บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ของวัตถุดิบ

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและจุลินทรีย์ ดังตารางที่ 4.1 พบว่าเม็ดเลือดแดงมีโปรตีน 34.26% ไขมัน 0.33% เกลือ 0.45% เหล็ก 1080 ppm จุลินทรีย์ทั้งหมด $2x10^3$ CFU/ml coliform bacteria $2.5x10^2$ CFU/ml และไม่พบ Escherichia coli ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับองค์ประกอบของเม็ดเลือดแดงสุกร ซึ่งวิเคราะห์โดย Grant (1980)กับ Nakamura และคณะ (1986) การที่เม็ดเลือดแดงมีโปรตีนสูงถึง 34.26% ซึ่งสูงกว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อจากสัตว์ชนิดเดียวกัน จึงน่าจะนำโปรตีนดังกล่าวนี้มาใช้ประโยชน์ ในอุตสาหกรรมอาหารได้บ้าง นอกเหนือจากประโยชน์ทางด้านโภชนาการ แต่เนื่องจากโปรตีนในเม็ดเลือดแดงประกอบไปด้วย heme ซึ่งมีเหล็ก เป็นองค์ประกอบถึง 1080 ppm เหล็กใน heme เมื่อได้รับความร้อนจะถูกออกซิไดซ์ เป็นผลให้ heme เปลี่ยนสภาพไปเป็น hemin ที่มีสีน้ำตาลดำ โปรตีนจากเลือดจึงไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท (Tybor และคณะ, 1975) ดังนั้นการนำโปรตีนจากเม็ดเลือดแดงมาปรับปรุงคุณภาพด้วยเอนไซม์ proteases โดยย่อยสลายโปรตีน globular ที่มีลักษณะเป็นก้อนกลม ให้คลายตัวออกเป็นสายสั้นและสายตรงมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ heme หลุดออกจากโปรตีน globinได้ การย่อยสลายโปรตีนของเม็ดเลือดแดงจากสุกรมีความเป็นไปได้สูง เพราะจากการวิเคราะห์องค์ประกอบ ของเม็ดเลือดแดงพบว่า มีไขมันอยู่เพียง 0.33%โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำ โดยทั่วไปแล้ว ไขมันจะเป็นตัวขัดขวางการย่อยสลายโปรตีน ด้วยการสร้างพันธะกับโปรตีนโมเลกุล ทำให้มีโครงสร้างใหญ่และซับซ้อนขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เยื่อหุ้มในเซลของเม็ดเลือดแดง ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลาย (Hald และคณะ, 1981) และเมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ในเม็ดเลือดแดง จะเห็นว่า

แม้จะตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมด และ coliform bacteria แต่ตรวจไม่พบ E.coli ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์โดย Nakamura และคณะ (1986) แสดงว่าการเก็บรวบรวมเลือดจากโรงฆ่าสัตว์ของบริษัท ไทยแปซิฟิค จำกัด เพื่อนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท และนำมาบริโภค ใช้อุปกรณ์ในการเก็บเลือดและกระบวนการผลิตที่ถูกสุขลักษณะจึงได้เลือดที่สะอาด เหตุที่มีการตรวจพบ coliform bacteria อาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างที่มีการเก็บตัวอย่างและการขนย้าย (Grant, 1980; Wismer และ Pederson, 1988)

5.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ proteases เชิงพาณิชย์ที่ใช้ย่อยสลายโปรตีนมีหลายชนิด ในงานทดลองนี้ได้เลือก Alcalase® และ Neutrase® มาศึกษาทดลองเบื้องต้นก่อนเพื่อที่จะเลือกชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม เนื่องจาก Kilara(1985) ได้รายงานประสิทธิภาพในย่อยสลาย hemoglobin ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดว่ามีค่าเท่ากับ 160 และ 135% ตามลำดับเมื่อคิดเทียบให้ papain เป็น 100% ในการทดลองเบื้องต้นได้ใช้ภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดได้แก่ Alcalase® (0.6 unit/g) ที่ pH 8.50 อุณหภูมิ 60 ^{o}C (NOVO Industri, 1984a) และ Neutrase® (0.5 unit/g) ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 60 ^{o}C (NOVO Industri, 1987) ปริมาณเอนไซม์ 6 % โดยน้ำหนักโปรตีนเม็ดเลือดแดง ย่อยสลายนาน 40 นาที ไฮโดรไลเซทจากเม็ดเลือดแดงที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase® มีค่า heme content recovery 56% ส่วนไฮโดรไลเซทที่ได้จากเอนไซม์ Neutrase® มีค่า heme content recovery 82% จะเห็นได้ว่า ไฮโดรไลเซทที่ได้จากเอนไซม์ Alcalase® มี heme เหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า แม้ว่าเอนไซม์ Alcalase® และ Neutrase® เป็น endopeptidases เช่นเดียวกัน แต่ผลิตจากแบคทีเรียต่างชนิดกัน คือ Alcalase® ได้จาก Bacillus licheniformis ส่วน Neutrase® ได้จาก Bacillus subtilis เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้มี specific activity ในการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกันไป ในส่วนโครงสร้างของ hemoglobin จะประกอบด้วยวงแหวน heme ยึดติดกับโปรตีน globin ที่สาย polypeptides ในส่วน hydrophobic ของโมเลกุล เอนไซม์ Alcalase® มี specificity ในการย่อยสลายที่

บริเวณหมู่ hydrophobic ในสาย polypeptides ได้ดี ทำให้กำจัด heme ออกจาก hemoglobin ได้มากกว่า เอนไซม์ Neutrase® (Adler และ Nissen ,1986 , Rossi และ Fanelli, 1964 , Hayakawa และคณะ, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Nakamura และคณะ(1986) ที่ได้ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ proteases พบว่า เอนไซม์ชนิด basic protease ซึ่งได้จาก Bacillus licheniformis สามารถกำจัด heme ได้มากกว่า neutral protease จาก Bacillus subtilis เมื่อใช้ภาวะที่ดีที่สุดของเอนไซม์แต่ละชนิด ดังนั้นจึงเลือกเอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g) สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้

5.2.1 ปริมาณเอนไซม์และอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ปริมาณเอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g) แปร E/S เป็น 2, 4, 6, 8 และ 10 % โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลายเป็น 35, 45, 55 และ 65^{o}C

ผลการวัดค่า DH และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าดังกล่าว ดังในตารางที่ 4.2-4.3 แสดงว่าปริมาณเอนไซม์ อุณหภูมิที่ใช้ในย่อยสลาย รวมทั้งอิทธิพลร่วมของทั้งสองปัจจัย มีผลต่อค่า DH ของไฮโดรไลเซทที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า DH กับปริมาณเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ (รูปที่ 4.1) พบว่า ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น ไฮโดรไลเซทมีค่า DH เพิ่มขึ้น เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อ substrate สูงขึ้น โอกาสที่เอนไซม์จะจับกับโมเลกุลของโปรตีนจะมีมากขึ้น จึงเกิดการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ค่า DH เพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มเอนไซม์ปริมาณมากขึ้น จนพอดีกันกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ ค่า DH จะเริ่มคงที่ (Whitaker, 1972) แม้เพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นก็ไม่ทำให้ค่า DH เพิ่มขึ้น และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 35^{o}C ค่า DH จะเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิ 65 ^{o}C อัตราการย่อยสลายคงที่ ค่า DH จึงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ผลดังกล่าวนี้ แสดงว่าอุณหภูมิ 55-65 ^{o}C เป็นช่วงที่เอนไซม์มี activity สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Petersen (1981) ที่ย่อยสลาย hemoglobin แปลงสภาพ ด้วยเอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g) ความเข้มข้น 0.3 AU/litre ที่อุณหภูมิ 30-80^{o} C

พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 30°C activity ของเอนไซม์ในการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ และถึงระดับสูงสุดที่อุณหภูมิ 55-65 °C หลังจากนั้น activity ของเอนไซม์จะลดลง ซึ่งเป็นผลจากการที่พลังงานความร้อนเพิ่มสูงมากขึ้น ถึงระดับที่เอนไซม์เกิดการแปลงสภาพ จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test พบว่าการใช้เอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g) ในปริมาณ E/S 8 และ 10 %โดยน้ำหนักโปรตีนย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ได้ไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH สูงสุด และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) จึงเลือกภาวะดังกล่าวนี้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากเป็นภาวะที่เอนไซม์ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพดีที่สุด และเพื่อให้ประหยัดทั้งเอนไซม์และพลังงาน ในการผลิตจึงได้เลือกใช้ เอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g) ที่อัตราส่วน E/S 8 % โดยน้ำหนักโปรตีน และอุณหภูมิ 55°C

5.2.2 ศึกษาความสัมพันธ์สมการ regression ของ DH กับเวลา

ในการวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของค่า DH ของไฮโดรไลเซทที่ระดับต่างๆ ต่อคุณภาพของโปรตีนที่ได้ ซึ่งในการวัดค่า DH นั้นมีขั้นตอนที่ต้องมีการเตรียม และวิธีการที่ยุ่งยากจากรายงานของ Duarte และคณะ (1988) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าจุดเยือกแข็งที่ลดลงของไฮโดรไลเซท กับค่า DH ที่เพิ่มขึ้นซึ่งการวัดจุดเยือกแข็งมีความสะดวกและรวดเร็ว และจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเมื่อเวลามากขึ้น ค่า DH ของ ไฮโดรไลเซทมีค่าสูงขึ้น ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงศึกษาผลของเวลาต่อการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์ Alcalase® โดยแปรเวลาซึ่งเป็นตัวแปรอิสระ(independent variable) ที่ 5, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที วัดค่า DH ของไฮโดรไลเซทที่ได้ซึ่งเป็นตัวแปรตาม (dependent variable) โดยทดลอง 6 ซ้ำ จากนั้นนำมาหาความสัมพันธ์ regression ของเวลากับ DH จากการคำนวณพบว่าสมการอยู่ในรูป logarithmic regression ดังนี้ $y = 16.473 + 20.897$ และค่า corelation coefficient (r^2) = 0.985 ซึ่งมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) ค่า r^2 เป็นค่าที่ยืนยันว่าตัวแปรอิสระและตัวแปรตามมีความสัมพันธ์กันจริง และค่า regression coefficient(b) คือค่าแสดงความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ และตัวแปรตาม จากสมการพบว่า b มีค่าเท่ากับ +20.897 แสดงว่ามีความสัมพันธ์กันจริงในเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

เหตุที่รูปแบบสมการเป็นเช่นนี้เนื่องมาจาก ในช่วงแรกของปฏิกิริยา เส้นกราฟมีความชันมาก เพราะเอนไซม์ยังอยู่ในรูปอิสระและการเกิด ES complex มีไม่มากนัก อัตราการย่อยสลายในช่วงแรกจึงเกิดขึ้นเร็ว ในระยะหลังของปฏิกิริยาไม่มีเอนไซม์อิสระอยู่ในสารละลาย หรือมีอยู่น้อยมากส่วนใหญ่อยู่ในรูป ES complex อัตราการย่อยสลายในช่วงต่อมาจึงลดลง และคงที่ในที่สุด (Adler และ Nissen, 1986) จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ได้สมการดังนี้ $y = 16.473 + 20.897 \ln x$ ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไป สามารถกำหนดเวลาโดยประมาณในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงให้ได้ไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH ตามต้องการได้โดยการคำนวณจากสมการดังกล่าว

5.3 <u>ศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH ที่กำหนด</u>

จากการศึกษาเบื้องต้นได้ผลิตไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH ตั้งแต่ 10-100 พบว่า ที่ DH 10-40% ไม่เป็นไปตามความสัมพันธ์สมการ regession เนื่องมาจากในช่วงแรกของปฏิกิริยาเกิดการย่อยสลายที่เร็วมาก ค่า DH ในช่วง 10-40% จึงคลาดเคลื่อนมาก แต่ที่ DH 50 พบว่าเป็นไปตามความสัมพันธ์ดังกล่าว ดังนั้นในขั้นตอนจึงเลือกศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH สุดท้าย 50,60,70,80,90, และ 100 โดยใช้ภาวะดังต่อไปนี้ คือ ปริมาณเอนไซม์ Alcalase® (0.6 unit/g)E/S 8 %โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 55°C ต้องใช้เวลาในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง 4 นาที 58 วินาที 8 นาที 2 วินาที 12 นาที 57 วินาที 20 นาที 54 วินาที 33 นาที 44 วินาที และ 54 นาที 26 วินาที ตามลำดับ (จากสมการความสัมพันธ์ของเวลาและ DH, ข้อ 4.2) ในการทดลองนี้ใช้ % yield, protein recovery, heme content recovery เป็นเกณฑ์ในการเลือก DH ที่เหมาะสม เนื่องจาก heme content recovery จะเป็นดัชนี สำหรับสีของไฮโดรไลเซทที่ได้ แต่เนื่องจากการกำจัดสีหรือ heme อาจมีผลทำให้ yield และ protein recovery ลดลงได้ จึงได้ใช้ค่าทั้ง 2 นี้เป็นปัจจัยรอง ผลการวัด yield, protein recovery, heme content recovery และการวิเคราะห์ความแปรปรวนค่าดังกล่าว (ตารางที่ 4.5-4.6) แสดงว่า ค่า DH มีผลอย่างผกผัน($p \leq 0.05$) ต่อ yield, protein recovery และ heme content recovery โดยเมื่อค่า DH ของไฮโดรไลเซทสูงขึ้นโดยเฉพาะที่ 90 และ 100 % yield, protein recovery และ heme content

recovery มีค่าต่ำที่สุด ในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วย polypeptides สายสั้นเป็นจำนวนมากและการกำจัด heme เกิดขึ้นโดย เอนไซม์มีความจำเพาะในการย่อยสลายบริเวณ hydrophobics ในโมเลกุลของโปรตีนได้ดี ซึ่งที่บริเวณดังกล่าวนี้ heme ยึดติดกับส่วนโปรตีนโมเลกุลด้วยแรง Van der Waals ระหว่าง ferrous กับหมู่ imidazole ของ histidine ตำแหน่งที่ 87 ในสาย alpha และ 92 ในสาย beta ของ polypeptides และการจัดโครงสร้างที่เป็นช่องว่าง (pocket) ของโมเลกุล hemeoglobin โดยหันส่วนที่เป็น hydrophobics เข้าหากันทำให้โมเลกุล hemoglobin เสถียร การย่อยสลายจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ทำให้ heme หลุดออกจากโมเลกุลของโปรตีน globin และเมื่อมีการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรด hydrochloric chloride ion จะรวมตัวกับ ferrous ion เกิดเป็นตะกอน ferrous chloride นอกจากนั้น polypeptides บางสายที่มีค่า pI 4 อาจตกตะกอนจากการที่กรด hydrochloric ทำให้ pH ของระบบต่ำลงด้วย (Rossi และ Fanelli, 1964, Hayakawa และคณะ, 1986) ดังนั้นจึงทำให้ yield ,protein recovery และ heme content recovery มีค่าลดลง

เมื่อผลิตลูกชิ้นไก่โดยใช้ไฮโดรไลเซทที่ DH ต่างๆเป็นสารเชื่อม แล้ววัดค่าแรงตัดขาดกับการสูญเสียน้ำหนักหลังสุก พบว่า DH มีผลต่อแรงตัดขาดของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่อย่างมีนัยสำคัญ โดยผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH สูงเป็นสารเชื่อมมีค่าแรงตัดขาดสูงขึ้นด้วย และไฮโดรไลเซทที่ DH 90 และ 100 ให้ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ที่มีมีค่าแรงตัดขาดสูงที่สุด เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจอธิบายได้ว่า โปรตีนหลักที่อยู่ในกล้ามเนื้อสัตว์ คือ myosin และ actin มี myoglobin ซึ่งมีโครงสร้างปฐมภูมิคล้ายกับ hemoglobin เป็นองค์ประกอบอยู่ โปรตีน myosin และ actin มีโครงสร้างตติยภูมิต่างจาก hemoglobin โดยเฉพาะ myosin ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นสายยาวไม่เป็นก้อนกลม (globular)เหมือน hemoglobin จึงมีสมบัติในการยึดเกาะโมเลกุลน้ำและยึดกันเอง หรืออีกนัยหนึ่งมีสมบัติเป็นสารเชื่อมที่ดี hemoglobin ในเลือดเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase® โครงสร้างตติยภูมิเดิมเปลี่ยนไป เป็น polypeptides สายสั้น โดยที่ปลายสาย และที่ functional group มีหมู่ $-NH_3^+$ และ $-COO^-$ อิสระเพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลข้างเคียงได้มากขึ้น (Rossi และ Fanelli, 1964, Cheftel และคณะ, 1985) เมื่อนำไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH 90 และ 100 มาใช้ในลูกชิ้นไก่จึงทำให้ค่าแรงตัดขาด สูงกว่าตัวอย่างที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH ต่ำกว่า นอกจากนั้น

ไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH 90 และ 100 ยังมีสีอ่อนกว่าพวกที่มีค่า DH ต่ำกว่า ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นที่ได้จึงมีสีอ่อนกว่าตามไปด้วย ในส่วนของปริมาณผลผลิตลูกชิ้นไก่ พบว่า DH ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อค่าดังกล่าวนี้ ($p > 0.05$) เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากปริมาณที่เติมในผลิตภัณฑ์เติมลงเพียง 3 % โดยน้ำหนัก ซึ่งนับว่าน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนกล้ามเนื้อไก่ หรือ myofibrillar protein ซึ่งมีอยู่มากถึง 2.3 % โดยน้ำหนักและอีกประการหนึ่งในผลิตภัณฑ์ได้เติมสาร TARI® K7 ซึ่งเป็นของผสมพวก tripolyphosphate และ pyrophosphate ในปริมาณ 0.3 % โดยน้ำหนัก สารดังกล่าวนี้มีผลในการเพิ่มความสามารถของ myofibrillar proteins ในการจับโมเลกุลของน้ำอยู่แล้ว (Ellinger, 1972) ปริมาณน้ำที่เสียไปจากการทำให้สุก จึงได้รับอิทธิพลจากทั้ง 2 ปัจจัยนั้นมากกว่าไฮโดรไลเซท ค่าที่ได้จึงไม่แตกต่างกัน จากผลการทดลองในขั้นนี้ได้เลือกไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH 90 และ 100 เพื่อใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

5.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการกำจัดสีไฮโดรไลเซท

5.4.1 ปริมาณ activated carbon powder และอุณหภูมิ

ไฮโดรไลเซทจากเม็ดเลือดแดงที่ผลิตโดยใช้เอนไซม์ Alcalase® แม้จะมีสีอ่อนกว่าสีของเม็ดเลือดแดงเดิมจากการที่สามารถกำจัด heme ออกไปได้บางส่วน แต่ยังมีสีน้ำตาลที่เกิดจาก hemin เหลืออยู่ค่อนข้างมากซึ่งทั้งนี้อาจเนื่องจากยังมี heme บางส่วนไม่ทำปฏิกิริยากับ chloride ion จึงยังยึดติดกับสาย polypeptides การกำจัดฮีมที่เหลือเหล่านี้อาจทำได้โดยการดูดซับด้วย activated carbon powder (Hald และคณะ, 1981) ขั้นตอนนี้จึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการกำจัดสีของไฮโดรไลเซท โดยแปรปริมาณ activated carbon powder และ อุณหภูมิในการดูดซับ

ภาวะที่ศึกษาในการทดลองนี้ ได้จากการทดลองเบื้องต้น ซึ่งได้ลองกำจัดสีของไฮโดรไลเซทด้วย activated carbon powder 10 %โดยน้ำหนักโปรตีน ที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 20 40 และ 60 นาที พบว่า ตัวอย่างที่ใช้เวลาในการกำจัดสี 60 นาที มีค่า heme content recovery ต่ำที่สุดจึงเลือกเวลาดังกล่าวมาศึกษา โดยแปรปริมาณ activated carbon powder 10, 20, 30 % แปรอุณหภูมิเป็น 35, 45, 55 และ 65 °C

ใช้เวลาในการกำจัดสีนาน 60 นาที พบว่าเมื่อใช้ปริมาณ activated carbon powder และอุณหภูมิที่สูงขึ้น ค่า protein recovery ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่ค่า heme content recovery ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และ มีอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและปริมาณ activated carbon ที่ใช้กำจัดสี เหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากไฮโดรไลเซทที่ DH 90 ยังมี polypeptides ที่เป็นสายที่ยาวและ heme ยังยึดติดอยู่บนโมเลกุลโปรตีนปริมาณมาก ซึ่งหลังจากที่ activated carbon ดูดซับ heme ที่อยู่บน polypeptides สายสั้นหมดแล้ว ไม่สามารถดูดซับโมเลกุลที่มีสายยาวซึ่งมีขนาดที่ใหญ่กว่า pore size บน carbon atom จึงทำให้ไม่มีการดูดซับเพิ่มและเกิดภาวะสมดุลในเวลาต่อมา (Garten และ คณะ, 1957) จากตารางที่ 4.8 ค่า heme content recovery ที่อุณหภูมิ 55-65 ^{o}C และปริมาณ activated carbon 20-30 % ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และเนื่องจากไฮโดรไลเซทที่ได้ประกอบไปด้วย polypeptides ที่มีขนาดใหญ่ ทำให้การสูญเสียปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับไปกับ activated carbon เกิดได้น้อย เมื่อวิเคราะห์ protein recovery จึงพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นเมื่อพิจารณาถึงประเด็นการประหยัดค่าใช้จ่ายและพลังงาน จึงได้เลือกภาวะที่ใช้ activated carbon powder 20 % อุณหภูมิ 55^{o}C เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

สำหรับไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH 100 ภาวะที่ให้ค่า heme content recovery ต่ำที่สุดคือ activated carbon powder 30%-65^{o}C โดยภาวะ 20%- 55^{o}c, 20%- 65^{o}c และ 30%- 55^{o}c ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีค่ามีค่า heme content recovery ต่ำรองลงมา และสามภาวะสุดท้ายนี้ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่ภาวะ 20%-65^{o}C, 30%- 55^{o}c, และ 30%-65^{o}C มีค่า protein recovery ต่ำกว่าภาวะอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ตัวถูกละลายในระบบคือไฮโดรไลเซท มีพลังงานสะสมสูงขึ้น อัตราการแพร่กระจายจึงสูงขึ้น ทำให้มีโอกาสเคลื่อนที่ไปสัมผัสกับ activated carbon มากขึ้น ทำให้การดูดซับเกิดขึ้นได้เร็ว ดังนั้น heme จึงถูกดูดซับได้มากขึ้น นอกจาก heme แล้ว กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น non-polar กับ di หรือ tripeptides ในระบบยังถูกดูดซับมากขึ้นด้วย ทำให้ ค่า protein recovery ต่ำลง (Hassler, 1974) ดังนั้นจึงเลือกภาวะเหมาะสมที่สุดที่ปริมาณ activated carbon powder 20%โดยน้ำหนักโปรตีน อุณหภูมิ 55^{o}c เนื่องจากผลผลิตโปรตีน เท่ากัน แต่ค่า heme content recovery ต่ำที่สุด

5.4.2 เวลาที่ใช้ในการกำจัดสี

จากผลการทดลองเบื้องต้นที่กล่าวมาแล้ว ได้นำมาออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการกำจัดสี โดยแปรเวลาในการดูดซับเป็น 20, 40, 60, 80 และ 100 นาที วิเคราะห์ค่า heme content recovery (ตารางที่ 4.11) พบว่าที่เวลา 80 นาที สามารถกำจัดสีได้มากที่สุด ในไฮโดรไลเซททั้ง 2 ตัวอย่าง กลไกในการกำจัดสีของ activated carbon เกิดจากปฏิกิริยาทางกายภาพ โดยในช่วงแรกของการดูดซับ activated carbon มีเนื้อที่ใน pore size ซึ่งมีประสิทธิภาพในการดูดซับสารอื่นอยู่มาก heme จึงถูกดูดซับได้มาก ด้วย Van der Waals โดยใช้บริเวณที่มีสมบัติ hydrophobic ของ heme ยึดกับบริเวณ pore size บน carbon โมเลกุลทำให้อัตราการดูดซับในช่วงแรกสูง จนที่ว่างบริเวณ pore size ลดน้อยลงเรื่อยๆ และในที่สุดจะถึงระดับที่อัตราการดูดซับเท่ากับอัตราสารที่ถูกดูดซับหลุดออกไปจากโมเลกุล หรือถึงภาวะสมดุล (Hutchins, 1980) ผลการทดลองนี้แสดงว่าภาวะสมดุลเริ่มเกิดเมื่อปฏิกิริยาดำเนินติดต่อกันนานถึง 80 นาที โดยจาก 80 ถึง 100 นาที ไม่มีการดูดซับเพิ่มขึ้นอีก นอกจากนี้ Garten และคณะ (1957) ได้กล่าวถึงผลของขนาดอนุภาคสารที่ถูกดูดซับ ต่อความสามารถในการดูดซับของ activated carbon ไว้ว่าถ้าขนาดอนุภาคของสารที่ถูกดูดซับใหญ่เกินไปจะทำให้ประสิทธิภาพของ activated carbon ในการดูดซับลดลง ผลดังกล่าวปรากฏในการทดลองนี้จากการที่ไฮโดรไลเซท DH 100 ซึ่งในทางทฤษฎีน่าจะมีขนาดเฉลี่ยของอนุภาคที่เล็กกว่าเนื่องจากการย่อยสลายที่สมบูรณ์มีค่า heme content recovery ต่ำกว่า ไฮโดรไลเซท DH 90 ถึง 3 เท่าตัว หลังปฏิกิริยาการฟอกสีที่ใช้เวลาเท่ากัน

จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมา จึงได้เลือกเวลาในการกำจัดสี เป็น 80 นาที สำหรับไฮโดรไลเซททั้ง 2 ตัวอย่าง เมื่อใช้ activated carbon powder 20% โดยน้ำหนักโปรตีน และอุณหภูมิขณะกำจัดสี 55 ^{0}C

5.4.3 สมบัติการเป็นสารเชื่อมและการยอมรับทางประสาทสัมผัส

ศึกษาสมบัติการเป็นสารเชื่อม และการยอมรับทางประสาทสัมผัสของไฮโดรไลเซทที่ผ่านการฟอกสี จากภาวะที่สรุปได้ในข้อ 5.4.2 โดยนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ 3%โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบ กับตัวอย่างที่มีค่า DH เท่ากันแต่ไม่กำจัดสี ผลิตภัณฑ์ที่ได้วัดค่าแรงตัด

ขาดและทดสอบทางประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่น และรสชาติ (ตารางที่ 4.15 - 4.16) พบว่า การกำจัดสีด้วย activated carbon powder ให้ไฮโดรไลเซทที่เมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์แล้วไม่มีผลทำให้ค่าแรงตัดขาดเปลี่ยนแปลง ($p > 0.05$) แต่ค่าดังกล่าวในลูกชิ้นไก่ที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH 100 สูงกว่าตัวอย่างที่ใช้ใช้ไฮโดรไลเซท DH 90 ($p \leq 0.05$) ขณะที่ผลทางประสาทสัมผัสด้านสี แสดงว่าลูกชิ้นไก่ที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH 100 และผ่านการกำจัดสีมีคุณภาพด้านสีดีที่สุด และแตกต่างจากตัวอย่าง DH เดียวกันแต่ไม่กำจัดสี ($p \leq 0.05$) ลูกชิ้นไก่ที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH 90 กำจัด หรือไม่กำจัดสี ไม่มีความแตกต่างในด้านสี ($p>0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ activated carbon powder กำจัดสีไฮโดรไลเซท DH 90 ได้เพียง 16.73% ในขณะไฮโดรไลเซท DH 100 กำจัดสีออกไปได้ถึง 79.3% ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในลูกชิ้นไก่ ไฮโดรไลเซท DH 100 จึงให้ผลิตภัณฑ์สีอ่อนกว่าเมื่อใช้ตัวอย่างไม่กำจัดสีเป็นสารเชื่อมอย่างเห็นได้ชัด เมื่อพิจารณาทางด้านกลิ่น และรส พบว่าลูกชิ้นไก่ที่ใช้ไฮโดรไลเซท DH 90 และ 100 มีแนวโน้มการเปลี่ยนของคะแนนในแนวเดียวกัน กล่าวคือ กลิ่นรสของตัวอย่างที่ใช้ไฮโดรไลเซทที่ผ่านการกำจัดสีแล้ว ดีกว่าพวกที่มีไฮโดรไลเซทที่ไม่กำจัดสีผสมอยู่ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะไฮโดรไลเซทก่อนการกำจัดสี มีกลิ่นคาว และขมเล็กน้อย ซึ่งกลิ่นและ รสไม่ดีเหล่านี้ เกิดจากกรดอะมิโนอิสระประเภท hydrophobics บางชนิดเช่น tryptophan , tyrosine, และ phenylalanine ซึ่งอาจมีได้หลังปฏิกิริยา hydrolysation (Schrodter และ Wolm ,1980) activated carbon ดูดซับสารที่มีสมบัติหรือหมู่ hydrophobic ได้ดี จึงดูดซับกรดอะมิโน, dipeptides และ tripeptides ที่มีสมบัติ hydrophobics ได้มาก จึงทำให้กลิ่น และรส ของไฮโดรไลเซทที่ได้ดีขึ้น (Hassler,1974) จากผลการทดลองดังกล่าว จึงเลือกโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีค่า DH 100 กำจัดสี ด้วย activated carbon powder 20 % โดยน้ำหนักโปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดจากการทดลองนี้

5.5 <u>ศึกษาภาวะในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเซท</u>

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้มีปริมาณน้ำอยู่สูง อายุการเก็บสั้น และไม่สะดวกแก่การใช้นำไปใช้งานรวมทั้งขนส่ง และจำหน่าย จึงนำมาทำ ไฮโดรไลเซทผง ด้วยวิธี freeze

drying และ spray drying เนื่องจากข้อจำกัดจากสมรรถนะของเครื่องซึ่งไม่สามารถแปรภาวะที่ใช้ในการทำแห้งได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงกำหนดสภาวะทำแห้งด้วยอุปกรณ์ทั้ง 2 ให้คงที่ (จากการศึกษาเบื้องต้น) แล้วเปรียบเทียบเฉพาะคุณภาพของไฮโดรไลเซทผงที่ได้จากทั้ง 2 วิธี โดยภาวะที่กำหนดไว้สำหรับทำแห้งแต่ละวิธีได้แก่ spray drying ใช้ อุณหภูมิลมเข้า 210 ^{o}C อุณหภูมิลมออก 90 ^{o}C ความดันลม 30 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อัตราการป้อน 400 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง freeze drying อุณหภูมิสุดท้าย shelf plate 35^{o}C อุณหภูมิ condensor -30^{o}C จากตารางที่ 4.19 ซึ่งเปรียบเทียบค่า solid และ protein recovery ที่ขั้นตอนต่างๆในกระบวนการผลิต โดยเริ่มจากเม็ดเลือดแดงตั้งต้นจนถึงไฮโดรไลเซทผง พบว่า หลังจากที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแล้ว ทั้งค่า protein และ solid recoveries ลดลงเหลือ 77.75 และ 67.63 % ตามลำดับ เนื่องจากขั้นตอนนี้เป็นการกำจัด heme ออกจากโครงสร้าง hemoglobin และมีการสูญเสียไฮโดรไลเซทบางส่วนที่มีค่า pI 4 หลังจากที่มีการปรับ pH เพื่อยับยั้งปฏิกิริยาเอนไซม์ เหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากที่ pI ผลรวมประจุสุทธิบวกและลบของหมู่ NH_3^+ และ COO^- และ functional group อื่นๆที่อยู่บนสายของโมเลกุลโปรตีน มีค่าเท่ากันทำให้สมบัติการละลายของโปรตีนลดลง จึงตกตะกอนลงมา (Regenstein และ Regenstein, 1984) และการกำจัดสีด้วย activated carbon เป็นการดูดซับ heme ที่เหลืออยู่ และรวมทั้งกรดอะมิโนบางชนิด เช่น tryptophan, tyrosine, และ phenylalanine ที่มีกลิ่นรสไม่ดีออกไป ทำให้ปริมาณของแข็งทั้งหมด และโปรตีนลดลงอีกจนเหลือ 70.24 และ 67.63 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับผลการทดลองของ Nakamura และคณะ (1986) ซึ่งรายงานว่าในช่วงที่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงมีค่า solid และ protein recoveries 87 และ 79 % ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผลการทดลองที่ได้อาจเนื่องจากในงานทดลองนี้ได้ปั่นแยก heme ออกจากไฮโดรไลเซทโดยสกัดและปั่นแยกถึง 2 ครั้งจึงอาจเป็นผลทำให้มีการสูญเสียทั้งของแข็งและโปรตีนออกจากผลิตภัณฑ์มากกว่า และในขั้นตอนทำแห้งพบว่า การทำแห้งวิธี spray drying ให้ solid และ protein recoveries 66.79 และ 48.31 % ซึ่งต่ำกว่า การทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ทั้งนี้เนื่องจาก freeze drying เป็นการทำแห้งแบบ batch ที่บรรจุผลิตภัณฑ์ในถาด การสูญเสียเกิดเพียงเล็กน้อยจากการติดตามภาชนะที่ใช้ แต่วิธี spray drying ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ spray dryer SD-04 ซึ่งเป็นขนาด lab scale ที่ใช้หลักการฉีดไฮโดรไลเซทจะถูกฉีดเป็นละอองฝอยด้วยความดัน 30 ปอนด์ต่อตารางนิ้วและสัมผัสลมร้อนที่เคลื่อนที่ผ่าน เข้ามาในทิศตรงกันข้าม การระเหยน้ำเกิดอย่าง

รวดเร็ว ไฮโดรไลเซทผงตกลงมาด้านล่าง และแยกจากลมร้อนด้วย cyclone separator ซึ่งการสูญเสียจะเกิดจากการที่ ไฮโดรไลเซทมีปริมาณของแข็งทั้งหมดเพียง 7%โดยน้ำหนัก จึงทำให้การทำแห้งไม่สมบูรณ์เนื่องจากมีปริมาณความชื้นสูง ทำให้ไฮโดรไลเซทผงมีส่วนที่ไม่แห้ง และเคลื่อนที่ไปเกาะอยู่ตามด้านข้างของเครื่อง ดังนั้นถ้าทำให้ไฮโดรไลเซทเข้มข้นขึ้นจะทำให้ไฮโดรไลเซทแห้งได้ง่ายขึ้น การสูญเสียก็จะลดน้อยลง เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของไฮโดรไลเซทผงที่ทำแห้งด้วยวิธี freeze drying และ spray drying เปรียบเทียบกับเม็ดเลือดแดงผงทำแห้งด้วยวิธี freeze drying (ตาราง 4.20) ตัวอย่างจากการทำแห้งทั้ง 2 วิธี มีโปรตีนต่ำกว่าเม็ดเลือดแดงผงเล็กน้อย แต่เถ้าและเกลือสูงกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากในกระบวนการย่อยสลายได้ มีการเติมกรดและด่างเพื่อปรับ pH ของปฏิกิริยาทำให้มีเกลือแร่จากปฏิกิริยาของกรด และด่างเพิ่มมากขึ้นในไฮโดรไลเซท เป็นผลทำให้สัดส่วนโปรตีนลดลงเถ้าสูงขึ้น ไฮโดรไลเซทผงทั้ง 2 ชนิดมีธาตุเหล็ก 0.0035-0.0036 % เปรียบเทียบกับตัวอย่างเม็ดเลือดแดงแล้ว จะเห็นว่ากระบวนการ hydrolysis กำจัดธาตุเหล็กออกไปได้ถึง 96.8 % ซึ่งผลดังกล่าวใกล้เคียงกับ Nakamura และคณะ (1986) ซึ่งได้รายงานว่าไฮโดรไลเซทผงที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Alcalase® และกำจัดสีด้วย activated carbon มีค่า ความชื้น 6.0 % โปรตีน 83.2 % ไขมัน 0.2 % และตรวจไม่พบธาตุเหล็ก

เมื่อพิจารณาสีของไฮโดรไลเซทซึ่งวัดด้วยด้วยเครื่อง Lovibond Tintometer (ตารางที่4.22) พบว่าสีแดง เหลือง และน้ำเงิน ของตัวอย่างทำแห้งด้วยวิธี freeze drying เข้มกว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งด้วยวิธี spray drying แต่ทั้ง 2 ตัวอย่างมีค่า brightness เท่ากัน ในการทำแห้งวิธี freeze drying ผลิตภัณฑ์ ผ่านการแช่เยือกแข็งและระเหิดน้ำออกไปโดยอุณหภูมิขณะระเหิดสูงเพียง 35 ^{o}C ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาตรคงเดิม แต่มีรูพรุนที่เกิดจากน้ำระเหิดออกไปสีของผลิตภัณฑ์ที่ได้ จึงมีสีที่เหมือนกับตัวอย่างก่อนการทำแห้ง แต่การทำแห้งด้วยวิธี spray drying ใช้การพ่นตัวอย่างให้เป็นฝอย และผ่านลมร้อน โดยใช้อุณหภูมิลมออก 90^{o}C ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะอนุภาคเป็นก้อนกลม ซึ่งมีผลต่อการสะท้อน และหักเหของแสงที่มองจึงทำให้สีอ่อนกว่าที่ควร (Harris และ Karmas, 1975)

สมบัติด้านการใช้งาน (functional properties)ในผลิตภัณฑ์อาหารที่สำคัญของโปรตีน อันหนึ่งได้แก่ การละลาย ในการทดลองนี้ได้ศึกษาสมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากการทำแห้งทั้ง 2 วิธี (ตารางที่ 4.23 และรูปที่ 4.6) ที่ pH 4, 5, 6,

7, 8, 9, และ 10 พบว่าการทำแห้งด้วยวิธี freeze drying ให้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติด้านการละลายดีกว่าตัวอย่างที่ทำแห้งวิธี spray drying ที่ทุกๆ pH Hermansson และ Hermansson(1976) อธิบายว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วย เอนไซม์ทำให้ globin แตกออกเป็น polypeptides สายสั้นซึ่งมีส่วนของหมู่ $-NH_3^+$ และ $-COO^-$ มากขึ้น เมื่อตัวถูกละลายมีขั้วมากขึ้น จะละลายในตัวทำละลายที่มีขั้วมากขึ้นด้วย การที่ตัวอย่างที่ทำแห้งด้วย freeze drying มีค่าการละลายสูงกว่า เป็นเพราะการทำแห้งด้วยวิธี spray drying ใช้ความร้อนสูงกว่ามาก โปรตีนที่บริเวณผิวของอนุภาคเกิดการแปลงสภาพบางส่วน นอกจากนั้นความร้อนทำให้โปรตีนโมเลกุล เกิด aggregation ทำให้พื้นที่ผิว และ polar amino group สำหรับจับโมเลกุลน้ำลดลง อัตราการละลายในน้ำจึงลดต่ำลง (Cheftel, Cuq และ Lorient, 1985)

ความร้อนของวิธีทำแห้งทั้ง 2 วิธี มีผลทำให้จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบในไฮโดรไลเซททั้ง 2 ตัวอย่างแตกต่างกัน (ตารางที่ 4.21) ตัวอย่างไฮโดรไลเซทแช่เย็นมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่าไฮโดรไลเซทผงเล็กน้อย ซึ่งอาจเป็นผลจากการปนเปื้อนระหว่างการเตรียมไฮโดรไลเซท เนื่องจากเลือดสดเป็นอาหารที่ดีของจุลินทรีย์ จึงเกิดการปนเปื้อนได้ง่าย ดังนั้นต้องควบคุมให้มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด อีกประการหนึ่งการเก็บตัวอย่างที่ภาวะเยือกแข็งโดยทั่วไปจะมีผลในการลดปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ได้ประมาณ 1 log cycle (Hayes, 1992) เมื่อพิจารณาผลของการทำแห้งต่อจำนวนของจุลินทรีย์ในไฮโดรไลเซท พบว่า spray dryingให้ผลิตภัณฑ์ที่มีจุลินทรีย์ต่ำกว่า freeze drying เพราะความร้อนสูงในช่วงอุณหภูมิลมเข้า 190 ^oC ทำให้จุลินทรีย์บางส่วนถูกทำลายไป และทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ coliform bacteria และ E. coli ซึ่งผลดังกล่าวไม่สอดคล้องกับ specification ของไฮโดรไลเซทจากเม็ดเลือดแดงที่ผลิตด้วยเอนไซม์ที่ใช้ทางการค้า (Aprocel® ผลิตโดย Aprocat,S.A.ประเทศเสปน และ Vepro® 90HT ผลิตโดย Veos NV ประเทศเบลเยี่ยม) ได้กำหนดไว้ว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบต้องไม่เกิน 5000 CFU/g และตรวจไม่พบ E. coli ทั้งนี้เนื่องมาจากการผลิตผลิตภัณฑ์ผงในอุตสาหกรรม มีการให้ความร้อนในระดับ pasteurization ก่อนการทำแห้งซึ่งเป็นการลดจำนวนจุลินทรีย์โดยเฉพาะ vegetative cell ขั้นตอนหนึ่ง แต่ในงานทดลองไม่ได้มีการให้ความร้อนก่อนการทำแห้ง จึงทำให้ตรวจพบจำนวนจุลินทรีย์มากกว่า

ไฮโดรไลเซทผงที่ได้นำมาใช้เป็นสารเชื่อมในปริมาณ 3 % ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ เปรียบเทียบกับไฮโดรไลเซทสดแช่เยือกแข็งซึ่งใช้ในปริมาณ 40 ml (โดยคำนวณให้มีของแข็งทั้งหมด 3 %) และไม่ใช้สารเชื่อม ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านสี กลิ่น เนื้อสัมผัส และความชุ่มน้ำของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ และประเมินสมบัติการเป็นสารเชื่อมของโปรตีนโดยวัดแรงตัดขาด(ตารางที่ 4.24) พบว่า คะแนนลักษณะเนื้อสัมผัส และค่าแรงตัดขาด ของลูกชิ้นไก่ที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทแช่เยือกแข็ง สูงกว่าตัวอย่างที่ใช้ไฮโดรไลเซทผง และไม่ใช้สารเชื่อม ที่เป็นเช่นนี้เพราะ โดยทั่วไปโปรตีนไฮโดรไลเซทจะมีสมบัติในการช่วยเสริมและปรับปรุงเนื้อสัมผัสให้ดีขึ้น จากการที่ globular protein คลายตัวออกเป็น fibrous polypeptides ทำให้มีประจุอิสระบนโมเลกุลซึ่งจับกับโมเลกุลน้ำ และโปรตีนอื่นๆ ได้ดีขึ้น (Swan และ Catcheside ,1983) แต่การทำแห้งของโปรตีนไฮโดรไลเซท แม้จะใช้ภาวะอ่อนที่สุดอย่าง เช่น freeze drying ก็ยังอาจมีผลทำให้โปรตีนเกิดการแปลงสภาพ (Whitaker และ Tannenbaum, 1977) ดังนั้นลูกชิ้นไก่ที่ใช้ไฮโดรไลเซทที่ทำแห้งทั้ง 2 วิธี จึงมีคะแนนลักษณะเนื้อและค่าแรงตัดขาดที่ต่ำกว่าไฮโดรไลเซทที่ไม่ผ่านการทำแห้ง การทำแห้งทั้ง 2 วิธีให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ผลดังกล่าวนี้แตกต่างจากสมบัติด้านการละลาย ซึ่งพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ทำแห้งด้วยกระบวนการ freeze drying ละลายได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตาม Cheftel และคณะ (1985) อธิบายว่าโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดีไม่จำเป็นต้องดูดกลืนน้ำได้ดี โปรตีนที่ละลายน้ำไม่ดีอาจดูดกลืนน้ำได้ในปริมาณมาก ซึ่งจะเป็นผลให้ตัวของมันพองออก และทำให้มีลักษณะซึ่งมี body, หนืด และมีสมบัติ adhesion ซึ่งจะเป็นผลทำให้เกิดลักษณะเนื้อสัมผัสที่แน่น เป็นเนื้อเดียวกันในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เหตุผลดังกล่าวนี้อาจใช้ช่วยอธิบายได้ว่า เพราะเหตุใด ไฮโดรไลเซทจากการทำแห้งทั้ง 2 วิธีจึงให้ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ที่มีค่าแรงตัดขาดและคะแนนลักษณะเนื้อไม่ต่างกัน ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบคุณภาพระหว่างไฮโดรไลเซทที่ทำแห้งทั้ง 2 วิธีแล้วแม้ว่าไฮโดรไลเซทที่ทำแห้งโดยวิธี freeze drying จะมีสมบัติด้านการละลายดีกว่า แต่ความเป็นไปได้ในการนำไปผลิตเชิงพาณิชย์และคุณภาพในด้านการเป็นสารเชื่อมไม่แตกต่างกัน จึงได้เลือกไฮโดรไลเซททำแห้งด้วยวิธี spray drying มาใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

5.6 เปรียบเทียบคุณภาพของลูกชิ้นไก่ที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทผงหรือโปรตีนชนิดอื่นเป็นสารเชื่อม

ในผลิตภัณฑ์เนื้อบดละเอียดที่มีไขมันต่ำนั้น สมบัติของโปรตีนที่มีผลต่อการปรับปรับปรุงคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ สมบัติการจับกับโมเลกุลน้ำ สมบัติการเกิดเจล และสมบัติการดึงดูดกันระหว่างอนุภาคต่างชนิดกัน (cohesion) (Mittal และ Usborne, 1985) จากการศึกษาเบื้องต้นได้ทดสอบสมบัติการเกิด emulsion ตามวิธีของ Satterlee, Bette, และ Ezra (1973) และสมบัติการเกิดเจลตามวิธีของ Nakamura และคณะ (1986) พบว่าไฮโดรไลเซทที่ได้ไม่มีสมบัติดังกล่าวแต่เมื่อนำมาใช้ในลูกชิ้นไก่ในปริมาณ 1%, 3% และ 5% โดยน้ำหนักเนื้อ พบว่าสามารถปรับปรุงคุณภาพของลูกชิ้นไก่ให้มีเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้นได้ตามลำดับแต่ที่ปริมาณ 5%โดยน้ำหนักเนื้อ เริ่มมีกลิ่นรสที่ไม่ยอมรับ จึงได้เลือกการใช้ไฮโดรไลเซทที่ปริมาณ 3 % โดยน้ำหนักเนื้อเพื่อใช้ในการทดลองเปรียบเทียบกับโปรตีนจากแหล่งอื่นๆ ได้แก่ albumin จากไข่ขาวผง globular-like fraction จาก ISP และ caseinate จากโปรตีนนมแต่ละชนิดใช้ในลูกชิ้นไก่ในปริมาณ 3% โดยน้ำหนักเนื้อ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เปรียบเทียบสมบัติทางกายภาพด้านแรงตัดขาด และ yield (ตารางที่ 4.25) พบว่า caseinate มีสมบัติการเป็นสารเชื่อมที่ดีที่สุดเนื่องจากผลิตภัณฑ์มีค่าแรงตัดขาดสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ ISP ไฮโดรไลเซท และไข่ขาวผง ตามลำดับ และพบว่าตัวอย่างที่ใช้ไข่ขาวผงมีค่า yield สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยตัวอย่างที่ใช้โปรตีนจากแหล่งอื่นไม่แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) โดยทั่วไปแล้วโปรตีนในไข่ขาวมีสมบัติในการฟองที่ดีมาก (Dominic,1989) ขณะที่มีการสับผสม ด้วยเครื่อง chopper ความเร็วสูงพบว่าส่วนผสมเกิดการฟู โดยจับและกักเก็บอากาศไว้มาก ทำให้หลังขึ้นรูปและให้ความร้อนลูกชิ้นไก่ที่ใส่ไข่ขาวผง มีค่าแรงตัดขาดที่ต่ำกว่าตัวอย่างที่ใช้ ISP ไฮโดรไลเซท และ caseinate นอกจากนั้นโครงสร้างที่ขึ้นฟูจากการเกิดฟองมาก ยังเป็นผลให้เจลที่ได้มีลักษณะหลวม โมเลกุลของน้ำจึงเข้าไปแทรกด้านในโครงสร้างได้มาก ทำให้ผลผลิตที่ได้สูงกว่าตัวอย่างอื่น เมื่อพิจารณาสมบัติของ ISP Mittal และ Usborne(1985) รายงานไว้ว่า ISP มีสมบัติการเกิดเจลที่ อุณหภูมิ 80-90^{o} C และเกลือจะมีผลทำให้อุณหภูมิในการเกิดเจลสูงขึ้น ในขณะที่ในการผลิตลูกชิ้นไก่นั้นใช้อุณหภูมิในการเกิดเจลที่ 80 ^{o}C จึงเป็นไปได้ว่ายังเกิดเจลที่ไม่สมบูรณ์ ในส่วนของ caseinate แม้จะเป็น globularโปรตีน แต่ละลายน้ำได้ดีมากโดยเฉพาะเมื่อมีเกลืออยู่ ด้วยจะมีโครงสร้างเป็นลักษณะคลายตัว (random coil) มี hydrophobicity

สูงกว่าโปรตีนชนิดอื่น และบริเวณ hydrophobic และ hydrophillic แยกจากกันอย่างสมบูรณ์ (Cheftel และคณะ, 1985) จึงมีสมบัติเป็นทั้งสาร emulsifier และ binder ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนชนิดอื่นที่ใช้ในการทดลองนี้ ส่วนไฮโดรไลเซทแม้ไม่มีสมบัติในการเกิดเจล แต่สามารถปรับปรุงเนื้อสัมผัสได้ซึ่งน่าจะเกิดจากแรง adhesion และพันธะไฮโดรเจนของโปรตีนไฮโดรไลเซทซึ่งมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับโปรตีนกล้ามเนื้อ แต่เป็นสายสั้นกว่าจึงน่าจะมีหมู่ $-NH_3^+$ และ $-COO^-$ ที่ปลายสายมากกว่า

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ทุกตัวอย่าง (ตารางที่ 4.26) พบว่ากลิ่นและความชุ่มน้ำไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารเชื่อมทุกประเภทใช้ในปริมาณเพียง 3 % จึงไม่มีผลทำให้กลิ่นของผลิตภัณฑ์ต่างกัน ในส่วนของความชุ่มน้ำก็เช่นกัน โปรตีนที่มีอิทธิพลกับปริมาณน้ำในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็น myofibrillar proteins ของเนื้อไก่ที่มีถึง 97 % ของโปรตีนทั้งหมด ความชุ่มน้ำของผลิตภัณฑ์ตัวอย่างต่างๆ จึงไม่ต่างกัน ส่วนสีพบว่าลูกชิ้นไก่ที่ใส่ไข่ขาวมีสีขาวกว่าตัวอย่างอื่นทุกตัวอย่าง ไข่ขาวเกิดฟองได้ดีผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงกักเก็บฟองอากาศขนาดเล็กไว้มาก ทำให้สีอ่อนกว่าตัวอย่างอื่น ขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ผสมไฮโดรไลเซทมีคะแนนสีไม่ต่างจากตัวอย่างอื่นๆ และคะแนนสีอยู่ในเกณฑ์น่าพอใจคือ 7.90 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไฮโดรไลเซทมีคะแนนรสชาติด้อยกว่าตัวอย่างที่ไม่ใช้สารเชื่อมและไข่ขาวผงกับ ISP เป็นสารเชื่อม ทั้งนี้อาจเนื่องจากไฮโดรไลเซทให้เกิดรสชาติแปลกปลอมจากกรดอะมิโนอิสระ tryptophan, tyrosine, และ phenylalanine แต่อย่างไรก็ตามคะแนนรสชาติยังอยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกับ caseinate ในส่วนของเนื้อสัมผัส การใช้ caseinate ให้ค่าผลิตภัณฑ์ที่มีคะแนนความชอบเนื้อสัมผัสสูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างไปจากไฮโดรไลเซท และ ISP และลูกชิ้นไก่ที่ไม่ใช้สารเชื่อม ใช้ไข่ขาวผง, ไฮโดรไลเซท, ISP มีคะแนนเนื้อสัมผัสไม่ต่างกัน ($p>0.05$) เหตุที่ผลดังกล่าวแตกต่างไปจากผลจากค่าแรงตัดขาด อาจเนื่องจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านเนื้อสัมผัส ประกอบด้วยหลายปัจจัยได้แก่ hardness, cohesiveness, adhesiveness, springiness, guminess, และ chewiness (Bourne , 1978) ในขณะที่ความจำกัดของเครื่อง Texturometer ที่ใช้วัด ทำให้วัดได้ค่าเฉพาะ firmness จึงทำให้ผลการทดลองจากการวัดด้วยเครื่องไม่สอดคล้องกับคะแนนที่ได้จากการทดสอบทางประสาทสัมผัส อย่างไรก็ตามคะแนนที่ได้จากตัวอย่างที่ใช้ไฮโดรไลเซทเป็นสารเชื่อมในลูกชิ้นไก่ ก็อยู่ในเกณฑ์เปรียบเทียบได้กับตัวอย่างที่ใช้สารเชื่อมชนิดอื่น

5.7 ศึกษาอายุการเก็บของไฮโดรไลเซทผง

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้มีโปรตีนในปริมาณสูง และดูดกลืนความชื้นได้ง่ายจึงได้ศึกษาชนิดของภาชนะบรรจุที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษา ผ โดยได้เลือกศึกษาเปรียบเทียบการใช้ถุง LDPE และ aluminium foil laminate บรรจุผลิตภัณฑ์ถุงละ 50 กรัม ปิดผนึกถุงที่บรรยากาศปกติ เก็บที่อุณหภูมิห้อง (29-31^{o}C) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ระหว่างเก็บ วิเคราะห์ปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์โดยกำหนดความชื้นสูงสุดที่ยอมให้มีได้เท่ากับ 12% นอกจากนี้ยังวิเคราะห์ค่า protein solubility และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดซึ่งกำหนดว่าต้องไม่เกิน 1x10^{5} CFU/g โดยค่าดังกล่าวนี้เป็นเกณฑ์มาตรฐานสำหรับผลิตภัณฑ์นมผง ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันและกำหนดไว้โดยหน่วยงาน สมอ (2533)

จากผลการทดลองหลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าถุง LDPE ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บไฮโดรไลเซทผงเนื่องจากหลังเก็บนาน 8 สัปดาห์ ตัวอย่างมีความชื้นเกิน 12 % (ตารางที่ 4.27) และมีลักษณะเยิ้มเหลว ในขณะที่ไฮโดรไลเซทผงที่บรรจุใน aluminium foil laminate ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน ปริมาณความชื้น, ค่า protein solubility และผลิตภัณฑ์ยังมีลักษณะปรากฏที่ดี เนื่องมาจาก aluminium foil มีสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของไอน้ำได้ดีมากกว่า LDPE ซึ่งยอมให้มีการซึมผ่านไอน้ำ 1-1.5 g mil ต่อ 100 ตารางนิ้ว ต่อวัน ที่ 35^{o}C ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 90% (Hui, 1992) เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์พบว่า log ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลงประมาณ 4% (ตารางที่ 4.28) ทั้งนี้เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความชื้นต่ำและระหว่างเก็บความชื้นคงที่ เป็นผลให้ จุลินทรีย์ที่เป็น vegetative cell ตายไปมากกว่าอัตราการเกิดใหม่เนื่องจากภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (Hayes, 1992) จำนวนจุลินทรีย์จึงมีแนวโน้มลดลง หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในส่วนของความสามารถในการละลายพบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ทั้งสองตัวอย่างตลอดระยะเวลาเก็บ ผลดังกล่าวนี้แสดงว่าภาวะในการเก็บที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่ทำให้เกิดให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของโปรตีนโมเลกุลแต่อย่างใด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าที่อุณหภูมิห้อง (29-31 ^{o}C) เก็บไฮโดรไลเซทจากเม็ดเลือดแดงในถุงเปิดผนึก aluminum foil laminate ไว้ได้อย่างน้อย 12 สัปดาห์ แต่ถ้าใช้ถุง LDPE จะเก็บไว้ได้เพียง 6-7 สัปดาห์