



วิทยานิพนธ์

การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือ
กระบวนการผลิตเนื้อไก่

APPLICATION OF MEMBRANE TECHNOLOGY FOR
PRODUCTION OF PROTEIN HYDROLYSATE FROM
CHICKEN PROCESSING BY-PRODUCT

นางสาวมนฤทัย ศรีทองเกิด

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. 2551



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือกระบวนการผลิตเนื้อไก่

Application of Membrane Technology for Production of Protein Hydrolysate from Chicken Processing By-product

นามผู้วิจัย นางสาวนฤทัย ศรีทองเกิด

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุกุล วัฒนสุข, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธนะบุญ สัจจานันตกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 26 เดือน พ.ค. พ.ศ. 2551

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือกระบวนการผลิตเนื้อไก่

Application of Membrane Technology for Production of Protein Hydrolysate from Chicken
Processing By-product

โดย

นางสาวมนฤทัย ศรีทองเกิด

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการอาหาร)

พ.ศ. 2551

มนฤทัย ศรีทองเกิด 2551: การใช้แมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือ
กระบวนการผลิตเนื้อไก่ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรกรอาหาร) สาขา
วิทยาศาสตรกรอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ประธานกรรมการที่ปรึกษา:
ผู้ช่วยศาสตราจารย์อนุกูล วัฒนสุข, Ph.D. 101 หน้า

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงไก่ด้วยเอนไซม์ เริ่มจากการสกัดน้ำซุปลกัดจากโครงไก่ โดยศึกษาอัตราส่วนการใช้โครงไก่บดต่อสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก 5 ระดับอัตราส่วนคือ 0.3:1, 0.5:1, 1:1, 2:1 และ 3:1 โดยน้ำหนัก ใช้อุณหภูมิในการสกัด 120°C และใช้เวลาในการสกัด 120 นาที พบว่าอัตราส่วนของโครงไก่ต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 ให้ปริมาณโปรตีนในน้ำซุปลกัดสูงที่สุดคือร้อยละ 8.24 และนำอัตราส่วนที่ได้มาศึกษาเวลาและอุณหภูมิในการสกัด โดยศึกษาเวลา 3 ระดับคือ 60, 90 และ 120 นาที อุณหภูมิ 2 ระดับคือ 110 และ 120°C พบว่าสภาวะที่เหมาะสมยังคงเป็นการสกัดที่อุณหภูมิ 120°C เวลา 120 นาที ให้ปริมาณโปรตีนในน้ำซุปลกัดสูงที่สุด

นำน้ำซุสสกัดมาบดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์ 3 ระดับคือ ร้อยละ 0.05, 0.15 และ 0.30 ของปริมาณโปรตีน ระยะเวลาในการบดสลาย 4 ระดับคือ 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยใช้อุณหภูมิในการบดสลาย 60°C และค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.5 พบว่าสถานะที่เหมาะสมซึ่งให้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.30 ของปริมาณโปรตีน เวลาในการบด 120 นาที มีค่าระดับการบดสลาย (Degree of hydrolysis) ร้อยละ 54 และให้โปรตีนร้อยละ 7.5 จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเซทไปกรองให้บริสุทธิ์ด้วยไมโครฟิลเตรชันแบบเบรนเพื่อแยกของแข็ง คอลลอยด์ ไขมัน สิ่งสกปรกต่างๆ รวมถึงโปรตีนโมเลกุลใหญ่เพื่อให้ได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วยโปรตีนโมเลกุลเล็ก เพปไทด์และกรดอะมิโน โดยกรองด้วยเมมเบรนขนาด 50 กิโลดาลตัน จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ พบกรดอะมิโนที่จำเป็น 10 ชนิดได้แก่ อาร์จีนีน 18.77, ฮีสทิดีน 63.36, ไอโซลิวซีน 94.8, ลิวซีน 225.13, ไลซีน 561.15, เมไทโอนีน 62.26, ฟีนอลอะลานีน 206.9, ทรีโอนีน 23.2, ทริฟโตเฟน 7.1 และ วาลีน 80.27 mg/100g

จากงานวิจัยนี้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ น่าจะนำไปใช้เป็นตัวเสริมสร้างร่างกาย เพราะประกอบด้วยโปรตีนโมเลกุลเล็ก เปปไทด์ และกรดอะมิโนที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย และไขมันต่ำ ซึ่งควรจะถูกดูดซึมสู่ร่างกายได้อย่างรวดเร็ว จึงเหมาะสำหรับผู้ป่วยในระยะพักฟื้นหรือผู้ที่ใส่ใจในสุขภาพ

Monruthai Srithongkerd 2008: Application of Membrane Technology for Production of Protein Hydrolysate from Chicken Processing By-product. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Assistant Professor Anukul Watthanasuk, Ph.D. 101 pages.

To study the optimised condition for production protein hydrolysate from chicken bones. The experiment was carried out using Alcalase enzyme to hydrolyze the long-chain protein from chicken bones soup. First, experiment is to study the chicken bone and 0.01% w/w salt solution ratio to obtain the high protein content in chicken soup. The ratio was varied from 0.3:1, 0.5:1, 1:1, 2:1 and 3:1 based on the ratio between chicken bones and water by weight. It was found that ratio of 2:1 produced the maximum protein content of 8.24%. The next experiment is to study time and temperature for the protein extraction. The studying parameters were time in range of 30 to 120 minutes and with temperature at 110°C and 120°C. It found that extraction at 120 minutes and 120°C obtained the highest protein content in chicken soup.

To produce protein solution, the Alcalase enzyme was applied at three level of enzyme 0.05, 0.15 and 0.30% of protein. The experiment was controlling hydrolysis time of 30, 60, 90 and 120 minutes, temperature of 60°C and pH 8.5. The highest protein content in chicken soup was found at 0.3% enzyme and digest time at 120 minutes. The final hydrolysate composed of peptide proteins and amino acid. The hydrolysate solution was filtered by microfiltration membrane sizing 50 KDa. Impurities such as solid particle, colloid and the long chain of protein were filtrated from the enzyme hydrolysed solution. The chemical composition of protein hydrolysate after filtered composed of amino acids, as Arginine 18.77 mg/100g, Histidine 63.36, Isoleucine 94.8, Leucine 225.13, Lysine 561.15, Methionine 62.26, Phenylalanine 206.9, Threonine 23.2, Tryptophane 7.1 and Valine 80.27 mg/100g. The proximate composition has 0.04% fat, 9.90% protein, 1.12% ash, 89.15% moisture, 0% carbohydrate.

From this research, the protein hydrolysate may use as a nutrient food for recovery patient. Since this solution contained amino acids and short-chain proteins with low lipid content, it may be absorbed at a high rate in the intestine absorption system.

Monruthai Srithongkerd

Student's signature

Watthanasuk A.

Thesis Advisor's signature

23 / May / 2008

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุกุล วัฒนสุข ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู กรรมการที่ปรึกษาวิชาเอก ดร.ประมุข กระจุกสุขสถิตย์ กรรมการที่ปรึกษาวิชารอง ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำข้อคิดเห็นและช่วยแก้ไขปัญหาต่างๆ ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ตลอดจนถึงการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ และอาจารย์ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ ตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์นี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิตที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเงินทุนสนับสนุนการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ ขอขอบพระคุณบริษัท อีสเอเชียติก (ประเทศไทย) จำกัด ที่อนุเคราะห์เอ็นไอเอ็มที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ และขอบพระคุณสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารที่ให้ความช่วยเหลือในด้านสถานที่ทำการทดลอง

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมนึก คุณแม่นฤมล ศรีทองเกิด พี่ชาย คุณสุภกิจ ศรีทองเกิด ที่ให้การสนับสนุนด้านกำลังใจทรัพย์และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด ขอขอบคุณ พี่ น้อง และเพื่อนๆ ร่วมสถานศึกษาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษานี้เป็นอย่างดี

มนฤทัย ศรีทองเกิด

พฤษภาคม 2551

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	32
อุปกรณ์	32
วิธีการ	33
ผลและวิจารณ์	39
ผล	39
วิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	67
สรุป	67
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	77

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	องค์ประกอบทางเคมีของโครงไก่กระตังและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้ว	5
2	ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ผลิตโดยใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่แตกต่างกัน	21
3	จำนวนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตลดส่วนเพิ่มในปี พ.ศ.2539-2546	27
4	ส่วนแบ่งการตลาดของซูปไก่สกัดตั้งแต่ปี พ.ศ.2545-2547	28
5	ปริมาณโปรตีน ระดับการย่อยสลาย และความยาวสายเพปไทด์ ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	49
6	ค่าสีและความขุ่นของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นแล้วย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนและหลังการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	60
7	ความเข้มข้นของกลีโคเจนจากไก่ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต	61
8	องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	62
9	องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนและการระเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator	62
10	ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนและระเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ซูปไก่สกัดที่จำหน่ายในท้องตลาด	63
11	ปริมาณกรดอะมิโนที่พบในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ปฏิกิริยาเคมีที่อาจเกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส	8
2	กระบวนการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตโดยใช้เอนไซม์	10
3	โครงไก่ที่ผ่านการคั้หนังและไขมันออกแล้วจากโรงงานชำแหละไก่	40
4	โครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต	40
5	โครงไก่บดผสมน้ำที่บรรจุในขวดแก้วก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันสูง	43
6	โครงไก่บดที่ผ่านการสกัดด้วยความร้อนสูงในหม้อนึ่งความดัน	44
7	น้ำสกัดจากโครงไก่บดที่นำไปลดอุณหภูมิเพื่อแยกไขมันและโปรตีน	44
8	ปริมาณของโปรตีนในน้ำสกัดจากโครงไก่ที่ความดันสูงอุณหภูมิ 120°C เวลา 120 นาที ด้วยอัตราส่วนโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือที่ใช้ในการสกัดต่างๆ กัน	45
9	ปริมาณของโปรตีนในน้ำสกัดจากโครงไก่ที่ความดันสูง สกัดที่อุณหภูมิ 110 และ 120°C เวลา 120 นาที 60, 90 และ 120 นาที โดยใช้อัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1	46
10	ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส	48
11	ระดับการย่อยสลายในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์	50
12	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 16	54
13	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการทดลอง ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 18	55
14	ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนขนาดรูพรุน 50 กิโลดาลตัน	58
15	สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตก่อนกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	58
16	สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตหลังจากกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	59
17	โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่ผ่านการระเหยด้วย Vacuum Evaporator	59

การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือกระบวนการผลิตเนื้อไก่

Application of Membrane Technology for Production of Protein Hydrolysate from Chicken Processing By-product

คำนำ

ในอุตสาหกรรมการส่งออกไก่สดแช่แข็งและผลิตภัณฑ์จากไก่ ไคโรงไก่นับว่าเป็นผลพลอยได้ (By-product) ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและขายได้ในราคาที่ค่อนข้างต่ำ การนำไปใช้ในการผลิตอาหารสัตว์หรือทำปุ๋ยนั้นปริมาณความต้องการยังมีค่อนข้างจำกัด อีกทั้งไม่ค่อยมีการนำไปผลิตเป็นอาหารสำเร็จรูปเนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกระดูกจึงมีปริมาณเนื้อค่อนข้างน้อยจากการศึกษาถึงปริมาณองค์ประกอบในไคโรงไก พบว่าเมื่อนำไปแยกเอาเศษเนื้อออกจะได้ปริมาณเศษเนื้อที่บริโภคได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งเศษเนื้อนี้มีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสูงถึงร้อยละ 20.5 (Kijowski, 1994) อีกทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตไก่จะมีไคโรงไก่มากถึง 220 กิโลกรัมต่อตันไก่ และถ้าเราสามารถนำโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเศษกระดูกจากไคโรงไกมาใช้ให้เกิดประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารก็จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับไคโรงไก

การผลิตน้ำสกัดโปรตีนเข้มข้น (broth) ในรูปแบบของเครื่องคั้นเพื่อสุขภาพ ปัจจุบันมีขายในรูปแบบของซูปไก่สกัด ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาสูง เนื่องจากความเชื่อในเรื่องของการเป็นอาหารเสริมสุขภาพและบำรุงร่างกาย บำรุงสมองและลดความอ่อนเพลีย ทำให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดี จึงเป็นที่สนใจต่อผู้บริโภคที่มีความใส่ใจในสุขภาพ แนวทางหนึ่งในการนำไคโรงไกมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในทางอุตสาหกรรมคือ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน องค์ประกอบของโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วจะประกอบด้วยกรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีนโมเลกุลเล็ก การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตในระดับอุตสาหกรรมมี 3 วิธี คือ การย่อยสลายด้วยกรด เบส และเอนไซม์ (สุปราณี, 2539 และ รุ่งอรุณ, 2545) การใช้กรดหรือเบสในการย่อยสลายโปรตีนนั้นต้องทำภายใต้สภาวะที่รุนแรง คือ ใช้ความเข้มข้นของกรดหรือเบสสูง อุณหภูมิสูง เวลานาน ทำให้เกิดการกัดกร่อนของเครื่องมือ ในขณะที่การย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีข้อได้เปรียบว่าเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง จึงใช้ในปริมาณน้อย ย่อยสลายภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง อุณหภูมิและความดันปกติ จึงไม่เกิดปัญหาการกัดกร่อนเครื่องมือ อีกทั้ง

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ทำให้กรดอะมิโนถูกทำลายอีกด้วย การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่โดยใช้เอนไซม์ครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปใช้เพื่อผลิตเป็นเครื่องคัมบำรุงสุขภาพในรูปแบบของซูปไก่สกัด จึงมีการนำวัตถุดิบไปสกัดน้ำซูปด้วยความดันสูงและนำน้ำซูปสกัดที่ได้มาผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) 2.4L ซึ่งมีรายงานการใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ดี (สุปราณี, 2539; รุ่งอรุณ, 2545; Mohr, 1980; Yu and Tan, 1992; Shahidi *et al*, 1995; Hoyle and Merrit, 1994)

จากการศึกษาการใช้เอนไซม์เบรนาเทคโนโลยี พบว่า ไมโครฟิลเตรชันเอนไซม์เบรนาสามารถใช้ในการกรองเพื่อแยกสิ่งสกปรก ไขมัน คอลลอยด์ รวมทั้งโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ออกจากสารละลายได้ ทำให้สารละลายมีความบริสุทธิ์สูงขึ้น มีความใสมากขึ้น กลิ่นรสดีขึ้น อีกทั้งยังสามารถทราบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ผ่านการกรอง ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงนำเอนไซม์เบรนาเทคโนโลยีมาใช้เพื่อเพิ่มคุณภาพให้กับผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่ทำให้สารละลายใส และมีสารประกอบที่มีขนาดโมเลกุลเล็กเพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมได้ง่ายกว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์อื่น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยหม้อนึ่งความดัน
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยเอนไซม์
3. ศึกษาการกรองสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตให้บริสุทธิ์ด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน
4. ศึกษาคุณภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นในด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

การตรวจเอกสาร

อุตสาหกรรมการส่งออกไก่เนื้อของไทยนับเป็นอุตสาหกรรมหลักที่สร้างรายได้ให้กับประเทศเป็นอย่างมาก ในแต่ละปีมีมูลค่าการส่งออกที่สูงขึ้น ในบรรดาเนื้อสัตว์ที่เป็นอาหารของประชากรโลก เนื้อไก่มักเป็นอาหารหลักของคนทั่วไปไม่ว่าจะเป็นคนเมือง หรือชนบท เป็นส่วนที่ใช้เลี้ยงทารก การนำไปปรุงเป็นอาหารเด็ก ผู้ใหญ่ และผู้สูงอายุ เพราะเหตุผลว่าเนื้อไก่เป็นผลผลิตที่มีปริมาณค่อนข้างสูง ราคาถูกกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้นจึงพบเนื้อไก่ในส่วนหนึ่งในเมนูของอาหารเสมอ ปัจจุบันอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่เนื้อในประเทศไทยได้เจริญรุดหน้าเทียบเท่าอารยประเทศที่มีการผลิตที่ได้มาตรฐาน อีกทั้งยังมีโรงเชือดไก่ที่ได้มาตรฐานสากล ดังนั้นอุตสาหกรรมการส่งออกไก่สดแช่เยือกแข็งและไก่ถนอมกระดุกจึงทำรายได้ให้กับประเทศเป็นจำนวนมาก โดยตลาดที่สำคัญของประเทศไทยคือ ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ และกลุ่มประเทศยุโรป

วัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตไก่เกิดขึ้นได้ในหลายขั้นตอนของกระบวนการแปรรูป ในขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งคือขั้นตอนการคัดแต่งซึ่งจะได้ของเหลือคือโครงไก่ และน้ำล้างซาก ในส่วนของโครงไก่นั้นมีมากถึง 220 กิโลกรัมต่อตันไก่ ซึ่งในอุตสาหกรรมไก่ของประเทศไทยมีการผลิตไก่ในช่วง 6 เดือนแรกของปี 2549 รวมทั้งสิ้น 122,307 ตัน ซึ่งก็จะทำให้มีโครงไก่ซึ่งเป็นของเหลือประมาณ 26,907 ตัน การนำโครงไก่มาใช้ประโยชน์ในปัจจุบันมีแค่การนำมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ และจำหน่ายในราคาถูกเพื่อให้ผู้บริโภคนำไปใช้เพื่อคั้นน้ำซุป หากพิจารณาจากองค์ประกอบของโครงกระดูกไก่จะพบว่าประกอบด้วยโปรตีนค่อนข้างสูงถึง 20% และมีปริมาณคอลลาเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่มีประโยชน์และกำลังเป็นที่ต้องการซึ่งมีปริมาณสูงถึง 35.5% ของปริมาณโปรตีนในโครงกระดูกไก่ Kijowski (1994) และยังมีกรดอะมิโนครบทุกชนิด การนำโครงไก่ไปใช้ประโยชน์ในปัจจุบันนี้ยังมีไม่มากนัก เมื่อเทียบกับปริมาณของโครงไก่ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมในแต่ละวัน อีกทั้งคุณค่าทางอาหารจากโครงไก่ก็มีมาก จึงมีความน่าสนใจในการศึกษาการผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่ ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบอีกด้วย โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ศึกษากันในปัจจุบันจะพบการนำวัสดุเศษเหลือจากสัตว์น้ำ เช่น ปลาชนิดต่างๆ มาผลิตเพื่อใช้เป็นสารเพิ่มความคงตัว อิมัลซิไฟเออร์ (รุ่งอรุณ, 2545) หรือผลิตสารให้กลิ่นรส เช่น ซอส (สุภาวดี, 2542) ซุปไก่สกัดเป็นรูปแบบหนึ่งของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซต ใช้ดื่มบำรุงร่างกาย ปัจจุบันในท้องตลาดมีราคาค่อนข้างสูงและกลิ่นรสยังไม่ค่อยเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

1. โครงกระดูกไก่

1.1 องค์ประกอบของโครงกระดูกไก่

โครงกระดูกไก่ที่ได้หลังจากแยกส่วนที่เป็นเนื้อไปแล้วยังมีองค์ประกอบทางเคมีที่เป็นประโยชน์อยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง โครงกระดูกดังกล่าวโดยทั่วไปแล้วมีความชื้นร้อยละ 63.4 โปรตีนทั้งหมดร้อยละ 20 ไขมันร้อยละ 10.1 เถ้าร้อยละ 6.6 และรงควัตถุร้อยละ 0.19 องค์ประกอบทางเคมีของโครงกระดูกไก่ที่ได้จากการตัดแต่งไก่กระທงและไก่ที่หมดไข่แล้วดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของโครงไก่กระທงและแม่ไก่ที่หมดไข่แล้ว

องค์ประกอบทางเคมี	โครงกระดูกไก่ (ร้อยละ)	
	ไก่กระທง	แม่ไก่
ความชื้น	63.4	63.9
โปรตีนทั้งหมด	20.0	20.9
คอเลสเตอรอล (ร้อยละของปริมาณโปรตีน)	35.5	40.2
ไขมัน	10.1	7.8
เถ้า	6.6	7.2
Heme pigments	0.19	0.22

ที่มา: Kijowski (1994)

จากข้อมูลในตารางที่ 1 พบว่าโครงไก่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง ซึ่งสามารถนำโปรตีนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ โดยเฉพาะใช้เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากจะเป็นการนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์แล้ว ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารด้วย การนำโครงไก่ดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์นั้น การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่น่าสนใจ

2. โปรตีนไฮโดรไลเซต

โปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นของผสมของเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อสัตว์หรือเศษเหลือด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์โปรติเอส วิธีการผลิตทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยสารเคมี และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โปรตีนไฮโดรไลเซตเริ่มมีการผลิตเพื่อทำการค้าตั้งแต่ปี 1990 โดยมีประเทศจีนและประเทศญี่ปุ่นเป็นผู้ริเริ่มการผลิต โดยวัตถุดิบที่ใช้ผลิตได้แก่ กลูเตนข้าวสาลี เคซีน (casein) แป้งปลา (fish flour) เจลาติน (gelatin) ยีสต์ และกลูเตนข้าวโพด เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร กลิ่นรสที่ได้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้น

โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีการผลิตกันอย่างแพร่หลายได้แก่โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลา ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้าร้อยละ 6-7 (Mackie, 1982)

นอกจากนี้ Hall and Ahmad (1992) ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลามีองค์ประกอบของกรดอะมิโนซึ่งมีบทบาทในการให้กลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีเปปไทด์ขนาดเล็ก ซึ่งมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณปลายสาย และเป็นสาเหตุของการเกิดรสขม ซึ่งรสขมที่ได้จะแตกต่างกันตามแหล่งของโปรตีนและชนิดของเอนไซม์ กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเปปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่อกรดอะมิโนอยู่ในรูปอิสระ

จึงมีการศึกษาการกำจัดรสขมออกไป โดย Chakradarti (1983) ได้ทดลองใช้เอทานอลกำจัดสารเปปไทด์ที่ให้รสขมออกไปจาก โปรตีนไฮโดรไลเซตปลาที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลน พบว่า ส่วนที่กำจัดรสขมออกไปแล้วมีโปรติเอส (protease) มาก และแอลฟา-อะมิโนไนโตรเจนน้อย

3. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยทั่วไปสามารถผลิตได้ 2 วิธี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยสารเคมี และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

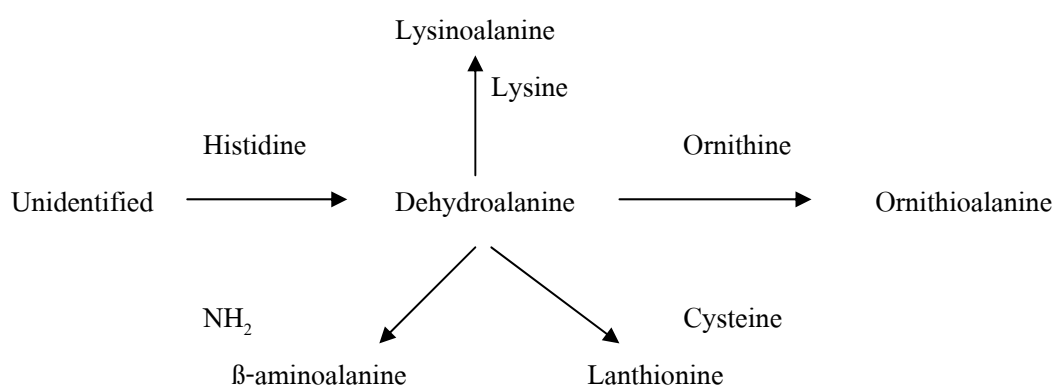
3.1 การย่อยสลายด้วยสารเคมี

คือ การย่อยสลายด้วยสารละลายกรดและเบส ซึ่งการย่อยสลายด้วยสารเคมีเป็นวิธีที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่ก็มีข้อจำกัดมากในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีการที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ (รุ่งอรุณ, 2545)

3.1.1 การย่อยสลายด้วยกรด เช่นการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดโดยใช้วัตถุติดผสมกับกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล ทิ้งให้ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 9-12 ชั่วโมง โปรตีนจะเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน กำจัดส่วนของฮิวมิน (humins) ซึ่งเป็นส่วนผสมของไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophane) ออกไป ส่วนที่เหลือนอกเหนือจากโปรตีน ทำให้เป็นกลางและนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอยหรือใช้กรดซัลฟูริกเข้มข้น 6-7 โมลาร์ ย่อยสลายโปรตีนที่อุณหภูมิ $100-120^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Peterson, 1974) ในประเทศสวีเดนจะใช้ส่วนผสมของกรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก pH 2.0 ทำการย่อยสลายโปรตีนแล้วไม่จำเป็นต้องทำให้เป็นกลางก่อนใช้สำหรับปลาที่มีไขมันน้อยจะทำการบด ผสมกับกรด ย่อยและเก็บรักษา แต่ถ้าปลาที่มีไขมันสูงต้องกำจัดไขมันออกก่อนการย่อยสลาย (Wignall and Tattersson, 1976) การย่อยสลายด้วยกรดนั้นพันธุ์เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติกอยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าพันธุ์เพปไทด์อื่นๆ ประมาณ 100 เท่า (Shih, 1992) วิธีการนี้จะทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟน ซีรีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซิสทีอีน และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย และยังทำให้กรดอะมิโนแอสปาราจีน และกลูตามีน ถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนแอสปาร์ติกและกลูตามิก (รุ่งอรุณ, 2545)

3.1.2 การย่อยสลายด้วยเบส เช่นการย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสจะเร็วกว่าการย่อยสลายด้วยสารละลายกรด (Shih, 1992) ถ้าหากทำการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสมีความรุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (racemization) ของกรดอะมิโนขึ้นดังภาพที่ 1 โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกรดอะมิโนจากรูปแบบแอล (L-form) เป็นรูปแบบดี (D-form) ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และยังทำให้เกิดปฏิกิริยาบีต้า-อีลิมีเนชัน (β -elimination) ของกรดอะมิโนซีรีนและซิสทีน เป็นผลให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) ขึ้น ซึ่งสารนี้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ซิสทีอีนและไลซีน เป็นต้น ทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิด เช่น แลนทิโอนีน (lanthionine) ไลซิโนอะลานีน (lysinoalanine) เกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญและเกิดสารพิษขึ้น (Howell, 1996) Opiacha *et al.* (1991) ศึกษากรรมวิธีการทำแห้งที่มีความสามารถในการย่อยของโปรตีนที่สกัดจากเศษกระดูกไก่โดยได้นำกระดูกไก่แช่ในสารละลายเบสที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 10 ที่อุณหภูมิ 10°C แยกส่วนของแข็งออกแล้ว

ปรับค่าความเป็นกรดเบสเป็น 6.8-7.0 นำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) ภายใต้แรงดันสูญญากาศ 0.5 มิลลิเมตรปรอท อีกส่วนหนึ่งทำแห้งแบบพ่นฝอย ใช้อัตราการป้อนอาหารเท่ากับ 30 มิลลิเมตรต่อนาที ลมร้อนเข้ามีอุณหภูมิ 175°C ลมร้อนออกมีอุณหภูมิ 85°C เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยได้ (digestibility) พบว่าโปรตีนสกัดจากกระดูกไก่ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีความสามารถในการย่อยได้สูงกว่าโปรตีนสกัดที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-dryer) โดยมีค่าเป็นร้อยละ 87.30 และ 84.60 ตามลำดับ



ภาพที่ 1 ปฏิกิริยาเคมีที่อาจเกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบส

ที่มา: Kristinsson and Rasco (2000 b)

3.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

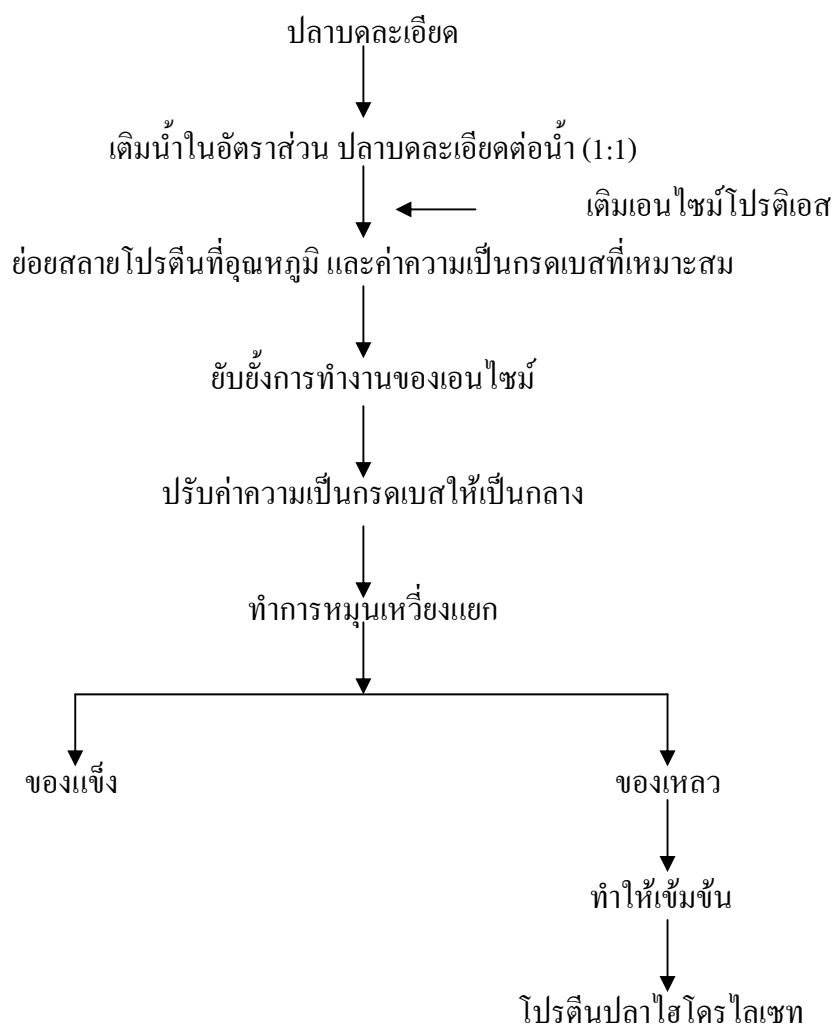
เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดและให้ปริมาณเปปไทด์สูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ค่าความเป็นกรดเบส ความคงทนต่อความร้อน มีความจำเพาะต่อตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งจึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ได้ตามความเหมาะสม ข้อเสียคือโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้อาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับ ส่วนประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเซตได้แก่ ของแข็งทั้งหมดร้อยละ 97 ซึ่งเป็นถัาร้อยละ 45 (รวมโซเดียมคลอไรด์) และของแข็งอินทรีย์ร้อยละ 50 ซึ่งจำแนกเป็นไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 7.0 โมโนโซเดียมกลูตาเมตร้อยละ 19.8 แอมโมเนียมคลอไรด์ร้อยละ 3.5 (โดยน้ำหนักแห้ง) และมีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.2 (Perterson, 1974)

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส เป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์ โดยเอนไซม์โปรติเอส ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์คือเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งโดยปกติแล้วสามารถสลายย่อยโปรตีนจากเนื้อสัตว์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในของสัตว์ เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และคาเทปซิน เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายดังกล่าวนี้เป็นวิธีการที่ซับซ้อนเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์และโครงกระดูมีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการเกิดการย่อยสลายของโปรตีนและใช้เวลาการย่อยสลายที่ยาวนาน ซึ่งผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จึงประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระ

ในปัจจุบันนี้การย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นกำลังได้รับความสนใจมาก เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้ได้ผลผลิตเปปไทด์ในปริมาณสูง และเอนไซม์โปรติเอสจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ความเป็นกรดเบส ความคงทนต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง อีกทั้งสภาวะการย่อยสลายก็ไม่รุนแรง สามารถควบคุมการย่อยสลายได้โดยเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์ และสภาวะการย่อยสลายให้เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ (รุ่งอรุณ, 2545)

เมื่อเปรียบเทียบโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยสารเคมีและเอนไซม์โปรติเอสจะพบว่า การย่อยสลายด้วยเอนไซมนั้นสามารถคัดสรรขอบเขตการย่อยสลายและขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ (Adler-Nissen, 1986) ในขณะที่การย่อยสลายด้วยสารเคมีนั้นไม่สามารถระบุถึงการแตกตัวของเปปไทด์และขนาดของเปปไทด์ แต่อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อาจมีรสขม ทำให้เกิดปัญหาในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Yu and Tan (1992) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์อัลคาเลสโดยใช้ปลา *Oreochromis mossambica* ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 2 ของน้ำหนักปลา ย่อยสลายนาน 150 นาที พบว่าได้โปรตีนไฮโดรไลเซตปลาที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด ซึ่งกรรมวิธีการผลิตดังกล่าวที่



ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตโดยใช้เอนไซม์
ที่มา: Yu and Tan (1992)

Quaglari and Orban (1987) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาซาร์ดีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของน้ำหนักปลาได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ดี สามารถใช้แทนโซเดียมเคซิเนทในผลิตภัณฑ์ได้

สุปราณี (2539) ผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตจากวัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.075 (โดยน้ำหนัก) ย่อยสลายนาน 150 นาที พบว่าสามารถใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในผลิตภัณฑ์ได้

นอกจากนี้ จิรศานต์ (2539) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากหัวปลาโอแถบย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง ใช้เวลาในการย่อย 240 นาที มีปริมาณผลผลิตสูงที่สุด มีความสามารถในการละลาย การเกิดฟอง และการเกิดอิมัลชันที่ดี

4. วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้นๆ และโปรตีนที่มีขนาดเล็กเกล็ดลงซึ่งสามารถทำได้โดยการใช้กรด เบส หรือเอนไซม์โปรติเอส ในการตัดพันธะเพปไทด์ของโปรตีนให้เป็นพันธะเอไมด์ (amide) ระหว่างหมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโน ซึ่งถือเป็นพันธะที่สำคัญที่เป็นตัวเชื่อมให้กรดอะมิโนมาประกอบกันเป็นสายของโปรตีนซึ่งโดยในธรรมชาติจะจับกันเป็นสายขนาบร้อยโมเลกุล โดยทั่วไปแล้ววัตถุดิบที่นำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตจะใช้พืชหรือสัตว์ที่เป็นแหล่งของโปรตีน เช่น โปรตีนจากเนื้อสัตว์ หมู ไก่ ปลา หรือเวย์โปรตีนในน้ำนม โปรตีนจากธัญพืช เช่น ถั่วเหลือง เป็นต้น

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยใช้เอนไซม์ สิ่งสำคัญคือการเลือกแหล่งของโปรตีนและเอนไซม์ที่จะนำมาใช้ในการผลิต ซึ่งจะต้องพิจารณาจากคุณสมบัติดังต่อไปนี้ คือ คุณค่าทางโภชนาการ ราคา ரசชาติ และสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซต วัตถุดิบหรือแหล่งโปรตีนที่ใช้ส่วนใหญ่ ได้แก่ เคซีน เวย์โปรตีน และโปรตีนจากถั่วเหลือง นอกจากนี้อาจจะใช้เจลาติน เนื้อปลา และอัลบูมิน เป็นแหล่งวัตถุดิบก็ได้ แต่จากเหตุผลทางด้านเศรษฐกิจ คุณค่าทางโภชนาการ และความเหมาะสมในเชิงปฏิบัติ การใช้เคซีน เวย์โปรตีน และโปรตีนจากถั่วเหลืองจะคุ้มค่ามากกว่า หรือหากจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบมากขึ้นก็ควรจะมีการนำวัตถุดิบที่เป็นผลพลอย

ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมเช่น โรงงานชำแหละตกแต่งเนื้อสัตว์ หรือโรงงานผลิตเครื่องดื่มจาก ัญญาพืชมมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบก็จะเป็นการใช้วัตถุดิบทางการเกษตรให้เกิดประโยชน์สูงสุด

สุภาวดี (2542) ใช้หัวปลาทูน่าพันธุ์โอแถบซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตปลาทูน่า กระป๋อง ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 57.33 ไขมันร้อยละ 24.46 และเถ้าร้อยละ 18.07 โดยนำหนัก แห้งมาใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยนำวัตถุดิบมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ระดับการย่อยสลายเท่ากับ 58 มีกรดอะมิโนที่เหมาะสม และมีรสขม น้อย จึงนำมาผลิตเป็นซอสปรุงรสสูตรซอสหอยนางรม และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโปรตีนเท่ากับร้อยละ 68.11

สุปราณี (2539) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยใช้หัวปลาและไส้ปลาทรายแดงเพื่อผลิตเป็น สารอิมัลซิไฟเออร์ เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแฟรงเฟอ์เตอร์หมู โดยวัตถุดิบมีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 10.35 ไขมันร้อยละ 10.27 เถ้าร้อยละ 6.06 และมีความชื้นร้อยละ 75.99 โดยนำหนักเปียก และพบว่าส่วนผสมของหัวปลาและไส้ปลาทรายแดงมีปริมาณโปรตีนสูง ควรแก่การนำไปใช้ ประโยชน์ให้คุ้มค่า และเมื่อนำวัตถุดิบไปบดและอบแห้งในตู้อบแห้งแบบถาด ที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 15-20 ชั่วโมง วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีให้ผลดังนี้ โปรตีนร้อยละ 49.92 ความชื้นร้อยละ 6.85 ไขมันร้อยละ 9.32 เถ้าร้อยละ 31.12 โดยน้ำหนักแห้ง และจากองค์ประกอบทางเคมีข้างต้น พบว่ามีความใกล้เคียงกับองค์ประกอบของโปรตีนปลาเข้มข้น (fish protein concentrate) ตาม ข้อกำหนดของ Ockerman (1992) ซึ่งกำหนดไว้ว่าโปรตีนปลาเข้มข้นประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 50-77 ความชื้นร้อยละ 6-12 ไขมันร้อยละ 5-15 เถ้าร้อยละ 8-33 และเส้นใยน้อยกว่าร้อยละ 1

โดยทั่วไปการนำวัตถุดิบมาใช้ผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตอย่างเช่นโปรตีนปลา ไฮโดรไลเซตนั้นสามารถแบ่งประเภทวัตถุดิบออกเป็น 2 ประเภท คือปลาสด และวัสดุเศษเหลือ จากกระบวนการแปรรูปปลา ซึ่งที่ปลาสดทุกชนิดสามารถนำมาใช้เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ ทั้งนี้แต่ที่นิยมใช้มากคือปลาที่มีขนาดเล็กและปลาที่ติดมากับเรือลากอวนเพราะมูลค่าทาง เศรษฐกิจต่ำขายได้ในราคาถูก (สุปราณี, 2539)

Sen et al. (1962) ได้ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้ปลา 2 ชนิดคือ ปลาน้ำจืดใช้เนื้อของ ปลา *Barbus carnaticus* และปลาทะเลใช้เนื้อปลา *Rastrelliger canagurta* โดยใช้เอนไซม์ปาเปนใน การย่อยสลาย พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้มีค่าใกล้เคียงกัน และพบว่าการย่อยสลายโปรตีน จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการย่อยสลาย และมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้น

การย่อยสลายจะเริ่มคงที่ ซึ่งผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับหลายๆ งานวิจัย (Tarky *et al.*, 1973; Quaglia and Orban, 1987a; Kristinsson and Rasco, 2000a)

5. เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

เอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตนิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายสับสเตรท โดยทั่วไปไม่นิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสบริสุทธิ์เพียงชนิดเดียว แต่นิยมใช้เอนไซม์เอกโซเพปติเคส และเอนโดเพปติเคสผสมกันเพื่อให้ได้กรดอะมิโน เปปไทด์ และไตรเพปไทด์ ตามที่ต้องการ

แพนแครีติน (pancreatin) ที่ผลิตทางการค้าเป็นส่วนผสมของทริปซินและไคโมทริปซิน ซึ่งจะมีความสามารถเป็นทั้งเอนโดเพปติเคสและเอกโซเพปติเคส โดยที่ไคโมทริปซินและทริปซิน จะมีความเฉพาะในการตัดพันธะระหว่างอาร์จินีน (arginine) และไลซีน (lysine) โดยปกติแล้ว เอนไซม์ที่พบในพืชและสัตว์ เช่น ปาเปน (papain) ฟิซิน (ficin) โบรมิเลน (bromelain) จะจำเพาะต่อการตัดพันธะน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้านั้น ต้องอาศัยการพัฒนาหาส่วนผสมของเอนไซม์ที่พอเหมาะเพื่อให้ได้อัตราส่วนของกรดอะมิโน ไคเพปไทด์ ไตรเพปไทด์ และโอลิโกเพปไทด์ ตามต้องการ ในการเลือกว่าจะใช้เอนไซม์เพียงชนิดเดียวหรือจะใช้เอนไซม์ผสม จะพิจารณาได้จากความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรทให้ได้ผลิตภัณฑ์ตามต้องการ โดยอัตราการย่อยสลายสามารถวัดได้ด้วยอัตราส่วนของ AN (amino nitrogen) ต่อ TN (total nitrogen) คือ ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และอัตราส่วนของ AN/TN จะมีค่าประมาณ 50 หรือมากกว่านี้ ในการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์เพียงชนิดเดียวจะมีผลทำให้เกิดการจำกัดความสามารถในการย่อยสลาย เช่น เอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากพืช จะมีค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดประมาณร้อยละ 35

การควบคุมกระบวนการย่อยสลาย ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซททางการค้า จะทำในลักษณะของกระบวนการผลิตที่ไม่ต่อเนื่องโดยกระบวนการย่อยสลายจะควบคุมปัจจัยการย่อยสลายต่างๆ คือ อุณหภูมิ เวลา ค่าความเป็นกรดเบส และ AN/TN สภาพะในการย่อยสลายจะถูกควบคุมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติตามที่ต้องการ เช่น มีการกระจายตัวของกรดอะมิโน สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ และปริมาณโปรตีนที่ไม่ได้ถูกย่อยสลาย (intact protein) สำหรับอุณหภูมิที่ใช้

ในการผลิตนั้น จะพิจารณาจากอุณหภูมิที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด โดยทั่วไปช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 32-50°C ส่วนค่าความเป็นกรดเบส จะกำหนดให้อยู่ในช่วงที่ทำให้เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุด เช่นถ้าใช้เพนเครียดิน ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมอยู่ประมาณ 7

เวลาในการย่อยสลายจะแปรผันโดยตรงกับอัตราส่วน AN/TN ที่ต้องการคือถ้าเวลาในการย่อยสลายมากค่า AN/TN จะมีค่าสูงขึ้นมากด้วย ดังนั้นในการผลิตจึงต้องหาความสัมพันธ์ของเวลาอุณหภูมิ อัตราส่วน AN/TN ที่เหมาะสมเพื่อสามารถผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติตามต้องการและคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

การเลือกใช้เอนไซม์จะพิจารณาจากประสิทธิภาพ และความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ดังนั้น ในภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของเอนไซม์ ปัจจัยทางเศรษฐกิจจะเป็นตัวกำหนดว่าระหว่างการลงทุนที่มากขึ้นกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สิ่งใดจะทำให้เกิดความคุ้มค่ามากที่สุดและในการผลิตบางครั้งอาจมีการใช้โคแฟกเตอร์ (cofactor) ร่วมด้วย

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งในการควบคุมการย่อยสลายคือการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยที่สับสเตรทและเอนไซม์จะต้องเก็บไว้ในสภาวะที่ปลอดเชื้อ ก่อนนำมาเข้าสู่กระบวนการ แต่เมื่อเข้าสู่กระบวนการอุณหภูมิที่ใช้ก็อาจมีผลทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์สามารถแก้ไขได้ โดยการควบคุมกระบวนการต่างๆ อย่างใกล้ชิด โดยเฉพาะอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดเบส รวมทั้งการทำให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้ออย่างแท้จริง

ความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท จะถูกควบคุมระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยสามารถควบคุมได้ใน 2 ลักษณะ คือ ระดับขั้นการย่อยสลาย จะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการละลายของผลิตภัณฑ์สุดท้าย การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายโดยโปรตีนที่ไม่ถูกย่อยสลายและเอนไซม์จะถูกแยกออกโดยการกรองผ่าน bacteria retention membrane filter และ cross flow filtration วิธีที่นิยมใช้ในการหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายคือ การปรับค่าความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ที่อุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสชนิดนั้นมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อน โดยการนำสารละลายปฏิกิริยาที่ได้มาผ่านอุณหภูมิสูง ซึ่งจะเป็นการทำลายแอกติวิตีของเอนไซม์และหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลาย การยับยั้งปฏิกิริยาโดยใช้กรดไม่เป็นที่นิยมทางการค้าเนื่องจากเมื่อมีการหยุดปฏิกิริยาโดยการปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็นกรดแล้วต้องมีการปรับค่าความเป็นกรดเบส ให้กลับมาเป็นกลางอีกครั้งทำให้เกิดเกลือขึ้นเป็นจำนวนมากในผลิตภัณฑ์ ซึ่งต้องมีการสกัดแยกเกลือออกอีกครั้งหนึ่ง การใช้ความร้อนสูงเพื่อยับยั้ง

ปฏิกิริยาการย่อยสลายอาจทำลายคุณค่าทางโภชนาการและก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่ไม่ต้องการได้เช่น ปฏิกิริยาเมลลาร์ด หรือก่อให้เกิดสารชนิดอื่นในผลิตภัณฑ์ได้ การหยุดปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่ง โดยการแยกเอาเอนไซม์ออกด้วยการกรองผ่านเมมเบรน เป็นต้น

ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไก่และได้ผลน่าพอใจคือ เอนไซม์นิวเทรส เอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีคุณสมบัติเฉพาะตามที่มีผู้ศึกษารวบรวมไว้สรุปได้ดังนี้

5.1 เอนไซม์นิวเทรส

เอนไซม์นิวเทรส ที่ผลิตโดยบริษัท Novo Industry นั้นจะมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลเข้มละลายน้ำได้ มีความหนาแน่นประมาณ 1.25 กรัมต่อมิลลิลิตร และมีแอกติวิตี 0.5 Au/g โดยที่ 1 Au (Ason unit) หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ ที่ย่อยสลายฮีโมโกลบิน (destroyed hemoglobin) ภายใต้สภาวะที่กำหนด อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 7.5 เป็นเวลา 10 นาที ให้ผลิตภัณฑ์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรแอซิดิก และเกิดสีกับฟีนอลรีเอเจนต์เท่ากับ 1 มิลลิอิกวาเลนต์ (milliequivalent) ของไทโรซีน

สภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นิวเทรส อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คือ 45-55°C การเก็บเอนไซม์นิวเทรสที่อุณหภูมิ 5°C จะทำให้อายุการเก็บนานขึ้นโดยไม่มีการสูญเสียแอกติวิตี อย่างน้อย 1 ปี ความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 5.5-7.5

5.2 เอนไซม์ปาเปน (Papain หรือ Papaya peptidase) (Adler-Nissen, 1986)

เอนไซม์ปาเปนหรือ Papaya peptidase 1; EC 3.4.22.2) มีชื่อตามรหัสของ The commission of Enzyme คือ E.C.3.4.22.2 แสดงว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายพันธะเพปไทด์เป็นหลักถ้าจัดตามกลุ่มของเอนไซม์ที่ได้จากมะละกอ มีมากในผล และส่วนอื่นๆ ใช้กันมากในการทำเบียร์เพื่อช่วยเพิ่มความใสในกระบวนการตกตะกอน และใช้หมักเนื้อเพื่อทำให้เนื้อนุ่ม เอนไซม์ปาเปนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 21000 มีจุด Isoelectric point (PI) เท่ากับ 8.75 มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 4°C ประสิทธิภาพของเอนไซม์จะลดลงร้อยละ 20 เมื่อเวลาผ่านไป 6 เดือน

ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการย่อยสลายคือ 6-7 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์คือ 100°C 15 นาที สารที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้แก่ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) แมคโครโกลบูลิน (macroglobulin) อีออนของโลหะ (metal ion), leupeptin และอนุพันธ์ของสารประกอบคาร์บอนิล

การเกิดปฏิกิริยาระหว่างปาเปนกับสารตั้งต้นจะเกิดบริเวณผิวโมเลกุลของปาเปนในส่วนที่มีลักษณะเป็นร่อง (groove) ซึ่งมีหมู่ซัลไฟไฮดริล (SH-group) ของซิสเตอีน (cysteine) ดังนั้นถ้าหมู่ซัลไฟไฮดริลถูกออกซิไดซ์โดยโลหะหนักหรือสารพวก oxidizing agent เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ขึ้น กิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนจะหยุดชะงักลง จึงควรป้องกันไม่ให้มีโลหะหนักอยู่ในวัตถุดิบ ส่วนสารที่เป็นตัวเร่งได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ ซิสเตอีน ซัลไฟด์ และรีดิวซ์กลูตาไทโอน โดยสารเหล่านี้ทำหน้าที่รีดิวซ์พันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของเอนไซม์ปาเปนให้อยู่ในรูปหมู่ไทโธลอิสระ (free-thiol group) ทำให้การทำงานดีขึ้น ในการทำงานของเอนไซม์ปาเพนนีจะไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์ เอไมด์และเอสเทอร์ของกรดอะมิโน โดยแสดงคุณสมบัติการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์แบบ broad specificity คือ สามารถไฮโดรไลซ์สารตั้งต้นได้หลายชนิด ทั้งนี้อกจากไฮโดรไลซ์พันธะเพปไทด์แล้วยังสามารถไฮโดรไลซ์พันธะเอไมด์ เอสเทอร์ ไทโอเอสเทอร์ได้อีกด้วย

5.3 เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase, Subtilopeptidase A, Subtilisin Carlsberg; EC 3.4.21.14) (Adler-Nissen, 1986)

เอนไซม์อัลคาเลส หรือ Subtilopeptidase A หรือ Subtilisin Carlsberg มีชื่อตามรหัสของ The Commission Enzyme คือ 3.4.21.14 จัดว่าเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Hydrolase ซึ่งจะย่อยสลายพันธะเพปไทด์เป็นหลัก ถ้าจัดกลุ่มเอนไซม์ตามลักษณะการทำงานแล้วจะจัดอัลคาเลสอยู่ในกลุ่ม Serine peptidase มีหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) ของ seryl อยู่ที่ active site เอนไซม์นี้เป็นเอนโคเพปติเคสกล่าวคือ จะย่อยมาจากภายในโมเลกุลโดยเลือกตำแหน่งย่อยแบบสุ่ม สารตั้งต้นจะเกิดพันธะโควาเลนต์กับเอนไซม์ที่บริเวณ active site เอนไซม์อัลคาเลสผลิตจากเชื้อ *Bacillus subtilis* ทำงานดีที่ค่าความเป็นกรดเบส ประมาณ 6.5-8.5 บางครั้งสามารถทำงานได้แม้ pH ลดต่ำลงถึง 5.0 อุณหภูมิพอเหมาะต่อการทำงานของอยู่ในช่วง $55-70^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 90°C นาน 20 นาที เอนไซม์ชนิดนี้ไม่จำเพาะต่อสารตั้งต้นแต่เลือกที่จะย่อยกรดอะมิโนที่เป็นกลาง (neutral) และกรด (acid amino acid) มากกว่า การเก็บที่อุณหภูมิ 4°C และแห้งจะมีความคงตัวสูง สารยับยั้งการทำงานได้แก่ aprotinin, indole, α -2-macroglobulin เอนไซม์ชนิดนี้มี

Ca^{+2} เป็นตัวกระตุ้นการทำงาน ควรหลีกเลี่ยงการใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพราะ Ca^{+2} อาจจะทำตกตะกอนในรูป calcium phosphate ซึ่งลดการทำงานของเอนไซม์ได้

6. คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซท

คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซทอาจจะพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยที่ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณลักษณะที่ดีควรมีปริมาณโปรตีนสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในปริมาณสูงและมีปริมาณไขมันต่ำ (Hall and Ahmad, 1992) องค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทขึ้นอยู่กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ เอนไซม์ที่เลือกใช้และกระบวนการผลิต เป็นต้น ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทมีคุณลักษณะที่สำคัญดังนี้คือ

6.1 องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าวัตถุดิบนั้นมีไขมันมากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ก็จะมีปริมาณไขมันสูง และอาจเกิดปฏิกิริยาการเหม็นหืนได้จึงต้องกำจัดไขมันออกจากวัตถุดิบก่อน หรือใช้สารยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาการเหม็นหืน Mackie (1982) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลาที่ปราศจากไขมันจะมีองค์ประกอบคิดเป็นร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้าร้อยละ 6-7

6.2 น้ำหนักโมเลกุล

น้ำหนักโมเลกุลมีความสำคัญในการบ่งบอกคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท ถ้าระดับการย่อยสลายสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมากทำให้ละลายได้ดีแต่ขาดคุณสมบัติบางอย่างไป และถ้าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดใหญ่ อาจจะไม่สามารถละลายได้เพียงพอที่จะแสดงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ออกมาได้ การกำจัดโมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทอาจทำได้โดยการกรองด้วยเมมเบรน การกำหนดขนาดโมเลกุลที่ผ่านเมมเบรนได้จะระบุเป็น cut off No. กล่าวคือ Cut off No. เท่ากับ 1000 หมายถึง สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1000 สามารถเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนออกไปได้ ดังนั้นจึง

ใช้การกรองด้วยเมมเบรนในการคัดเลือกโปรตีนที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ตามที่ต้องการได้ (Greenberg and Ship, 1979)

6.3 ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis)

การวัดปริมาณการย่อยสลายโปรตีนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการย่อยสลายเพื่อแสดงถึงจำนวนพันธะที่ถูกทำลายระหว่างการเกิดปฏิกิริยา จึงมีการกำหนดค่าที่ใช้บ่งบอกถึงความก้าวหน้าของปฏิกิริยาในรูปของร้อยละของไนโตรเจนที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid) เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ (Greenberg and Ship, 1979) ระดับการย่อยสลายคือ เปอร์เซนต์เพปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเพปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ ถ้าค่าระดับการย่อยสลายสูงแสดงว่า โปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก

6.4 ความยาวของสายเพปไทด์ (Peptide Chain Length)

ความยาวของสายเพปไทด์เป็นจำนวนเฉลี่ยของกรดอะมิโนในโพลีเพปไทด์ สามารถคำนวณได้จากระดับการย่อยสลาย (DH) กล่าวคือ ความยาวของสายเพปไทด์จะเท่ากับ $100/DH$ ถ้าระดับการย่อยสลายสูงเพปไทด์จะสั้นลง นั่นคือ โปรตีนถูกย่อยสลายจนเป็นเพปไทด์สายสั้นๆ (Adler-Nissen, 1986) โดยค่าความยาวสายเพปไทด์ไม่ได้แสดงถึงขนาดโมเลกุลของเพปไทด์แต่เป็นการแสดงแนวโน้มในเชิงเปรียบเทียบเท่านั้น

6.5 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

องค์ประกอบของกรดอะมิโนมีความสำคัญ 2 ประการ คือ ให้กลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีเพปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณปลายสายจะมีรสขม รสขมที่ได้อาจจะมาจากวัตถุดิบและชนิดของเอนไซม์ เช่นถ้าใช้เอนไซม์เพปติเนสย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองหรือเคซีนจะได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีรสขม กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเพปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่ออยู่แบบอิสระ (Hall and Ahmad, 1992) เพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีกรดอะมิโนที่เป็นกลางอยู่ปลายสายจะมีรสขม ถ้ามีกรดอะมิโนที่เป็นกรด

อยู่ปลายสายจะให้รสหวานคล้ายน้ำซूप (Noguchi *et al*, 1975) เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาหมึกอะมิโนไคซีนอยู่สูง ดังนั้น จึงมีการใช้ควบคู่กับโปรตีนธัญพืช ได้แก่ ข้าวไรน์ ข้าวโพด และข้าวสาลี เพื่อเสริมให้เกิดความสมดุลของกรดอะมิโนจำเป็นในอาหารที่บริโภคซึ่ง จากการรายงานพบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทจากปลาบางชนิดมีปริมาณกรดอะมิโนสูง และหรือปลาบางชนิดอาจมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นน้อยกว่ามาตรฐานของ FAO/WHO (1973) เล็กน้อย ดังแสดงในตารางที่ 2 (สุภาวดี, 2542)

6.6 ความสามารถในการละลาย (Solubility)

ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นคุณสมบัติที่มีผลต่อคุณสมบัติอื่นๆ มากมาย การละลายของโปรตีนขึ้นกับค่าความเป็นกรดเบสของสารละลายและชนิดและปริมาณของตัวถูกละลายอื่นๆ ที่ผสมอยู่ด้วย ความสามารถในการละลายวัดในรูปของดัชนีการละลายของไนโตรเจน (Nitrogen Solubility Index, NSI) ซึ่งคำนวณจากร้อยละของไนโตรเจนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือ เทียบกับร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซท (Quaglia and Orban, 1987)

Tybor *et al*, (1973) ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดเบส ต่อการละลายได้ของซีรัม (serum) และโกลบิน (globin) ได้ผลคือที่ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.8 และ 6.5 จะมีการละลายได้ของซีรัมและโกลบินต่ำที่สุด ตามลำดับ ดังนั้น ถ้าใช้โกลบินเป็นอิมัลซิไฟเออร์ควรใช้ที่ค่าความเป็นกรดเบสสูงหรือต่ำกว่า 6.5 Satterlee and Better (1973) รายงานว่า โปรตีนในส่วนที่ละลายได้มีค่า Emulsifying capacity (EC) สูงกว่าโปรตีนที่ไม่สามารถละลายได้

6.7 ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying capacity)

หมายถึงความสามารถของสารที่ทำหน้าที่เป็นสารช่วยในการรวมตัวของน้ำกับไขมัน โดยหุ้มรอบเม็ดไขมันเอาไว้ทำให้อิมัลชันคงตัว (นิธิยา, 2534) เมื่อย่อยสลายโปรตีนจนเกิดเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กซึ่งสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วสามารถที่จะทำให้เกิดอิมัลชันได้ โดยการที่เปปไทด์เหล่านี้เคลื่อนที่ไปยังบริเวณพื้นผิวเมื่อน้ำมัน หันโมเลกุลทางด้านที่ไม่มีขั้วเข้าหาเม็ดน้ำมันและหันโมเลกุลที่มีขั้วเข้าหาโมเลกุลน้ำหรือโมเลกุลมีขั้ว ซึ่งมีส่วนช่วยในการลดแรงตึงผิวระหว่างเม็ดน้ำมันและน้ำ จึงทำให้เกิดสภาพอิมัลชันขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไล

เซพที่ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลาย ความเป็นกรดเบส เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย และ surface hydrophobicity เป็นต้น โดยที่ความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะมีค่าต่ำ ณ จุด pI (Nielsen, 1997)

Hoyle and Merritt (1994) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาแฮร์ริง โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส และปาเปน พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสนั้นมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเอนไซม์ปาเปน แต่มีค่าการละลายของไนโตรเจนต่ำกว่า เนื่องจากการใช้เอนไซม์ปาเพนย่อยสลายจะทำให้ได้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่ชอบน้ำอยู่ปริมาณมาก แต่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันต่ำกว่า

Quaglia and Orban (1990) พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยสลายจากร้อยละ 5 เป็นร้อยละ 20 ความยาวของสายเปปไทด์จะสั้นลง และความสามารถในการเกิดอิมัลชันจะลดต่ำลงด้วย และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า surface hydrophobicity สูง จะมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า surface hydrophobicity ต่ำ

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ผลิตโดยใช้วัตถุดิบชนิดต่างๆ และเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

วัตถุดิบ	เอนไซม์	ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น (กรัม/100 กรัมโปรตีน)								เอกสารอ้างอิง
		Iso	Leu	Lys	Met+ Cys	Phe+ Tyr	Thr	Tryp	Val	
เนื้อปลาแฮก	โบรมิเลน	4.4	9.5	11.8	4.2	6.6	3.7	1.3	5.7	Yanez <i>et al</i> , (1976)
เครื่องในปลาคอด	ปาเปน	2.86	6.27	7.26	2.90	3.25	3.89	-	3.55	Mackie (1982)
เนื้อปลาคอด	ปาเปน	3.20	7.30	10.2	2.88	3.49	4.24	-	3.73	Mackie (1982)
เนื้อปลาซาร์ดีน	อัลคาเลส	3.87	8.41	9.66	3.37	5.88	4.97	1.10	5.10	Quaglia and Orban (1987a)
เนื้อปลาซาร์ดีน	ปาเปน	4.02	8.20	9.07	3.87	6.99	4.59	1.22	5.17	Quaglia and Orban (1987a)
เนื้อปลากระบอก	เอชที 200	3.85	5.10	7.29	4.27	3.15	2.89	n.d.	3.73	Rebaca <i>et al</i> , (1991)
เนื้อปลากระบอก	โปรติเอส เอ็น	4.09	4.71	7.48	5.63	3.31	3.99	0.94	4.78	Rebaca <i>et al</i> , (1991)
เนื้อปลากระบอก	เพส คาเลส 500	3.97	6.07	8.45	4.73	4.44	3.68	n.d.	4.52	Rebaca <i>et al</i> , (1991)
เนื้อปลากระบอก	ซีพีเอสพี 90	4.57	6.29	7.31	4.55	3.87	4.33	0.85	4.92	Rebaca <i>et al</i> , (1991)
FAO	-	4.20	4.80	4.20	2.20	2.80	2.80	-	4.20	FAO (1973)

ที่มา: สุภาวดี (2542)

7. คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซต

7.1 คุณภาพทางเคมี

คุณภาพทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตอาจพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมีและปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพดีควรมีปริมาณโปรตีนสูงและมีชนิดของกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนตามความต้องการของร่างกายในปริมาณสูง และมีไขมันต่ำ (Hall and Ahmad, 1992) ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีและกรดอะมิโนของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ เอนไซม์ และกระบวนการผลิต

Mackie *et al.*, (1982) ย่อยสลายเนื้อและเครื่องในปลาสด (cod) ด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าในส่วนเครื่องในปลาคอดนั้นให้ปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนและโพรลีนสูงกว่าส่วนของเนื้อปลา ทั้งนี้เป็นเพราะว่าส่วนของเครื่องในปลาคอดนั้นมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงกว่าส่วนของเนื้อปลาคอด

7.2 คุณภาพทางกายภาพ

คุณภาพทางกายภาพที่สำคัญได้แก่ คุณภาพในด้านสี โดยสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต การสกัดไขมัน และการทำแห้ง (Mahesh *et al.*, 1993; Hoyle and Merritt, 1994)

Hoyle and Merritt (1994) นำเนื้อปลาแฮร์ริงสด ปลาแฮร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยการบีบอัด และปลาแฮร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและปาเปน พบว่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาแฮร์ริงสด และปลาแฮร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยวิธีบีบอัด และผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปน จะให้ค่าความสว่างมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการนำเนื้อปลาแฮร์ริงที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยเอทานอลมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีค่าความสว่างมากที่สุด

Surowka and Fix (1992) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายหัวไก่ด้วยเอนไซม์นิวเทรสและผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะมีสีขาวครีม ในขณะที่การทำแห้งแบบ

สูญญากาศทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีสีน้ำตาล ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท

7.3 คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนปลาด้วยเอนไซม์โปรติเอสนั้นมักจะมีรสขม ซึ่งเป็นคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่มีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค ซึ่งรสขมที่เกิดขึ้นนั้นมีสาเหตุจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ทริปโตเฟน และวาเลอีน เป็นต้น กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเพปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่ออยู่แบบอิสระ (Hall and Ahmad, 1992)

ความยาวของสายเพปไทด์มีความสำคัญต่อการเกิดรสขม คือเมื่อมีจำนวนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า 3 หมู่ในสายเพปไทด์จะให้รสขมลดลง นอกจากนั้นค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสายเพปไทด์ ยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดรสขมด้วย คือถ้าสายเพปไทด์มีค่าความไม่ชอบน้ำมากกว่า 5.85 กิโลจูลต่อโมลจะให้รสขม แต่ถ้าสายเพปไทด์มีค่าความไม่ชอบน้ำน้อยกว่า 5.43 กิโลจูลต่อโมล จะไม่ก่อให้เกิดรสขม ความเข้มของรสขมที่เกิดขึ้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์และชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ชอบน้ำเช่น เจลาติน จะให้รสขมน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เคซีนและถั่วเหลือง (Damodaran, 1996)

Kristinsson and Rasco, (2000 d) พบว่าการแก้ไขหรือการกำจัดรสขมที่เกิดขึ้นทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นร่วมกับเอนไซม์เอนโดเพปติเคสในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นี้เรียกว่าปฏิกิริยาพลาสติก (plastein) และอีกวิธีในการบดบังรสขมได้แก่การเติมน้ำตาลซูโครส (Mahesh *et al*, 1993)

8. ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซต

โครงกระดูกเป็นส่วนของวัสดุพิเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปเนื้อไก่ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 20 (Kijowski, 1994) ในปัจจุบันการใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซต

จากโครงไก่ยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก แต่สำหรับโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลานั้นมีการผลิตและการนำมาใช้ประโยชน์มากกว่า ซึ่งถ้าพิจารณาถึงองค์ประกอบทางเคมี พบว่าปริมาณโปรตีนของโครงไก่ไม่ได้แตกต่างจากโปรตีนปลา อีกทั้งโครงไก่ยังมีปริมาณมากในอุตสาหกรรมอาหาร และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากแหล่งวัตถุดิบทั้งสองชนิดนี้ก็เหมือนกัน ได้แก่ คุณสมบัติด้านการละลาย และการเกิดอิมัลชัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์สำหรับเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส จึงทำให้มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางอันได้แก่

8.1 อาหารสัตว์

Mackie (1982) นำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการใช้ปลาสดเป็นวัตถุดิบมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 30 นาที ทำให้โปรตีนร้อยละ 30-50 เปลี่ยนเป็นเปปไทด์สายสั้นลงและสามารถละลายได้มากขึ้น ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูงถึง ร้อยละ 84.8 มีเถ้าร้อยละ 6.2 และมีไขมันร้อยละ 12 สามารถนำมาใช้ทดแทนเคซีนได้แต่ไม่ควรเกินร้อยละ 60 เพราะอาจทำให้การใช้ประโยชน์จากอาหารสัตว์มีค่าลดลง

Green and Mattick (1979) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาป่นโดยใช้เอนไซม์ปาเปน พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีชนิดของกรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับเคซีน และได้มีการนำไปใช้เป็นแหล่งโปรตีนในอาหารไก่และสุกร

8.2 อาหารมนุษย์

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซตในแง่ของการใช้เป็นอาหารสำหรับมนุษย์นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 รูปแบบ ได้แก่ การใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และใช้เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส (สุภาวดี, 2542)

8.2.1 ใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional ingredients) โปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายแล้วจะช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีน ตัวอย่างการใช้งานเช่นการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อให้โปรตีนไฮโดรไลเซตนั้นแสดงสมบัติที่ต้องการในอาหาร เช่น การละลาย การเกิดอิมัลชัน และการเกิดฟอง Heimlich (1974) และ Mohr (1978) นำโปรตีนไฮโดรไลเซตไปผสมกับแป้งคัดแปรในปริมาณร้อยละ 10 เพื่อทำผลิตภัณฑ์เลียนแบบนม (milk analog) สามารถช่วยเพิ่ม

อัตราการใช้ประโยชน์โปรตีน (Protein efficiency ratio : PER) จาก 0.66 ไปเป็น 2.5 นอกจากนั้นพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันได้ดี และผลิตภัณฑ์มีลักษณะจับตัวเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีขึ้น

Yu and Tan (1994) ใช้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายปลา *Oreochromis mossambicus* มาผลิตข้าวเกรียบโดยในใช้ปริมาณร้อยละ 10 พบว่าข้าวเกรียบที่ได้มีอัตราการพองตัวสูง

Miller and Groninger (1976) ได้ศึกษาการใช้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตทดแทนอัลบูมินซึ่งเป็นโปรตีนในไข่ขาวเพื่อเสริมลงในอาหาร เช่น ไอศกรีม ลูกกวาด เพื่อพัฒนาสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความสามารถในการเกิดฟอง การละลาย และการเกิดอิมัลชันของโปรตีนโดยรวมในอาหาร

8.2.2 ใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ (Nutritional ingredients) สุปรานี (2539) ได้ศึกษาการใช้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตในไส้กรอกแฟรงเฟอ์เทอร์หมูเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ โดยโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีปริมาณโปรตีนสูงถึงร้อยละ 38.9 และพบว่าการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซตปริมาณร้อยละ 3 ทำให้ไส้กรอกมีความสามารถในการอุ้มน้ำและความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด และได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้านสี เนื้อสัมผัส และความชุ่มฉ่ำที่ดี แต่อย่างไรก็ตามไส้กรอกก็ยังมีความคงตัวอยู่ทำให้ไม่ได้รับการยอมรับในด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์

นอกจากนั้นยังมีการใช้เพื่อเป็นเครื่องดื่มน้ำ โดย Christopher (1994) ศึกษาการใช้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตในการเป็นเครื่องดื่มเสริมสุขภาพ พบว่าร่างกายสามารถดูดซึมโปรตีนปลาที่ผ่านการย่อยสลายแล้ว และนำไปใช้ได้เร็วกว่าโปรตีนทั่วไป และยังมีการใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพให้กับผู้ป่วย ผู้บาดเจ็บ ผู้ผ่านการผ่าตัด และผู้ที่มีปัญหาในการย่อยอาหาร ซึ่งเกิดจากตับอักเสบเป็นผลทำให้เกิดการขาดน้ำย่อย หรือเป็นโรคทางเดินน้ำดี และโรคขาดสารอาหาร

8.2.3 ใช้เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารมี 2 ประเภท คือ สารให้กลิ่นรสในอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีกลิ่นรสตามต้องการ ผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ได้แก่ ขนมขบเคี้ยว ชุปผง ชุปกระป๋องที่ได้จากผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อ น้ำแกง น้ำต้มกระดูก และซอสพริก ส่วนอีกประเภทหนึ่งเป็นสารเพิ่มกลิ่นรสที่ใช้เพิ่มกลิ่นรสในอาหารหรือผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกลิ่นรสอยู่แล้ว ให้สูงขึ้น อาหารที่ใช้ได้แก่ ครีมชุป ผลิตภัณฑ์

จากปลา เช่น สเต็กปลา ไส้กรอก หรือมีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสปลา (อาภัสรา, 2535)

สุภาวดี (2542) ผลิตซอสปรุงรสจากโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตโดยใช้หัวปลาทู นำพันธุ์โอแลบ และใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยสลาย พบว่า ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 58 มีกรดอะมิโนที่เหมาะสม และมีรสขมน้อยเหมาะแก่การนำมาผลิตเป็นซอสหอยนางรม ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณโปรตีน 68.11 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง

8.3 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Gildberg (1993) ผลิตเปปโตนจากโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต โดยใช้ปลา red hake และย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ตามธรรมชาติที่มีอยู่ภายในตัวปลา แล้วนำเปปโตนมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับจุลินทรีย์ โดยเปรียบเทียบกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจาก beef extract พบว่าจุลินทรีย์เจริญได้ดีไม่แตกต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด

9. ชูปไก่สกัด

ชูปไก่สกัด หมายถึง ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากการนำไก่ทั้งตัวมาบดสับก่อนที่จะนำไปต้มจนงวดและนำไปกรองเพื่อไปดำเนินการต้มซ้ำ จนได้น้ำชูปไก่ที่เข้มข้นในที่สุด แต่ปัจจุบันมีการพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์เป็นแบบเม็ดเพื่อให้สะดวกต่อการรับประทาน

ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ใช้รับประทานโดยตรงนอกเหนือจากการรับประทานอาหารหลักตามปกติ ซึ่งมักอยู่ในลักษณะเป็นเม็ด แคปซูล ผง เกล็ด ของเหลว หรือลักษณะอื่น และมีจุดมุ่งหมายสำหรับบุคคลทั่วไปที่มีสุขภาพปกติ (มิใช่สำหรับผู้ป่วย) เช่น น้ำมันปลาชนิดแคปซูล โยอาหารอัดเม็ด โยอาหารสำหรับขงหรือโรยอาหาร เป็นต้น สำหรับผลิตภัณฑ์ซึ่งมีลักษณะเป็นของเหลวนั้น หากบริโภคโดยมีวัตถุประสงค์หรือมีลักษณะเพื่อให้รสชาติ กลิ่น รส จัดเป็นเครื่องดื่ม หากเป็นของเหลวที่บริโภคโดยไม่มุ่งหวังเพื่อให้รสชาติ หรือบริโภคต่างจากเครื่องดื่มทั่วไป (เช่น ครั้งละ 10 มิลลิลิตร) หรือเป็นของเหลวชั้นสำหรับหยดใส่น้ำหรือน้ำผลไม้ เพื่อมุ่งให้สารบางอย่าง จัดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

ตารางที่ 3 จำนวนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตตลาดส่วนเพิ่มในปี พ.ศ.2539-2546

พ.ศ.	จำนวนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตตลาด				รวม (ราย)
	ผลิตใน ประเทศ (ราย)	การเปลี่ยนแปลง (ร้อยละ)	นำเข้าจาก ต่างประเทศ (ราย)	การเปลี่ยนแปลง (ร้อยละ)	
2539	55	-	71	-	126
2540	118	114.55	233	228.17	351
2541	366	210.17	236	1.29	602
2542	387	5.74	167	-29.24	554
2543	231	-40.31	150	-10.18	381
2544	281	21.65	115	-23.33	396
2545	1,421	405.69	836	626.96	2,257
2546	260	-81.70	64	-92.34	324
รวม	3,119	-	1,872	-	4,991

ที่มา: กองควบคุมอาหาร สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (2546)

ซูปลั๊กสกัดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทหนึ่งของผู้บริโภคนิยมซื้อมารับประทาน โดยจัดเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้จากธรรมชาติคือ พืชหรือสัตว์ ในกลุ่มที่มีการสกัด (Extracted Dietary Supplement Product) (ที่มา : ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2544 ฉบับที่ 238) โดยเริ่มเข้าสู่ตลาดครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ. 2517 ภายใต้ตราสินค้าแบรนด์ ระยะเวลาในการทำตลาด ผลิตภัณฑ์แบรนด์จัดจำหน่ายโดยบริษัท แองโกลไทย (ประเทศไทย) จำกัด โดยในปี พ.ศ. 2539-2546 มีจำนวนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตตลาดดังตารางที่ 3 และมีส่วนแบ่งการตลาด ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ส่วนแบ่งตลาดของซูบไ้สกัดตั้งแต่ปี พ.ศ.2545-2547

ปี พ.ศ.	ส่วนแบ่งตลาด (ร้อยละ)		
	เบรนต์	สก๊อต	เบซซ์
2545	90	NA	NA
2546	70	20	10
2547	60	30	10

หมายเหตุ: ส่วนแบ่งตลาดของสก๊อตและเบซซ์ในปี พ.ศ.2545 รวมกันเป็นร้อยละ 10

ที่มา: บัณฑิต (2548)

10. การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีในการกรองสารละลายโปรตีน

กระบวนการทางเมมเบรนหรือเยื่อแผ่นสังเคราะห์ (synthetic membrane processes) เป็นกระบวนการที่ใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์หรือเมมเบรนเพื่อแยกสาร หรือเพิ่มความเข้มข้น หรือทำสารให้บริสุทธิ์ขึ้น กระบวนการทางด้านเมมเบรนถูกค้นพบมานานกว่า 30 ปีแล้ว และมีการพัฒนาขึ้นมาเป็นลำดับ จนปัจจุบันนี้มีการใช้กระบวนการเยื่อแผ่นสังเคราะห์หลายกระบวนการในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยอาจนำไปใช้แทนกระบวนการแยกอื่นๆ หรือใช้เสริมในกระบวนการเดิม

เทคโนโลยีเมมเบรนเป็นเทคโนโลยีที่นำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการเพิ่มความเข้มข้น (concentration) การแยกส่วน (fractionation) การทำให้บริสุทธิ์ (purification) ยังช่วยลดกระบวนการบำบัดน้ำเสีย และใช้กับสารละลายที่มีปริมาณมาก การเชื่อมต่องานการกรองเข้ากับระบบต่างๆ ได้ง่าย มีความสะดวกในการติดตั้ง และมีความเหมาะสมในอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

หลักการสำคัญของกระบวนการทางเมมเบรนคือ จะต้องมีความเข้มข้นที่ทำให้ของผสมหรือสารละลายไหลผ่านเมมเบรนและเกิดการแยก เช่น ผลต่างของความเข้มข้น หรือผลต่างของความดัน ถ้าจะให้คำจำกัดความ อาจอธิบายได้ว่า เมมเบรนคือ ตัวกลางซึ่งอาจเป็นฟิล์มบางๆ หรือหยดขนาดเล็กมากๆ ที่ทำหน้าที่กั้นระหว่าง 2 เฟส โดยทั่วไปเมมเบรนเป็นของแข็ง และอาจเป็นของเหลว ลักษณะที่สำคัญที่สุดของเมมเบรนคือ มีคุณสมบัติในการเลือกผ่านสารหนึ่งมากกว่าสารอื่น (semi-permeable/permeable) การเลือกผ่านสารเป็นผลมาจากโครงสร้างทางเคมี หรือทาง

กายภาพของเมมเบรน ซึ่งอาจพิจารณาได้จากการมี affinity ของเมมเบรนต่อสารนั้นๆ หรือจากขนาดรูพรุนของเมมเบรน หรือจากการมีประจุของเมมเบรน เป็นต้น เมมเบรนที่ใช้งานอยู่ทั้งหมดจัดได้ว่าเป็นเมมเบรนที่มีการสังเคราะห์ หรือผลิตขึ้น (synthetic membranes) หรือไม่ใช่เมมเบรนจากธรรมชาติ การใช้กระบวนการแยกด้วยเมมเบรน (membrane separation process) ยังมีวัตถุประสงค์ที่แตกต่างกันออกไป เช่น บางครั้งต้องการใช้ส่วนที่ถูกกรองเอาไว้ ซึ่งจะมีสารละลายที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ที่ไม่สามารถซึมผ่านเมมเบรนออกไปได้ เรียกสารละลายนี้ว่า รีเทนเตต (retentate) ในขณะที่อีกพวกหนึ่งต้องการใช้สารละลายที่ซึมผ่านเมมเบรนออกไป ซึ่งเรียกสารละลายที่ซึมผ่านเมมเบรนออกไปนี้ว่า เพอมีเอต (permeate) หรือ ฟิลเตรต (filtrate)

Lin *et al* (1996) รายงานว่า การกรองน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตซูรีมด้วยเมมเบรนที่มีขนาด 50 และ 30 ไมโครเมตร สามารถเก็บเกี่ยวเนือปลาบดที่มีขนาดชิ้นเล็กๆ ซึ่งมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบ แต่ยอมให้โปรตีนที่ละลายน้ำและอนุภาคเนือปลาบดที่มีขนาดเล็กกว่าของเมมเบรนผ่านไปได้ ของแข็งที่เก็บเกี่ยวได้โดยวิธีนี้สามารถใช้เตรียมเจลที่มีการยึดเกาะที่ดี เมื่อผสมในซูรีมปกติ ปริมาตรร้อยละ 10 พบว่า ไม่มีผลให้เจลที่เตรียมจากซูรีมผสมมีความแข็งแรง การยึดเกาะ และสีแตกต่างจากเจลของซูรีมปกติแต่อย่างใด ที่สำคัญยังทำให้ผลผลิตของกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้นร้อยละ 1.7

Torres *et al* (2002) ใช้อัลตราฟิลเตรชันเมมเบรน เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนในพลาสมาจากเลือดไก่ พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนจาก 0.0046 กรัมต่อมิลลิกรัม เป็น 0.0908 กรัมต่อมิลลิกรัม และมีความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 85-91 อัลตราฟิลเตรชันและไมโครฟิลเตรชันสามารถประยุกต์ใช้กับระบบบำบัดน้ำทิ้งได้

Lo *et al* (2005) เก็บเกี่ยวโปรตีนจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกด้วยอัลตราฟิลเตรชันเมมเบรนขนาด 30 กิโลดาลตัน ผลที่ได้คือโปรตีนเข้มข้นขึ้นจาก 110 เป็น 390 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ทั้งหมด เพราะในส่วนเพอมีเอตตรวจไม่พบโปรตีนและสามารถลดค่าซีไอดีจาก 853 ลดลงเหลือ 353 มิลลิกรัมต่อลิตร

ไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration, MF) เป็นกระบวนการที่ใช้เมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนค่อนข้างใหญ่ (0.1-10 ไมโครเมตร) สำหรับแยกโมเลกุลใหญ่ๆ สารแขวนลอย หรืออนุภาคเล็กออกจากของเหลว โดยช่วงความดันหรือแรงขับเคลื่อนในการป้อนสารละลายต่ำกว่าเมมเบรนชนิดออสโมซิสผันกลับและอัลตราฟิลเตรชัน คืออยู่ในช่วง 100-500 กิโลปาสกาล (1-5 บรรยากาศ) ถ้า

ใช้ไมโครฟิลเตรชันในลักษณะ dead-end จะทำให้เกิดการสะสมของเค้ก (cake) บนผิวของเมมเบรน ดังนั้นการจะออกแบบการไหลผ่านเมมเบรนในลักษณะไหลขวางซึ่งเรียกกันทั่วไปว่า cross flow microfiltration (CFMF) จะเหมาะสมกว่า ในแง่ของการช่วยลดการสะสมของเค้ก การใช้งานที่แพร่หลายคือ การบำบัดน้ำทิ้ง ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม ใช้ในเทคโนโลยีชีวภาพร่วมกับกระบวนการหมักเพื่อแยกเซลล์จากผลิตภัณฑ์

Zydney (1998) พบว่าการใช้เทคโนโลยีเมมเบรนในอุตสาหกรรมนมถือว่าประสบความสำเร็จอย่างมาก เช่น ใช้ไมโครฟิลเตรชันช่วยกำจัดจุลินทรีย์ออกจากนมโดยไม่ต้องใช้ความร้อนสูงในการทำพาสเจอร์ไรส์ และใช้อัลตราฟิลเตรชันกำจัดเล็กโตสออกจากหางนม นอกจากนี้ยังใช้ในการแยกส่วนโปรตีนในนมได้อีกด้วย จากการทดลองยังพบว่าสามารถแยก Hemoglobin ออกจาก BSA และทำให้ Immunoglobulin บริสุทธิ์ได้

Lin *et al* (1995) เก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมิโดยใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนร่วมกับการใช้อัลตราฟิลเตรชันเมมเบรน โปรตีนจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นในส่วนรีเทนเนต เพื่อนำกลับไปผสมในซูริมิ และน้ำที่ผ่านการกรองมีค่าซีโอดีลดลงร้อยละ 89-94 ทำให้สามารถนำกลับไปใช้ในกระบวนการผลิตได้

ข้อดีของการใช้เมมเบรนมีข้อได้เปรียบกระบวนการแยกอื่นๆ ตัวอย่างเช่น เป็นการแยกตามขนาดของโมเลกุล หรือรูปร่าง หรือชนิดของประจุ ซึ่งทำให้สามารถดำเนินการที่อุณหภูมิปกติ (ยกเว้นการกลั่นผ่านเมมเบรน) จึงเหมาะสำหรับการแยกสารที่อาจเสื่อมสภาพเพราะความร้อนได้

กระบวนการเมมเบรนส่วนใหญ่ใช้พลังงานในการแยกค่อนข้างต่ำ เพราะสามารถแยกได้โดยไม่ต้องเปลี่ยนเฟส ตัวอย่างเช่น สำหรับกระบวนการแยกเกลือจากน้ำกร่อยหรือน้ำทะเล ถ้าใช้ออสโมซิสผันกลับ หรือ อิเล็กโตรไดอะไลซิส จะมีข้อได้เปรียบทางด้านพลังงานมากกว่าการกลั่นหรือการต้มระเหย ไม่ก่อให้เกิดของเหลือทิ้ง เพราะกระบวนการเมมเบรนทำให้สามารถแยกผลิตภัณฑ์ได้ตามที่ต้องการ สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเพอมีเอทและรีเทนเนต ตัวอย่างเช่น ในการผลิตน้ำสะอาดจากน้ำทะเล ได้เพอมีเอท คือ น้ำจืด ส่วนสารละลายเกลือเข้มข้นสามารถนำไปต้มระเหย ตกผลึก เพื่อผลิตเกลือ หรือในการบำบัดน้ำทิ้งบางชนิดที่ได้น้ำสะอาดกลับไปใช้ในกระบวนการและได้ผลิตภัณฑ์เข้มข้นซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ สามารถขยายขนาดจากระดับต้นแบบให้เป็นระดับอุตสาหกรรมได้ไม่ยาก เนื่องจากชุดเมมเบรนมีลักษณะเป็นชุด (modular) หรือหน่วยที่เรียกว่าโมดูล และสามารถนำหน่วยย่อยต่างๆ มาต่อกันเพื่อเพิ่มพื้นที่ในการ

แยก สามารถดำเนินการแบบกะ (batch) หรือแบบต่อเนื่อง (continuous) ตลอดจนติดตั้งระบบควบคุมการทำงานแบบอัตโนมัติได้ไม่ยาก มีขนาดกระทัดรัดไม่เปลืองพื้นที่ เพราะชุดอุปกรณ์เมมเบรนมีการออกแบบให้มีพื้นที่ในการกรองต่อหน่วยปริมาตรของอุปกรณ์สูง

ด้วยเหตุผลดังกล่าวทำให้สามารถนำกระบวนการทางเมมเบรนไปใช้แทนกระบวนการแบบดั้งเดิมที่ใช้อยู่ซึ่งอาจจะใช้เพื่อทดแทนบางกระบวนการหรือทั้งกระบวนการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับธรรมชาติของกระบวนการนั้นๆ ดังตารางที่ 5 ซึ่งสามารถชี้ให้เห็นว่ากระบวนการทางเมมเบรนสามารถใช้ทดแทนกระบวนการใดได้บ้าง

Jeon *et al* (1999) ได้ทดลองนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จากวัสดุเศษเหลือจากปลาสดมาผ่านกระบวนการอัลตราฟิเตรชัน โดยใช้แผ่นกรองที่มีรูพรุนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคขนาดเท่ากับ 3, 5, 10 และ 30 กิโลดาลตัน พบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนขนาด 10 และ 30 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอิมัลชันและโฟมได้ดี นอกจากนั้น โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนขนาด 10 กิโลดาลตันยังมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้อีกด้วย

Shiau and Chai (1999) กล่าวว่าการใช้เทคโนโลยีการกรองด้วยเมมเบรนเป็นวิธีที่ไม่ยุ่งยาก และไม่ต้องใช้ความร้อน สามารถประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารได้หลายอย่าง เช่น นม น้ำผลไม้ โปรตีน และได้ใช้อัลตราฟิเตรชันเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำเลี้ยงหอยนางรมทำให้ได้โปรตีนเข้มข้นขึ้น 18 เท่า และลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 47

ดังนั้นการนำเทคโนโลยีเมมเบรนมาใช้เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่ โดยกรองเพื่อแยกไขมัน คอลลอยด์ สิ่งสกปรก ตะกอนและโปรตีนโมเลกุลใหญ่ออกไปจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต เมื่อเทียบกับวิธีอื่นนั้น การใช้เทคโนโลยีเมมเบรนมีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีอื่น นอกจากนี้ได้มีการนำเทคโนโลยีเมมเบรนมาใช้กับอุตสาหกรรมหลายด้าน เช่น นม น้ำดื่ม น้ำผลไม้ การบำบัดน้ำเสีย จึงเป็นไปได้ว่าเทคโนโลยีเมมเบรนเป็นเทคโนโลยีที่มีความเหมาะสมในอุตสาหกรรมทั้งในด้านประสิทธิภาพการทำงานและที่สำคัญช่วยประหยัดค่าใช้จ่าย รวมทั้งระยะเวลาในการผลิตก็สั้นลงอีกด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 โครงไก่จากบริษัท เบทาโกร จำกัด (มหาชน)

1.2 เอนไซม์อัลคาเลส 2.4 L (alcalase) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์บริษัท NOVO Industri A/S Copenhagen Denmark มีความสามารถในการทำงาน 2.4 AU/g มีลักษณะเป็นของเหลวใสสีน้ำตาลแดง

2. อุปกรณ์ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

2.1 ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน ขนาด 50 กิโลดาลตัน (Microfiltration Membrane) (KALIFILTER 2 CA-0910H-WHITE)

2.2 อุปกรณ์เครื่องครัว

2.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Hot air oven) (Memmert)

2.4 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate Centrifuge) (HITACHI himac CR20B2)

2.5 หม้อนิ่งความดันสูง (Retort gas)

2.6 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) (Orion 410A)

2.7 ผ้ากรองในลอน

2.8 เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Vacuum Evaporator)

3. อุปกรณ์วิเคราะห์ทางเคมี

3.1 เครื่องมือวิเคราะห์โปรตีน (Macro-Kjeldahl digestion and distillation apparatus)

3.2 เครื่องมือวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet's apparatus)

3.3 ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)

3.4 เตาเผาถ่าน (Muffle furnace)

3.5 เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (BIORAD)

3.6 เครื่องวัดสี (Spectrophotometer) (HunterLab Model D25D3)

3.7 เครื่องวัดความขุ่น (Spectrophotometer)

วิธีการ

1. วิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีในด้านโปรตีนและความชื้นของโครงไก่บด

นำโครงไก่ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (by-product) ของโรงงานอุตสาหกรรมไก่สดแช่เยือกแข็ง มาล้างทำความสะอาด แยกหนังและไขมันออก จากนั้นนำไปบดหยาบเพื่อลดขนาดอนุภาคโดยการ สับด้วยมีดและควบคุมให้วัตถุดิบมีขนาดสม่ำเสมอ จากนั้นสุมตัวอย่างโครงไก่บดมาเพื่อ วิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีในด้านปริมาณโปรตีน และปริมาณความชื้น (AOAC, 1990) ซึ่ง โครงไก่ที่บดที่ได้นี้จะนำมาใช้ในการศึกษาข้อ 2 และ 3 ต่อไป โดยในงานวิจัยนี้จะเรียกส่วน ดังกล่าวนี้ว่า “โครงไก่บด”

2. การหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยหม้อนึ่งความดัน

2.1 การหาอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือ

การศึกษการหาอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือในข้อนี้เราจะตรวจสอบ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดจากโครงไก่บดด้วยความร้อนในหม้อนึ่งความดัน โดย ปัจจัยที่ศึกษาคือ อัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 (โดย น้ำหนัก) ซึ่งอัตราส่วนที่ใช้มีดังนี้คือ โครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 3:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 และ 0.3:1 โดยน้ำหนัก โดยเริ่มจากการนำโครงกระดูกไก่มาล้างทำความสะอาด แยกหนังและไขมันออก จากนั้นนำมาสับบดให้แตกด้วยมีดควบคุมขนาดให้มีความสม่ำเสมอ (จากการเตรียมในข้อ 1) เตรียมสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก บรรจุลงขวดแก้วพร้อมโครงไก่บดใน อัตราส่วนต่างๆ ดังต่อไปนี้ โครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 3:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 และ 0.3:1 โดยน้ำหนัก ซึ่งแต่ละอัตราส่วนมีน้ำหนักโครงไก่บดกับสารละลายเกลือรวมกันเท่ากับ 150 กรัม ปิดฝาขวดแก้วให้สนิท และนำเข้าปัสกัดในหม้อนึ่งความดัน (Retort gas) โดยควบคุมอุณหภูมิใน การสกัดเท่ากับ 120°C และเวลาการสกัดเท่ากับ 120 นาที ตั้งให้เย็นแล้วกรองด้วยผ้าขาวบางแล้วจึง ใช้มือบีบแยกน้ำสกัดออกมาจากโครงกระดูกโดยบีบจนกระทั่งโครงไก่บดแห้งสนิทไม่สามารถบีบ น้ำสกัดออกมาได้อีก จึงนำน้ำสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อให้ไขมัน

แยกชั้นกับโปรตีน จากนั้นทำการแยกไขมันออกโดยวิธีการดักออกได้เป็นน้ำสกัดโปรตีน นำน้ำสกัดโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ข) และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่าง เลือกสถานะที่เหมาะสมและนำสถานะที่เลือกไปทดลองในข้อ 2.2 ต่อไป

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อเลือกอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือที่ให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดสูงที่สุด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (จริญ, 2534)

2.2 การหาเวลาและอุณหภูมิในการสกัด

การศึกษาเวลาและอุณหภูมิในการสกัดในข้อนี้จะตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดโปรตีนจากโครงไก่บดด้วยความร้อนในหม้อหุงความดัน โดยศึกษาปัจจัยที่ 2 ปัจจัย คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัด (110°C และ 120°C) และระยะเวลาในการสกัด (60, 90 และ 120 นาที) โดยเริ่มจากการนำวัตถุดิบโครงไก่ล้างทำความสะอาด แยกหนังและไขมันออกจากนั้นนำมาสับให้แหลกด้วยมีดควบคุมขนาดให้มีความสม่ำเสมอ (จากการเตรียมในข้อ 1) เตรียมสารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก และบรรจุลงขวดแก้วพร้อมโครงไก่บดในอัตราส่วนโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 โดยน้ำหนัก (จากการทดลองที่ 2.1) ปิดฝาขวดแก้วให้สนิทและนำไปสกัดในหม้อหุงความดัน ใช้อุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 110°C และ 120°C ใช้เวลาในการสกัดเท่ากับ 60, 90 และ 120 นาที จากนั้นตั้งให้เย็นแล้วกรองน้ำสกัดด้วยผ้าขาวบางแล้วจึงใช้มือบีบแยกน้ำสกัดออกมาจากโครงกระดูกโดยบีบจนกระทั่งโครงไก่บดแห้งสนิทไม่สามารถบีบน้ำสกัดออกมาได้อีก จากนั้นจึงนำน้ำสกัดที่ได้ไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อแยกไขมันออกจากน้ำสกัดที่ได้ โดยไขมันจะแยกตัวจากโครงไก่บดและลอยอยู่บนผิวของสารละลายใช้วิธีตักแยกไขมันออก ส่วนที่เหลือคือน้ำสกัดโปรตีน นำน้ำสกัดโปรตีนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ข) และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ในแต่ละตัวอย่าง

ข้อมูลที่ได้นำไปเปรียบเทียบเพื่อเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่บด โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design :

CRD) ซึ่งจัดหน่วยการทดลองเป็นแบบ 2x3 Factorial Experiment ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (จริญ, 2534)

ทำการตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยการศึกษาขนาดโมเลกุลของวัตถุดิบก่อนการย่อยสลายจะให้ความเข้มข้นของแผ่นเจลเท่ากับร้อยละ 16 โดยใช้ไกลซีนเป็น running buffer และใช้ Marker ขนาด 10-250 กิโลดาลตัน ซึ่งคัดแปลงจากวิธีของ Laemmli, (1970) ส่วนการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตจะให้ความเข้มข้นของแผ่นเจลเท่ากับร้อยละ 18 ซึ่งคัดแปลงจากวิธีของ Schagger and Jagow โดยใช้ไตรซินเป็น running buffer และใช้ Marker ขนาด 2.5-45 กิโลดาลตัน (1987) (ภาคผนวก ข)

3. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยเอนไซม์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่บดด้วยเอนไซม์ในข้อนี้นี้จะทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีน ค่าระดับการย่อยสลาย และความยาวสายเปปไทด์ ทั้งหมด 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลส (ร้อยละ 0, 0.05, 0.15 และ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง) ระยะเวลาในการย่อยสลาย (30, 60, 90 และ 120 นาที) โดยเริ่มจากการนำน้ำสกัดโปรตีนที่ตกแยกไขมันออกแล้วมาปรับค่าความเป็นกรดเบสให้มีค่าเท่ากับ 8.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (เกรดสำหรับอาหาร) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 90 นาที จากนั้นจึงเติมเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05, 0.15 และ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60°C ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยเขย่าเป็นระยะ จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเหวี่ยงแยกที่ 2,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) โดยวิธีของ Qi *et al* (1997) (ภาคผนวก ข) และหาความยาวสายเปปไทด์โดยวิธีของ Adler-Nissen (1986) (ภาคผนวก ข) และตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ Tricine Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ให้ความเข้มข้นของแผ่นเจลเท่ากับร้อยละ 18 (Schagger and Jagow, 1987) (ภาคผนวก ข) เลือกสภาวะการย่อยที่ดีที่สุดจากทริทเมนต์ที่ให้ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดสูงที่สุด

การทดลองเป็นแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design : CRD) ซึ่งจัดหน่วยการทดลองเป็นแบบ 4x4 Factorial Experiment ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (เจริญ, 2534)

4. การกรองสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตให้บริสุทธิ์ด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน

การศึกษาการกรองสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตให้บริสุทธิ์ด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนนั้น จะตรวจสอบปัจจัยที่มีผลต่อค่าสี ค่าความขุ่น และค่าความเข้มข้นของกลีโนวไก์ โดยศึกษาความแตกต่างระหว่างสารที่ผ่านการกรองและไม่ได้ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน โดยเริ่มจากการนำสารละลายส่วนใสของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการเหวี่ยงแยกที่ 2000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ด้วยเครื่อง Refrigerate Centrifuge มากรองให้บริสุทธิ์โดยใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน โดยใช้เมมเบรนเซรามิกที่มีความสามารถในการกรองอนุภาคที่มีขนาดเล็กกว่า 50 kDa เป็นเมมเบรนแบบไหลขวาง (Cross flow Microfiltration) อัตราการกรอง (flow rate) ประมาณ 20 ลิตรต่อนาที ความดันที่ใช้ประมาณ 5 บรรยากาศ เพื่อกรองแยกไขมัน คอลลอยด์ต่างๆ และสิ่งสกปรก รวมทั้งตะกอนโปรตีน ออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการกรองมาวิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่อง MINOLTA Spectrophotometer โดยเลือกสถานะในการวัดเป็นแบบ Specular Component Included (SCI) และวัดความขุ่นเพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ค่า absorbance 420 nm เพื่อเปรียบเทียบตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรอง เพื่อหาข้อได้เปรียบของการใช้เครื่องมือทางเมมเบรนในอุตสาหกรรมอาหารและทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านความเข้มข้นของกลีโนวไก์โดยวิธีของ Hoyle and Merritt, (1994)

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบการเลือกใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน เพื่อให้สารละลายที่ได้มีค่าสี ค่าความขุ่น และค่าความเข้มข้นของกลีโนวไก์น้อยที่สุด ซึ่งมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองด้วยวิธี Duncan' s New Multiple Range Test (เจริญ, 2534)

5. คุณภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นในด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

การศึกษาคุณภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นในด้านองค์ประกอบทางเคมีของอาหารในข้อนี้เน้นศึกษาการเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตและโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น เริ่มต้นโดยการนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันไปทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (vacuum evaporator) ระเหยให้มีปริมาตรลดลง 4 เท่า จากนั้นนำผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่ได้ไปบรรจุลงขวดแก้วปิดสนิทแล้วทำการฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า ไฟเบอร์ รวมทั้งปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณโปรตีนในปริมาณที่สูง และมีปริมาณไขมันต่ำ ซึ่งมีการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design : CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของหน่วยทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (จริญ, 2534)

วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์เพื่อให้ทราบถึงชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยเปรียบเทียบกับมาตรฐานของ WHO

สถานที่และระยะเวลาการทําวิจัย

1. สถานที่

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร และอาคารแปรรูป
ของคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

อาคารแปรรูปของสถาบันคั้นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

2. ระยะเวลาการทําวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ เริ่มตั้งแต่เดือน พฤศจิกายน 2548 ถึงเดือน พฤศจิกายน 2550

ผลและวิจารณ์

1. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงไก่บด

เมื่อนำโครงไก่ที่ได้จากโรงงานแปรรูปไก่สดของบริษัทเบทาโกร (ภาพที่ 3) มาสับให้เป็นชิ้นเล็ก (ภาพที่ 4) และสุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น และปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก และ ภาคผนวก ข) ให้ผลดังนี้คือ โครงไก่บดประกอบด้วยปริมาณความชื้นร้อยละ 72.2 (โดยน้ำหนักสด) และโปรตีนร้อยละ 14.82 (โดยน้ำหนักสด) ซึ่งโครงไก่ประกอบด้วยส่วนกระดูกและเนื้อไก่ที่ติดกระดูก ปริมาณโปรตีนที่พบถึงร้อยละ 14.2 ในโครงไก่จึงจะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ให้ได้มากที่สุด

จากการที่ส่วนของโครงกระดูกที่ใช้เป็นวัตถุดิบประกอบด้วยกระดูกอ่อน กระดูกแข็ง และพังศืด ซึ่งมีแร่ธาตุและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้ส่วนของโครงกระดูกไก่มีความแข็ง และเหนียว ซึ่งส่งผลต่อการลดขนาดของวัตถุดิบ โดยไม่สามารถบดโครงกระดูกไก่ให้มีความละเอียดด้วยเครื่องบดผสมแบบธรรมดาได้ ดังนั้นจึงต้องมีการใช้มีดสับเพื่อลดขนาดโดยควบคุมให้มีขนาดที่เท่ากัน วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองจึงมีลักษณะเป็นกระดูกชิ้นเล็กๆ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร โดยจะเรียกส่วนนี้ว่าโครงไก่บด และเนื่องจากโครงไก่เป็นผลพลอยได้จากการชำแหละชิ้นส่วนต่างๆ ของไก่จึงทำให้มีหนังและไขมันอยู่เป็นจำนวนมากและการทดลองต้องการนำสกัดที่เป็นโปรตีน จึงต้องมีการดึงหนังและไขมันออกก่อนที่จะทำการบด



ภาพที่ 3 ไครงไก่ที่ผ่านการดึงหนังและไขมันออกแล้วจากโรงงานชำแหละไก่



ภาพที่ 4 ไครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

2. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยหม้อนึ่งความดัน

2.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือ

สกัดเอาสารอาหารจากโครงไก่บดโดยใช้สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วนโครงไก่บดต่อน้ำเท่ากับ 3:1, 2:1, 1:1, 0.5:1 และ 0.3:1 โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะความดันสูง โดยควบคุมอุณหภูมิใจกลางอาหารเท่ากับ 120°C เป็นเวลา 120 นาที พบว่าโครงไก่มีลักษณะนิ่มและสามารถใช้ผ้าขาวบางกรองน้ำสกัดและบีบของแข็งให้แห้งและแห้งด้วยมือได้ง่าย เมื่อนำของเหลวที่แยกได้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C 12 ชั่วโมงเพื่อลดอุณหภูมิให้ต่ำลงทำให้แรงยึดเหนี่ยวระหว่างโมเลกุลของไขมันและโปรตีนในน้ำสกัดลดลง ทำให้โมเลกุลของไขมันถูกปลดปล่อยออกมา และจากการที่ไขมันเป็นโมเลกุลที่มีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำและโปรตีนจึงทำให้ไขมันเกิดการลอยตัวและจับตัวเป็นของแข็งอยู่บริเวณผิวหน้าของน้ำสกัดโปรตีน จึงดักไขมันแยกออกได้ง่าย ลักษณะของส่วนผสมโครงไก่บดและน้ำเกลือที่ใช้สกัดก่อนให้ความร้อน หลังให้ความร้อน และเมื่อทำให้เย็นลงเป็น 4°C แสดงดังภาพที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในน้ำสกัดจากโครงไก่บด พบว่า อัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 ได้ปริมาณร้อยละของโปรตีนสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 8.24 (ภาพที่ 8) โดยสูงกว่าที่อัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 0.3:1, 0.5:1, 1:1 และ 3:1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งจากการทดลองสกัดที่ระดับอัตราส่วนต่างๆ พบว่าสารละลายเกลือควรมีปริมาณเพียงพอท่วมชิ้นของแข็งคือโครงไก่บดจึงจะเกิดการละลายของแข็งได้ดีดังเช่นอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 (ภาพที่ 5) แต่ถ้าของเหลวมากเกินไป เช่นอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 0.3:1, 0.5:1, 1:1 จะทำให้ส่วนของน้ำสกัดมีความเจือจาง แต่ถ้าของเหลวน้อยเกินไปจะไม่มีตัวทำละลายไปละลายหรือชะเอาตัวถูกละลายออกมาดังเช่นอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 3:1

ดังนั้นในการทดลองเพื่อหาอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อปริมาณน้ำ ที่ใช้ในการสกัดสารอาหารจากโครงไก่บด จึงเลือกอัตราส่วนโครงไก่บดต่อน้ำเท่ากับ 2:1 มาเพื่อใช้ในการทดลองในการทดลองต่อไป เนื่องจากในการทดลองต้องการอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือที่ให้ปริมาณโปรตีนในส่วนสกัดสูงที่สุด

ในการทดลองนี้ น้ำสกัดโปรตีนที่ได้มีตัวทำละลายคือสารละลายเกลือเจือจางซึ่งโปรตีนที่อยู่ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทคือโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการละลายได้ในน้ำเกลือ และส่วนที่ไม่ละลายจะจับตัวกันเป็นก้อนและตกตะกอนลงมา และจากผลการทดลองจะเห็นว่าสมบัติการละลายของโปรตีนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อน้ำหนักของโปรตีน กล่าวคือ การที่โปรตีนสามารถละลายอยู่ในน้ำได้มีเหตุผล 2 ประการคือ โมเลกุลของโปรตีนมีส่วนที่ชอบน้ำ สามารถเกิดอันตรกิริยากับน้ำ เรียกส่วนนี้ว่า Hydrophilic patches ซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าเอาโมเลกุลของน้ำมาล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีน อีกสาเหตุหนึ่งคือ บนโมเลกุลของโปรตีนแรงที่เกิดจากแรงผลัดจากประจุที่อยู่บนโมเลกุล ทำให้โมเลกุลของโปรตีนอยู่ห่างกัน จึงไม่สามารถรวมตัวเข้ามาอยู่ใกล้กัน ดังนั้นปัจจัยใดก็ตามที่สามารถเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยตัวเอง (protein-protein interaction) หรือลดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำ (protein-water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนลดลง ในทางตรงกันข้าม ถ้าลดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein-water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนด้วยตัวเอง (protein-protein interaction) หรือเพิ่มอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและน้ำ (protein-water interaction) ทำให้ความสามารถในการละลายน้ำของโปรตีนเพิ่มขึ้นบนโมเลกุลของโปรตีนสามารถแบ่งส่วนที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการละลายได้เป็นสองส่วนคือ ส่วนที่ชอบน้ำสามารถเกิดแรงดึงดูดกับน้ำได้ดี (hydrophilic patches) กว่าส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) พฤติกรรมของโมเลกุลของโปรตีนในการละลายโปรตีนโดยการผลัดกันเนื่องจากประจุสุทธิบนโมเลกุลของโปรตีนแต่ละโมเลกุลมีประจุชนิดเดียวกัน ทำให้โมเลกุลโปรตีนอยู่ห่างกันมากพอ จึงสามารถละลายอยู่ในน้ำได้เมื่อมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่มีประจุต่างชนิดกัน ทำให้โปรตีนเข้ามาอยู่ใกล้กัน สามารถรวมตัวกันตกตะกอนลงมาได้ (Scopes, 1987)

ความสามารถในการละลายของโปรตีนมีความสำคัญกับความสมดุลของความชอบน้ำและความไม่ชอบน้ำของโปรตีน (hydrophobic/hydrophilic balance) ดังนั้นองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนที่มีอยู่จึงมีส่วนสำคัญต่อลักษณะการละลายของโปรตีน เพราะการละลายของโปรตีนเป็นการบ่งชี้ถึงความแตกต่างในเรื่องพลังงานอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนกับโปรตีนและโปรตีนกับสารละลาย (Damodaran and Paraf, 1997)

การสกัดโปรตีนในการทดลองนี้ใช้สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก เพื่อให้ตัวทำละลายมีลักษณะเป็นสารละลายเกลืออ่อนๆ เป็นการเพิ่มความสามารถในการละลายให้ดียิ่งขึ้น เนื่องจากความแรงของประจุเป็นปัจจัยสำคัญต่อการละลายของโปรตีน โดยกลไกของผลจากความแรงของประจุที่มีต่อความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน ไอออนของเกลือที่

มีความเข้มข้น 0.1-1 โมลาร์ จะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยไอออนของเกลือจะเกิดปฏิกิริยาจับกับหมู่ที่มีประจุตรงข้ามในโปรตีน ทำให้เกิดเป็น double layer ของหมู่ ionic ซึ่งจะทำให้ electrostatic interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนลดลง ทำให้โปรตีนสามารถละลายได้มากขึ้น (Zayas, 1997) ถ้าความเข้มข้นของเกลือมากกว่า 1 โมลาร์ ความสามารถในการละลายของโปรตีนจะลดลง (salting out) เนื่องจาก hydrophobic interaction และการเกิด aggregation เพิ่มขึ้น และเกิดการขัดขวางการจับตัวของโปรตีนกับน้ำ ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ที่ความเข้มข้นของไอออนของเกลือสูง โมเลกุลของน้ำส่วนใหญ่จะจับกับไอออนของเกลือมากกว่าจับกับโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งทำให้เกิดการ interaction ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับโปรตีน มากกว่าโมเลกุลของโปรตีนกับน้ำ ทำให้เกิดการตกตะกอน (Vojdani, 1996)



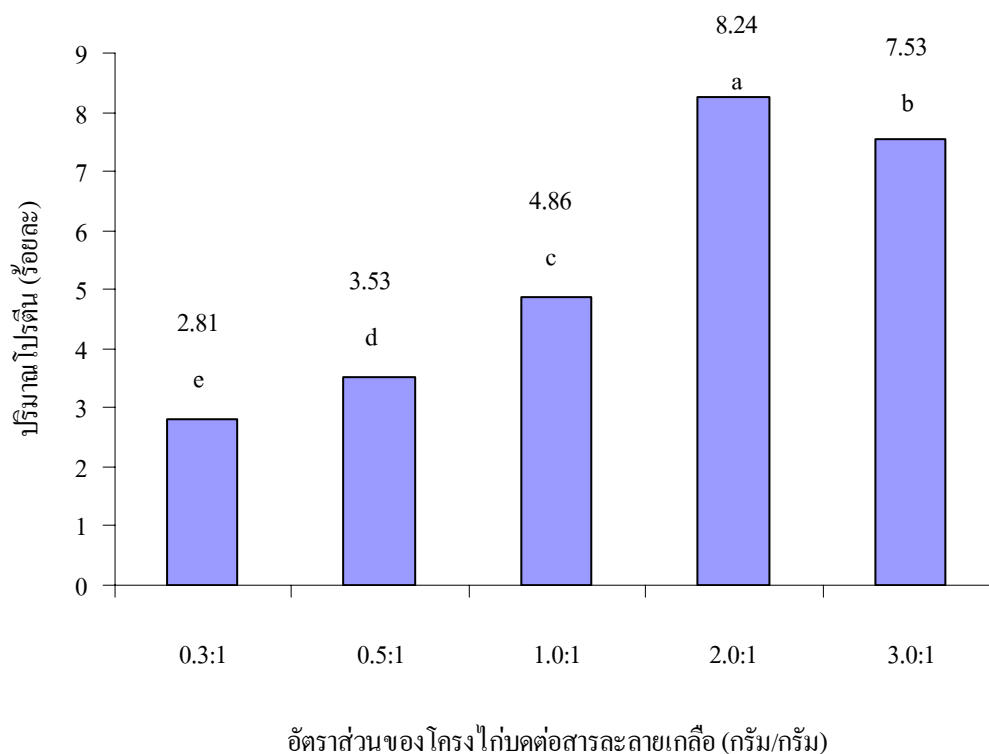
ภาพที่ 5 โครงไก่บดผสมน้ำที่บรรจุในขวดแก้วก่อนนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันสูง



ภาพที่ 6 โคร่งไถบดที่ผ่านการสกัดด้วยความร้อนสูงในหม้อนึ่งความดัน



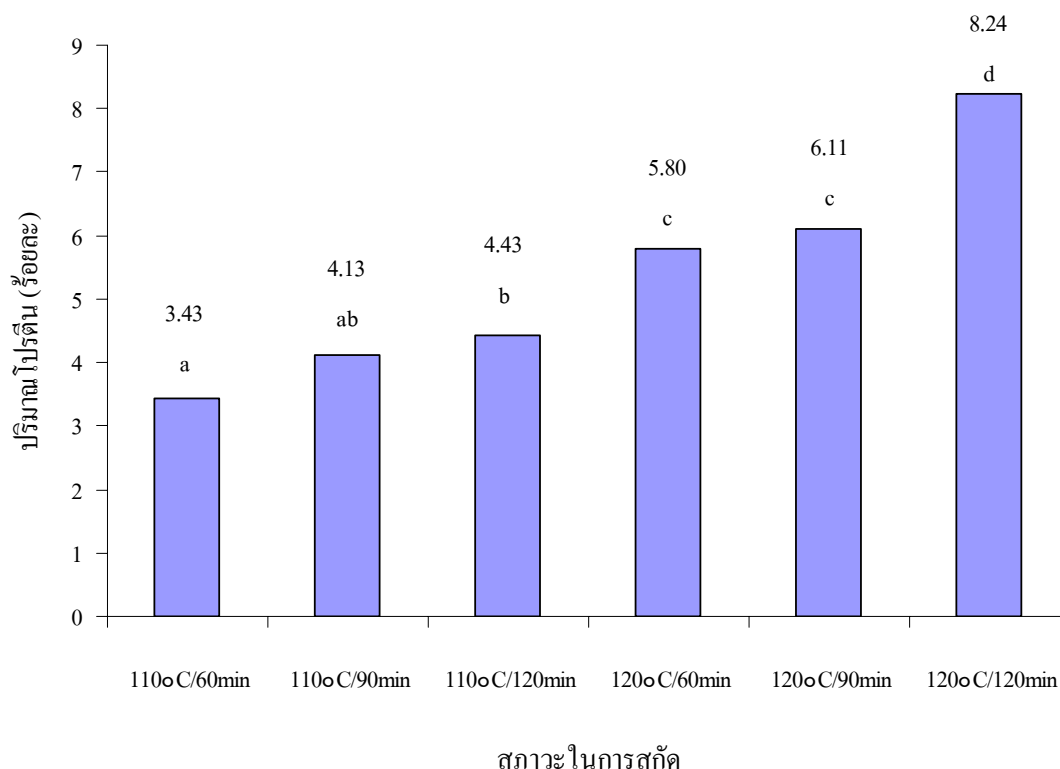
ภาพที่ 7 น้ำสกัดจากโคร่งไถบดที่นำไปลดอุณหภูมิเพื่อแยกไขมันและโปรตีน



ภาพที่ 8 ปริมาณของโปรตีนในน้ำสกัดจากโครงไถที่ความดันสูงอุณหภูมิ 120°C เวลา 120 นาที ด้วยอัตราส่วนโครงไถบดต่อสารละลายเกลือที่ใช้ในการสกัดต่างๆ กัน

2.2 ผลการศึกษาเวลาและอุณหภูมิในการสกัด

สกัดเอาสารอาหารจากโครงไถบดโดยใช้สารละลายเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก ที่อัตราส่วนโครงไถบดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 โดยน้ำหนัก ภายใต้สภาวะความดันสูง โดยควบคุมอุณหภูมิใจกลางอาหารเท่ากับ 110 และ 120°C เป็นเวลา 60, 90 และ 120 นาที พบว่า การสกัดด้วยความดันสูงโดยใช้อุณหภูมิ 120°C และใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง สกัดได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดกว่าทุกตัวอย่าง โดยเมื่อเพิ่มเวลาในการสกัดนานขึ้นจาก 60 นาทีเป็น 90 นาที และ 120 นาที พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีปริมาณโปรตีนสูงขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบในเรื่องของความร้อนที่ใช้ในการสกัด โดยทดลองสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 110°C และ 120°C พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยอุณหภูมิในการสกัดเท่ากับ 120°C ได้น้ำหนักโปรตีนสูงกว่าการสกัดด้วยอุณหภูมิ 110°C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 9 ปริมาณของโปรตีนในน้ำสกัดโครงไก่ที่ความดันสูง สกัดที่อุณหภูมิ 110 และ 120°C เวลา 60, 90 และ 120 นาที โดยใช้อัตราส่วนของโครงไก่กับต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1

ในส่วนของอุณหภูมิที่ส่งผลต่อการละลายของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยทั่วไปโปรตีนจะมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 0 ถึง 40-45°C แต่เมื่ออุณหภูมิของสารละลายเพิ่มสูงกว่านี้โปรตีนจะเกิดการสูญเสียสภาพตามธรรมชาติ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลต่อพันธะที่เป็น non-covalent ซึ่งเป็นพันธะที่ยึดโมเลกุลของโปรตีนในการเกิดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิ เช่น พันธะ hydrogen, hydrophobic และ electrostatic เมื่อโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิเกิดการคลายตัว ส่วนที่ห่อหุ้ม (hydrophobic) จะเพิ่มมากขึ้น ทำให้โปรตีนจับกับโมเลกุลของน้ำได้น้อยลงและเกิดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนมากขึ้นและเกิดการตกตะกอนของโปรตีน (Vojdani, 1996) การให้ความร้อนสูงแก่วัตถุดิบที่เป็นส่วนของกระดูกจะทำให้กระดูกอ่อนนุ่มขึ้น และการใช้ความร้อนสูงจะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายกลายเป็นกรดอะมิโนจำนวนมาก (Jelen *et al*, 1979) McBride *et al*, (1961) กล่าวว่าปลาทั้งตัวบดละเอียดเมื่อได้รับความร้อนจะทำให้โปรตีนคอลลาเจนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งไม่ละลายน้ำเปลี่ยนเป็นเจลาตินซึ่งละลายน้ำได้ ถ้าเติมเอนไซม์โปรตีเอสลงในเนื้อปลานี้จะทำให้เอนไซม์ลงไปย่อยเนื้อปลาได้ดีขึ้น สุปรานี (2539) พบว่าวัตถุดิบที่เตรียมโดยการให้ความร้อนสูง 121°C เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อัล

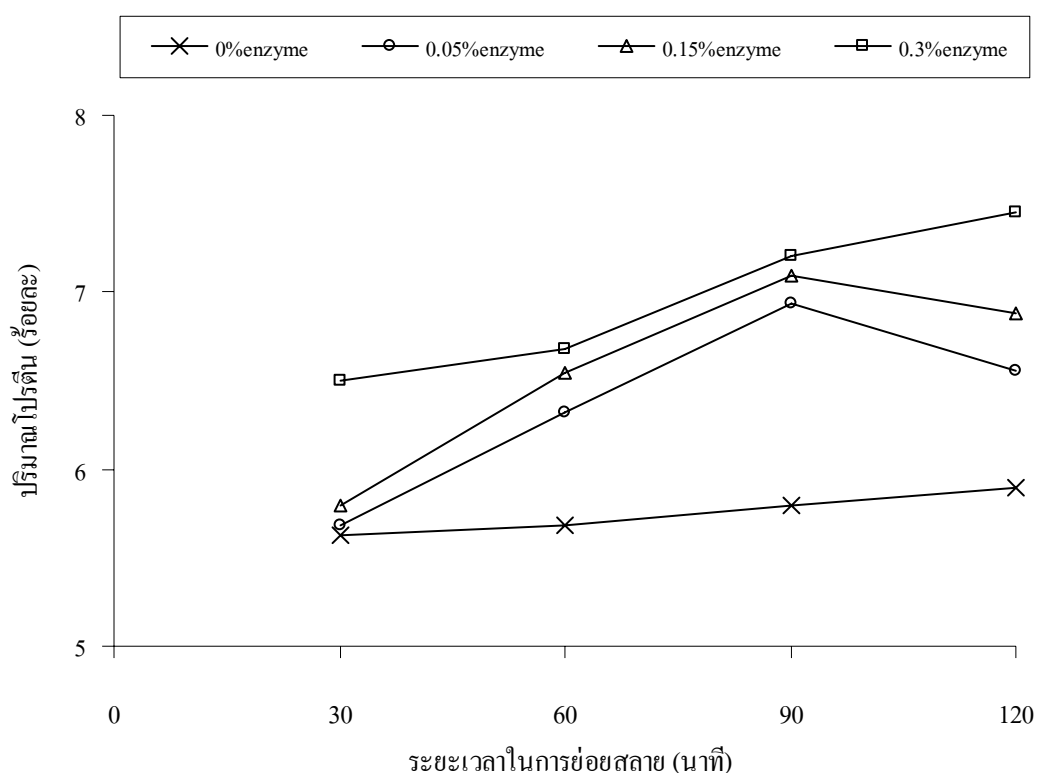
คาเลสหรือปาเปน โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จะมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าวิธีที่ไม่ผ่านขั้นตอนการเตรียมใดๆ

3. ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการย่อน้ำสกัดจากโครงไก่ด้วยเอนไซม์

ผลการเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยสลายที่ทำให้ปริมาณโปรตีน และค่าระดับการย่อยสลายสูงที่สุด โดยการย่อยสลายน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่บด โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.05, 0.15 และ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง ทำการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที โดยทำการเขย่าเป็นระยะ จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปเหวี่ยงแยกที่ 2,000 g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl วิเคราะห์ค่าระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) โดยวิธีของ Qi *et al* (1997) ความยาวสายเปปไทด์ (Adler-Nissen, 1986) ผลการทดลองในตารางที่ 5 และภาพที่ 10 แสดงให้เห็นว่า ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยรวมทั้งปฏิสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อปริมาณโปรตีนในน้ำสกัด ($P < 0.05$) โดยเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นจาก 30 นาที เป็น 60, 90 และ 120 นาที ปริมาณโปรตีนจะมีค่าสูงขึ้น และเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าสูงขึ้นด้วย ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.30% ของปริมาณโปรตีน เอนไซม์สามารถย่อยสลายน้ำสกัดโครงไก่ทำให้ได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 7.45 (โดยน้ำหนัก) และเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยสลายของเอนไซม์จาก 30 นาที เป็น 120 นาที ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้มีค่าสูงขึ้น เช่นเดียวกัน Tarky *et al* (1973) รายงานว่า กลไกการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซมนั้นเริ่มจากการที่เอนไซม์แข่งขันกันดูดซับที่บริเวณผิวของสารตั้งต้นแล้วเข้าไปทำให้พันธะเปปไทด์ของโปรตีนเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยกรดอะมิโนหรือเปปไทด์ที่ละลายได้สู่สารละลาย ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้นจะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายมากขึ้น ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จึงมีค่ามากขึ้น

เช่นเดียวกับค่าระดับการย่อยสลาย พบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อย รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ของทั้ง 2 ปัจจัย มีผลต่อค่าระดับการย่อยสลาย ($P < 0.05$) โดยเมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยสลายและความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลส ค่าระดับการย่อยสลายจะสูงขึ้น (ตารางที่ 5 และภาพที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของรุ่งอรุณ (2545) ในการย่อยสลายหัวปลาและไส้ปลาด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยปกติแล้วกลไกการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว

ในช่วงต้นๆ ของการย่อยสลาย ทำให้ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่อระยะเวลาย่อยสลายมากขึ้นอัตราการย่อยสลายจะลดลงและเข้าสู่สมดุล ซึ่งปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จะมีค่าคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (Mohr, 1980) ซึ่งในการทดลองนี้การย่อยสลายน้ำสกัดจากโครงไก่บดด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.30% ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง เป็นเวลานาน 120 นาที จะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้มีปริมาณโปรตีนสูงสุดคือร้อยละ 7.45 และให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดคือร้อยละ 54

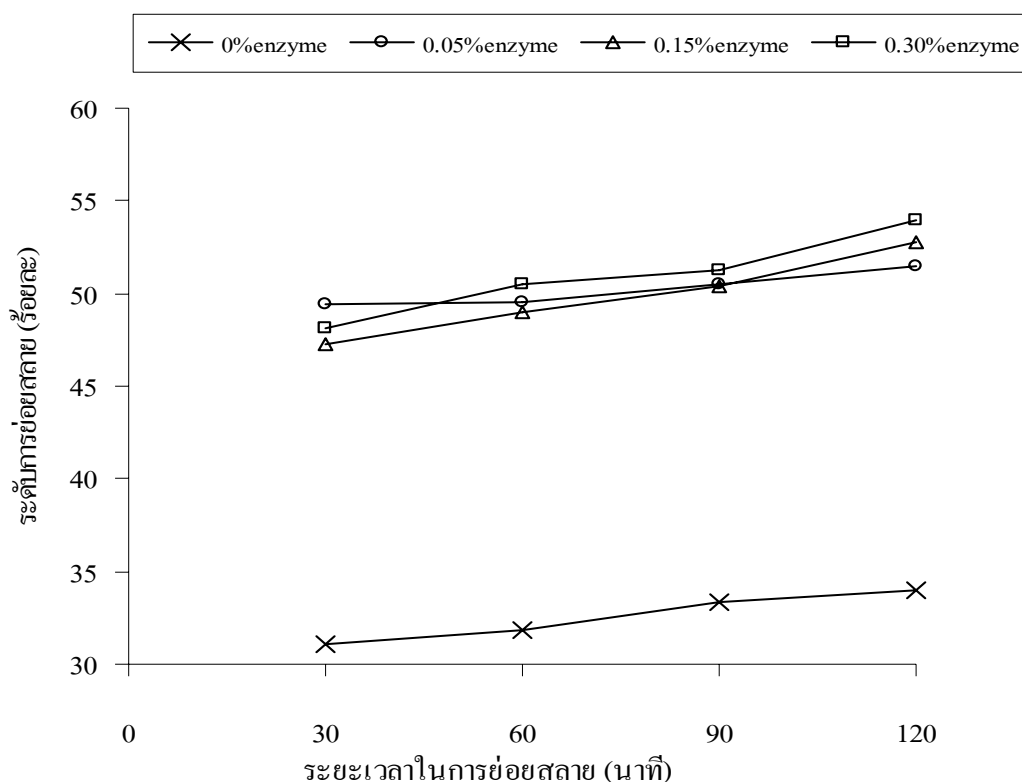


ภาพที่ 10 ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ตารางที่ 5 ปริมาณโปรตีน ระดับการย่อยสลาย และความยาวสายเปปไทด์ ในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ความเข้มข้นของเอนไซม์ (ร้อยละของปริมาณโปรตีน)	ระยะเวลาในการ ย่อยสลาย (นาที)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)	ระดับการย่อย สลาย (ร้อยละ)	ความยาวสายเปป ไทด์
0	30	5.63 a	31.11a	3.21e
	60	5.68 a	31.87 a	3.14e
	90	5.80 a	33.33 b	3.00d
	120	5.90 ab	34.04 b	2.94d
0.05	30	5.68 a	49.45 ef	2.02bc
	60	6.32 abc	49.50 ef	2.02bc
	90	6.94 cdf	50.45 fg	1.98abc
	120	6.56 bcde	51.43 g	1.94ab
0.15	30	5.80 a	47.31 c	2.02bc
	60	6.55 bcde	49.00 de	1.91ab
	90	7.09 def	50.44 fg	1.95ab
	120	6.88 cdef	52.73 h	1.90a
0.30	30	6.50 bcd	48.08 cd	2.08c
	60	6.68 cde	50.46 fg	1.98abc
	90	7.21 ef	51.30 g	1.95ab
	120	7.45 f	54.00 h	1.92ab

จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนมาระเหยเพื่อลดปริมาณลง 4 เท่าตัว โดยใช้เครื่องระเหยสุญญากาศ (Vacuum Evaporator) ที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 55°C พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตมีลักษณะเข้มข้นขึ้นและมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย ดังภาพที่ 17



ภาพที่ 11 ระดับการย่อยสลายในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

หมายเหตุ: อักษรตัวแรกแสดงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ (a = ความเข้มข้นร้อยละ 0, b = ความเข้มข้นร้อยละ 0.05, c = ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ d = ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีในตัวอย่าง)

ผลการทดลองหาค่าระดับการย่อยสลายและความยาวสายเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่บด ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยสลายต่างๆ ดังภาพที่ 10-11 และตารางที่ 5 พบว่าการเพิ่มระยะเวลาการย่อยสลายจาก 30 นาทีเป็น 120 นาที ค่าระดับการย่อยสลายจะเพิ่มสูงขึ้นและความยาวสายเปปไทด์จะลดลง และการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้จากร้อยละ 0.05 เป็นร้อยละ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง จะทำให้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้มีค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นและความยาวสายเปปไทด์ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ รุ่งอรุณ (2545) ที่ใช้เอนไซม์อัลคาเลส และผลการทดลองของ Quaglia and Orban (1987 a) ที่ใช้เอนไซม์อัลคาเลส นิวเทรส และปาเปน ย่อยสลายเนื้อปลาจารีดิน พบว่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงต้นของการย่อยสลาย หลังจากนั้นค่าระดับการย่อยสลายจะคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทั้งนี้เนื่องจาก

เกิดการแข่งขันกันระหว่างโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นและเปปไทด์ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ในการเข้าจับกับเอนไซม์ หรืออาจเนื่องมาจากปริมาณโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นได้หมดไป และเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ระดับการย่อยสลายจะสูงขึ้น

Adler-Nissen (1986) อธิบายว่าค่าระดับการย่อยสลายเป็นค่าที่ใช้บอกจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยังใช้ควบคุมขอบเขตการย่อยสลายเพื่อให้ได้โพลีเปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสม ซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าความยาวสายเปปไทด์โดยเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้น ความยาวสายเปปไทด์จะลดลง

จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนในของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบโดยนำโครงไก่มาสับด้วยมีดให้ละเอียดที่สุดและบีบน้ำออกมาและหาขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของเจลเท่ากับ 16% เจลและใช้โกลซินเป็น sample buffer (ภาพที่ 12) พบว่าของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบประกอบด้วยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-105 กิโลดาลตัน แถบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 105 กิโลดาลตันมีปริมาณเล็กน้อย โดยแถบโปรตีนอยู่หนาแน่นในช่วง 30-75 และ 10-15 กิโลดาลตัน แสดงว่าของเหลวที่ได้จากโครงไก่บดเป็นโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ ได้แก่ เอนไซม์ เม็ดสีในกล้ามเนื้อ และเม็ดเลือด จากผลการทดลองของ Lin *et al* (1995) พบว่าโปรตีนชาร์โคพลาสติกจากปลาแปซิฟิกไวต์คิงที่สูญเสียออกมาน้ำล้างเนื้อปลาจากกระบวนการผลิตซูริมมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 29-45 กิโลดาลตัน และพบโปรตีนไมโอพิลลาร์ ได้แก่ ไมโอซินน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 205 กิโลดาลตัน แต่ในการทดลองครั้งนี้ ภาพที่ 12 ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองคือโปรตีนจากโครงไก่บด พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาด 205 กิโลดาลตันเพียงเล็กน้อย จากแถบโปรตีนที่ปรากฏเพียงจางๆ ทั้งนี้เนื่องมาจากตัววัตถุดิบเองมีเอนไซม์โปรติเอสตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการย่อยสลายไมโอซิน Myosin heavy chain จากปลาซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 200 กิโลดาลตัน ซึ่งถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดคาเทปซินบี (cathepsin B) ได้เป็น 2 ส่วนย่อย คือ 150 และ 140 กิโลดาลตัน ในเวลา 21 ชั่วโมง และในส่วนของคาเทปซินแอล (cathepsin L) สามารถย่อยสลายส่วนย่อยของไมโอซินได้อีกภายในเวลา 21 ชั่วโมงเช่นกัน นอกจากนี้โปรตีนชาร์โคพลาสติกก็ถูกย่อยได้เช่นกัน

การย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสนั้นใช้สภาวะในการย่อยสลายที่เป็นเบส ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 8.5 เนื่องจากสภาวะดังกล่าวมีความเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ และจากการที่วัตถุดิบคือโครงไก่บด ซึ่งนอกจากมีองค์ประกอบที่เป็นกระดูกแล้วยังพบว่ามีเยื่อที่ติดมากับกระดูกอีกเป็นจำนวนมาก ซึ่งก็คือไมโอพิลลาร์โปรตีน และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective

tissue) สภาวะเบสจะไปมีผลทำให้โปรตีนในโครงสร้างกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการพองตัวเอนไซม์จึงเข้าไปทำงานได้ง่ายขึ้น

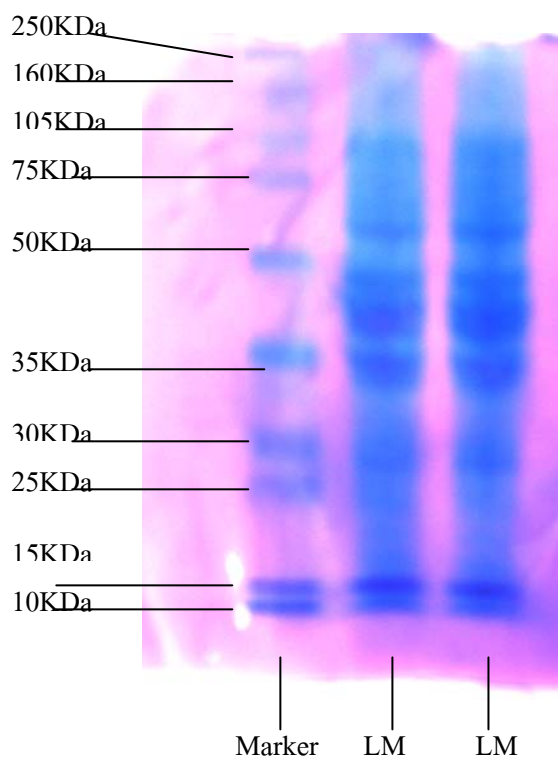
จากภาพที่ 13 เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลโปรตีนของสารละลายโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ (HD) ด้วย SDS-PAGE โดยใช้ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 18 และใช้โครซินเป็น sample buffer โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนของน้ำสกัดโปรตีนจากการนึ่งโครงไก่บด (ET), สารละลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูปไก่เครื่องหมายการค้า “เบอร์นาร์ด” (BR) และของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ (LM) จากผลการทดลองพบว่า การแยกของโปรตีนไม่ชัดเจนทั้งนี้อาจเป็นผลของเกลือในสารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีนและเทคนิคของการทำเจลอิเล็กโตรโฟริซิส ยังต้องมีการปรับปรุง แต่อย่างไรก็ดีสามารถประมาณค่าขนาดโมเลกุลของโปรตีนได้ดังนี้ สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่บด (HD) ประกอบด้วยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5-14.3 กิโลดาลตัน น้ำสกัดโปรตีนจากการนึ่งโครงไก่บด (ET) ที่ผ่านการสกัดด้วยความร้อนสูงมีแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5-45 กิโลดาลตัน สารละลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูปไก่เครื่องหมายการค้า “เบอร์นาร์ด” (BR) มีแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5-45 กิโลดาลตัน แต่แถบโปรตีนหนาแน่นในช่วงขนาดโมเลกุลช่วง 14.3-45 กิโลดาลตัน และใหญ่กว่า 45 กิโลดาลตันขึ้นไป และของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ (LM) มีแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 14.3-45 กิโลดาลตัน และใหญ่กว่า 45 กิโลดาลตันขึ้นไปเช่นเดียวกัน

จากการใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อศึกษาเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนในสารละลายต่างๆ อาทิเช่นในน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่ ก็จะพบว่าเฉพาะความร้อนเพียงอย่างเดียวก็ทำให้สารละลายโปรตีน (ET) ถูกย่อยสลายจนมีโมเลกุลขนาดเล็กบางส่วนแล้วดังที่ปรากฏในแถบโปรตีน (ภาพที่ 13) แต่ภายหลังจากนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ก็จะได้โปรตีนโมเลกุลเล็กเพิ่มขึ้นโดยเห็นได้ชัดว่าแถบโปรตีนของส่วนที่เป็นโปรตีนโมเลกุลใหญ่ได้หายไปจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต (HD) แต่การใช้วิธี SDS-PAGE เพื่อหาแถบของกรดอะมิโนซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 1 กิโลดาลตันนั้นไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยวิธีนี้

หากพิจารณาจากค่าระดับการย่อยสลายและค่าความยาวสายเพปไทด์ พบว่า ค่าระดับการย่อยที่สูงที่สุดคือที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์สูงที่สุดคือ ร้อยละ 0.30 ของปริมาณโปรตีน ระยะเวลาย่อยสลายนานที่สุดคือ 120 นาที ให้ค่าระดับการย่อยสลายร้อยละ 54 และค่าความยาวสายเพปไทด์ 1.92 มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5 ถึง 14.3 กิโลดาลตัน ซึ่งสารละลายโปรตีนดังกล่าวยังมีเพปไทด์ในปริมาณที่สูงอยู่เนื่องจากมีค่าระดับการย่อยสลายร้อยละ 54 ซึ่งหมายความว่ายังมี

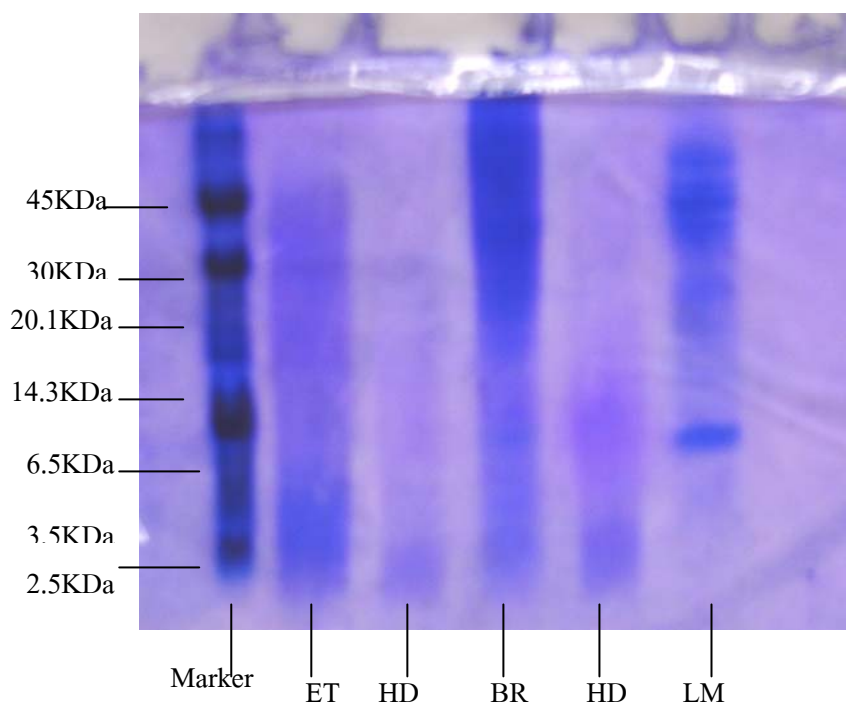
โปรตีนอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่ได้ถูกย่อยสลาย ถ้าต้องการให้ระดับการย่อยสลายมากกว่านี้อาจต้องพิจารณาการย่อยสลายในแบบอื่นๆ เช่นการย่อยสลายด้วยกรด เนื่องจากการย่อยสลายด้วยกรดนั้น พืชเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสพาร์ติกอยู่ทางปลายสายจะถูกย่อยสลายได้เร็วกว่าพันธะเพปไทด์อื่นๆ ประมาณ 100 เท่า (Shih, 1992) ทำให้ได้กรดอะมิโนมากกว่าและหลากหลายกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ แต่การย่อยสลายด้วยกรดมีข้อเสียคือ สภาพการย่อยสลายรุนแรงอาจทำให้ย่อยจนไม่เหลือกรดอะมิโน อาจจะเหลือเป็น ไนโตรเจน ไฮโดรเจน และออกซิเจน และสลายไปในที่สุด และกรดอะมิโนบางชนิดถูกทำลายไปเนื่องจากสภาพการย่อยสลาย และไม่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ง่ายเหมือนกับเอนไซม์ แต่ด้วยข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์คือให้ระดับการย่อยสลายไม่สูงเท่ากับการย่อยสลายด้วยกรด และค่าความยาวสายเพปไทด์มีค่าสูง

จากภาพที่ 13 ในการใช้วิธี SDS-PAGE ในการหาขนาดของโมเลกุลของโปรตีน พบว่าแถบโปรตีนของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต (HD) ในช่วงของขนาดโมเลกุลโปรตีนเดียวกันมีความเข้มของแถบโปรตีนน้อยกว่าแถบโปรตีนของน้ำสกัดโปรตีนจากการนึ่งโครงไก่ (ET) อาจเป็นเพราะการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทำให้เกิดโมเลกุลของโปรตีนขนาดเล็กกว่า 2.5 กิโลดาลตัน ซึ่งเป็นขนาดของกรดอะมิโน และจากการที่กรดอะมิโนมีขนาดเล็กทำให้เกิดการเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเจลออกไป จึงไม่ปรากฏแถบโปรตีนที่วิเคราะห์ผลออกมา หากพิจารณาจากการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (HD) ประกอบด้วยเพปไทด์ประมาณ 2.5-14.3 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ากรดอะมิโน



ภาพที่ 12 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในของเหลวจากโครมโทกราฟีที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 16

หมายเหตุ: อักษรที่อยู่ใต้แถบโปรตีนแสดงถึงชนิดของวัตถุดิบ (Marker = โปรตีนมาตรฐาน, LM = ของเหลวจากโครมโทกราฟีที่ใช้เป็นวัตถุดิบ)



ภาพที่ 13 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ได้จากการทดลอง ที่ความเข้มข้นของเจลเท่ากับร้อยละ 18

หมายเหตุ: อักษรที่อยู่ใต้แถบโปรตีนแสดงถึงชนิดของวัตถุดิบ (Marker = โปรตีนมาตรฐาน, ET = น้ำสกัดโปรตีนจากการนึ่งโครงไก่บด, HD = สารละลายโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์, BR = สารละลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูปลั๊กสกัดเครื่องหมายการค้า “แบรนด” และ LM = ของเหลวจากโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ)

การพิจารณาข้อดีของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (HD) นี้คือ โปรตีนที่ได้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่าสารละลายโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูปลั๊กสกัดเครื่องหมายการค้า “แบรนด” (BR) การบริโภคสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีกรดอะมิโนและมีโปรตีนโมเลกุลเล็ก จึงน่าจะเป็นผลดีคือร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้งานได้อย่างรวดเร็ว

ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสกลุ่มที่เป็นเอนโดเพพติเดส มีความแตกต่างจากการใช้เอนไซม์กลุ่มเอ็กโซเพพติเดสกล่าวคือ กลุ่มเอนโดเพพติเดสสามารถย่อยพันธะเปปไทด์เป็นแบบสุ่มโดยย่อยจากภายในสายของโพลีเปปไทด์ และย่อยไปเรื่อยๆ จนกว่าจะมีการหยุดยั้งการทำงานของเอนไซม์หรือจนกว่ายับยั้งหมด แต่เอนไซม์

กลุ่มเอ็กโซเพปติเคสจะมีความจำเพาะเจาะจงในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีความเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นั้นๆ การย่อยโพลิเพปไทด์ไปเรื่อยๆ ของเอนโดเพปติเคสทำให้สามารถย่อยสลายได้พันธะเพปไทด์ที่มีความหลากหลายทั้งชนิดและขนาดโมเลกุล ทำให้สามารถย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีเพปไทด์ และกรดอะมิโนหลากหลายชนิด ทำให้ได้กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายของผู้บริโภคอีกด้วย แต่สำหรับเอ็กโซเพปติเคสนั้นจะใช้ในกรณีที่ต้องการให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดเพปไทด์ที่มีขนาดเฉพาะ ซึ่งอาจจะนำไปใช้เฉพาะงานเช่นใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์

4. ผลการศึกษาการกรองสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน

จากการนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทไปผ่านการเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ควบคุมความเย็น (Refrigerated Centrifuge) จากนั้นนำสารละลายมากรองให้บริสุทธิ์โดยใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน (ภาพที่ 14) โดยใช้เมมเบรนเซรามิกที่มีความสามารถในการกรองโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 50 กิโลดาลตัน เป็นเมมเบรนแบบไหลขวาง (Cross flow Microfiltration) อัตราการกรอง (Flow rate) ประมาณ 20 ลิตรต่อนาที ความดันที่ใช้ประมาณ 5 บาร์อากาศเพื่อกรองแยกไขมัน คอลลอยด์ต่างๆ และสิ่งสกปรก รวมทั้งตะกอนโปรตีน ออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยหลักการโมเลกุลที่มีขนาดเล็กกว่า 50 กิโลดาลตันน่าจะไหลผ่านเมมเบรนออกไปได้ ซึ่งสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยโปรตีนที่มีขนาดเล็กกว่า 45 กิโลดาลตันเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 16) จึงควรไหลผ่านเมมเบรนออกมาได้ทั้งหมด ในการทดลองใช้ตัวอย่างเพื่อกรองเพียง 30 ลิตร ใช้เวลาในการกรองไม่นาน การอุดตันของเมมเบรนยังเกิดขึ้นไม่มาก พบว่าสารละลายที่กรองได้มีลักษณะเป็นสีเหลืองใสไม่มีไขมันลอยบริเวณผิวหน้า ภาพตัวอย่างก่อนและหลังกรองแสดงในภาพที่ 15 และ 16 ตามลำดับ ถ้ามีการกรองต่อเนื่องเป็นเวลานานอาจพบการอุดตันของเมมเบรนเนื่องจากโปรตีนบางส่วนที่มีโมเลกุลเล็กแทรกผ่านเข้าไปภายในรูพรุนของเมมเบรนและเกิดการดูดซับของโปรตีนและเกิดการอุดตันภายในรูพรุนของเมมเบรนจึงทำให้อัตราการไหลของเพอมีเอทมีค่าลดลงเมื่อการกรองผ่านไปไครยะเวลาหนึ่ง ซึ่งสังเกตได้จากการที่สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทในส่วนของเพอมีเอทไหลช้าลง

สำหรับภาพเครื่องกรองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้แสดงดังภาพที่ 14 เนื่องจากใช้เมมเบรนที่มีขนาดการกักกันโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน ดังนั้นโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ซึ่งมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5 ถึง 20 กิโลดาลตัน จึงสามารถไหลผ่านรูพรุนของเมมเบรนออก มาในส่วนของเพอมีเอทแทบทั้งหมดจึงไม่เกิดการสูญเสียเชิงคุณภาพ

และเชิงปริมาณ เพราะเมมเบรนสามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตออกมาได้เกือบทั้งหมด แต่ก็อาจจะมีการสูญเสียบ้างเนื่องจากเมมเบรนเกิดการอุดตันเพราะไขมันแต่ในการทดลองครั้งนี้ใช้ตัวอย่างในการกรองไม่มากคือประมาณ 30 ลิตร จึงใช้เวลาในการกรองไม่นานจึงยังไม่ก่อให้เกิดการอุดตันจนถึงขั้นส่งผลกระทบต่อการทำงาน และเมมเบรนสามารถกรองเก็บไขมันไว้ในส่วนของรีเทนเนอร์ เนื่องจากว่าขนาดเม็ดไขมันมีขนาดใหญ่กว่าขนาดรูของเมมเบรนจึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความใส เนื่องจากตะกอนของโปรตีนและเม็ดไขมันถูกกรองเก็บไว้บนผิวของเมมเบรน ภาพที่ 15 คือสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แต่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการกรองด้วยเมมเบรน จึงทำให้มีตะกอนของโปรตีนและเม็ดไขมันลอยอยู่บนผิวหน้าทำให้สารละลายมีความขุ่น นอกจากนั้นยังมีสิ่งสกปรกเช่นผงสีน้ำตาลจากการย่อยสลายกระดูก ทำให้สารละลายดูไม่สะอาด แต่ภาพที่ 16 คือสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ถูกกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน จะพบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีความใสมากกว่าเดิม และไม่มีเม็ดไขมันลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลาย อีกทั้งสิ่งสกปรก เช่น ผงกระดูกก็ถูกกรองออกไปจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความใสและมีความสะอาดมากกว่า

นอกจากนี้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน น่าจะสามารถกรองแยกจุลินทรีย์บางส่วนออกไปจากสารละลาย เนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่ารูของเมมเบรน นับว่าเป็นวิธีการลดปริมาณจุลินทรีย์ได้วิธีหนึ่งแต่ในการทดลองนี้ไม่ได้ทำการทดลองยืนยันแนวคิดนี้

การกรองโดยใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน ซึ่งมีความสามารถกรองโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 กิโลดาลตัน ดังนั้นสารละลายโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่กรดอะมิโนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 190 ดาลตัน และเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 30 กิโลดาลตัน จึงไหลผ่านเมมเบรนออกไปได้ แต่อนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า 50 กิโลดาลตัน เช่น ไขมัน และสิ่งสกปรก รวมถึงจุลินทรีย์บางชนิดจะถูกกักไว้ Marshall (1993) ซึ่งใช้เมมเบรน ขนาด 30 กิโลดาลตัน กรองน้ำล้างสุริมิ พบว่าสารละลายไหลออกจากเครื่องกรองช้าลงเนื่องจากการดูดซับและสะสมของตัวถูกละลายเกิดขึ้นที่ผิวหน้าของเมมเบรน ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวสามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มอัตราการไหลวนในเครื่องกรองเพื่อเพิ่มแรงเฉือนทำให้ตัวถูกละลายที่สะสมที่ผิวหน้าของเมมเบรนหลุดออกไป



ภาพที่ 14 ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนขนาดจุพูน 50 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 15 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทก่อนกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน



ภาพที่ 16 สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทหลังจากกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน



ภาพที่ 17 โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผ่านการระเหยด้วย Vacuum Evaporator

จากนั้นนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนมาระเหยเพื่อลดปริมาตรลง 4 เท่าตัว โดยใช้เครื่องระเหยสูญญากาศ (Vacuum Evaporator) ที่ความดัน 760 มิลลิเมตรปรอท อุณหภูมิ 55°C พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทมีลักษณะเข้มข้นขึ้นและมีสีเข้มขึ้นเล็กน้อย ดังภาพที่ 17 และเมื่อนำไปวัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสี MINOLTA

Spectrophotometer ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 6 พบว่า สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยเมมเบรนมีค่าความสว่างมากขึ้นโดยพิจารณาได้จากค่าความสว่าง (L^*) ซึ่งแตกต่างกับค่าความสว่างของสารละลายก่อนกรองด้วยเมมเบรน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตะกอนของโปรตีนและเม็ดไขมันได้ถูกกรองออกจากสารละลาย จึงมีแต่โปรตีนซึ่งมีอนุภาคนาขนาดเล็กกระจายตัวอยู่ในผลิตภัณฑ์ทำให้การหักเหของแสงที่ตกกระทบกับอนุภาคนาเล็กน้อยกว่าอนุภาคนาใหญ่ จึงเกิดความสว่างมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการกรอง ส่วนค่า a^* ซึ่งแสดงถึงค่าสีแดง พบว่า ค่าสีแดงของสารละลายหลังกรองมีค่าสีแดงลดลง และค่า b^* ซึ่งแสดงถึงค่าสีเหลือง พบว่า ค่าสีเหลืองของสารละลายหลังกรองน้อยกว่าสารละลายก่อนกรอง นั่นคือเหตุผลที่แสดงว่าเมมเบรนได้เก็บกักเอาค่าสีของผลิตภัณฑ์เอาไว้บางส่วนเช่นเดียวกับตะกอนโปรตีน ไขมัน และสารคอลลอยด์อื่นๆ มีผลทำให้สารละลายที่ผ่านการกรองมีคุณลักษณะที่ดีขึ้นดังภาพที่ 16

ตารางที่ 6 ค่าสีและความขุ่นของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตย่อยด้วยเอนไซม์ก่อนและหลังการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน

ตัวอย่าง	ค่าสี			ค่าความขุ่น
	L^*	a^*	b^*	
สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตก่อนกรอง	87.19	-1.85	27.33	1.82
สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตหลังกรอง	95.63	-3.27	21.91	1.27

จากการวัดความขุ่น (ตารางที่ 6) เพื่อหาค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer โดยใช้ค่า absorbance 420 nm เพื่อเปรียบเทียบตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรอง พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนมีค่าความขุ่นลดลง จาก 1.818 เป็น 1.271 เนื่องจากการกรองด้วยเมมเบรนได้กักกันตะกอนของโปรตีนขนาดใหญ่และเม็ดไขมันรวมทั้งเศษตะกอนอื่นๆ อยู่ภายในส่วนของรีเทนเทตทำให้ผลิตภัณฑ์ในส่วนของเพอมีเอทมีความขุ่นลดลงซึ่งทำให้มีคุณภาพดีขึ้น

จากการหาความเข้มข้นของกลีนาในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตและผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกรองด้วยเมมเบรนพบว่ากลีนาลดลงเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่กำหนดในตลาดเครื่องหมายการค้าแบรนด์ ดังปรากฏในผลการทดลองตารางที่ 7 อย่างไรก็ตามเมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตไปประเหยให้โปรตีนเข้มข้นขึ้นจนมีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับ

ผลิตภัณฑ์แบรนด์ กลิ่นคาวก็จะเพิ่มขึ้นแต่ก็ยังมียกกลิ่นคาวน้อยกว่ามาก กลิ่นคาวที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่ น่าจะเกิดจากไขมันขนาดเล็กที่กระจายตัวอยู่ในสารละลายเมื่อไขมันถูกกรองออกด้วยเมมเบรน กลิ่นคาวก็จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ผลิตภัณฑ์สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่ได้จากการทดลองนี้ น่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคที่ไม่ชอบกลิ่นคาวจากเครื่องดื่มน้ำเสริมประเภทนี้

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของกลิ่นคาวจากไก่ของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของกลิ่นคาวจากไก่
น้ำสกัดที่ข่อยด้วยเอนไซม์และกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	2.31 ^a
น้ำสกัดที่ข่อยด้วยเอนไซม์แล้วกรองด้วยเมมเบรนและทำให้เข้มข้นด้วย Vacuum Evaporator	6.11 ^b
สารละลายซูเปอร์ไก่สกัดเครื่องหมายการค้า “แบรนด์”	12.93 ^c

5. ผลการศึกษาคุณภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นในด้านจุลินทรีย์และองค์ประกอบทางเคมีของอาหาร

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันไปทำการเพิ่มความเข้มข้นโดยวิธีการระเหยด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Vacuum Evaporator) โดยทำการระเหยให้ปริมาตรสารละลายลดลง 4 เท่า จากนั้นนำผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปบรรจุลงขวดแก้วปิดสนิทแล้วทำการฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของอาหารได้แก่ โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า ไฟเบอร์ วิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ รวมทั้งปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ได้ผลดังตารางที่ 8 และ 9

ตารางที่ 8 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน

องค์ประกอบของอาหาร	ผลการวิเคราะห์ (g/100g)
คาร์โบไฮเดรต	0.21
เถ้า	0.40
น้ำ	95.84
ไขมัน	0.01
โปรตีน	3.54

จากตารางที่ 8 แสดงองค์ประกอบของอาหารของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตประกอบด้วยโปรตีน 3.54 g/100g และไขมัน 0.01 g/100g แสดงให้เห็นว่าถ้าบริโภคผลิตภัณฑ์นี้ 100 กรัม จะได้รับโปรตีน 3.54 กรัม แต่หากพิจารณาถึงปริมาณน้ำที่มีอยู่ถึง 95.84 g/100g พบว่าปริมาณน้ำมากเกินไป การกำจัดน้ำออกโดยการระเหยน้ำจะได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีความเข้มข้นมากกว่าเดิม 4 เท่า แต่จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของอาหารในโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 12

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนและผ่านการระเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator

องค์ประกอบของอาหาร	ผลการวิเคราะห์ (g/100g)
คาร์โบไฮเดรต	0.00
เถ้า	1.12
น้ำ	89.15
ไขมัน	0.04
โปรตีน	9.90

จากผลการทดลองในตารางที่ 9 พบว่า เมื่อลดปริมาณน้ำลงไป 4 เท่า ปริมาณโปรตีนและองค์ประกอบอื่นๆ ก็เพิ่มขึ้น โดยความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มจาก 3.54 เป็น 9.90 กรัมต่อร้อยกรัม

โดยเข้มข้นขึ้นเกือบ 3 เท่าตัว ในส่วนของคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นไม่เพิ่มขึ้นแต่กลับลดลง การที่ความเข้มข้นโปรตีนเพิ่มขึ้นเล็กน้อยไม่ถึง 4 เท่าตัว และคาร์โบไฮเดรตหายไป อาจมีสาเหตุจากในขณะทำการระเหยของค์ประกอบดังกล่าวเกิดการตกตะกอน ซึ่งเห็นได้จากการมีตะกอนเกิดขึ้นในสารละลายหลังการทำเข้มข้น

สำหรับปริมาณไขมันที่พบในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตและสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นนั้นมีเพียง 0.01 และ 0.04 กรัมต่อร้อยละ ถือว่ามีปริมาณน้อยมากนับว่าเป็นข้อได้เปรียบของการนำเทคโนโลยีทางด้านเมมเบรนมาใช้เพื่อกรองสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตทำให้ไขมันถูกกักเก็บไว้ สารละลายที่ผ่านเมมเบรนออกมาที่เรียกว่าส่วนเพอมีเอทจึงมีไขมันน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่พบพบว่าสารละลายที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนนั้นมีค่าความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่น้อยกว่าสารละลายที่ไม่ได้กรอง ($P < 0.05$) และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดพบว่าสารละลายที่ได้มีจุลินทรีย์น้อยกว่า 1 cfu/g ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสเตอริไรซ์ของกระทรวงสาธารณสุข (ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2544 ฉบับที่ 238)

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต เปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น และผลิตภัณฑ์ซูปเปอร์ไก่สกัดเข้มข้นที่วางจำหน่ายในท้องตลาด เครื่องหมายการค้าแบรนด์ ได้ผลดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นจากโครงไก่บดที่ย่อยด้วยเอนไซม์แล้วกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนและระเหยด้วยเครื่อง Vacuum Evaporator เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ซูปเปอร์ไก่สกัดที่จำหน่ายในท้องตลาด

ปริมาณโปรตีน	ผลการวิเคราะห์ (g/100g)
โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์และผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรน	3.54
โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่ย่อยด้วยเอนไซม์และผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนและทำให้เข้มข้นด้วย Vacuum Evaporator	9.90
โปรตีนจากผลิตภัณฑ์ซูปเปอร์ไก่สกัดเครื่องหมายการค้า “แบรนด์”	8.11

จากผลการทดลองในตารางที่ 10 พบว่า โปรตีนที่ได้จากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นและผลิตภัณฑ์ซูเปอร์สกัดเข้มข้นที่วางจำหน่ายในท้องตลาดเครื่องหมายการค้าแบรนด์มีค่าไม่แตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่น $P > 0.05$ แต่โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นมีองค์ประกอบของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ร่างกายต้องการอยู่ในปริมาณมาก ผลการวิเคราะห์สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตก่อนทำการระเหยเพื่อเพิ่มความเข้มข้น แสดงในตารางที่

ตารางที่ 11 ปริมาณค่ากรดอะมิโนที่พบในสารละลายโปรตีนไฮโดรโครไลเซทจากโครงไก่บดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แล้วการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันแบบเบรน

กรดอะมิโน	MW ¹	ผลวิเคราะห์ (mg/100g)	กรดอะมิโนจาก โปรตีนไฮโดรไล เซท (mg/g of protein)	ปริมาณที่WHO/FAO/UNU ^b แนะนำ	
				(mg/kg/day)	(mg/g of protein) ^a
น					
อะลานีน	71.08	164.1	46.4	-	-
อาร์จินีน	156.19	18.8	5.3	-	-
กรดแอสพาร์ติก	114.10	113.8	32.1	-	-
ซีสทีน	103.15	<5.0	<1.4	-	-
กรดกลูตามิก	129.12	259.1	73.2	-	-
ไกลซีน	57.05	264.2	74.6	-	-
ฮิสทีดีน	137.14	63.4	17.9	8-10	16
ไฮดรอกซีไลซีน	-	17.2	4.9	-	-
ไฮดรอกซีโพรลีน	-	77.7	21.9	-	-
ไอโซลิวซีน	113.16	94.8	26.8	10	13
ลิวซีน	113.16	225.1	63.6	14	19
ไลซีน	128.17	561.2	158.5	12	16
เมทไทโอนีน	131.20	62.3	17.6	13	17
ฟีนิลอะลานีน	147.18	206.9	58.4	14	19
โพรลีน	97.12	<5.0	<1.4	-	-
เซอรีน	87.08	19.2	5.4	-	-
ทรีโอนีน	101.11	23.2	6.6	7	9
ทริптоเฟน	186.21	7.1	2.0	3.5	5
ไทโรซีน	163.18	58.2	16.4	-	-
วาลีน	99.1	80.3	22.7	10	13

หมายเหตุ: ผลวิเคราะห์จากห้องปฏิบัติการกลางตรวจสอบผลิตภัณฑ์เกษตรและอาหาร

¹ น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโน

^a Mean nitrogen requirement of 105 mg nitrogen/ kg per day (0.66 g protein/ kg per day)

^b FAO/ WHO/ UNU, (1985)

ในตารางที่ 11 พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด ได้แก่ ไลซีน, ฮีสทีดีน, ทรีโอนีน, วาลีน, เมไทโอนีน, ไอโซลิวซีน, ลิวซีน และ ฟีนิลอะลานีน โดยเฉพาะลิวซีน ไลซีนและฟีนิลอะลานีน ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 225.13, 561.15 และ 206.90 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ถ้าผู้บริโภคได้บริโภคโปรตีนไฮโดรไลเซตก็จะได้กรดอะมิโนที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายครบทุกชนิด และสามารถดูดซึมได้ง่ายกว่าการทานอาหารที่มีโปรตีนขนาดใหญ่เป็นองค์ประกอบ ซึ่งถ้าเรารับประทานอาหารที่มีโปรตีนขนาดใหญ่เมื่ออาหารถูกกลืนก็จะผ่านการย่อยที่กระเพาะอาหารและลำไส้เล็กโดยเอนไซม์โปรติเอสจากร่างกาย โปรตีนจะถูกกลายเกลียวออกเนื่องจากสภาวะกรด และถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ได้เป็นพอลิเปปไทด์ที่มีสายสั้นลง และในลำไส้เล็กก็จะมีเอนไซม์จากตับอ่อนมาช่วยย่อยสลายพอลิเปปไทด์ให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน จากนั้นจึงถูกดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของร่างกายโดยผนังลำไส้เล็ก ซึ่งถ้าหากระบบการย่อยอาหารเกิดความผิดปกติก็จะทำให้การย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนได้ไม่สมบูรณ์ ทำให้ร่างกายไม่ได้รับกรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ไม่พอเพียง และถ้าคำนวณปริมาณกรดอะมิโนต่อการบริโภคสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต 100 กรัม จะพบว่าปริมาณโปรตีนที่พบยังสูงกว่าที่ FAO/WHO แนะนำ และผลิตภัณฑ์มีข้อดีคือประกอบด้วยเปปไทด์โมเลกุลเล็ก (2.5-14.3 กิโลดาลตัน) ซึ่งเมื่อบริโภคจะย่อยสลายได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ และร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ได้เร็วกว่า เหมาะกับผู้ที่ต้องการสารอาหารทันที เช่นคนที่ร่างกายอ่อนเพลียเป็นต้น (ปาริฉัตร, 2548)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. จากผลการศึกษาอัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือ พบว่าอัตราส่วนที่มีความเหมาะสมที่สุดคืออัตราส่วนของโครงไก่บดต่อสารละลายเกลือเท่ากับ 2:1 นั่นคือปริมาณเนื้อต่อน้ำมีผลต่อการละลายของโปรตีน ถ้าน้ำน้อยเกินไปดังอัตราส่วน 3:1 จะทำให้โปรตีนละลายออกจากโครงสร้างได้น้อยกว่า จึงเลือกอัตราส่วนโครงไก่บดต่อน้ำเท่ากับ 2:1 มาเพื่อใช้ในการทดลองในการทดลองถัดไป

2. จากผลศึกษาเวลาและอุณหภูมิในการสกัดในหม้อนึ่งความดันโดยใช้อุณหภูมิ 120°C และใช้เวลาในการสกัด 2 ชั่วโมง สกัดได้น้ำหนักโปรตีนสูงที่สุดกว่าทุกตัวอย่าง และการเพิ่มเวลาในการสกัดนานขึ้น พบว่าน้ำสกัดโปรตีนที่ได้มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเพิ่มอุณหภูมิการสกัดจาก 110°C เป็น 120°C พบว่า ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำสกัดโปรตีนจากโครงไก่โดยใช้เอนไซม์ พบว่าใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง ย่อยสลายนาน 120 นาที จะได้สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดคือร้อยละ 7.45

4. จากผลการศึกษาการกรองให้บริสุทธิ์โดยใช้ไมโครฟิลเตรชันเมมเบรนที่สามารถกรองกักโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาด 50 กิโลดาลตัน สามารถกรองแยกไขมัน คอลลอยด์ต่างๆ และสิ่งสกปรก รวมทั้งตะกอนโปรตีน ออกจากสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความใสมากขึ้นและมีกลิ่นคาวลดลง

5. จากผลการศึกษาคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตในด้านคุณค่าทางอาหารเมื่อนำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการกรองด้วยไมโครฟิลเตรชันแล้วไปทำการเพิ่มความเข้มข้น พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด ได้แก่ ไลซีน, ฮิสทีดีน, ทรีโอนีน, วาลีน, เมทไทโอนีน, ไอโซลิวซีน, ลิวซีน และฟีนิลอะลานีน โดยเฉพาะลิวซีน ไลซีนและฟีนิลอะลานีน ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 225.13, 561.15 และ 206.90

มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับผู้บริโภคที่ต้องการดื่มเครื่องดื่มที่มีสารละลายโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก เพื่อให้โปรตีนสามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ของร่างกายได้อย่างรวดเร็ว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการนำเศษวัสดุเหลือชนิดอื่นๆ จากไก่ เช่น ขนไก่ หัวไก่ และไส้ไก่มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต
2. ควรลดขนาดโครงไก่โดยใช้อุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพในการลดขนาด เช่น Silent cutter และ Mass colloid แทนการสับด้วยมือ ในกรณีที่ต้องการทำตัวอย่างปริมาณมาก และต้องการลดขนาดโครงไก่ให้มีขนาดเล็กและสม่ำเสมอ
3. ในการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลายเกลือ ควรทำการไดอะไลซิสโปรตีนไฮโดรไลเซตในน้ำที่กำจัดออสโมน ก่อนนำมาใช้เป็นตัวอย่างเพื่อลดการรบกวนจากผลของเกลือในตัวอย่าง
4. ควรมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการกรองด้วยเมมเบรนเพื่อให้ได้อัตราการกรองสูงสุด
5. ควรตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่อื่นๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อเป็นแนวทางในการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไก่มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กองควบคุมอาหาร. 2546. จำนวนผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่ได้รับอนุญาตตลาด. สำนักคณะกรรมการอาหารและยา. กระทรวงสาธารณสุข, นนทบุรี.
- จิรศานต์ ชัยสุนทรานนท์. 2539. การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหัวปลาพันธุ์โอแลบ. ปัญหาพิเศษ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.
- จรัญ จันทลักษณ์. 2534. สถิติ วิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. พิมพ์ครั้งที่ 6. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ. 468 น.
- นิชิยา รัตนานนท์. 2534. คอลลอยด์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร. คณะเกษตรศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 77 น.
- บัณฑิต โชคสิทธิการ. 2548. ข้อมูลการตลาดซูเปอร์ (ตลาดรวม). แหล่งที่มา: <http://www.marketinfo.in.th>
- ปิยวรรณ ศักดิ์รัตนอมพร. 2549. พฤติกรรมการซื้อซูเปอร์มาร์เก็ตของผู้บริโภคในกรุงเทพมหานคร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 131 น.
- ปาริฉัตร หงสประภาส. 2548. โปรตีนในอาหาร. เอกสารคำสอน 052154. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 119-136.
- ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2544 ฉบับที่ 238
- รุ่งอรุณ ตระการชัชวาลย์. 2545. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 95 น.

- สุปราณี เข้มพราย. 2539. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 114 น.
- ศุภาวดี ฟูกุล. 2542. ขอสปรุงรสจากโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตจากหัวปลาทูน่าพันธุ์โอแลบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา. 122 น.
- อากัสรา สุขเจริญศักดิ์กุล. 2535. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากน้ำแข็งปลาทูน่าเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein.** Vanderbilt, New York. p. 421
- AOAC. 1990. **Official Methods of Analysis. 14 th ed.** The Association of Official Analytical Chemist, Washington D.C. p. 975
- Belitz, H.D. and W. Grosch. 1999. **Food Chemistry.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Benjakul, S. and M.T. Morrissey. 1997. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. **J. Agric. Food Chem.** 45: 3423-3430.
- Chakradarti, R. 1983. Debittering method of fish protein hydrolysate. **J. Food Sci. and Technol.** 20: 154-158.
- Christopher, T.C. 1994. Control of food allergies using protein hydrolysate. **J. Food Technol.** 20: 72-76.
- Damodaran, S. 1996. Amino acids, peptides and proteins, pp. 321-430. In O.R. Fennema, ed. **Food Chemistry.** 3 rd ed. Marcel Dekker, New York.

- Damodaran, S. and A. Paraf. 1997. **Food Protein and Applications**. Marcel Dekker, Inc. New York. p. 681.
- Fabiani, C., M. Pizzichini., M. Spadoni, and G. Zeddit. 1996. Treatment of waste water from silk de gumming processes for protein recovery and water reuse. **Desalination**. 105: 1-9.
- Fane, G. 1987. Neutral taxation under uncertainty. **J. of Public Economics**. 33: 95-105.
- FAO/WHO. 1973. **Energy and protein requirement**. Report of a Joint FAO/WHO and Hoc. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- FAO/WHO/UNU. 1985. **Energy and protein requirements**. Report of a joint FAO/WHO/UNU expert consultation. Technical report series no. 724. Geneva: World Health Organization.
- Gildberg, A. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. **Process Biochem**. 28: 1-15.
- Green, J.H. and J.F. Mattick. 1979. **Fishery waste management: In food processing waste management**. USA. pp. 208-210.
- Greenberg, N.A. and W.F. Shipe. 1979. Comparison of abilities of TCA, picric, sulphosalicylic and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. **J. Food Sci**. 44: 735-737.
- Hall, G.M. and N.H. Ahmad. 1992. Functional properties of fish protein hydrolysates, pp. 249-274. In G.M. Hall, ed. **Fish Processing Technology**. Van Nostrand Reinhold, New York.

- Howell, N.K. 1996. Chemical and enzymatic modifications, pp. 235-280. *In* S. Nakai and H.W. Modler, eds. **Food Proteins: Properties and Characterization**. VCH Publishers, New York.
- Hoyle, N.T. and J.H. Merrit. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring. **J. Food Sci.** 59: 76-79.
- Jeon, Y., H. Byun and S. Kim. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membrane. **Process Biochem.** 35: 471-478.
- Kijowski, J. 1994. Surimi technology from poultry, red meat and fish. **Division of Poultry Products Technology**. Agricultural University of Poznan, Wojaka, Poland.
- Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000a. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline protease. **J. Agric. Food Chem.** 48: 657-666.
- Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000b. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. **Cri. Rev. Food Sci. Nutri.** 40: 43-81.
- Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000c. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from atlantic salmon (*Salmo salar*) pyloric caeca. **J. Food Biochem.** 24: 177-187.
- Leammli, U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*. 227: 680-685.
- Lin, T.M., J.W. Park and M.T. Morrissey. 1995. Recovery proteins and reconditioned water from surimi processing waste. **J. Food Sci.** 60: 4-9.
- Lin, T.M. and J.W. Park. 1996. Extraction of proteins from pacific whiting minced and various washing conditions. **J. Food Sci.** 61: 432-438.

- Lo, M.Y., D. Cao., S. Argin-Soysal., J. Wang and T. Hahm. 2005. Recovery of protein from poultry processing wastesater using membrane ultrafiltration. **Bioresour. Technol.** 96: 687-698.
- Mackie, I.M. 1982. Fish protein hydrolysates. **Process Biochem.** 17: 26-28.
- Mahesh, T., T.M.R. Setty, T.S. Shetty and C.N. Ravishankar. 1993. Studies on the preparation of functional fish protein concentrate from *Nemipterus japonicus* by enzymatic method. **Fishery Technol.** 30: 57-61.
- Marshall, D.L. and P.L.W. Lehigh. 1993. Nobody nose know. **CHEMTECH** 23. pp. 38-42.
- Miller, R. and H.S. Groninger. 1976. Functional property of enzyme modified acetelate fish protein derivatives. **J. Food Sci.** 41: 268-272.
- Miyata, Y. 1984. Concentration of protein from the waste water of red meat fish by ultrafiltration membrane. **Bull Jap. Soc. Sci. Fish.** 50(4): 659-663.
- Mohr, V. 1980. Enzyme technology in the meat and fish industries. **Process Biochem.** 15: 18-21, 32.
- Nielsen, P.M. 1997. Functionality of protein hydrolysates, pp. 443-472. *In* S. Damodaran and A. Paraf, eds. **Food Proteins and Their Applications.** Marcel Dekker, New York.
- Noguchi, M., M. Yamashita, S. Arai and M. Fujimaki. 1975. On the bitter masking activity of a glutamic acid-rich oligopeptide fraction. **J. Food Sci.** 40: 367-369.
- Ockerman, H.W. 1992. Fishery by-products, pp. 155-192. *In* **Fish Processing Technology.** Van Nostrand Reinhold, New York.

- Opiacha, J.O., M.G. Mast and J.H. MacNeil. 1991. In-Vitro protein digestibility of dehydrated protein extract from poultry bone residue. **J. Food Sci.** 56: 1751-1752.
- Peterson, J. 1974. **Encyclopedia of Food Technology**. Van Nostrand reinhold company, New York.
- Qi, M., N.S. Hettiarachchy and U.Kalapathy. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **J. Food Sci.** 62: 1110-1115.
- Quaglai, G.B. and E. Orban. 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysate from sardine (*Sardina pilchardrs*). **J. Sci. Food Agric.** 38: 271-276.
- _____. 1987a. Enzymic solubilization of protein of sardine (*Sardina pilchardrs*) by commercial enzymes. **J. Sci. Food Agric.** 38: 263-269.
- _____. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardrs*) protein hydrolysates. **J. Food Sci.** 55: 309-341.
- Rebaca, B., M.T. Pena-Vera and M. Diaz-Castaneda. 1991. Production of fish protein Hydrolysate with bacterial protease: Yield and nutrition value. **J. Food Sci.** 56: 309-341.
- Satterlee, L.D. and Better. 1973. Utilization of high protein tissue powders as a binder/extender in meat emulsion. **J. Food Sci.** 38: 306-309.
- Schagger, H. and G.V. Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Anal Biochem.** 166: 368-379.

- Scopes, R.K. 1987. **Protein Purification: Principles and Practice**. 2nd ed. Springer-Verlag. United States of America.
- Sen, D.P., N.L. Sripathy, A. Sreenivasan and V. Subrahmanyam. 1962. Fish hydrolysates. I. Rate of hydrolysis of fish fresh with papain. **Food Technol.** 17: 138-141.
- Shahidi, F., X.Q. Han and J. Synowiecki. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chem.** 58: 285-293.
- Shiau, C.Y. and T.J. Chai. 1999. Protein recovered from oyster waste water by ultrafiltration and their utilization as oyster sauce through fermentation. **J. Marine Sci. Technol.** 7(2): 110-116.
- Shih, F.F. 1992. Modification of food proteins by non-enzymatic methods, pp. 235-248. In B.J.F. Hudson, ed. **Biochemistry of Food Proteins**. Elsevier Applied Science, London.
- Surowka, K. and M. Fix. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. **Int. J. Food Sci. Technol.** 27: 9-20.
- Tarky, W., O.P. Agawara and G.M. Pigott. 1973. Protein hydrolysate from waste. **J. Food Sci.** 38: 917-918.
- Torres, M.R., F.R. Marin., A.J. Romos and E. Soriano. 2002. Study of operating conditions in concentration of chicken blood plasma protein by ultrafiltration. **J. Food Eng.** 54: 215-219.
- Tybor, P.T., C.W. Dill and W.A. Landmann. 1973. Effect of decolorization and lactose incorporation on the emulsification capacity of spray-dried blood protein concentrates. **J. Food Sci.** 38: 4-6.

- Vojdani, F. 1996. Solubility. In *Methods of Testing Protein Functionality*, G.M. Hall, ed. pp. 11-60, **Blackie Academic & Professional**, New York.
- Wignall, J. and J. Tatterson. 1976. Fish silage. **Process Biochem.** 11: 17-19.
- Yanez, E., D. Ballester and F. Monckeberg. 1976. Enzymatic fish protein hydrolysate: chemical composition, nutritive value and use as a supplement to cereal protein. **J. Food Sci.** 41: 1289-1292.
- Yu, S.Y. and L.K. Tan. 1992. Enzymatic solubilization of protein of *Oreochromis mossambicus* by alcalase. **ASEAN Food J.** 7: 157-158.
- _____. 1994. Acceptability of cracker, (keropok) with fish protein hydrolysate. **J. Food Sci.** 25: 204-298.
- Zayas, J.F. 1997. **Functionality of proteins in food.** Springer-Varlag, New York (1997). pp. 134-156, 144-146.
- Zydney, A.L. 1998. Protein separations using membrane filtration: New opportunities for whey fractionation. **Int. Dairy J.** 8: 243-250.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการคำนวณ

1. ผลการคำนวณหาปริมาณความชื้นในโครงไก่บดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และความชื้นเริ่มต้นของโครงไก่บดที่ได้จากโรงงานแปรรูปไก่สดของบริษัทเบทาโกร (ภาพที่ 3) เพื่อให้ทราบถึงปริมาณน้ำที่มีอยู่ในโครงไก่บด และปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในโครงไก่บด

การวัดปริมาณความชื้น พบว่า ในโครงไก่น้ำหนัก 5 กรัม มีน้ำอยู่ในโครงสร้างเนื้อประมาณ 3.61 กรัม เพราะฉะนั้น

$$\begin{aligned}\text{ร้อยละของความชื้นฐานเปียก} &= \frac{3.61 \times 100}{5} \\ &= 72.2\end{aligned}$$

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณน้ำในโครงไก่บดมีค่าเท่ากับ 72.2% โดยน้ำหนักสด

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในโครงไก่บด โดยนำโครงไก่ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานแปรรูปไก่สดของบริษัทเบทาโกร (ภาพที่ 3) มาล้างทำความสะอาดแยกหนังและไขมันออก จากนั้นนำไปบดหยาบ (ภาพที่ 4) และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน นำไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด และคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โปรตีน (ภาคผนวก ข) โดยใช้เครื่อง Buchi ในการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน พบว่า โครงไก่บดมีปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากับ 14.82% โดยน้ำหนักสด ซึ่งจากผลการทดลองหมายความว่าโครงไก่บด 100 กรัม จะมีโปรตีน 14.82 กรัม และส่วนที่เหลือคือน้ำและแร่ธาตุอื่นๆ ซึ่งจะเห็นได้ว่าโครงไก่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงเหมาะแก่การนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์และเนื่องจากโครงไก่เป็นผลพลอยได้จากการชำแหละชิ้นส่วนต่างๆ ของไก่จึงทำให้มีหนังและไขมันอยู่เป็นจำนวนมากและการทดลองต้องการน้ำสกัดที่เป็นโปรตีน จึงต้องมีการดึงหนังและไขมันออกก่อนที่จะทำการบด

จากการที่โครงไก่ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตประกอบด้วยโครงกระดูกซึ่งมีแร่ธาตุและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้โครงกระดูกมีความแข็งและเหนียวมากซึ่งส่งผลต่อขั้นตอนการบดเพื่อลดขนาดของวัตถุดิบ โดยทำให้ไม่สามารถบดโครงกระดูกให้ละเอียดด้วยเครื่องบดผสมแบบธรรมดาได้ ดังนั้นจึงต้องใช้วิธีบดหยาบด้วยมีดแทนทำให้วัตถุดิบมีขนาดใหญ่กว่าการบดด้วยเครื่องบดละเอียด แต่อย่างไรก็ตามสามารถควบคุมให้วัตถุดิบมีขนาดสม่ำเสมอได้ ซึ่งโครงไก่บดนี้จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการทดลองศึกษาข้อ 2, 3 และ 4 ต่อไป โดยจะเรียกส่วนนี้ว่าโครงไก่บด

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

1.1 วิธีการวิเคราะห์

อบจานอลูมิเนียมพร้อมด้วยฝาปิดในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาใส่เดซิเคเตอร์ (desicator) ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ในจานอลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2-5 กรัม แล้วนำเข้าอบที่ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาใส่เดซิเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น นำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำตัวอย่างไปอบซ้ำอีกครั้งจนได้น้ำหนักคงที่

1.2 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณความชื้น} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{(W_2 - W_1)}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียม หน่วยเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ หน่วยเป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างหลังอบ หน่วยเป็นกรัม

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธีเจดคาล (AOAC, 1990)

2.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

2.1.1 ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250-300 มิลลิลิตร

2.1.2 ชุดกลั่นโปรตีน

2.1.3 ขวดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.1.4 ขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มิลลิลิตร

2.1.5 ปิเปต ขนาด 5, 10 มิลลิลิตร

2.1.6 บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร

2.1.7 ลูกแก้ว

2.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

2.2.1 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.2.2 สารเร่งปฏิกิริยา ใช้คอปเปอร์ซัลเฟต (CuSO_4) 1 ส่วนต่อโปแตสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วน

2.2.3 สารละลายของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และโซเดียมไฮโอซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 60 ชั่งสารโซเดียมไฮดรอกไซด์ 60 กรัม และโซเดียมไฮโอซัลเฟต 5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2.4 สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ละลายกรดบอริก 40 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2.2.5 สารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.02 นอร์มัล

2.2.6 อินดิเคเตอร์ใช้ fashiro indicator เตรียมเป็น stock solution ซึ่งเมทิลีนบลู (methylene blue) 0.2 กรัม ละลายในเอทานอล (ethanol) 200 มิลลิลิตร และซึ่งเมทิลเรด (methyl red) 0.05 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร เวลาใช้นำมาผสมในอัตราส่วน stock solution 1 ส่วน : เอทานอล 1 ส่วน : น้ำกลั่น 2 ส่วน

2.3 วิธีการวิเคราะห์

2.3.1 ชั่งตัวอย่างอาหารบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงขวดย่อยโปรตีน

2.3.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร

2.3.3 ใส่ลูกแก้ว 2 เม็ด นำไปย่อยบนเตาไฟฟ้าในตู้ควันจนกระทั่งได้สารละลายใสปล่อยทิ้งให้เย็น

2.3.4 เติมน้ำกลั่นร้อนลงไปล้างบริเวณคอขวดให้ทั่ว และให้ความร้อนต่อไปจนเกิดควันของกรดซัลฟูริกปล่อยทิ้งให้เย็น

2.3.5 นำมาถ่ายลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ใช้ น้ำกลั่นล้างขวดย่อยโปรตีนให้หมดสารละลายตัวอย่าง แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.3.6 จัดอุปกรณ์กลั่น

2.3.7 นำขบวนการผสมพูนขนาด 50 มิลลิลิตร เติมกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ลงไป 5 มิลลิลิตร ผสมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และเติมอินดิเคเตอร์เรียบร้อยแล้วไปกรองรับของเหลวที่จะกลั่น โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดนี้

2.3.8 ควบสารละลายตัวอย่างด้วยปิเปตขนาดความจุ 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่างแล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป 20 มิลลิลิตร

2.3.9 กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ

2.3.10 ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล จะได้จุดยุติเป็นสีม่วง

2.3.11 ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2.2.2 ถึง 2.2.10

2.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 14 \times \text{Factor}}{W}$$

โดยที่

a = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็นมิลลิลิตร

b = ปริมาณของสารละลายกรดเกลือที่ใช้กับ blank เป็นมิลลิลิตร

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือเป็นนอร์มัล

Factor = ตัวเลขที่เหมาะสม โปรตีนเนื้อสัตว์ใช้ 6.25

(น้ำหนักกรัมสมมูลของไนโตรเจน = 14.007)

3. การวิเคราะห์ไขมัน Crude fat (AOAC, 1990)

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

3.1.1 Soxtec System HT 6 ประกอบด้วย 1043 Extraction unit และ 1044 Service unit

3.1.2 หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)

3.1.3 สำลี

- 3.1.4 ตู้อบไฟฟ้า
- 3.1.5 เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
- 3.1.6 โถดูดความชื้น

3.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

- 3.2.1 ปีโตรเลียม อีเทอร์

3.3 วิธีการวิเคราะห์

- 3.3.1 ชั่งตัวอย่างใส่ thimble (W_1) (ตัวอย่างต้องแห้งและบดให้เป็นเนื้อเดียวกัน) ประมาณ 5 กรัม
- 3.3.2 นำ thimble ดังกล่าวไปใส่ในเครื่อง extraction unit
- 3.3.3 ชั่งน้ำหนักของ extraction cup (W_2)
- 3.3.4 เติมตัวทำละลายปีโตรเลียม อีเทอร์ลงใน extraction cup ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในเครื่อง extraction unit
- 3.3.5 ทำการสกัด (boiling) นาน 20 นาที และทำการชะล้าง (rinsing) นาน 40 นาที
- 3.3.6 นำไปอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เพื่อระเหยตัวทำละลายออกไป
- 3.3.7 นำไปเก็บไว้ในเดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3)

3.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(W_3 - W_2) \times 100}{W_1}$$

เมื่อ

W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ หน่วยเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนัก extraction cup หน่วยเป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนัก extraction cup และไขมันที่ได้จากการสกัด หน่วยเป็นกรัม

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 1990)

4.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

- 4.1.1 เตาเผาไฟฟ้า
- 4.1.2 จานกระเบื้องเคลือบ
- 4.1.3 เคชิกเคเตอร์

4.2 วิธีการวิเคราะห์

- 4.2.1 นำจานกระเบื้องเคลือบมาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียสและชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (W_1)
- 4.2.2 ชั่งตัวอย่างมา 5 กรัม (W) ใส่ในจานกระเบื้องเคลือบ
- 4.2.3 นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควัน แล้วนำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
- 4.2.4 นำออกมาใส่ในเคชิกเคเตอร์ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก
- 4.2.5 นำมาเผาต่อจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 12 มิลลิกรัม จดน้ำหนักที่น้อยที่สุดถือเป็นน้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างเผาจนได้น้ำหนักคงที่ (W_2)

4.3 วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณเถ้า} = \frac{(W_2 - W_1) \times 100}{W}$$

เมื่อ

W คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา หน่วยเป็นกรัม

W_1 คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ หน่วยเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานกระเบื้องเคลือบและตัวอย่าง ภายหลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ หน่วยเป็นกรัม

5. การวิเคราะห์หาระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) (Qi และคณะ, 1997)

5.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

- 5.1.1 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน Kjectec I
- 5.1.2 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerate centrifuge)
- 5.1.3 หลอดเซนต์ปีฟว

5.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

- 5.2.1 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 20

5.3 วิธีการวิเคราะห์

- 5.3.1 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทปริมาตรที่แน่นอนใส่ในหลอดเซนต์ปีฟว
- 5.3.2 เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (Trichloroacetic acid : TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากันประมาณ 2 นาที
- 5.3.3 หมุนเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10,000 g นาน 15 นาที
- 5.3.4 นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (AOAC, 1990)

5.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายใน 10\% TCA} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}}$$

6. การวิเคราะห์ค่าความยาวของสายเพปไทด์ (Adler-Nissen, 1986)

ความยาวสายเพปไทด์สามารถคำนวณได้จากค่าระดับการย่อยสลาย

$$\text{ความยาวสายเพปไทด์} = 100 / \text{ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)}$$

7. การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนก่อนการย่อยสลายโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

7.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

7.1.1 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (BIORAD)

7.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

7.2.1 สารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS (N,N-bis-methylene acrylamide) : ละลาย acrylamide 30 กรัม และ BIS 0.8 กรัม ในน้ำก่จัดอออน (deionied water) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษา 30 วัน

7.2.2 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8 : ละลาย สาร Tris-base 14.15 กรัม ในน้ำก่จัดอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดเบสให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2.3 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 : ละลาย สาร Tris-base 6.05 กรัม ในน้ำก่จัดอออนปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดเบสให้ได้ 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2.4 สารละลาย 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) : ละลายสาร SDS 10 กรัม ใน น้ำกำจัดอออนปริมาตร 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ จนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

7.2.5 สารละลาย running buffer : ละลายสาร Tris-base 3.0 กรัม ไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำกำจัดอออน แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับ ปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7.2.6 สารละลายสีย้อม Coomassie blue R-250 : ละลายสาร Coomassie blue R-250 1 กรัมในเมทานอลปริมาตร 400 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกำจัดอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

7.2.7 สารละลายล้างสีย้อม (destaining solution) : ผสมสารเมทานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำ กำจัดอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

7.2.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

7.2.9 สาร TEMED (N,N,N',N'-tetra ethylene diamine)

7.2.10 สาร 2-mercaptoethanol

7.2.11 กลีเซอรอล

7.2.12 สารละลายบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

7.2.13 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลของบริษัท Biorad ซึ่ง ประกอบด้วยโปรตีน myosin (200 kDa) β -galactosidase (116.25 kDa) phosphorylase b (97.4 kDa) serum albumin (66.2 kDa) ovalbumin (45 kDa) carbonic anhydrase (31 kDa) trypsin inhibitor (21.5 kDa) lysozyme (14.4 kDa) Aprotinin (6.5)

7.3 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

7.3.1 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.0 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร

7.3.2 เติมสารละลาย SDS ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 160 ไมโครลิตร สาร 2-mercaptoethanol ปริมาตร 40 ไมโครลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร กลีเซอรอล ปริมาตร 80 ไมโครลิตร และ

สารละลายบรอมฟีนอลบลู ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 40 ไมโครลิตร น้ำกำจัดอออนปริมาตร 380 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7.3.3 นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที และทำให้เย็น จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

7.3.4 ส่วนสารละลายโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมีวิธีเตรียมเช่นเดียวกัน

7.4 วิธีการเตรียมเจล

7.4.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล

7.4.2 ทำการประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาแน่นของแผ่นเจล 0.75-1.0 มิลลิเมตร กำหนดให้ stacking gel มีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร เหนือ separating gel

7.4.3 เตรียมสารละลายของ separating gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 12 ดังนี้ ผสมสารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS ปริมาตร 4.0 มิลลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิตร และน้ำกำจัดอออนปริมาตร 3.35 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

7.4.4 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเพอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

7.4.5 ทำการเทสารละลายผสมของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยให้เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร ระมัดระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำแผ่นกระจกวางในแนวตั้ง

7.4.6 เติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยที่มุมทั้งสองด้านของกระจกเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว เมื่อเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำให้ดูดน้ำทิ้งไป แล้วใช้กระดาษกรองชิ้นเล็กๆ ดูดซับน้ำออกไปอีกที

7.4.7 เตรียมสารละลาย stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 4 ดังนี้ ผสมสารละลาย 30% acrylamide, 0.8% BIS ปริมาตร 1.33 มิลลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิตร และน้ำกำจัดอออนปริมาตร 6.1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน

7.4.8 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

7.4.9 เทสารละลายผสมของเจลลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนโดยใช้หวี (template comb) ลงใน stacking gel แล้วทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว นำแผ่นหี้ออก จะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีน

7.5 วิธีการทดลอง

7.5.1 ต่ออุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมสารละลาย running buffer ลงในภาชนะทั้งด้านในและด้านนอกจนเกือบเต็ม

7.5.2 ใส่สารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในแต่ละช่องโดยใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

7.5.3 ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลต์

7.5.4 หยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของสารบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ไปเกือบถึงปลายของ separating gel

7.5.5 นำแผ่นเจลออกจากชุดของอุปกรณ์ แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายสีย้อม Coomassie blue R-250 นาน 30 นาที

7.5.6 ล้างสารละลายสีย้อมออกโดยใช้สารละลายล้างสีย้อม (destaining solution)

จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

8. การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) คัดแปลงจากวิธีของ Schagger และ Jagow (1987)

8.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

8.1.1 อุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิส (BIORAD)

8.2 สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์

8.2.1 สารละลาย 29% acrylamide, 1% BIS (N,N-bis-methylene acrylamide) : ละลาย acrylamide 29 กรัม และ BIS 1.0 กรัม ในน้ำกึ่งจัดไอออน (deionied water) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 เก็บสารละลายในขวดสีชา ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บรักษา 30 วัน

8.2.2 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 8.8 : ละลาย สาร Tris-base 14.15 กรัม ในน้ำกึ่งจัดไอออนปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดเบสให้ได้ 8.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บ สารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2.3 สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 : ละลาย สาร Tris-base 6.05 กรัม ในน้ำกึ่งจัดไอออนปริมาตร 60 มิลลิลิตร ปรับความเป็นกรดเบสให้ได้ 6.8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6.0 นอร์มัล ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บ สารละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2.4 สารละลาย 10% SDS (sodium dodecyl sulfate) : ละลายสาร SDS 10 กรัม ใน น้ำกึ่งจัดไอออนปริมาตร 90 มิลลิลิตร กวนเบาๆ จนสารละลายใส ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

8.2.5 สารละลาย running buffer : ละลายสาร Tris-base 12.114 กรัม ไตรซีน (tricine) 17.918 กรัม ในน้ำกึ่งจัดไอออน แล้วเติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8.2.6 สารละลายสีย้อม Coomassie blue R-250 : ละลายสาร Coomassie blue R-250 1 กรัมในเมทานอลปริมาตร 400 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกึ่งจัดไอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

8.2.7 สารละลายล้างสีย้อม (destaining solution) : ผสมสารเมทานอล ปริมาตร 400 มิลลิลิตรและกรดอะซิติกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกึ่งจัดไอออนเป็น 1 ลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

8.2.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร

8.2.9 สาร TEMED (N,N,N',N'-tetra ethylene diamine)

8.2.10 สาร 2-mercaptoethanol

8.2.11 กลีเซอรอล

8.2.12 สารละลายบรอมฟีนอลบลู (bromphenol blue) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

8.2.13 สารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล (polypeptide standard molecular weight ของบริษัท Biorad) ซึ่ง ประกอบด้วยโปรตีน triosephosphate isomerase (26.625 kDa) myoglobin (16.95 kDa) α -lactalbumin (14.437 kDa) aprotinin (6.521 kDa) insulin b chain (3.496 kDa) และ bacitracin (1.423 kDa)

8.3 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

8.3.1 เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 80 ไมโครลิตร สาร 2-mercaptoethanol ปริมาตร 16 ไมโครลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โมลาร์ ความเป็นกรดเบส 6.8 ปริมาตร 160 ไมโครลิตร กลีเซอรอล ปริมาตร 192 ไมโครลิตร และสารละลาย tracking dye ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 320 ไมโครลิตร นำมาจัดอออนปริมาตร 320 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.3.2 นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 2 นาที และทำให้เย็น จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที

8.3.3 ส่วนสารละลายโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลมีวิธีเตรียมให้มีความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร จากนั้นนำมาเตรียมเช่นเดียวกันกับวิธีการข้างต้น

8.4 วิธีการเตรียมเจล

8.4.1 ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล

8.4.2 ทำการประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ โดยใช้ spacer เป็นตัวปรับความหนาแน่นของแผ่นเจล 0.75-1.0 มิลลิเมตร กำหนดให้ stacking gel มีความสูงประมาณ 1.5 เซนติเมตร เหนือ separating gel

8.4.3 เตรียมสารละลายของ separating gel ที่ความเข้มข้นร้อยละ 18 ดังนี้ ผสมสารละลาย 29% acrylamide, 1.0% BIS ปริมาตร 6.0 มิลลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิตร และน้ำกำจัดอออนปริมาตร 1.33 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

8.4.4 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

8.4.5 ทำการเทสารละลายผสมของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นกระจกที่เตรียมไว้ โดยให้เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 2.0 เซนติเมตร ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ นำแผ่นกระจกวางในแนวตั้ง

8.4.6 เติมน้ำกลั่นเพียงเล็กน้อยที่มุมทั้งสองด้านของกระจกเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัว เมื่อเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำให้ดูดน้ำทิ้งไป แล้วใช้กระดาษกรองชิ้นเล็กๆ ดูดซับน้ำออกไปอีกที

8.4.7 เตรียมสารละลาย stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 4 ดังนี้ ผสมสารละลาย 29% acrylamide, 1.0% BIS ปริมาตร 1.33 มิลลิลิตร สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร สารละลาย 10% SDS ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกำจจัดอ็อกซอน ปริมาตร 6.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

8.4.8 นำสารละลายทั้งหมดไปดูดอากาศออก (degas) นาน 5 นาที แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อมิลลิลิตร และ TEMED ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยไม่ให้มีฟองอากาศ

8.4.9 เทสารละลายผสมของเจลลงบน separating gel ระวังอย่าให้มีฟองอากาศ ทำช่อง (well) สำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีนโดยใช้หวี (template comb) ลงใน stacking gel แล้วทิ้งไว้จนเจลแข็งตัว นำแผ่นหวีออก จะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีน

8.5 วิธีการทดลอง

8.5.1 ต่ออุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรีซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมสารละลาย running buffer ลงในภาชนะทั้งด้านในและด้านนอกจนเกือบเต็ม

8.5.2 ใส่สารละลายตัวอย่างและสารละลายโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลลงในแต่ละช่องโดยใช้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร

8.5.3 ต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 75 โวลต์

8.5.4 หยุดการจ่ายกระแสไฟฟ้าเมื่อสีของสารบรอมฟินอลบลูเคลื่อนที่ไปเกือบถึงปลายของ separating gel

8.5.5 นำแผ่นเจลออกจากชุดของอุปกรณ์ แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายสีย้อม Coomassie blue R-250 นาน 1 ชั่วโมง

8.5.6 ล้างสารละลายสีย้อมออกโดยใช้สารละลายล้างสีย้อม (destaining solution) จนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

9. การวิเคราะห์ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโน (AOAC, 1990)

9.1 อุปกรณ์ที่ใช้วิเคราะห์

9.1.1 เครื่อง High-performance liquid chromatography โมเดล LC-6A ยี่ห้อ Shimadzu

9.2 สภาพะของการวิเคราะห์

9.2.1 โมเดล LC-6A ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น

9.2.2 คอลัมน์ ISC-07/S 1504 Na

9.2.3 โมบายเฟส

A : โซเดียมซิเตรท เข้มข้น 0.2 นอร์มัล พีเอช 3.2

B : โซเดียมซิเตรท เข้มข้น 0.6 นอร์มัล และกรดบอริกเข้มข้น 0.2 นอร์มัล พีเอช 10

C : โซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.2 นอร์มัล

9.2.4 อัตราการไหลเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตรต่อนาที

9.2.5 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

9.2.6 วัดค่าด้วย fluorescence detector (FLD-6A)

9.3 สารเคมีที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา

9.3.1 A = โซเดียมไฮโปคลอไรด์ทางการค้า 0.4 มิลลิลิตร ต่อ อัลคาไลด์บัฟเฟอร์ 1 ลิตร

9.3.2 B = ออโท-ฟอสฟอไรส์จำนวน 0.8 กรัม ต่อ เอทานอล 14 มิลลิลิตร, โพสโอสเฟตที่เอทิลีนไดออกไซด์อีเทอร์ (Brij-35) 0.4 กรัม, เอ็น-อะซิทิวซ์-แอล-ไซทีลีน 10 กรัม เดิมอัลคาไลน์ บัฟเฟอร์ ให้ครบปริมาตร 1 ลิตร อัตราการไหล 0.2 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส วัดค่าด้วย RF – a535 EX 348 นานโนเมตร (หรือ FLD-6A)

9.3.3 สารละลายบัฟเฟอร์ โซเดียมคาร์บอเนตเข้มข้น 0.384 โมลาร์ กรดบอริกเข้มข้น 0.216 โมลาร์ และโพแทสเซียมซัลเฟต 0.108 โมลาร์ ปรับให้มีค่าพีเอชเท่ากับ 10

9.3.4 สารละลายมาตรฐานของกรดอะมิโน และการเจือจางตัวอย่าง ประกอบด้วย โซเดียมซิเตรตเข้มข้น 0.2 นอร์มัล กรดเปอร์คลอริกเข้มข้นร้อยละ 1.5 กรดเอ็น-คาร์โบริกเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชให้ได้ 2.2

9.4 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

9.4.1 นำตัวอย่างจำนวน X กรัมลงในหลอดสุญญากาศ

9.4.2 เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล จำนวน 3-4 มิลลิลิตร ปิดหลอดให้สนิท

9.4.3 ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 22-24 ชั่วโมง และลดอุณหภูมิลง

9.4.4 ปรับปริมาตรด้วยตัวอย่างที่เจือจาง

9.4.5 กรอง และฉีดตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตรใน HPLC

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์

1. การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total Viable Count) โดยวิธี pour plate (Speck, 1984)

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1.1 Plate count agar (PCA)

1.1.2 0.85% normal saline solution

1.2 วิธีการเตรียมตัวอย่าง

1.2.1 ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงในถ้วยบดตัวอย่างที่ปลอดเชื้อ

1.2.2 เติม 0.85% normal saline solution จำนวน 90 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วยความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นำไปตั้งทิ้งในตู้เย็น 30 นาที

1.2.3 ทำการเจือจางให้เป็น 1:100, 1:1000 และ 1:10000 ตามลำดับ โดยใช้ 0.85% normal saline solution

1.3 วิธีการตรวจนับจุลินทรีย์

1.3.1 ดูดตัวอย่างจากข้อ 1.2.3 อย่างละ 1 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) ลงในจานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้ว

1.3.2 เททับด้วยอาหาร PCA (Plate count agar) ประมาณ 15 มิลลิลิตร

1.3.3 หมุนจานเพาะเชื้อเบาๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวประมาณ 15 นาที

1.3.4 อบจานเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส ในลักษณะคว่ำจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.3.5 ตรวจนับจำนวนโคโลนีจากจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนประมาณ 30-300 โคโลนี รายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (CFU/g)

1.4 วิธีการคำนวณ

$$\text{CFU/g} = \text{Average no. of colonies} \times \text{dilution factor}$$

ภาคผนวก ก

การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส

1. การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มข้นของกลิ่นควาไ้ดัดแปลงจากวิธีการของ Hoyle and Merritt (1994) อ้างตาม รุ่งอรุณ (2545)

ในการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มข้นของกลิ่นควาจากไ้ในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นนี้ จะใช้ผู้ทดสอบที่ได้รับการฝึกฝนจำนวน 15 คน โดยใช้โครงไ้บดเป็นตัวอย่างมาตรฐานของกลิ่นควาไ้ ซึ่งในการดำเนินการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นควาไ้จะเริ่มจากให้ผู้ทดสอบดมกลิ่นควาไ้จากโครงไ้บดที่ผ่านการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นต่างๆ รุ่งอรุณ (2545) พบว่า ระดับความเจือจางของหัวและไ้ปลาบดที่ผู้ทดสอบสามารถบอกได้ว่าเป็นกลิ่นควาปลาและเป็นระดับความเจือจางที่ให้กลิ่นควาปลาที่ไม่เข้มข้นมากเกินไป คือ ที่ระดับความเจือจางของหัวและไ้ปลาบดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 4 และ 1 ต่อ 8 จึงใช้ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกับรุ่งอรุณ

เมื่อนำตัวอย่างมาตรฐานที่ระดับความเจือจางทั้ง 3 ระดับมาให้ผู้ทดสอบทำการดมกลิ่นควาไ้ และให้คะแนนความเข้มข้นของกลิ่นควาไ้ให้ตรงกับความรู้สึก โดยใช้แบบสอบถามแบบการใช้สเกล จะได้ค่าคะแนนความเข้มข้นของกลิ่นควาไ้ของตัวอย่างมาตรฐานที่ระดับความเจือจางของโครงไ้บดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1, 1 ต่อ 4 และ 1 ต่อ 8 ดังนี้คือ 13.87 (R_1) 8.03 (R_2) และ 1.65 (R_3) ตามลำดับ

สำหรับการฝึกฝนผู้ทดสอบนั้นทำได้โดยการนำตัวอย่างมาตรฐานของกลิ่นควาไ้ที่ระดับความเจือจางทั้ง 3 ระดับ มาให้ผู้ทดสอบดมกลิ่น เพื่อสร้างความคุ้นเคย และจะนำมาให้ผู้ทดสอบดมกลิ่นเพื่อรู้พื้นความจำก่อนที่จะทำการทดสอบตัวอย่างผลิตภัณฑ์จริงทุกครั้ง

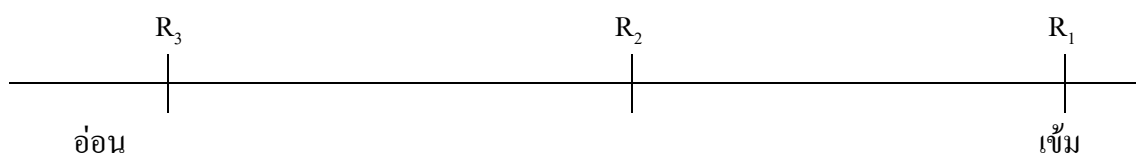
แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ชื่อสกุล _____ วันที่ _____

ผลิตภัณฑ์ : โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงไก่บด

คำชี้แจง กรุณาทดสอบกลิ่นคาวจากใบ ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้นที่เสนอให้จาก
ซ้ายไปขวา และประเมินคุณลักษณะด้านความเข้มของกลิ่นคาวจากใบ โดยทำเครื่องหมาย (I) ลงบน
เส้นซึ่งแสดงถึงความเข้มของกลิ่นคาวจากใบ พร้อมทั้งเขียนรหัสตัวอย่าง

กลิ่นคาวจากไก่



วิจารณ์ข้อเสนอแนะ

ขอบคุณ

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวมนฤทัย ศรีทองเกิด
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 13 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	กาญจนบุรี
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนบุคคลภายนอก มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต