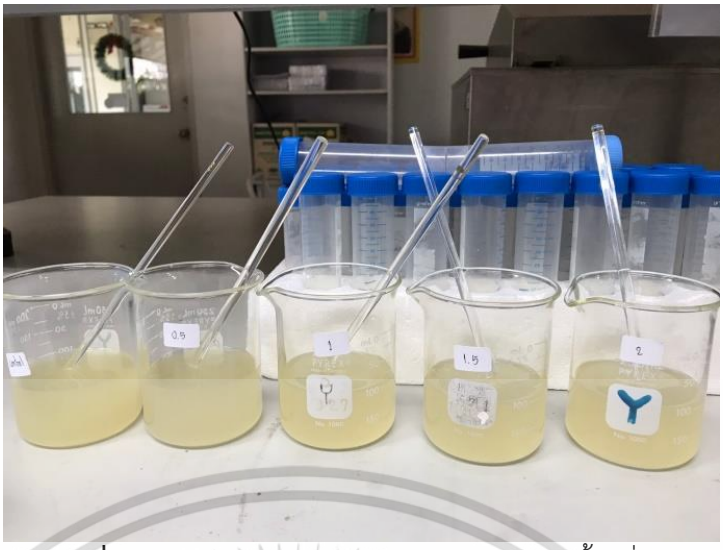
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
การวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

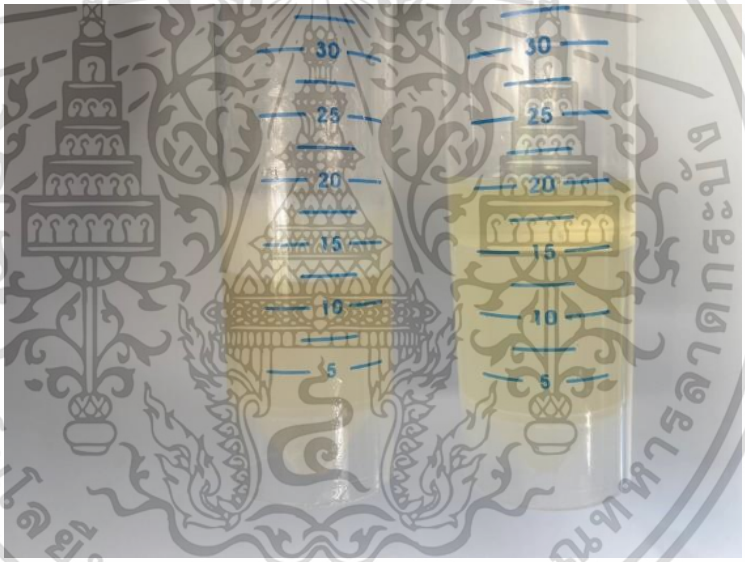
ง.1 ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



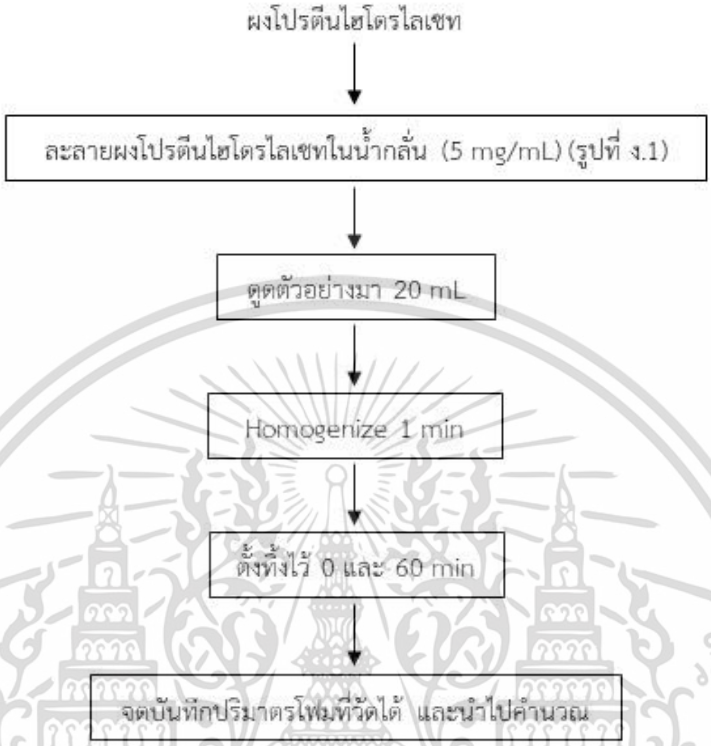
รูปที่ ง.1 การละลายผงโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยน้ำกลั่น



รูปที่ ง.2 การวิเคราะห์ดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying activity index) และ ดัชนีความเสถียรของอิมัลชั่น (Emulsion stability index)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการก่อโฟม (Foam capacity) และความเสถียรของโฟม (Foam stability)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ประภาพร ญาณปัญญา
วัน เดือน ปี เกิด	4 พฤศจิกายน 2540
ประวัติการศึกษา	- โรงเรียนจุฬาภรณราชวิทยาลัย พิษณุโลก - โรงเรียนราชวินิต บางแก้ว - วท.บ. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย	นักศึกษาฝึกงาน บริษัททุเรียนฟรีซดราย จำกัด
รางวัลที่เคยได้รับ	-

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว ปัณฑารีย์ ชุติมาธินกูล
วัน เดือน ปี เกิด	14 กันยายน 2540
ประวัติการศึกษา	- โรงเรียนนวมินทราชินูทิศ บดินทรเดชา - วท. บ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย	นักศึกษาฝึกงาน บริษัททุเรียนฟรีซดราย จำกัด
รางวัลที่เคยได้รับ	-

ชื่อ-นามสกุล	นางสาว อภิชญา เลิศกุลธรรม
วัน เดือน ปี เกิด	2 กรกฎาคม 2541
ประวัติการศึกษา	- โรงเรียนสวนกุหลาบวิทยาลัย ธนบุรี - วท. บ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ
ประสบการณ์การทำงานและผลงานวิจัย	นักศึกษาฝึกงาน บริษัท เพรซิเดนท์ เบเกอรี่ จำกัด(มหาชน)
รางวัลที่เคยได้รับ	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้