บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบแมงกะพรุน

แมงกะพรุนที่ใช้ในการทดลองนี้มีทั้งหมด 2 ชนิด คือ แมงกะพรุนหนัง (*Rhopilema hispidum*) แมงกะพรุนลอดช่อง (*Lobonema smithii*) จาก บริษัท มหาชัย ซีฟูดส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร

3.1.2 วัสดุ

3.1.2.1 กรดซิตริก (Citric Acid) บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด

3.1.2.2 คาราจีแนน (Carrageenan) บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด

3.1.2.3 โปตัสเซียมซิเตรท บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด

3.1.2.4 โซเดียมเบนโซเอท บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด

3.1.2.5 โพแทสเซียมซอร์เบท บริษัท รวมเคมี 1986 จำกัด

3.1.2.6 ไข่ไก่ ตราซีพี

3.1.2.7 น้ำตาล ตรามิตรผล

3.1.2.8 แป้งสาลี ตรากบ

3.1.2.9 เกลือ ตราปรุงทิพย์

3.1.2.10 น้ำส้มสายชู (Rice Vinegar)

3.1.2.11 ผงชาเขียว

3.1.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1.3.1 อุปกรณ์

ก) อุปกรณ์เครื่องครัว

ข) เครื่องแก้ว

ค) เทอร์โมมิเตอร์ 0-200 องศาเซลเซียส ยี่ห้อ Testo 826- T2 รุ่น 826-T2 ประเทศเยอรมัน

ง) เครื่องชั่งชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AG204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

จ) เครื่องชั่งชนิดหยาบ 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D Company, Ltd., รุ่น GX 400 ประเทศญี่ปุ่น

ฉ) โถดูดความชื้น (Dessicator)

ช) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

ซ) เครื่องปั่น ยี่ห้อ Panasonic รุ่น MX-795N ประเทศญี่ปุ่น

ฌ) Salometer ยี่ห้อ ATAGO ประเทศญี่ปุ่น

ญ) อุปกรณ์อื่น ๆ เช่น ตะแกรง กระดาษอะลูมิเนียม ถุงพลาสติก เป็นต้น

3.1.3.2 เครื่องมือ

ก) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน Bushi digestion Unit รุ่น K424 และ Bushi Distillation Unit รุ่น K350 ยี่ห้อ Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ข) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ชุดสกัดไขมัน Soxhlet Extraction

ค) เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Hot air oven) รุ่น G 01350 บริษัท Bluem ประเทศสหรัฐอเมริกา

ง) เครื่องวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (Muffle Furnance) รุ่น Eurotrm 91e ยี่ห้อ Scientific ประเทศอังกฤษ

จ) เครื่องวัด pH รุ่น 510 ยี่ห้อ Cyberscan ประเทศเนเธอร์แลนด์

ฉ) เครื่องวัดสี (Hunter Lab) Color Quest ประเทศสหรัฐอเมริกา

ช) เครื่องวัด Water Activity (a_w) CX-2 AQUA LAB ประเทศสหรัฐอเมริกา

ซ) ชุดระเหย (Evaporator) Rotavopor R-114, Vacuum Controller B-721 , Waterbath B-480 ยี่ห้อ Buchi ประเทศ สวิตเซอร์แลนด์

ฌ) เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย รุ่น B-191 ยี่ห้อ Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ญ) เครื่องวัดเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) รุ่น TA-XT2 ประเทศอังกฤษ

3.1.4 สารเคมี

3.1.4.1 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส

3.1.4.2 คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ยี่ห้อ Fisher Scientifie ประเทศอังกฤษ

3.1.4.3 โซเดียมซัลเฟต (Anhydrous Na_2SO_4) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.4.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.4.5 สารกันกระเด็น

3.1.4.6 กรดบอริค (Boric Acid) 4% ยี่ห้อ Fisher Scientifie ประเทศอังกฤษ

3.1.4.7 กรดไฮโดรคลอริก (HCl) 0.1 N ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส

3.1.4.8 อินดิเคเตอร์ผสม ประกอบด้วยเมทิลเรด 0.625 กรัม และเมทิลลีนบลู 0.480 กรัม ในเอทานอล 500 มิลลิลิตร

3.1.4.9 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยี่ห้อ Fisher Scientifie ประเทศอังกฤษ

3.1.4.10 กรดอะซิติก (Acetic Acid) 0.5% ยี่ห้อ ภูเขาทอง

3.1.4.11 มอลโตเด็กซตริน (Moltodextrin) บริษัท เครส ฟาร์มา จำกัด

3.1.4.12 แคลเซียมไบคาร์บอเนต ($NaCO_3$) ยี่ห้อ SP GOLD

3.1.4.13 เอทิลแอลกอฮอล์

3.1.4.14 ปิโตรเลียมอีเทอร์ ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส

3.1.4.15 สารดูดความชื้น

3.1.4.16 เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์

3.1.4.17 เฮกเซน (Hexane) ยี่ห้อ B&J

3.1.4.18 DPPH ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมันนี

3.1.4.19 TNBS ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมันนี

3.1.4.20 Ferrozine ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมันนี

3.1.4.21 Sodium Sulphite ยี่ห้อ PRS Panreac ประเทศสเปน

3.1.4.22 Ferrous Chloride ($FeCl_2$) ยี่ห้อ POCH

3.1.4.23 Potassium Ferricyanide ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมันนี

3.1.4.24 Trichloroacetic Acid ยี่ห้อ CARLO ERBA

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

3.1.5.1 Plate Count Agar (Standard Method Agar) HiMedia Laboratories Put.Ltd., ประเทศอินเดีย

3.1.5.2 Lauryl Tryptose Broth HiMedia Laboratories Put.Ltd., ประเทศอินเดีย

3.1.5.3 Maximun Recovery Diluent Difco (Difco Laboratories, 1995) ประเทศฝรั่งเศส

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การศึกษาวัตถุดิบกำจัดกลิ่นในวัตถุดิบแมงกะพรุน

นำวัตถุดิบแมงกะพรุนหนัง และแมงกะพรุนลอดช่องชนิดดองเกลือ ทั้งส่วนร่ม (Umbrella) และขา (Oral Arm) ล้างด้วยน้ำสะอาด และนำแต่ละส่วนมาแช่น้ำสะอาดทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อกำจัดเกลือ จากนั้นล้างน้ำให้สะอาดแช่น้ำ และใช้ Salometer ตรวจสอบปริมาณเกลือโดยอ่านค่าปริมาณเกลือต้องเท่ากับ 0 ^{o}Brix ผึ่งบนตะแกรงให้สะเด็ดน้ำ และบีบตัวอย่างจนไม่มีน้ำเหลืออยู่ นำมาหั่นเป็นชิ้น โดยมีขนาดความกว้าง 1 เซนติเมตรและยาว 3 เซนติเมตร (อิสรี, 2552) จากนั้นนำแมงกะพรุนไปตากแดดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำมาแช่น้ำส้มสายชู โดยใช้ความเข้มข้นน้ำส้มสายชู 5 % (Rice Vinegar) และชาเขียว 3% (Green Tea) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่าสี, TVB-N และ TMA เป็นการบ่งบอกความสด และกลิ่นคาวของแมงกะพรุน และค่าสี โดยคัดเลือกจากค่า TVB-N

ที่น้อยที่สุด และค่าสีที่ใกล้เคียงกับแมงกะพรุนดั้งเดิม เป็นแมงกะพรุนที่กำจัดกลิ่นที่ดีที่สุดไปศึกษาขั้นต่อไป

3.2.2 การศึกษากระบวนการเตรียมตัวอย่างแมงกะพรุน และสารสกัดแมงกะพรุนก่อนการอบแห้งแบบพ่นฝอย

นำแมงกะพรุนที่ได้จากการทดลองข้อ 3.2.1 โดยนำแมงกะพรุนหนังและลอดช่องมาทำการลวกในน้ำเดือดที่อัตราส่วนน้ำ 2,000 ml ต่อ เนื้อแมงกะพรุน 500 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นใช้อัตราส่วนของเนื้อแมงกะพรุนต่อน้ำเป็น 70:100 กรัมต่อมิลลิลิตร ปั่นส่วนผสมให้ละเอียด ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ (Erlenmyer Flask) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำมาปรับ pH ให้ได้ 6 ซึ่งเป็น pH ที่เหมาะสมในการทำงานของโบรมิเลน (พร้อมลักษณ์, 2540) ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2 N เติมเอนไซม์โบรมิเลน ที่0, 0.5, 1 และ 1.5% ต่อปริมาตรวัตถุดิบแมงกะพรุน นำไปเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 6,12 และ 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน วิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%Yield), ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble Protein), pH, อัตราการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis), ค่าสี, การวิเคราะห์ความสารมารถต้านอนุมูลอิสระ, ปริมาณกรดอะมิโน และปริมาณกรดไขมัน

3.2.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและมอลโตเด็กซตรินที่มีต่อโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนเข้มข้นด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอย

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 3.2.2 ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดก้นกลมและนำไประเหยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความดัน 180 มิลลิปาสคาล ความเร็วรอบในการหมุนที่ 20 รอบ ต่อนาที จากนั้นวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำให้ได้ 6 °Brix กรองด้วยผ้าขาวบาง แล้วแปรปริมาณมอลโตเด็กซตริน ที่ 2%, 4% และ6% ต่อน้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน และใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เป็นชุดควบคุม นำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย ที่อุณหภูมิ 120, 150 และ180 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่อัตราการป้อน 5 มิลลิลิตรต่อนาที ความดัน 4 บรรยากาศ อัตราเร็วหมุนเวียนอากาศในเครื่อง 90% ตรวจสอบลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนจากแมงกะพรุน วิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีกายภาพ จุลชีววิทยา ร้อยละผลผลิต ความสามารถในการละลาย คุณสมบัติโปรตีนละลายน้ำ SDS-PAGE การต้านอนุมูลอิสระ และอายุการเก็บรักษาของผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

3.2.4 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตเยลลี่คาราจีแนนผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

การเตรียมเยลลี่ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน โดยใช้ผงโปรตีนจากแมงกะพรุนที่ได้จาก 3.2.3 ใส่ในเยลลี่ที่ดัดแปลงมาจากสูตรการผลิตเยลลี่น้ำส้มแท้ของ ธนะ (2532) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 ทำการดัดแปลง ปริมาณผงโปรตีนจากแมงกะพรุน ที่ 0.2, 0.4 และ 0.6% โดยน้ำหนัก โดยชั่ง

ส่วนประกอบตามสูตรน้ำผลไม้ดังตารางที่ 3-2 ผสมคาราจีแนนกับน้ำตาลก่อนคนให้เข้ากัน ต้มน้ำเปล่าให้อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เติมลงในส่วนผสมคาราจีแนนกับน้ำตาล คนจนได้สารละลายใส เติมน้ำผลไม้ตามสูตรคนให้เข้ากัน ก่อนเติมกรดซิตริก, กรดซิเตรท โซเดียมเบนโซเอท, โพแทสเซียมซอร์เบท คนให้เข้ากัน หลังจากนั้น บรรจุเยลลี่ขณะร้อนลงภาชนะตั้งทิ้งไว้ให้เกิดเจลที่อุณหภูมิห้องจนเย็น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไป ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

3.2.5 การศึกษาสูตรที่เหมาะสมในการผลิตบะหมี่ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

การเตรียมบะหมี่ผสมโปรตีนเข้มข้นจากแมงกะพรุน โดยใช้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ได้จาก 3.2.3 ใส่ในบะหมี่ที่ดัดแปลงมาจากสูตรมาตรฐานในการผลิตบะหมี่ วิไล (2547) ดังแสดงในตารางที่ 3-3 ทำการเติมผงโปรตีนจากแมงกะพรุนที่ 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยน้ำหนักโดยชั่งแป้งสาลีผสมกับเกลือให้เข้ากัน และนำไข่ไก่ผสมกับผงโปรตีนจากแมงกะพรุนตามสูตรดังตารางที่ 3-4 ตีผสมให้แมงกะพรุนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดผสมกันและนวดเป็นเวลา 5-10 นาที และพักให้เกิดโดเป็นเวลา 15 นาที และนำไปรีดให้ได้แผ่นบาง จากนั้นนำไปตัดให้เป็นเส้น และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3-1 สูตรพื้นฐานดัดแปลงผลิตภัณฑ์เยลลี่คาราจีแนน

ส่วนผสม	ปริมาณ (%)
น้ำ	57.8
น้ำตาล	20.0
น้ำผลไม้	20.0
คาราจีแนน	1.4
โปตัสเซียมซิเตรท	0.3
กรดซิตริก	0.5

ที่มา : ธนะ (2532)

ตารางที่ 3-2 สูตรผลิตเยลลี่ผลไม้ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

ส่วนประกอบ (กรัม)	สูตร						
	1	2	3	4	5	6	7
น้ำเปล่า	57.8	57.8	57.8	57.8	57.8	57.8	57.8
น้ำผลไม้	20	20	20	20	20	20	20
น้ำตาล	20	20	20	20	20	20	20

ตารางที่ 3-2 (ต่อ)

ส่วนประกอบ (กรัม)	สูตร						
	1	2	3	4	5	6	7
แมงกะพรุน	0	0.2	0.4	0.6	0.2	0.4	0.6
คาราจีแนน	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
กรดซิตริก	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
กรดซิเตรท	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
ซอร์เบท	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
เบนโซเอท	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025

หมายเหตุ : สูตรที่ 2, 3 และ 4 ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุนหนังส่วนร่ม

สูตรที่ 5, 6 และ 7 ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุนลอดช่องส่วนร่ม

ตารางที่ 3-3 สูตรมาตรฐานในการผลิตบะหมี่

ส่วนผสม	ปริมาณ
แป้งสาลี	100 กรัม
เกลือ	1 กรัม
ไข่ไก่	20 กรัม

ที่มา : วิไล (2547)

ตารางที่ 3-4 สูตรผลิตบะหมี่ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

ส่วนประกอบ (กรัม)	สูตร						
	1	2	3	4	5	6	7
แป้งสาลี	100	100	100	100	100	100	100
ไข่ไก่	20	20	20	20	20	20	20
แมงกะพรุน	0	0.5	1.0	1.5	0.5	1.0	1.5
เกลือ	1	1	1	1	1	1	1

หมายเหตุ : สูตรที่ 2, 3 และ 4 ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุนหนังส่วนร่ม

สูตรที่ 5, 6 และ 7 ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุนลอดช่องส่วนร่ม

3.2.6 การวิเคราะห์

3.2.6.1 การวิเคราะห์ TVB-N (Total Volatile Basic Nitrogen)

การวิเคราะห์ TVB-N ดัดแปลงจาก Malle and Tao (1987) โดยชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 10 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่เครื่องบดมูลิเน็กซ์ เติมสารละลายกรด 7.5% TCA

(Trichloroacetic Acid) จำนวน 20 ml ปั่นเป็นเวลา 1-2 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นแยกด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 ปิเปตส่วนที่ผ่านการกรองจำนวน 10 ml ใส่ในหลอด Kjeldahl และเติมน้ำกลั่น 50 ml เติม 10% NaOH จำนวน 5 ml เพื่อให้เป็นด่าง เตรียมขวดรูปชมพู่ขนาด 150 ml ใส่กรดบอริคจำนวน 15 ml และเติมอินดิเคเตอร์ ผสม 2-3 หยด กลั่นเป็นเวลา 4 นาที จนได้ปริมาณ 50-70 ml นำมาไตเตรตด้วย 0.05 N HCl ทำปฏิกิริยาพอดีกับ 0.7 mg ของไนโตรเจน

$$\text{ปริมาณความเข้มข้น TVB (mg Nitrogen/ 100 g)} = \frac{N_{HCl} \times V_{HCl} \times 14 \times 100}{10}$$

3.2.6.2 การวิเคราะห์ TMA (Trimethylamine)

การวิเคราะห์ TMA ดัดแปลงจาก Malle and Tao (1987) ชั่งตัวอย่างอาหารจำนวน 10 กรัม ตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วใส่เครื่องบดมูลิเน็กซ์ เติมสารละลายกรด 7.5% TCA (Trichloroacetic Acid) จำนวน 20 ml ปั่นเป็นเวลา 1-2 นาที นำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นแยกด้วยเครื่องเซนตริฟิวส์ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และกรองด้วยกระดาษกรอง whatman No.1 ปิเปตส่วนที่ผ่านการกรองจำนวน 10 ml ใส่ในหลอด Kjeldahl และเติมน้ำกลั่น 50 ml เติม 10% NaOH จำนวน 5 ml เพื่อให้เป็นด่าง แล้วเติม 35% Formaldehyde จำนวน 10 ml เตรียมขวดรูปชมพู่ขนาด 150 ml ใส่กรดบอริคจำนวน 15 ml และเติมอินดิเคเตอร์ผสม 2-3 หยด กลั่นเป็นเวลา 4 นาที จนได้ปริมาณ 50-70 ml นำมาไตเตรตด้วย 0.05 N HCl ทำปฏิกิริยาพอดีกับ 0.7 mg ของไนโตรเจน

$$\text{ปริมาณความเข้มข้น TMA (mg Nitrogen/ 100 g)} = \frac{N_{HCl} \times V_{HCl} \times 14 \times 100}{10}$$

3.2.6.3 การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%Yield)

นำโปรตีนไฮโดรไลเซท 100 ml มากรองด้วยตะแกรง และวัดปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สามารถผ่านกรองได้ คำนวณตามสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{ปริมาณ hydrolysate หลังกรอง (มิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณ hydrolysate เริ่มต้น (100 มิลลิลิตร)}} \times 100$$

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble Protein)

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยวิธี Lowry, et al. (1951) โดยเตรียมสารละลาย ดังนี้

สารละลาย A : 2 % (w/v) Na_2CO_3 ใน 0.1N NaOH

สารละลาย B : 1 % (w/v) NaK Tartrate ในน้ำกลั่น

สารละลาย C : 0.5 % (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น

สารละลาย D : ผสมสารละลาย A, B และ C ในอัตราส่วน 48 : 1 : 1 ml ตามลำดับ

สารละลาย Folin : Folin Reagent ผสมน้ำกลั่น อัตราส่วน 1 : 1 ml

สารละลายมาตรฐาน ใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2 ml ของสารละลาย D ผสมให้เข้ากันโดยเว้นระยะห่าง 60 วินาทีในแต่ละตัวอย่าง และจากนั้นตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลาย Folin ผสมให้เข้ากัน และทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ผงโปรตีนจากแมงกะพรุน เจือจางโดยใช้ผงโปรตีน ต่อน้ำเท่ากับ 1 : 10 (w/v) จากนั้นนำไปเซนตริฟิวก์ที่ ความเร็ว 1000 rmp อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที และนำส่วนใส วิเคราะห์เช่นกันกับโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน

3.2.6.5 การวิเคราะห์ pH

การวัด pH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน ด้วยเครื่องวัด pH รุ่น 510 ยี่ห้อ Cyberscan ที่อุณหภูมิห้อง

3.2.6.6 การวิเคราะห์อัตราการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis)

การวัดอัตราการย่อยในผงโปรตีนไฮโดรไลเซท (Protein Hydrolysate) วิเคราะห์ตามวิธีของ (Benjakul and Morrissey, 1997) เริ่มจากใช้ตัวอย่างแมงกะพรุนไฮโดรไลเซทปริมาณ 125 ไมโครลิตร มาผสมกับ 2 มิลลิลิตร ของ 0.2125 M Phosphate Buffer pH 8.2 จากนั้นผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 0.01% TNBS จากนั้นผสมสารตัวอย่างให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่ 50°C เป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.2 มิลลิลิตร ของ 0.1 M sodium sulfite ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที และตรวจสอบด้วยความยาวคลื่นที่ 420 nm โดย Degree of Hydrolysis คำนวณได้จากสูตรของ (Benjakul and Morrissey, 1997) ดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysate} = [(L_t - L_0)/(L_{max} - L_0)] \times 100$$

โดย L_t คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm ที่เวลาใดๆ ของตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์

L_0 คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm ของตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์

L_{max} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm ของตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์สูงสุด (นำตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มา 500 µl มาผสมกับ 4.5 ml ของ 6 N HCl จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่

100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 แล้วนำส่วนใสมาปรับให้เป็นกลางด้วย 6 N NaOH ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว)

3.2.6.7 การวิเคราะห์สี

การวิเคราะห์สีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนปริมาตร 25 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Hunter lab ทำการวัดในระบบ CIE L* a* b* โดยทำการวัด 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง ดังภาคผนวก ข

3.2.6.8 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระ

ก) วิธี DPPH Radical Scavenging Activity

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Activity ดัดแปลงจากวิธีของ Thiansilakul et al. (2007) โดยเจือจางตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.15 mM DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรที่ละลายในเอทานอล 95% ผสมตัวอย่างอย่างรวดเร็ว จากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด วัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm และคำนวณดังสูตร

$$\text{Radical-scavenging activity} = ((B-A)/B) \times 100$$

A คือ ตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

B คือ Blank ที่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

ข) การต้านอนุมูลอิสระ Reducing Power

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Reducing Power ดัดแปลงจากวิธีของThiansilakul et al. (2007) โดยเจือจางตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ที่ถูกผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 0.2 M Phosphate Buffer pH 6.6 จากนั้นผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 1% Potassium Ferricyanide ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของ 10% Tricholroacetic Acid หลังจากนั้นดูดส่วนใสของสารผสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร และผสมกับ 1 มิลลิลิตร ของน้ำกลั่นผสม 200 ไมโครลิตร ของ 0.1% $FeCl_3$ และวัดความยาวคลื่นที่ 700 nm โดยการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นแสดงถึงการเป็น Reducing Power ที่เพิ่มมากขึ้น

$$\% \text{ Reducing power} = ((A-B)/B) \times 100$$

A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ทุกช่วงเวลา

B คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm ของตัวอย่างที่ไม่ใช้เอนไซม์ เวลา 0 hr

3.2.6.9 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

ตัวอย่างแมงกะพรุนไฮโดรไลเซท 50 mg ของแมงกะพรุนที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยโบรมิเลน และแมงกะพรุนที่ผ่านการย่อยด้วยโบรมิเลน เติม 5 ml ของ 6N HCL ที่อุณหภูมิ

110 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่องให้ความร้อน (Model SBH 130D, Stuart Scientific, Manchester, UK) จากนั้นนำตัวอย่างไปทำเข้มข้นจากนั้นชะด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำไปเติมน้ำกลั่น 5 ml และกรองด้วยเครื่องกรองเซลลูโลส 0.45 μm (VertiPure™ CA Syringe Filter, Vertical Chromatography Co., Ltd. Bangkok, Thailand) และกรดอะมิโนถูกตรวจสอบโดยวิธี Yan, et al., (2007) โดยนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (RP-HPLC Model 1200, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) และตรวจสอบด้วย ELSD (Model 3300, Alltech®, Deerfield, IL, USA) และใช้กรดอะมิโน 19 ชนิด เป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน

3.2.6.10 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

ปริมาณกรดไขมันของแมงกะพรุนไฮโดรไลเซทตรวจสอบใช้AOAC (2005) ปริมาณกรดไขมันถูกตรวจสอบด้วยเครื่อง GC (GC-6890, Agilent Technologies, Inc. Palo Alto, CA, USA) ที่ตรวจสอบไอออนด้วยการเผา ซึ่งเป็นการฉีดตัวอย่างแบบอัตโนมัติ โดยตัวอย่าง 1 μl ถูกฉีดลงในคอลัมน์ (Supelco SP 2650, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA.) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา โดยคอลัมน์แรกมีอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และตั้งอุณหภูมิสุดท้ายที่ 230 องศาเซลเซียส โดยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสต่อนาที โดย 37 กรดไขมัน (FAME-Mix C4-24 Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. USA.) ถูกใช้เป็นกรดไขมันมาตรฐาน และกราฟที่ได้แสดงปริมาณกรดไขมันเป็น % ไขมันทั้งหมด

3.2.6.11 การวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี

วิเคราะห์ผงโปรตีนจากแมงกะพรุน ดังนี้ ปริมาณความชื้น (AOAC, 1995) ปริมาณไขมัน (AOAC, 1995) ปริมาณโปรตีน (AOAC, 1995) ปริมาณเถ้า (AOAC, 1995) และค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) ดังภาคผนวก ก

3.2.6.12 การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

นำตัวอย่างผงผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย เยลลี่ และบะหมี่ ตัวอย่างละ 1 กรัม มาใส่ลงในหลอดทดลองที่มี MRD (Maximum Recovery Diluent) 9 มิลลิลิตร ทำเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้น 10^{-1},10^{-2},10^{-3} ตามลำดับ เพื่อตรวจวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โคลิฟอร์ม (Coliform) และ *E.coli* (BAM, 1992) *Staphylococus aureus* และจำนวนยีสต์และรา (BAM, 1992) ดังภาคผนวก ค

3.2.6.13 การวิเคราะห์ร้อยละผลผลิตผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

นำโปรตีนไฮโดรไลเซท 100 ml มาอบแห้งแบบพ่นฝอย และเก็บตัวอย่างผงโปรตีนจากแมงกะพรุนมาชั่งน้ำหนัก และคำนวณดังสูตร

$$\% \text{ yield} = \frac{W2}{W1} \times 100$$

W1 คือ น้ำหนักของโปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนอบแห้งแบบพ่นฝอย

W2 คือ น้ำหนักของผงโปรตีนจากแมงกะพรุนหลังอบแห้งแบบพ่นฝอย

3.2.6.14 การวิเคราะห์ความสามารถในการละลาย

การวัดความสามารถในการละลาย ดัดแปลงจากวิธีของ Al-Kahtani, et al. (1900) โดยชั่งตัวอย่างแมงกะพรุนผงด้วยน้ำหนักที่แน่นอน 10 g ละลายในน้ำกลั่น pH 7 ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ ขนาด 500 มิลลิลิตร กวนของผสมทั้งหมดด้วย Magnetic Stirrer ที่ระดับความเร็ว 5 วัดเวลา (วินาที) ที่ทำให้แมงกะพรุนผงละลายจนสมบูรณ์

3.2.6.15 การวิเคราะห์มวลโมเลกุล

การวิเคราะห์มวลโมเลกุลของผงโปรตีนจากแมงกะพรุนด้วยวิธี SDS-PAGE ที่ความเข้มข้น 20% Gel โดยใช้แถบโปรตีนมาตรฐานขนาด 250-10 KDa เปรียบเทียบ ใช้ตัวอย่างผงโปรตีนจากแมงกะพรุนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไปวิเคราะห์ มีวิธีดังภาคผนวก จ

3.2.6.16 การวิเคราะห์อายุการเก็บรักษา

นำตัวอย่างผงโปรตีนจากแมงกะพรุน เก็บรักษาเป็นเวลา 3 เดือน และนำไปวิเคราะห์ทุก ๆ เดือน โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณความชื้น และค่า a_w

นำตัวอย่างบะหมี่ เก็บรักษาเป็นเวลา 16 วัน และนำไปวิเคราะห์ทุก ๆ 4 วัน โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณความชื้น และค่า a_w

นำตัวอย่างเยลลี่ เก็บรักษาเป็นเวลา 2 เดือน และนำไปวิเคราะห์ทุก ๆ เดือน โดยวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ ปริมาณความชื้น และค่า a_w

3.2.6.17 การวิเคราะห์ทางประสาทสัมผัสของเยลลี่คาราจีแนนผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน และบะหมี่ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยวิธีให้คะแนนความชอบ 5-point Hedonic Scale โดยให้คะแนน (1=ชอบน้อยที่สุด, 2=ชอบน้อย, 3= ชอบปานกลาง, 4= ชอบมาก และ 5=ชอบมากที่สุด) ให้คุณลักษณะความชอบรวม ลักษณะเนื้อสัมผัสด้านความแข็ง ความยืดหยุ่น กลิ่น และสี โดยใช้ผู้ทดสอบ 30 คน

ในการทดสอบกับเยลลี่ ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน และคัดเลือกเยลลี่ที่ผู้บริโภคให้คะแนนสูงสุดไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ค่าสี และอายุการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 2 เดือน โดยวิเคราะห์ทุกเดือน

ในบะหมี่ผสมผงโปรตีนจากแมงกะพรุน และคัดเลือกบะหมี่ที่ผู้บริโภคให้คะแนนสูงสุดไปวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และจุลชีววิทยา ค่าสี และอายุการเก็บรักษา 16 วัน โดยวิเคราะห์ทุก 4 วัน

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลทั้งหมดทั้งหมดจะถูกแสดง เป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการสุ่มตรวจวิเคราะห์ 3 ครั้ง โดยวางแผลการทดลองแบบ วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance, ANOVA) และความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติแบบ Dancan's New Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน และผลิตภัณฑ์อาหารที่ผสมโปรตีนไฮโดรไลเซทเจากแมงกะพรุน โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ SPSS Version 11.5 (2002)