

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* โดยการทำแห้งแบบพ่นฝอย
และเสถียรภาพระหว่างการเก็บรักษา



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PRODUCTION OF SPRAY-DRIES PROTEIN HYDROLYSATE FROM FRESH WATER
PRAWN *Macrobrachium lanchesteri* AND STABILITY DURING STORAGE



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Food Technology
Department of Food Technology
FACULTY OF SCIENCE
Chulalongkorn University
Academic Year 2022
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย <i>Macrobrachium lanchesteri</i> โดยการทำแห้งแบบฟุ้งและเสถียรภาพระหว่างการเก็บรักษา
โดย	น.ส.ฉัตรชนก ไพศาลศักดิ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวณิช)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศิริมา พ่วงประพันธ์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวภา หล่อเจริญผล)

ฉัตรชนก ไพศาลศักดิ์ : การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* โดยการทำ
 แห้งแบบพ่นฝอยและเสถียรภาพระหว่างการเก็บรักษา. (PRODUCTION OF SPRAY-DRIES PROTEIN
 HYDROLYSATE FROM FRESH WATER PRAWN *Macrobrachium lanchesteri* AND STABILITY
 DURING STORAGE) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ดร.อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์

กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) เป็นสัตว์น้ำจืดที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่งประกอบด้วย
 กรดอะมิโนและเปปไทด์ที่เป็นสารตั้งต้นสำคัญในการสร้างกลิ่นรสและรสชาติในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร
 งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสของโปรตีนจากกุ้งฝอยด้วยพลาไวโซม
 ศึกษาสภาวะการทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย และศึกษาเสถียรภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่าง
 การเก็บรักษา โดยใช้ response surface methodology (RSM) และออกแบบการทดลองแบบ central composite
 design (CCD) กำหนดตัวแปรต้น 3 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S; 5-15 LAPU/g
 protein) อุณหภูมิ (45-55 °C) และ pH (6-8) กำหนดให้ค่าระดับการย่อยของโปรตีน (degree of hydrolysis; DH) เป็น
 ตัวแปรอิสระ พบว่าการใช้ E/S ที่ 10 LAPU/g protein อุณหภูมิ 50°C และ pH 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสม มีค่าระดับการ
 ย่อยของโปรตีนสูงที่สุด (20.97±0.86%) โปรตีนไฮโดรไลเสตมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเป็น 48.3 kDa มีปริมาณกรดอะมิโน
 อิสระสูงกว่าตัวอย่างควบคุม และมีคะแนนโดยรวม ความชอบด้านกลิ่นรสและด้านรสชาติเพิ่มขึ้น เมื่อนำโปรตีน
 ไฮโดรไลเสตไปทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยของโปรตีนไฮโดรไลเสต
 กำหนดปัจจัยอุณหภูมิขาเข้าของกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย (120, 150 และ 180°C), อุณหภูมิขาออก 95 °C และ
 อัตราการป้อน 10 mL/min พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิขาเข้า 150°C ได้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุด (72.41±0.53%)
 นอกจากนี้ ค่ากิจกรรมของน้ำ ค่าความชื้น และค่าความขาว เท่ากับ 0.159±0.02, 4.29±0.36 %, และ 69.83±0.50
 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยบรรจุในถุงอลูมิเนียมลามิ
 เนตชนิด aluminum/LLDPE ทึบแสงปิดสนิทแบบสุญญากาศเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 25 °C ติดตามผลการ
 เปลี่ยนแปลงทุก 2 สัปดาห์ พบว่า เมื่ออายุการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ค่าความชื้นเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ค่ากิจกรรมของน้ำไม่
 เปลี่ยนแปลง ส่วนค่าความขาวลดลง นอกจากนี้เมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าระดับความเข้มข้นของกลิ่นกุ้งและกลิ่น
 รสกุ้งลดลง แต่ระดับความหวานเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์สารให้กลิ่น
 สำคัญ ที่พบว่าปริมาณความเข้มข้นของสารที่ให้กลิ่นสำคัญเช่น N,N-dimethyl-methylamine ซึ่งให้กลิ่นคาวลดลง แต่
 ความเข้มข้นของ 2-furanmethanol, maltol และ vanillin ซึ่งให้กลิ่นหอมหวานและคาราเมลเพิ่มขึ้น

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
 ปีการศึกษา 2565

ลายมือชื่อนิสิต
 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

6270019423 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORD: PROTEIN HYDROLYSATES, FLAVOURZYME®, FLAVORING, FRESHWATER PRAWNS

Chatchanok Paisansak : PRODUCTION OF SPRAY-DRIES PROTEIN HYDROLYSATE FROM FRESH WATER PRAWN *Macrobrachium lanchesteri* AND STABILITY DURING STORAGE. Advisor: Assoc. Prof. INTHAWOOT SUPPAVORASATIT, Ph.D.

Freshwater prawn (*Macrobrachium lanchesteri*) is a source of proteins containing amino acids and peptides as precursors that flavors and tastes can be developed during food processing. The objective of this study was to investigate the production of protein hydrolysates from freshwater prawn with Flavourzyme®. An optimal hydrolysis condition was established using the response surface methodology (RSM) with a central composite design (CCD). An enzyme/substrate ratio (E/S; 5-15 LAPU/g protein), temperature (45-55 °C), and pH (6-8) were used as independent variables, while the dependent variable was a degree of hydrolysis (DH). The optimum conditions were found to be the E/S of 10 LAPU/g protein, temperature of 50 °C, and pH at 7. The highest DH obtained from optimal condition was 20.97±0.86 %. At this condition, the average molecular mass of the hydrolysate was about 48.3 kDa, which amount of free amino acids was increased compared to the control. It was also found that the hydrolysate contributed higher liking score of overall preference, flavor, and taste compared to the control. The spray drying was performed by varying inlet temperatures (120, 150, and 180°C), while the outlet temperature of 95°C and flow rate at 10 mL/min were kept constant. The results showed that the highest yield of hydrolysate was found when using 150°C as inlet temperature (72.41±0.53%). In addition, water activity (aw), moisture content, and whiteness index were 0.159±0.02, 4.29±0.36 %, and 69.83±0.50, respectively. The hydrolysate powders were vacuum packed in an aluminum foil laminated bags (aluminum/LLDPE) and stored for 12 weeks at 25°C and the changes during storage were determined every 2 weeks. It was found that the moisture content was increased, while there is no change found in aw of the samples during storage. Furthermore, the whiteness index was decreased during storage. Moreover, the sensory evaluation indicated that the intensity of the shrimp aroma and flavor were gradually decreased, but the intensity of the sweetness was increased. These results were corresponding to the decrease in some flavor compounds such as N,N-dimethyl-methylamine, making the decreasing in fishy flavor. In contrast, the increase in 2-furanmethanol, maltol and vanillin which these compounds contribute sweet and caramel flavor.

Field of Study: Food Technology

Student's Signature

Academic Year: 2022

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (GCUGR1125651045M) ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อินทาวุธ สรรพวรสถิตย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์เป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำในด้านงานวิจัย ด้านวิชาการ และตรวจสอบความถูกต้องและให้คำแนะนำในการแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ และให้แนวคิด คำแนะนำในการใช้ชีวิตและให้กำลังใจ รวมทั้งมอบโอกาสในการได้เรียนรู้ประสบการณ์ต่าง ๆ มากมายมาโดยตลอดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอาจารย์มา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ธนจันทร์ มหาวณิช ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริมา พ่วงประพันธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยวภา หล่อเจริญผล ที่ให้ความกรุณาเป็นคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อีกทั้งยังให้คำแนะนำด้านวิชาการ รวมทั้งตรวจสอบและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารและเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่านสำหรับการอำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำในการใช้อุปกรณ์ต่างๆ ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้องในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตและหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิตทุกท่าน ที่ได้ให้คำแนะนำ สอนการใช้เครื่องมือ และให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจมาโดยตลอด ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาวที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจสำคัญ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะสำเร็จไม่ได้หากไม่ได้รับการสนับสนุนจากทุก ๆ ท่าน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ฉัตรชนก ไพศาลศักดิ์

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ณ
สารบัญตาราง.....	ด
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 กุ้งฝอย.....	3
2.2 กลิ่นรสอาหารทะเล (seafood flavor).....	7
2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต.....	9
2.4 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying).....	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	24
3.1 วัตถุประสงค์ สารเคมี และอุปกรณ์.....	24
3.1.1 วัตถุประสงค์.....	24
3.1.2 สารเคมี.....	24
3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์.....	25
3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย.....	26
3.2.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย.....	26
3.2.1.1 เตรียมตัวอย่าง.....	26
3.2.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ของกุ้งฝอย.....	26

3.2.1.3	ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต	27
3.2.1.4	วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน	27
3.2.1.5	วิเคราะห์รูปแบบและขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสต	29
3.2.1.6	การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid)	29
3.2.1.7	การทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation).....	30
3.2.2	การศึกษาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการทำแห้งแบบ พ่นฝอย	31
3.2.2.1	คำนวณผลผลิตของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต	31
3.2.2.2	วิเคราะห์ปริมาณความชื้น	31
3.2.2.3	วิเคราะห์ค่า water activity (a_w).....	32
3.2.2.4	วิเคราะห์ค่าสี.....	32
3.2.2.5	ศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้น.....	32
3.2.3	การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและกายภาพ องค์ประกอบและปริมาณของ สารให้กลิ่น และคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างการเก็บรักษา	33
3.2.3.1	วิเคราะห์ปริมาณความชื้น	33
3.2.3.2	วิเคราะห์ค่า water activity a_w	33
3.2.3.3	วิเคราะห์ค่าสี.....	33
3.2.3.4	วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารให้กลิ่น	33
3.2.3.5	ทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation).....	34
3.2.4	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	34
บทที่ 4	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4.1	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย	36
4.1.1	การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (proximate composition) ของกุ้งฝอย.....	36
4.1.2	การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย	37

4.1.3 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสต	49
4.2 การศึกษาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย	54
4.2.1 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต	55
4.2.2 พฤติกรรมการดูดความชื้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	58
4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต	61
4.3.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา	61
4.3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารระเหยให้กลิ่นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา.....	63
4.3.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา.....	74
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	78
5.1 สรุปผลการทดลอง	78
5.2 ข้อเสนอแนะ	79
บรรณานุกรม.....	80
ภาคผนวก ก.....	90
ภาคผนวก ข.....	98
ภาคผนวก ค.....	99
ภาคผนวก ง	104
ประวัติผู้เขียน.....	105

สารบัญรูป

รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งน้ำเค็ม.....	3
รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งน้ำจืด	4
รูปที่ 2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งฝอย (<i>Macrobrachium lanchesteri</i>) และอวัยวะของกุ้งฝอยส่วนที่มีลักษณะจำเพาะ ได้แก่ ก) กรี ข) รยางค์หนวดคู่ที่ 2 ค) ขาเดินคู่ที่ 2 ง) หางและแพนหาง	5
รูปที่ 2.4 ปฏิกริยาไฮโดรลิซิส	9
รูปที่ 2.5 แผนผังขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์.....	11
รูปที่ 2.6 กลไกในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ประเภท endoprotease	12
รูปที่ 2.7 กลไกในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ประเภท exopeptidase	13
รูปที่ 2.8 กลไกการย่อยของโปรตีนและลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์	14
รูปที่ 2.9 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างต่อมรับรสบริเวณลิ้นกับเปปไทด์ที่มีรสขม.....	15
รูปที่ 2.10 กลไกการเร่งปฏิกริยาการย่อยโปรตีนของฟลาโวไซม์	16
รูปที่ 2.11 กระบวนการทำแห้งและองค์ประกอบของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)	22
รูปที่ 2.12 โครงสร้างของมอลโทเด็คซ์ตริน	23
รูปที่ 4.1 surface plot ของระดับการย่อยของโปรตีน (DH) ที่แปรปัจจัยระหว่างอุณหภูมิและค่า pH	41
รูปที่ 4.2 การกระจายตัวของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE	45
รูปที่ 4.3 ลักษณะปรากฏของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะการทำแห้งแตกต่างกัน (อุณหภูมิเข้า 120, 150 และ 180 °C).....	56
รูปที่ 4.4 พฤติกรรมการดูดความชื้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยอุณหภูมิเข้า 3 ระดับ ได้แก่ 120°C (●), 150°C (■) และ 180°C (▲)	60

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกุ้งฝอย	6
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของปลาไวโซม ที่ระบุได้จากการวิเคราะห์มวลสาร (mass spectrometric analysis)	16
ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย.....	28
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบหลักของกุ้งฝอย.....	36
ตารางที่ 4.2 ระดับการย่อยของโปรตีน (degree of hydrolysis, DH) จากสภาวะการย่อยต่างกัน	38
ตารางที่ 4.3 p-value ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อระดับการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	39
ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ (mg/ 100 g protein) ของโปรตีนไฮโดรไลเสต....	48
ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic ของโปรตีนไฮโดรไลเสต	50
ตารางที่ 4.6 คุณลักษณะ คำอธิบาย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อ้างอิง และระดับความเข้มที่ใช้สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ modified quantitative descriptive analysis (QDA) ของโปรตีนไฮโดรไลเสต	52
ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี quantitative descriptive analysis.....	54
ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละปริมาณผลผลิต ปริมาณความชื้น และค่ากิจกรรมของน้ำของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะต่างกัน	56
ตารางที่ 4.9 ค่าสี (L^* , a^* , และ b^*) และค่าความขาวของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะต่างกัน (อุณหภูมิเข้า 120, 150 และ 180 °C).....	58
ตารางที่ 4.10 ค่าความขาว ความแตกต่างของสีตัวอย่างกับตัวอย่างเริ่มต้น (ΔE^*) ค่าความชื้น และค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา	62
ตารางที่ 4.11 สารระเหยที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	66
ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นสำคัญของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการเก็บรักษาช่วง 0-12 สัปดาห์.....	73

ตารางที่ 4.13 คุณลักษณะ คำอธิบาย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อ้างอิง และระดับความเข้มที่ใช้สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ quantitative descriptive analysis (QDA) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	76
ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ quantitative descriptive analysis (QDA) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต	77



บทที่ 1

บทนำ

กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดเล็กจัดอยู่ในกลุ่มสัตว์น้ำมีเปลือกแข็งกลุ่มครัสเตเชียน (Crustacean) พบได้ในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย อินเดียน เป็นต้น กุ้งฝอยมีคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก กรดอะมิโนที่พบมากในกุ้งสกุล *Macrobrachium* spp. ได้แก่ อาร์จินิน (arginine) โพรลีน (proline) ไกลซีน (glycine) กรดกลูตามิก (glutamic acid) ไลซีน (lysine) อะลานีน (alanine) ทอรีน (taurine) และเซอรีน (Serine) เป็นต้น โดยไกลซีน อะลานีน โพรลีน และเซอรีน เป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวานและให้กลิ่นรสกุ้ง (Holthuis, 2000) ซึ่งกลิ่นรสกุ้งส่วนใหญ่จะเกิดจากกระบวนการให้ความร้อนระหว่างกระบวนการแปรรูป

โปรตีนไฮโดรไลเสต คือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยของโปรตีนโดยมีน้ำเป็นตัวสลายพันธะเปปไทด์ของโมเลกุลโปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ๆ (Fu et al., 2018) ซึ่งสามารถให้กลิ่นรสได้มากกว่าโปรตีนในธรรมชาติที่ยังไม่ผ่านการย่อย เนื่องจากโปรตีนในธรรมชาติมีโมเลกุลใหญ่จึงไม่สามารถให้กลิ่นรสโดยตรง แต่อาจให้กลิ่นรสร่วมกับสารอื่นโดยโปรตีนสามารถเกิดอันตรกริยากับสารให้กลิ่นรสทั้งที่พึงประสงค์ (desirable flavor) และไม่พึงประสงค์ (undesirable flavor หรือ off-flavor) ได้ (Silva et al., 2012; Suppavorasatit, 2014) Qi et al. (2017) รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากพืชและสัตว์ที่ประกอบด้วย กรดแอสปาร์ติก (aspartic acid) กรดกลูตามิก อาร์จินิน และไลซีนจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสที่ดี จึงมีการประยุกต์ใช้กระบวนการไฮโดรลิซิสเพื่อผลิตสารเสริมกลิ่นรส (flavoring agent) ในอาหาร

การไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เป็นวิธีการทางชีวภาพ ผลิตภัณฑ์ที่ได้คุณภาพดีไม่สูญเสียกลิ่นรสธรรมชาติของผลิตภัณฑ์ และสามารถควบคุมคุณลักษณะของกลิ่นรสผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น เช่น ตำแหน่งเปปไทด์หรือกรดอะมิโนบนสายโซ่เปปไทด์ อีกทั้งยังเป็นกระบวนการที่ปลอดภัย ไม่ใช้สารเคมี และไม่ก่อให้เกิดสารพิษในผลิตภัณฑ์ (Silva et al., 2012b) โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีน สามารถจำแนกเป็นประเภทตามเกณฑ์ต่าง ๆ เช่น แหล่ง

ที่สกัด ตำแหน่งที่ตัดพันธะ กลไกในการเร่งปฏิกิริยา เป็นต้น ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme®) เป็นเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่สกัดจากจุลินทรีย์ *Aspergillus* sp. ทำงานได้ในสภาวะอุณหภูมิ 30-65 องศาเซลเซียส pH 4-8 ทำหน้าที่เป็นได้ทั้งเอนโดเพปติเดส (endopeptidase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะภายในโมเลกุลโปรตีนหรือสายโซ่เปปไทด์ตัดพันธะเปปไทด์แบบสุ่มเพื่อให้สายโซ่เปปไทด์สั้นลง และเอ็กโซเพปติเดส (exopeptidase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะภายนอกที่ตำแหน่งปลายคาร์บอน (C-terminal) หรือปลายไนโตรเจน (N-terminal) ของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) จากการศึกษาพบว่าความจำเพาะของเอนไซม์ชนิดนี้ช่วยลดรสขมที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตได้ (Aspevik et al., 2016) มีการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากพืชและสัตว์น้ำโดยใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ เช่น ปลา (Imm and Lee, 1999) หมึก (Sukkhown et al., 2018) สาหร่าย (Zhang et al., 2019) และกุ้ง (Dey and Dora, 2014) เป็นต้น สภาวะที่ใช้ในกระบวนการไฮโดรลิซิสเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ระยะเวลา ย่อย และค่า pH เป็นต้น

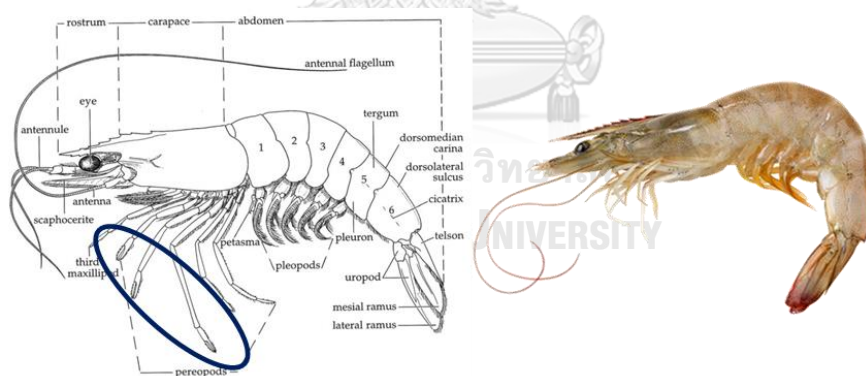
ตัวแปรที่ใช้เป็นตัวชี้บ่งบอกคุณภาพดังกล่าว เช่น ระดับการย่อยโปรตีน (degree of hydrolysis) น้ำหนักมวลโมเลกุล (molecular weight) องค์ประกอบของกรดอะมิโน (amino acid composition) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ทำงานได้ดีในสภาวะที่แตกต่างกันประกอบกับแต่ละปัจจัยมีผลตอบสนองต่อตัวแปรต่าง ๆ ดังนั้น เพื่อลดจำนวนการทดลองและศึกษาผลตอบสนองของแต่ละปัจจัยจึงมีการใช้วิธีพื้นที่ผิวผลตอบสนอง (response surface methodology, RSM) เป็นเทคนิคทางคณิตศาสตร์และสถิติเพื่อใช้ออกแบบการทดลองหาจุดที่เหมาะสมต่อผลนั้น โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นของเหลวเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ง่ายส่งผลต่ออายุการเก็บรักษา การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ร่วมกับการห่อหุ้ม (encapsulation) เพื่อช่วยเพิ่มความคงตัวระหว่างการเก็บรักษา และป้องกันการเสื่อมสลายจากปัจจัยด้านสภาวะแวดล้อม (Wongsangasri et al., 2015; Sarabandi et al., 2020) อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตพ่นฝอยโดยการตัดแปรโปรตีนจากกุ้งฝอยด้วยเอนไซม์นั้นมียุ่อย่างจำกัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตพ่นฝอยจากกุ้งฝอยและศึกษาเสถียรภาพระหว่างการเก็บรักษา

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

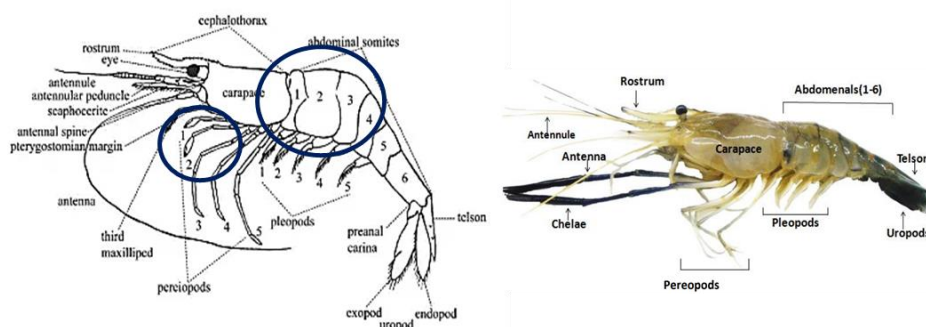
2.1 กุ้งฝอย

กุ้งเป็นสัตว์น้ำมีเปลือกสามารถแบ่งโดยใช้แหล่งที่อยู่อาศัยเป็นเกณฑ์ได้ 2 ประเภท ได้แก่ กุ้งทะเลหรือกุ้งน้ำเค็ม (shrimp) เจริญและอาศัยในน้ำเค็ม เช่น กุ้งกุลาดำ กุ้งขาวแวนาไมด์ กุ้งแชบ๊วย เป็นต้น และกุ้งน้ำจืด (prawn) เจริญและอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืด ได้แก่ กุ้งก้ามกราม กุ้งกะต๋อม และกุ้งฝอย เป็นต้น ลักษณะสำคัญที่ใช้จำแนกความแตกต่างของกุ้งทั้ง 2 ประเภท คือบริเวณขาเดิน (walking legs) มีลักษณะแตกต่างกัน โดยกุ้งน้ำเค็มบริเวณปลายขาเดิน 3 คู่แรกมีลักษณะเป็นก้ามหนีบใช้สำหรับจับเหยื่อและเปลือกหุ้มด้านข้างท้องเรียงกันเป็นระเบียบ แสดงดังรูปที่ 2.1 ส่วนกุ้งน้ำจืดที่บริเวณปลายขาเดิน 2 คู่แรกเป็นก้ามหนีบและเปลือกหุ้มด้านข้างท้องของคู่ที่ 2 ซ้อนทับคู่ที่ 1 และคู่ที่ 3 แสดงดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.1 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งน้ำเค็ม

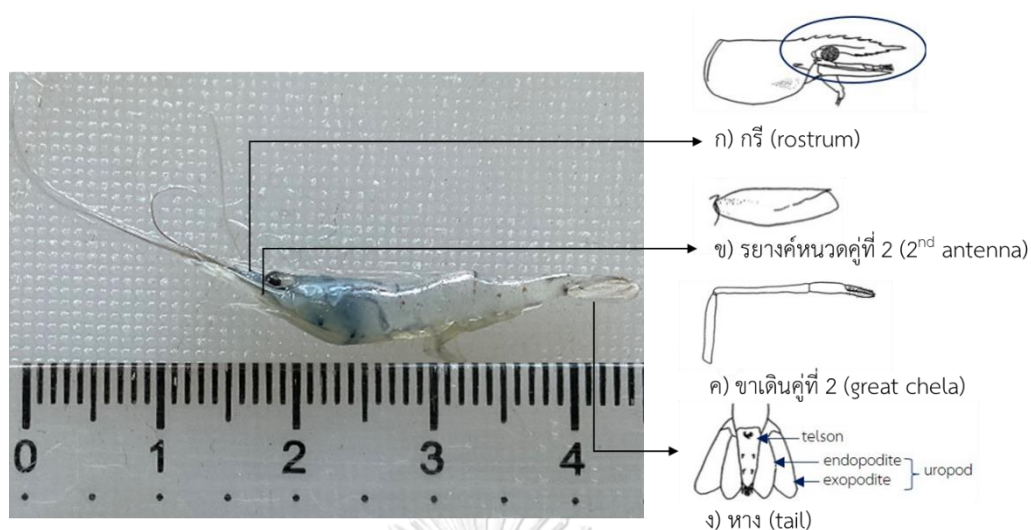
ที่มา: ดัดแปลงจาก Farfante and Kensley (1997)



รูปที่ 2.2 ลักษณะทางกายภาพของกุ้งน้ำจืด

ที่มา: ดัดแปลงจาก สุวลี มษอนันต์ และจิราพร โรจน์ทินกร (2562); Farfante and Kensley (1997)

กุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) หรือกุ้งนาถูกจัดกลุ่มตามอนุกรมวิธานได้ ดังนี้ Phylum: Arthropoda Class: Crustacea Sub class: Malacostraca Order: Decapoda Sub order: Natanita Family: Paleamonidae Genus: *Macrobrachium* และ Species: *Lanchesteri* พบทั่วไปในแหล่งน้ำจืดบริเวณเขตร้อน อาศัยอยู่ในน้ำนิ่งหรือน้ำไหลที่มีลักษณะขุ่นมีระดับน้ำลึกไม่เกิน 1 เมตร แหล่งน้ำที่พบ เช่น น้ำตก ลำธาร แม่น้ำ คลอง หรือบึง เป็นต้น กุ้งชนิดนี้แพร่กระจายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออก ขนาดความยาวลำตัวของกุ้งตัวเต็มวัยเฉลี่ย 2.8 – 3 เซนติเมตร ลักษณะลำตัวใส เปลือกหุ้มลำตัวบางมีสีขาวแกมเขียว แสดงดังรูปที่ 2.3 มีลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากลูกกุ้งก้ามกรามคือ กริตรงยาวกว่าแผ่นกำบังหนวดคู่ที่ 2 ด้านบนของกริมี่พินเล็กน้อยจำนวน 9-14 ซี่ เรียงอยู่หลังใบดาจำนวน 2-3 ซี่ ส่วนด้านล่างมีซี่พินจำนวน 4-5 ซี่ รัยวงค์หนวด (antenna) คู่ที่ 2 บริเวณโคนหนวดเป็นแผ่นเรียบปลายโค้งมน ส่วนขาเดินคู่ที่ 2 เป็นรัยวงค์แบบ 2 แขนงรูปทรงกระบอกยาวเรียว ทั้งสองข้างมีขนาดเท่ากัน ตรงปลายส่วนก้ามหนีบมีขนาดเล็กและมีขนสั้นเล็กและสั้นปกคลุม บริเวณหางประกอบด้วย 2 ส่วน คือ telson มีลักษณะเป็นแผ่นปลายสุดเรียวแหลมตรงและส่วนแพนหาง (uropod) เป็นแผ่นสี่เหลี่ยมเรียงซ้อนกันประกอบด้วย 2 ส่วนย่อย คือ แพนหางด้านใน (endopodite) และแพนหางด้านนอก (exopodite) แสดงในรูปที่ 2.3 (นภาพร ศรีพุฒินิพนธ์ และสุรียา จงโยธา, 2540; วุฒิวัดน์ เรื่องชัย, ประดิษฐ์ แสงทอง และเลิศลักษณ์ เงินศิริ, 2552; กัญญาณัฐ สุนทรประสิทธิ์, ดุจดดี ปานพรหมมินทร์ และลลิตา ช่างบุญ, 2562)



รูปที่ 2.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกุ้งฝอย (*Macrobrachium lanchesteri*) และอวัยวะของกุ้งฝอยส่วนที่มีลักษณะจำเพาะ ได้แก่ ก) กรี ข) ไรยางค์หมวดคู่ที่ 2

ค) ขาเดินคู่ที่ 2 ง) หางและแพนหาง

ที่มา: ดัดแปลงจาก วณิชยา น้อยวังคลัง และสมศักดิ์ ปัญหา (2544)

ปัจจุบันกุ้งฝอยได้รับความนิยมในการบริโภคเพิ่มขึ้นทำให้การจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค จึงมีการนำมาเพาะเลี้ยงในหลายรูปแบบ เช่น เลี้ยงในกระชัง บ่อซีเมนต์ บ่อดิน เป็นต้น สำหรับการเพาะเลี้ยงกุ้งฝอยเริ่มต้นจากการนำแม่พันธุ์กุ้งฝอยมาเลี้ยงให้โตเต็มวัยใช้ระยะเวลา 60 วันจึงสามารถวางไข่และผสมพันธุ์ได้ แม่กุ้งฝอยจะมีไข่ประมาณ 200-250 ฟอง ไข่ของกุ้งฝอยที่ผ่านการปฏิสนธิแล้ว 3 วันจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนและสีเหลือง ต่อมาอีก 7-9 วัน จะมองเห็นตาของตัวอ่อนอย่างชัดเจนหลังจากนั้นไข่ในท้องแม่กุ้งฝอยจะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและฟักออกมาเป็นตัวเมื่ออายุ 21-25 วัน และตัวอ่อนกุ้งฝอยจะใช้เวลาในพัฒนาอวัยวะให้เหมือนกุ้งฝอยตัวเต็มวัยประมาณ 30-35 หลังฟักออกจากไข่ และมีการลอกคราบเป็นระยะตลอดระยะเวลาเติบโต กุ้งฝอยใช้ระยะเวลาในการเจริญเติบโต 3-4 เดือนจึงจะสามารถนำมาบริโภคได้ โดยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมบริเวณบ่อเลี้ยง (วณิชยา น้อยวังคลัง และสมศักดิ์ ปัญหา, 2544; บัญชา ทองมี, 2553)

กุ้งฝอยสามารถนำมาทำอาหาร เช่น กุ้งเต้น กุ้งทอด ปลา กุ้ง ทอดมันกุ้ง เป็นต้น กุ้งฝอยเป็นที่นิยมรับประทานเนื่องจากมีรสชาติดีมีคุณค่าทางโภชนาการ ซึ่ง บัญชา ทองมี (2553) รายงานองค์ประกอบทางเคมีของกุ้งฝอย ได้แก่ ความชื้น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน แร่ธาตุ และพลังงาน

แสดงดังตารางที่ 2.1 กรดอะมิโนที่พบในกุ้งสกุล *Macrobrachium* spp. ได้แก่ อาร์จินิน โพรลีน ไกลซีน กรดกลูตามิก ไลซีน อะลานีน ทอรีน และเซอรีน เป็นต้น โดยไกลซีน อะลานีน โพรลีน และเซอรีน เป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวานและให้กลิ่นรสกุ้ง ซึ่งกลิ่นกุ้งส่วนใหญ่จะเกิดจากกระบวนการให้ความร้อนระหว่างกระบวนการแปรรูป นอกจากนี้ยังมีการนำกุ้งฝอยมาแปรรูปเป็นกะปิ จากงานวิจัยของ Pongsetkul et al. (2017) ศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกะปิที่ผลิตจากกุ้งสองชนิด คือ เคย (*Acetes vulgaris*) และกุ้งฝอย โดยนำกุ้งทั้งสองชนิดมาผ่านกระบวนการหมักด้วยวิธีการออโตไลซิส (autolysis) ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ภายในตัวกุ้ง 2 ชนิดคือโคโมทริปซินและทริปซินจัดเป็นเอนไซม์กลุ่มเซอรีน (serine proteases) พบว่ากะปิที่ผลิตจากเคยมีค่า Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) และฤทธิ์ในการการต้านอนุมูลอิสระที่วิเคราะห์ด้วยวิธี Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), Chelation Activity และค่า singlet oxygen scavenging activities ที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่ากะปิที่ผลิตจากกุ้งฝอย เนื่องจากปริมาณและความจำเพาะของเอนไซม์ภายในกุ้งรวมถึงลำดับของสายโซ่เปปไทด์ของกุ้งแต่ละชนิดแตกต่างกันจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักดังกล่าวทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระได้แตกต่างกัน

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกุ้งฝอย

องค์ประกอบ	ปริมาณ (g/ 100 g sample)
ความชื้น	78.70
โปรตีน	15.80
คาร์โบไฮเดรต	1.00
ไขมัน	1.20
แร่ธาตุ	
แคลเซียม	9.20
ฟอสฟอรัส	2.69
เหล็ก	0.08
พลังงาน (kcal/100 g)	78.0

ที่มา: ดัดแปลงจาก บัญชา ทองมี (2553)

กึ่งฝอยมีสารก่อภูมิแพ้เป็นองค์ประกอบ คือ tropomyosin (34-38 kDa), arginine kinase (40 kDa) และ hemocyanin (67-77 kDa) (Lopata et al., 2010; Srinroch et al., 2015) กระบวนการแปรรูปอาหารโดยใช้ความร้อน ความดัน คลื่นอัลตราซาวนด์หรือคลื่นไมโครเวฟ เป็นวิธีที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติเกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีน สามารถลดการก่อภูมิแพ้ ลดความเป็นพิษ รวมทั้งกำจัดเชื้อจุลินทรีย์และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหาร (Julmanlik et al., 2019) มีรายงานการใช้กระบวนการแปรรูปอาหารร่วมกับกระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ Boukil et al. (2020) ศึกษาการลดการก่อภูมิแพ้จาก tropomyosin และ arginine-kinase ที่พบในหนอน (*Tenebrio molitor*) โดยใช้ high hydrostatic pressure (HHP) ร่วมกับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ อัลคาเลส และเปปซิน พบว่าวิธีการดังกล่าวช่วยลดการก่อภูมิแพ้จากโปรตีนได้ เนื่องจาก สารก่อภูมิแพ้ทั้ง 2 ชนิดเป็นโปรตีนเมื่อได้รับความร้อนภายใต้สภาวะความดันทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ อีกทั้งยังถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเปปซินได้เป็นเปปไทด์สายสั้นที่ไม่สามารถก่อภูมิแพ้ได้

2.2 กลิ่นรสอาหารทะเล (seafood flavor)

กลิ่นรส (flavor) เป็นคุณลักษณะสำคัญของอาหารมีอิทธิพลต่อการยอมรับของผู้บริโภคและสามารถใช้เป็นดัชนีในการประเมินคุณรูปทางประสาทสัมผัส (sensory attribute) ของอาหารได้ การรับรู้ของกลิ่นรสในอาหารเป็นความรู้สึกขณะที่อาหารอยู่ในปากโดยจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ การรับรู้รสชาติ (taste) ของอาหารเกิดขึ้นที่ต่อมรับรส (taste bud) บริเวณลิ้นขณะที่อาหารอยู่ในปาก และการรับรู้กลิ่น (aroma) ของอาหารเกิดขึ้นขณะที่รับประทานอาหารในปาก สารระเหยให้กลิ่นจะส่งผ่านไปที่คอหอยด้านหลังโพรงจมูก (retronasal) จะเกิดขึ้นหลังการหายใจออกหรือกลืนอาหารนอกจากนี้การรับรู้กลิ่นยังเกิดขึ้นระหว่างการหายใจเข้าหรือการดมโดยสารระเหยให้กลิ่นจะผ่านเข้าทางโพรงจมูก (orthonasal) สูเยื่อเมือกรับกลิ่น (olfactory mucosa) เพื่อรับรู้กลิ่นนั้น ๆ (กาญจนา มัทธนทวี, 2552)

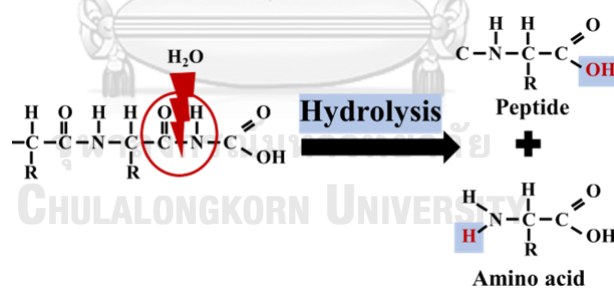
กลิ่นรสอาหารทะเลเป็นระบบที่มีความซับซ้อนประกอบด้วยกลิ่นและรสชาติ โดยส่วนประกอบที่ให้รสชาติจะเป็นสารประกอบที่ไม่ระเหย (non-volatile compound) เช่น กรดอะมิโนอิสระ น้ำตาล แร่ธาตุ เป็นต้นซึ่งมีส่วนสำคัญต่อรสชาติของอาหารทะเล สำหรับกลิ่นอาหารทะเลแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือ กลิ่นอาหารทะเลสด (fresh seafood flavor) และกลิ่นอาหารทะเลปรุงสุก (cooked seafood flavor) ซึ่งกลิ่นของอาหารทะเลสดมีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภคด้านความสดของสัตว์น้ำ เช่น ปลา กุ้ง ปู หอย เป็นต้น การเปลี่ยนแปลงของกลิ่นสัตว์น้ำโดยส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์ไลพอกซิจีเนส (lipoxygenase) กับสารระเหยกลุ่มไขมัน (lipid-based volatiles) รวมถึงปฏิกิริยาการสลายตัวของไตรเมทิลามีนออกไซด์ (trimethylamine N-oxide, TMAO) ทำให้เกิดไตรเมทิลามีน (trimethylamine, TMA) เป็นสารระเหยให้กลิ่นเหม็น (off-flavor) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาของสัตว์น้ำสด โดยในการวิเคราะห์ความสดของสัตว์น้ำสามารถใช้การวิเคราะห์ปริมาณของสารไตรเมทิลามีนเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การเสื่อมเสียของสัตว์น้ำ (Carneiro et al., 2022)

สำหรับกลิ่นอาหารทะเลปรุงสุกจะมีความแตกต่างจากกลิ่นของอาหารทะเลสดซึ่งกลิ่นที่เกิดจากการปรุงสุกของสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเกิดจากกระบวนการให้ความร้อน โดยที่องค์ประกอบทางเคมีของสัตว์น้ำ เช่น โปรตีน ไขมัน เป็นต้น สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่นๆ ทำให้เกิดสารให้กลิ่นที่เฉพาะตัวของสัตว์น้ำแต่ละชนิดซึ่งประกอบไปด้วยสารระเหยให้กลิ่น (odor-active volatile) และสารระเหยไม่ให้กลิ่น (odorless volatile) ซึ่งปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในอาหารที่ผ่านการให้ความร้อน เนื่องจากเป็นปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ที่มีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลิ่นรสและลักษณะปรากฏของอาหาร นอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาอื่น ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นอาหารทะเล เช่น ปฏิกิริยา retro-aldol condensation, lipid oxidation เป็นต้น ซึ่งการรวมตัวของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาที่อธิบายข้างต้นทำให้เกิดกลิ่นที่มีความจำเพาะของอาหารทะเลปรุงสุก โดยงานวิจัยของ Simpson et al. (1998) ศึกษาการใช้เอนไซม์โคโมซินและทริปซินในกระบวนการไฮโดรลิซิสของโปรตีนจากส่วนเนื้อกุ้ง ส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ เช่น ไกลซีน อะลานีน อาร์จินีน โพรลีน และวาซีน เป็นต้น เพิ่มขึ้นและได้คะแนนความเข้ม (intensity) ของกลิ่นจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส และนอกจากนี้ Imm and Lee (1999) ได้รายงานผลของการใช้ฟลาโวไซม์ ในการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากปลา red hake (*Urophycis chuss*) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมี

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มมากขึ้น กรดอะมิโนอิสระที่พบมาก ได้แก่ ลิวซีน ไลซีน และ อาร์จินีน และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคะแนนความเข้มข้นกลิ่นสุปปลาและรสอูมามีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส จากงานวิจัยที่อธิบายข้างต้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนเป็นกระบวนการหนึ่งที่สามารถปรับปรุงกลิ่นรสของอาหารได้

2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรลิซิสของโปรตีนซึ่งกระบวนการนี้ทำให้โครงสร้างของโปรตีนถูกย่อยโดยมีน้ำเป็นตัวสลายพันธะเปปไทด์ของโมเลกุลโปรตีนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการนี้ เรียกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้นๆ ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสของโปรตีนแสดงในรูปที่ 2.4 ซึ่งกระบวนการดังกล่าวส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ได้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558; Zhang et al., 2015)

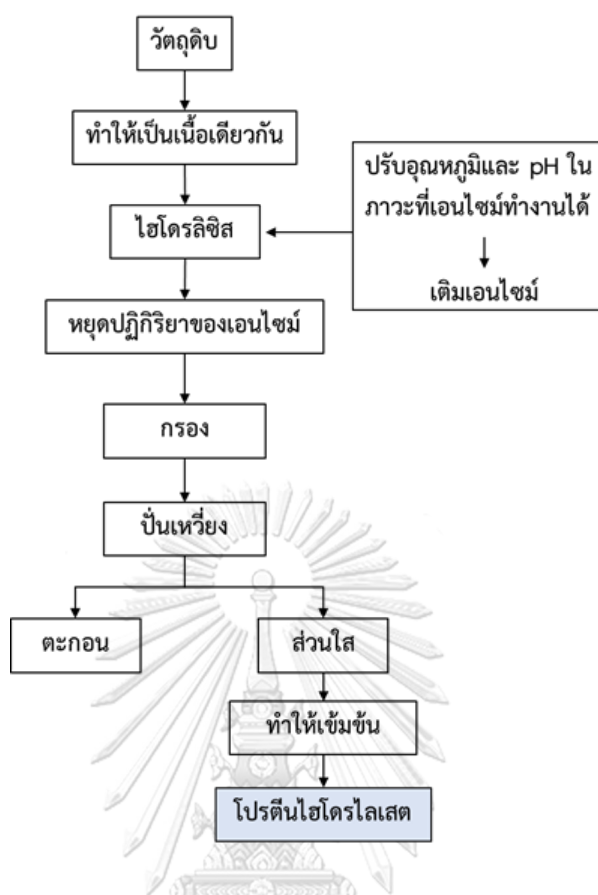


รูปที่ 2.4 ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kiewiet et. al. (2018)

กรรมวิธีในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นสามารถทำได้หลากหลายวิธี เช่น วิธีทางกายภาพ วิธีทางเคมี และวิธีทางชีวภาพ เป็นต้น ยังมีผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยกระบวนการออโตลิซิส (autolysis) เป็นวิธีทางชีวภาพที่เอนไซม์ในธรรมชาติสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนได้จากงานวิจัยของ Sinthusamran et al. (2019) ศึกษาอิทธิพลของกระบวนการไฮโดรลิซิสต่อคุณภาพของหัวกุ้งขาวแวนนาไมด์ (*Litopenaeus vannamei*) ไฮโดรไลเสต พบว่าการไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ภายในหัวกุ้ง (endogenous enzyme) ร่วมกับการใช้เอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 1 ส่งผลให้ผลผลิต protein recovery และระดับการย่อยสูง เนื่องจาก ระหว่างกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ภายในหัวกุ้ง ได้แก่ ไคโมทริปซินและทริปซิน จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสให้เกิดการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง เกิดกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น ประกอบกับการเติมเอนไซม์อัลคาเลสทำให้ปฏิกิริยาไฮโดรลิซิสเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง สำหรับวิธีการผลิตโดยใช้สารเคมีเป็นมีข้อดี คือ สะดวก รวดเร็ว ขั้นตอนการผลิตไม่ซับซ้อนและต้นทุนต่ำจึงได้รับความนิยมในระดับอุตสาหกรรม อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ควบคุมปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนได้ยาก ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาบนสายเปปไทด์ เกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ วิธีนี้จึงไม่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมอาหาร

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนที่สำคัญ แสดงดังรูปที่ 2.5 เริ่มต้นจากการนำวัตถุดิบที่ผ่านการทำความสะอาดและหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายในวัตถุดิบ จากนั้นนำมาบดละเอียดด้วยเครื่องบดหรือโม่โม่ในซีเพื่อลดขนาดของวัตถุดิบและช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างเอนไซม์กับตำแหน่งเร่ง (active site) ของโปรตีน จากนั้นปรับสภาวะอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ทำงานได้และทำการเติมเอนไซม์ลงไปตามระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จนกระทั่งครบระยะเวลาในการไฮโดรลิซิส นำไฮโดรไลเสตที่ได้ปรับ pH หรือให้ความร้อนเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่เติมลงไป จากนั้นนำไปกรองและปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนนำส่วนใสที่ได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยวิธีการระเหยน้ำออกจะได้เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสต (Kristinsson and Rasco, 2000; Lee, 2007)



รูปที่ 2.5 แผนผังขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kristinsson and Rasco (2000)

เอนไซม์โปรติเอสจัดเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยของพันธะเปปไทด์ของโปรตีนจึงเกิดการเปลี่ยนโครงสร้างของกรดอะมิโนและมีการสร้างเปปไทด์ที่มีลักษณะและน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ซึ่งกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดเป็นสารให้กลิ่นรส เอนไซม์กลุ่มนี้มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ตัวอย่างเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ เช่น ปาเปน (papain) เรนนิน (rennin) โบรมีเลน (bromelain) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ซับทิลิซิน (subtilisin) เอสพาราส (esparase) อัลคาเลส (Alcalase®) ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme®) และนิวเทรส (Nutrase®) เป็นต้น เอนไซม์โปรติเอสจัดแบ่งโดยใช้ลักษณะการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์เป็นเกณฑ์การแบ่งเป็น 2 ประเภท ได้แก่

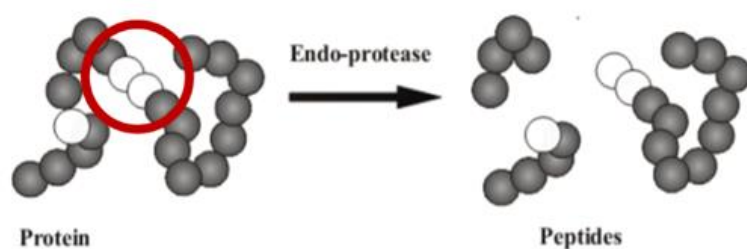
เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนอย่างอิสระ โดยเอนไซม์จะต้องมีความจำเพาะต่อตำแหน่งอนุมูลของกรดอะมิโนที่อยู่ในโมเลกุลของโปรตีนซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นเปปไทด์สายสั้น แสดงในรูปที่ 2.6 สามารถจัดแบ่งกลุ่มย่อยตามกลไกการทำงานของเอนไซม์แบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

Serine proteases เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์โดยที่ซีรีนจะทำหน้าที่เป็นนิวคลีโอไฟล์ให้อิเล็กตรอนเพื่อใช้ในการสร้างพันธะกับหมู่คาร์บอนิลบนสายโซ่เปปไทด์ที่บริเวณเร่ง ทำงานได้ในสภาวะ pH 7-11 เช่น ไคโมทริปซิน ทริปซิน เป็นต้น

Sulfhydryl proteases เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีซัลไฮดริลอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ทำงานได้ในสภาวะ pH 6-7.5 เช่น ปาเปน โบรมิเลน เป็นต้น

Metal containing proteases เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน สามารถทำงานได้ในสภาวะ pH 5-9

Acidic proteases หรือ Aspartic proteases เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่มีหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนแอสปาร์ติกหรือกลูตามิกอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำงานได้ในสภาวะกรดช่วงค่า pH 3-4 มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น aromatic เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ เช่น เรนิน เปปซิน เป็นต้น

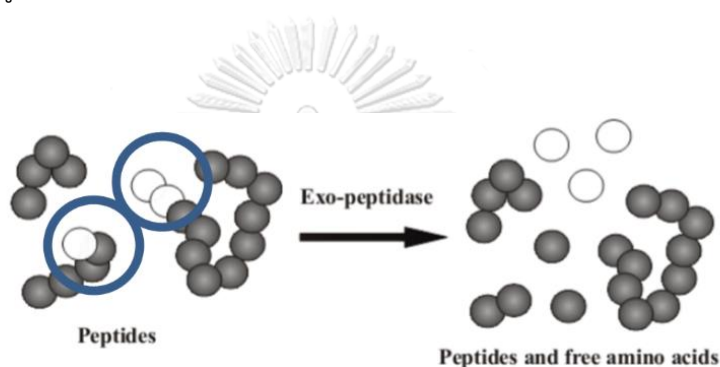


รูปที่ 2.6 กลไกในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ประเภท endoprotease
ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://symbiotech.ru/en/enzymes-proteases/>

สำหรับเอนไซม์ประเภทเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายเปปไทด์แสดงในรูปที่ 2.7 ซึ่งขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อตำแหน่งอนุกรมกรดอะมิโนอิสระ สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ดังนี้

Aminopeptidase เป็นกลุ่มของเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะเปปไทด์บริเวณปลายสายด้านที่มีหมู่อะมิโน (N-terminal)

Carboxypeptidase เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายเปปไทด์จากทางปลายสายเปปไทด์ด้านที่มีหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal)



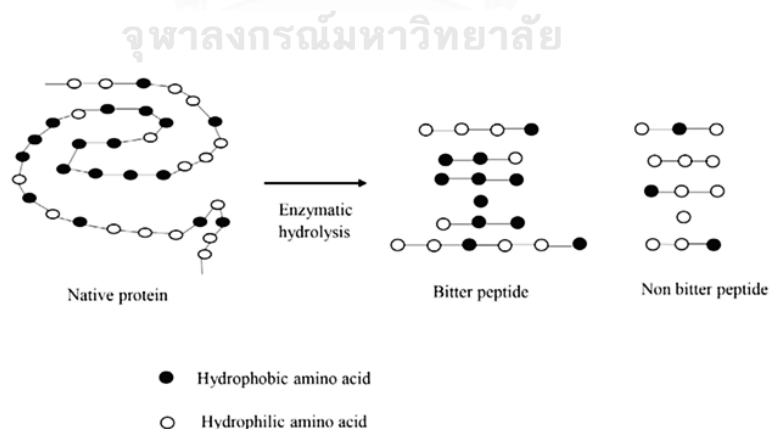
รูปที่ 2.7 กลไกในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ประเภท exopeptidase

ที่มา: ดัดแปลงจาก <https://symbiotech.ru/en/enzymes-proteases/>

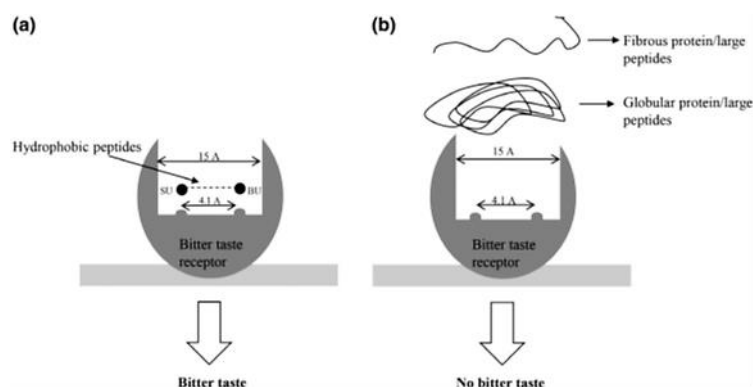
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอสมีหลากหลายปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate) และสถานะที่ใช้ในการย่อยคงที่ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันถ้าหากมีปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไป ปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่และลดลงตามลำดับเนื่องจากปริมาณโปรตีนตั้งต้นลดลงและเปลี่ยนรูปเป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์, ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จะมีผลต่อการแตกตัวของไอออนของบริเวณเร่งของเอนไซม์, อุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เพราะอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะผันแปรตามอุณหภูมิ และอุณหภูมิยังมีอิทธิพลต่อความคงตัวของเอนไซม์ หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและมีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสูญเสียไป ด้วย เนื่องจากโครงสร้างที่ตำแหน่ง Active site เปลี่ยนไป และระยะเวลาในการย่อย ในช่วงต้นของการย่อยเอนไซม์จะเข้าจับกับโปรตีนอย่างรวดเร็วเกิดการย่อยจนทำให้เกิดเปปไทด์ขึ้น จากนั้นเมื่อ

เวลาการย่อยมากขึ้นจะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขัน (competition inhibition) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

ปัญหาที่พบบ่อยมากในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์น้ำคือการเกิดรสขมและกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ซึ่งมีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัย เช่น องค์ประกอบและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของโปรตีนตั้งต้น ระดับการย่อยของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล และความจำเพาะของเอนไซม์ เป็นต้น Idawu and Benjakul (2019) ได้อธิบายการเกิดรสขมที่มีสาเหตุเกิดจากการใช้เอนไซม์ในกระบวนการไฮโดรไลซิสของโปรตีนว่า เอนไซม์มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของโปรตีนตั้งต้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้น โดยที่ภายในสายเปปไทด์จะมีการจัดเรียงตัวกันของกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำ (hydrophilic amino acids) เช่น ซีรีน ทรีโอนีน ซิสเทอีน เมธไทโอนีน กลูตามีน แอสพาราจีน เป็นต้น และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) เช่น ทริปโตฟาน ฟีนอลาลานีน ไอโซลิวซีน ไทโรซีน วาลีน และลิวซีน เป็นต้น จากรูปที่ 2.8 เปปไทด์ที่มีรสขมนั้นเกิดจากการที่กรดอะมิโนอิสระกลุ่มไม่ชอบน้ำจัดเรียงตัวต่อกันบนสายเปปไทด์ ซึ่งเปปไทด์ที่มีรสขมจะประกอบด้วย binding unit (BU) และ stimulating unit (SU) จะเข้าจับกับต่อมรับรสขม (bitter taste receptor) ที่อยู่บริเวณลิ้นทำให้เกิดรสขม ในขณะที่เดียวกันหากเปปไทด์มีขนาดเท่ากับ 4.1 และ 15 Å (angstrom) จะส่งผลให้เกิดรสขมได้เช่นเดียวกัน เนื่องจากเป็นขนาดที่พอดีกับตำแหน่งของต่อมรับรสขม ดังแสดงในรูปที่ 2.9



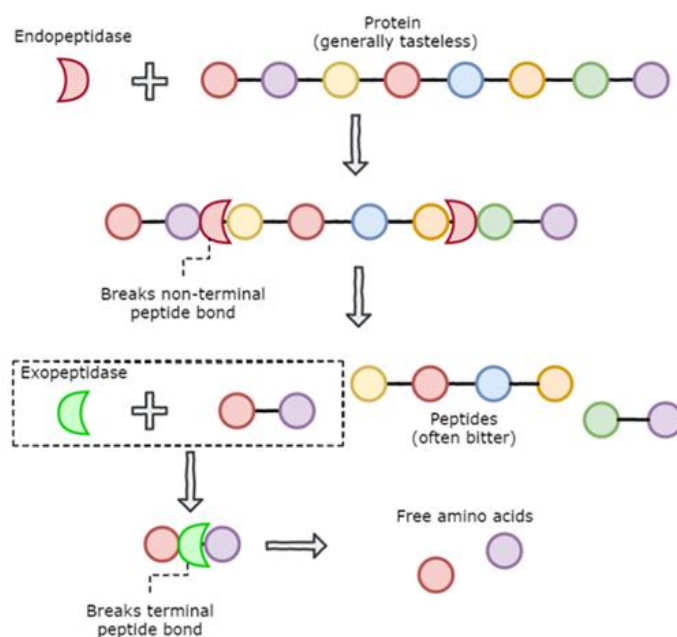
รูปที่ 2.8 กลไกการย่อยของโปรตีนและลักษณะการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนบนสายเปปไทด์
ที่มา: Idowu and Benjakul (2019)



รูปที่ 2.9 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างต่อมรับรสบริเวณลิ้นกับเปปไทด์ที่มีรสขม

ที่มา: Idowu and Benjakul (2019)

ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme®) เป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส สกัดได้จากกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์อยู่ในช่วง 500-1,000 LAPU/g (LAPU; Leucine Aminopeptidase Unit) เอนไซม์ชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มของ leucine amino peptidases ประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีกลไกในการย่อยโปรตีน 2 กลไก คือ เอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส (Grossmann et al., 2019) เอนไซม์กลุ่มที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยภายในสายเปปไทด์จะเข้าจับกับบริเวณตำแหน่งเร่งของกรดอะมิโนอยู่ที่บริเวณเร่งภายในสายเปปไทด์ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์สายสั้น จากนั้นเอนไซม์ย่อยพันธะเปปไทด์จากภายนอกหรือด้านปลายของสายเปปไทด์แสดงดังรูปที่ 2.9 จากงานวิจัยของ Merz et al. (2015) ศึกษากิจกรรมจำเพาะของฟลาโวไซม์ และรายงานระบุชนิดของเอนไซม์กลุ่มย่อยที่เป็นองค์ประกอบภายในฟลาโวไซม์ โดยใช้วิธีการทำให้บริสุทธิ์ (purification) จากนั้นวิเคราะห์ชนิดของเอนไซม์โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) พบว่าฟลาโวไซม์ประกอบด้วยเอนไซม์ที่มีกลไกในการทำงานแตกต่างกัน สามารถแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม aminopeptidases 2 ชนิด, กลุ่ม dipeptidyl peptidases 2 ชนิด กลุ่ม endopeptidases 3 ชนิด และ กลุ่มอะไมเลส 1 ชนิด ซึ่งมีการระบุขนาดมวลโมเลกุลของเอนไซม์กลุ่มต่างๆ แสดงในตารางที่ 2.2



รูปที่ 2.10 กลไกการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนของฟลาโวไซม์

ที่มา: <https://controlledmold.com/flavourzyme-a-purified-enzyme-mixture-from-aspergillus-oryzae/>

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของฟลาโวไซม์ ที่ระบุได้จากการวิเคราะห์มวลสาร (mass spectrometric analysis)

Enzymes	Molecular weight (kDa)	EC number
Leucine aminopeptidase A	32.5	3.4.11
Leucine aminopeptidase 2	51.9	3.4.11
Dipeptidyl peptidase 4	85.1	3.4.14.5
Dipeptidyl peptidase 5	78.6	3.4.14
Neutral peptidase 1	42.4	3.4.24
Neutral peptidase 2	19	3.4.24.39
Alkaline peptidase 1	29	3.4.21.63
α-amylase A 3	52.5	3.2.1.1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Merz et al. (2015)

การใช้ฟลาโวโซมในกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น กลิ่นรส และรสชาติของผลิตภัณฑ์ สำหรับด้านการพัฒนาผลิตภัณฑ์ซึ่งต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมและต้องมีการควบคุมสภาวะในการย่อยโปรตีนให้เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยของ Nilsang et al. (2005) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาหูช้างซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้จากการผลิตทูน่ากระป๋อง โดยใช้ฟลาโวโซมกำหนด 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ (45-60°C) ความเข้มข้นของเอนไซม์ (1-5 %w/w) และระยะเวลาในการเกิดไฮโดรลิซิส (1-6 ชั่วโมง) พบว่า การย่อยโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาโดยใช้ความเข้มข้นของฟลาโวโซม 50 LAPU/g Protein ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรลิซิส เนื่องจากมีค่าระดับการย่อยของโปรตีนสูงที่สุดเป็นร้อยละ 62 เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสภาวะการย่อยดังกล่าวผ่านกระบวนการทำแห้งและทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการเปรียบเทียบระดับความขมของโปรตีนไฮโดรไลเสตกับสารละลายคาเฟอีนมาตรฐาน (ความเข้มข้นของสารละลายคาเฟอีนมาตรฐาน 1 ppm) พบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนความขมของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 3.45 ± 1.8 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าสารละลายคาเฟอีนมาตรฐาน ซึ่งงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. (2019) ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยและรสชาติจากปลาปักเป้า (*Takifugu obscurus*) ไฮโดรลิซิสด้วยเอนไซม์ 5 ชนิดตามสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ โพรตาเมกซ์ (pH 6), อัลคาเลส (pH 8), ทริปซิน (pH 8), ฟลาโวโซม (pH 6) และ นิวเทรส (pH 7) อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นร้อยละ 2 ระยะเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสเพื่อวิเคราะห์รสอูมามิและรสขม โดยให้ผู้ทดสอบให้คะแนนความขมของรสชาตินั้น ๆ ผลการทดสอบ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากฟลาโวโซมและโปรตาเมกซ์ได้คะแนนความขมของรสอูมามิสูง (5.25 ± 0.37 และ 5.58 ± 0.43) และรสขมต่ำกว่า (3.17 ± 0.39 และ 2.60 ± 0.25) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสตจากอัลคาเลสและนิวเทรสซึ่งได้คะแนนความขมของรสขมที่สูงกว่า (4.08 ± 0.47 และ 3.50 ± 0.42) เกิดจากเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรสเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนจากภายในสายเปปไทด์ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำทำให้เกิดรสขม

นอกจากนี้มีการศึกษาการใช้ฟลาโวไซม์ในการลดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดย Sinthusamran et al. (2020) ศึกษาการลดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมตัดแต่งเนื้อปลาแซลมอน (*Salmo salar*) ประกอบด้วย ส่วนหัว เกล็ด และก้างด้วย เอนไซม์ 2 ชนิด คือ ฟลาโวไซม์และอัลคาเลส ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากฟลาโวไซม์มีระดับคะแนนด้านรสขม (6.01 ± 2.34) ซึ่งต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากอัลคาเลส (9.13 ± 1.77) และนอกจากนี้ยังได้รายงานผลลดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้ง 2 ทริทเมนต์โดยใช้แอลกอฮอล์ 2 ชนิด คือ 2-butanol และ iso-propanol พบว่าผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านรสขมลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ 2-butanol จะได้คะแนนด้านรสขมที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ iso-propanol

ปัจจุบันมีการนำฟลาโวไซม์มาใช้ในกระบวนการไฮโดรลิซิสเพื่อผลิตสารเสริมกลิ่นรสจากโปรตีนทั้งในพืชและเนื้อสัตว์ เช่น ซอสปรุงรสจากโปรตีนไฮโดรไลเสตสำหรับ (Selamassakul et al., 2010) สารปรุงแต่งกลิ่นรสจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วเขียว (Laohakunjit et al., 2011) ผงปรุงรสบะหมี่กึ่งสำเร็จรูปจากหอยแมลงภูไฮโดรไลเสต (Breternitz et al., 2017) เป็นต้น จากงานวิจัยของ Vijaykrishnaraj et al. (2016) รายงานระบุลำดับของกรดอะมิโนบนสายโซ่เปปไทด์ของหอยแมลงภูไฮโดรไลเสต โดยใช้ RP-HPLC ร่วมกับ ESI mass spectrometer (Q-TOF) พบว่าลำดับของกรดอะมิโนบนสายโซ่เปปไทด์ของหอยแมลงภูไฮโดรไลเสต คือ Lys-Gly-Ser-Ser-Tyr-Cys-Asp-Lys ซึ่งมีกรดอะมิโนที่มีรสอูมามิ และรสหวาน คือไทโรซีน ไกลซีน และซีรีน การเติมหอยแมลงภูไฮโดรไลเสตลงในขนมปังส่งผลต่อลักษณะทางกายภาพของขนมปัง ช่วยเพิ่มปริมาตรของขนมปัง ความแน่นเนื้อและเนื้อสัมผัสของขนมปังดีขึ้น และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของขนมปัง พบว่าสูตรที่เติมผงโปรตีนไฮโดรไลเสตได้รับคะแนนความชอบด้านกลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวมสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับขนมปังที่ไม่เติมผงโปรตีนไฮโดรไลเสต และมีการนำเอนไซม์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงด้านกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ในระหว่างหมัก (fermentation) เช่น Cheddar cheese (Kheadr et al., 2003), ไส้กรอก (Feng et al., 2004), เบคอน (Zhang et al., 2017) เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่และคุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระ (Klompong et al., 2007; Pedrouso et al., 2020)

โปรตีนไฮโดรไลเซตมีลักษณะเป็นของเหลวที่สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่นๆ ในอาหาร ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นรส เนื้อสัมผัสของอาหาร รวมถึงสารให้กลิ่นรสที่อยู่ในรูปของอะโรมาติก (aromatic compound) มีมวลโมเลกุลต่ำ ทำให้ระเหยได้ง่าย อาจเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อม เช่น แสง ออกซิเจน ความร้อน pH เป็นต้น สามารถเกิดปฏิกิริยาการเสื่อมสลาย (degradation reaction) ได้ง่าย นำไปสู่การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้นกระบวนการทำแห้งหรือระเหยน้ำออกจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจึงเป็นวิธีการที่ช่วยเพิ่มความคงตัวและยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์

2.4 การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying)

กลิ่นรสของอาหารจะเกิดการเสื่อมสลายในระหว่างกระบวนการผลิตและเก็บรักษา การห่อหุ้ม (encapsulation) สารให้กลิ่นรสเป็นกระบวนการหนึ่งที่มีส่วนช่วยลดการเสื่อมสลายของสารให้กลิ่นรสที่อาจเกิดขึ้นได้ การห่อหุ้มเป็นกระบวนการที่อนุภาคทั้งที่อยู่ในสถานะที่เป็นของแข็งของเหลว หรือก๊าซ ถูกล้อมรอบด้วยการเคลือบ (coating) หรือการห่อหุ้มไว้ภายในโครงสร้างที่เป็นเนื้อเดียวกันหรือไม่เป็นเนื้อเดียวกันเพื่อให้ได้ลักษณะที่เป็นแคปซูล อย่างไรก็ตามเทคนิคที่นำมาใช้ในการห่อหุ้มมีอิทธิพลต่อการแพร่กระจายของสารให้กลิ่นรสรวมถึงความคงตัวของสารให้กลิ่นรสในระหว่างการเก็บรักษา ดังนั้น จึงต้องพิจารณาถึงรูปแบบการนำไปประยุกต์ใช้ของสารให้กลิ่นรสนั้นๆ ด้วย เช่น อุตสาหกรรมการผลิตเบเกอรี่ควรเลือกใช้เทคนิคการห่อหุ้มที่ทำให้สารให้กลิ่นรสอยู่ในรูปของผงแห้งเพื่อให้ง่ายต่อการกำหนดสัดส่วนในสูตรอาหารและเก็บรักษาได้ง่าย เป็นต้น (Saifullah et al., 2019)

การทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เป็นเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการห่อหุ้มสารให้กลิ่นรส ซึ่งเป็นกระบวนการลดความชื้นของของเหลวโดยการผ่านของเหลวเข้าสู่เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drier) โดยที่ของเหลวจะถูกฉีดพ่นเป็นละอองฝอยเข้าสู่โถอบลมร้อน (drying chamber) ที่มีอุณหภูมิสูงเพื่อทำให้น้ำเกิดการระเหย เมื่อนำไปทำแห้งจะได้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 - 200 μm (Sarabandi et al., 2020)

สำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยของสารให้กลิ่นรสที่ผ่านกระบวนการห่อหุ้มแล้วประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ได้แก่ การทำสารละลายให้เป็นอิมัลชัน โดยการนำสารห่อหุ้ม (wall material) ที่ใช้ในการเคลือบหรือส่วนผสมของสารเหล่านี้มาละลายน้ำ จากนั้นนำสารให้กลิ่นรสซึ่งเป็นสารแกนกลาง (core materials) ที่ต้องการห่อหุ้มมาผสมกับสารละลายของสารห่อหุ้ม (carrier solution) จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ไปโฮโมจีไนซ์เพื่อให้เกิดหยดของสารให้กลิ่นรส และขั้นตอนที่ 2 การทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นขั้นตอนที่นำของเหลวที่ผ่านการห่อหุ้มแล้วฉีดเข้าไปเป็นละอองฝอยผ่านทางหัวฉีด (nozzle) เพื่อให้เกิดเป็นหยด (droplet) ของสารจากนั้นจะเกิดการสัมผัสกับความร้อนภายในโถอบลมร้อนทำให้น้ำที่อยู่บริเวณรอบๆหยดของสารเกิดการระเหยได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีลักษณะเป็นผงแห้ง ขั้นตอนการทำแห้งแบบพ่นฝอยแสดงในรูปที่ 2.11 ประกอบด้วย (1) ตัวทำละออง (atomizer) (2) ระบบทำความร้อน (air heating system) (3) ไซโคลน (4) ส่วนระบายอากาศ (exhaust air) (Wongsangasri et al., 2015; Sarabandi et al., 2020) ซึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของผง ได้แก่

อัตราการพ่นกระจาย (atomized speed) ซึ่งมีผลต่อโครงสร้างและขนาดของอนุภาค โดยเมื่ออัตราการป้อนของเหลวคงที่การที่เพิ่มความเร็วในการพ่นกระจายจะทำให้ขนาดของอนุภาคที่ได้เล็กลง ความหนาแน่นสูง

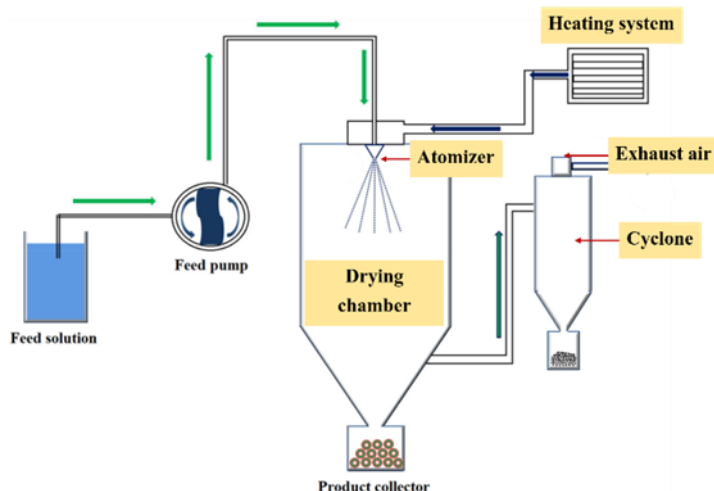
คุณสมบัติในการป้อน (feed properties) พบว่าปริมาณของแข็งในสารละลายมีผลต่อลักษณะและขนาดของอนุภาคผงที่ได้ การป้อนด้วยอัตราเร็วที่เพิ่มขึ้นหรือการลดอุณหภูมิความร้อนขาเข้าจะทำให้อนุภาคมีความหยาบ และทำให้ความชื้นของอนุภาคสูงขึ้น เนื่องจากมีปริมาณของแข็งเพิ่มขึ้นรวมถึงอนุภาคมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงทำให้การระเหยของน้ำมีอัตราที่ช้ากว่าอนุภาคที่มีขนาดเล็ก

ความหนืด (viscosity) พบว่าของเหลวที่มีความหนืดสูงจะทำให้ของเหลวที่ฉีดออกมา มีลักษณะคล้ายเส้นด้าย ทำให้อาหารไม่แห้งตามต้องการหรืออาจมีผลทำให้เกิดการอุดตันของหัวฉีดแบบพ่นฝอย

ชนิดของหัวฉีด (type of atomizer) โดยชนิดของหัวฉีดมี 2 แบบ คือ rotary และ nozzle ซึ่งมีผลต่อลักษณะของขนาดของอนุภาคแตกต่างกัน โดยหัวฉีดแบบ nozzle จะให้ลักษณะของอนุภาคผงที่ได้มีลักษณะที่หยาบกว่า

การไหลของอากาศ (air flow) อัตราการไหลของอากาศภายในห้องอบแห้งมีผลต่อเวลาของที่อยู่ในห้องอบแห้งของอนุภาคหรือเวลาที่ใช้ในการอบแห้งโดยตรง ถ้าอัตราการไหลของอากาศลดลงส่งผลให้เวลาที่อยู่ในห้องอบแห้งของอนุภาคหรือเวลาที่ใช้ในการอบแห้งเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำที่ถูกระเหยมีมากขึ้นมีผลให้ความชื้นลดลงและยังส่งผลต่อคุณรูปของผลิตภัณฑ์ที่ได้ทั้งในด้านคุณสมบัติทางกายภาพและเคมี เช่น การเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาล อันเนื่องมาจากความร้อนส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเข้มและเกิดกลิ่นใหม่ ถ้าอัตราการไหลของอากาศลดลง ส่งผลให้ละอองสัมผัสกับอากาศร้อนนานขึ้น ปริมาณน้ำในอาหารจะระเหยมากขึ้น ส่งผลทำให้ปริมาณความชื้นในผลิตภัณฑ์ลดลง

อุณหภูมิในการอบแห้ง (drying temperature) อุณหภูมิของลมร้อนในการอบแห้งทั้งขาเข้าและขาออกมีผลต่อลักษณะของผลิตภัณฑ์ เมื่ออุณหภูมิขาเข้าเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราการไหลคงที่จะส่งผลให้เกิดการระเหยน้ำออกไปได้อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้อุณหภูมิขาเข้าที่สูง ยังมีผลให้ความหนาแน่นปรากฏรวมมีค่าลดลง ทำให้เกิดโครงสร้างที่มีรูพรุนในอนุภาคมากกว่า ในขณะที่อุณหภูมิขาออกจะส่งผลต่อปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขาออกให้สูงขึ้น มีผลให้ปริมาณความชื้นที่เหลือลดลง ดังนั้นการกำหนดอุณหภูมิลมร้อนขาออก จึงขึ้นกับปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสิ่งสำคัญ ผลของความชื้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะส่งผลต่อสมบัติการละลาย (solubility) ความหนาแน่น (bulk density) ขนาดของผง (particle size) ลักษณะการดูดความชื้น (hygroscopicity) และ อายุการเก็บรักษา (shelf life) (Madene et al., 2006; Sarabandi et al., 2020)

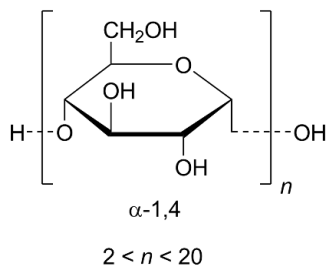


รูปที่ 2.11 กระบวนการทำแห้งและองค์ประกอบของเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dryer)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sarabandi et al. (2020)

นอกจากปัจจัยด้านสถานะในการทำแห้งแล้วนั้น ชนิดของสารหล่อหุ้ม (wall materials) และ สัดส่วนของสารหล่อหุ้มเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพของผง สารหล่อหุ้มแต่ละชนิดมี คุณสมบัติที่แตกต่างกันในด้านน้ำหนักและรูปร่างของโมเลกุลและความมีขั้ว (polarity) ส่งผลต่อ ลักษณะการหล่อหุ้มและการปลดปล่อยสารให้กลีนิรส สารหล่อหุ้มกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่นิยมนำมาใช้ใน การหล่อหุ้มสารให้กลีนิรส เช่น สตาร์ช (starch) สตาร์ชดัดแปร (modified starch) มอลโทเดกซ์ทรีน (maltodextrin) ปีตา-ไซโคลเดกซ์ทรีน กัมอาราบิก (gum arabic) เป็นต้น โดยลักษณะการจับกับ สารให้กลีนิรสของสารหล่อหุ้มกลุ่มสตาร์ชแบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ inclusion complex เป็นการกัก เก็บสารให้กลีนิรสที่เป็นสารแกนกลางด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกไว้ภายในโมเลกุล และ polar interaction เป็นการกักเก็บสารให้กลีนิรสด้วยพันธะไฮโดรเจนบริเวณตำแหน่ง hydroxyl groups ของสตาร์ชและสารให้กลีนิรส

มอลโทเดกซ์ทรีน (maltodextrin) เป็นพอลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการไฮโดรลิซิสสตาร์ช เริ่มต้นจากการนำน้ำแป้ง (starch) มาให้ความร้อนเพื่อเหนียวน้ำให้เกิดการเจลาติไนซ์ (gelatinizing) จากนั้นเติมกรดหรือเอนไซม์เพื่อไฮโดรลิซิสโครงสร้างของแป้งข้าวโพด ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของพอลิเมอร์ประกอบด้วย α -D-glucopyranosyl เชื่อมกันด้วยพันธะ α -1,4-bonds มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์เส้นตรงและกิ่งก้าน แสดงในรูปที่ 2.11



รูปที่ 2.12 โครงสร้างของมอลโทเด็กซ์ตริน

ที่มา: <https://www.plantasyhongos.es/glosario/maltodextrinas.htm>

มอลโทเด็กซ์ตรินสามารถจัดกลุ่มได้โดยใช้ค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose Equivalent, DE) ซึ่งเป็นค่าธรรมชาติที่บ่งบอกถึงขนาดโมเลกุลของสตาร์ชที่ถูกย่อย โดยมอลโทเด็กซ์ตรินที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสสูงแสดงว่าโมเลกุลของสตาร์ชถูกย่อยได้น้ำตาลกลูโคสมาก จะมีความหวานมากกว่ามอลโทเด็กซ์ตรินที่มีค่าสมมูลเดกซ์โทรสต่ำ (Sarabandi et al., 2020; Du et al., 2021) มอลโทเด็กซ์ตรินทางการค้าจะประกอบด้วยกลูโคส 20 ยูนิตและมีค่าสมมูลเดกซ์โทรสอยู่ในช่วง 3-20 ข้อดีของการใช้มอลโทเด็กซ์ตรินเป็นสารหล่อหุ้ม คือ ละลายน้ำได้ดี ความหนืดต่ำ ใช้ร่วมกับสารหล่อหุ้มชนิดอื่นๆ ได้ ค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (glass transition; Tg) สูง ซึ่งจะช่วยให้เกิดผลิตภัณฑ์คงตัวในรูปของแข็งที่อุณหภูมิห้องได้ดี และมอลโทเด็กซ์ตรินมีคุณสมบัติเป็น Amphiphilic สามารถสร้างพันธะร่วมกับโมเลกุลมีขั้วและไม่มีขั้วได้ สารให้กลิ่นรสถูกกักเก็บโดยสายโซ่ของโมเลกุลผ่านพันธะไฮโดรโฟบิก

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุติบ สารเคมี และอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุติบ

กุ้งฝอย มีขนาดเฉลี่ย 2.3-4 cm เก็บตัวอย่างในช่วงเดือนมิถุนายน 2564 จากบ่อเลี้ยงกุ้ง
ในจังหวัดเพชรบุรี

Flavourzyme® (1,000 LAPU/g; Novozyme, Denmark) จากบริษัท Brenntag
Ingredient (PCL, Bangkok, Thailand)

มอลโทเดกซ์ทริน DE 10-12 จากบริษัท Ingredion (Thailand) company limited

3.1.2 สารเคมี

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (Sigma-Aldrich, USA)

2,4,6-trimethylpyridine (Sigma-Aldrich, Switzerland)

bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)

C₁₁ – C₂₃ saturated alkanes standard (Sigma-Aldrich, Switzerland)

DC protein assay (Bio-rad, USA.)

dichloromethane (RCI Labscan, Ireland)

Di-sodium hydrogen phosphate dihydrate (Kemaus, Australia)

ethanol (99.9%) (QRëC, New Zealand)

gel electrophoresis Xcell SureLock (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

- antioxidant agent
- bis-tris precast gel (Novex, Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)
- LDS buffer
- protein marker
- reducing agent

hydrochloric acid (QRëC, New Zealand)
 sodium chloride (NaCl) (QRëC, New Zealand)
 sodium dihydrogen phosphate dihydrate (Kemaus, Australia)
 sodium hydroxide (QRëC, New Zealand)
 trichloroacetic acid (Loba Chemie, India)
 tris (hydroxymethyl) aminomethane (Carlo, Italy)

3.1.3 วัสดุและอุปกรณ์

เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS1602S/01, Switzerland)
 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
 centrifuge (Kubota รุ่น Model 6000, Japan)
 colorimeter (Konica Minolta รุ่น CR-400, Japan)
 hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)
 high-performance liquid chromatography (HPLC)
 laboratory blender (Waring Commercial รุ่น 8010BU, USA)
 magnetic stirrer with heating plate (IKA รุ่น C-MAG HS7, Germany)
 micropipette (Mettler Toledo, USA)
 microplate reader (Biochrom Asys รุ่น UVM340, England)
 pH meter (Mettler Toledo รุ่น Seven compact, Switzerland)
 refrigerator (Sanyo รุ่น SF-C95, Japan)
 rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-114, Switzerland)
 shaking water bath (GFL รุ่น 1082, Germany)
 spray dryer (GEA Process Engineering รุ่น NIRO A/S small-scale model E Mobile
 minortm 2000, Denmark)
 gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS)

- GC column (DB-WAX, Agilent Technologies, USA)
- GC system (Agilent Technologies รุ่น 7890B GC system, USA)
- MS (Agilent Technologies รุ่น 5977B GC/MSD Single Quad, USA)

- multipurpose sampler (MPS; Gerstel, Germany)
- temperature-programmable vaporization inlet (Gerstel CIS 4 PT, Germany)

UV-visible spectrophotometer (Thermo Spectronic รุ่น Genesys 10UV, USA)

vortex mixer (Genie2 รุ่น G560E, Scientific industries, Inc., USA)

water bath (Buchi Oilbath B-485, Switzerland)

water activity meter (Aqualab รุ่น 4te, USA)

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย

ศึกษาปัจจัยในกระบวนการไฮโดรลิซิสกุ้งฝอยด้วยฟลาโวไซม์ โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และ pH ที่มีความเหมาะสมต่อการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยวิธีการพื้นผิวผลตอบสนอง (RSM) ใช้การออกแบบการทดลองและสุ่มตัวอย่างด้วย central composite design (CCD) ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตและวิเคราะห์ กำหนดให้ตัวแปรตาม (dependent variables) คือ ค่าระดับการย่อยโปรตีน แสดงดังตารางที่ 3.1 โดยกำหนดสถานะอื่น ๆ ในกระบวนการให้คงที่ วิเคราะห์ผลและทำนายเป็นสมการโดยใช้โปรแกรม Statistica® software (Version 12.0, Stat Soft Inc., Oklahoma, USA) คัดเลือกสถานะที่มีระดับการย่อยสูงที่สุดเป็นสถานะที่เหมาะสม

3.2.1.1 เตรียมตัวอย่าง ล้างทำความสะอาดกุ้งฝอย สะเด็ดน้ำ แล้วบรรจุลงในถุงชนิด LDPE ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดลอง เมื่อทำการทดลอง นำตัวอย่างมาละลายน้ำแข็ง จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือด ระยะเวลา 5 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นๆในตัวกุ้ง เมื่อครบระยะเวลาการให้ความร้อนแล้วนำมาลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วด้วยน้ำเย็นที่มีอัตราส่วนน้ำ 1 ส่วนต่อน้ำแข็ง 2 ส่วน จากนั้นพักไว้ให้สะเด็ดน้ำแล้วนำไปคั่วด้วยเครื่องบดก่อนนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ของกุ้งฝอย ได้แก่ ปริมาณ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เป็นต้น โดยวิธีการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.1.1-ก.1.4

3.2.1.3 ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ดัดแปลงจาก Laohakunjit et al. (2014) และ Yang et al. (2019) เริ่มต้นจากการนำกุ้งฝอยปริมาณ 50 g เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6-8) 150 mL นำไปให้ความร้อนโดยใช้ incubator shaker อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 นาที เมื่ออุณหภูมิในระบบคงที่แล้วเติมฟลาโวไซม์ในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (enzyme: substrate) 5-15 LAPU/g protein แล้วนำไปให้ความร้อนโดยใช้ incubator shaker และตั้งค่าความเร็วในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ระยะเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดนำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยให้ความร้อน 90 °C เวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C ระยะเวลา 15 นาทีและนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนในขั้นต่อไป

3.2.1.4 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน ตามวิธีการของ Suppavorasatit et. al. (2011) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนด้วย Trichloroacetic acid (TCA) โดยการนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตปริมาตร 10 mL กับสารละลาย TCA เข้มข้น 20% ปริมาตร 10 mL ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสเพื่อหาปริมาณโปรตีนโดยใช้ DC protein assay เริ่มต้นจากการนำส่วนใสที่แยกได้ปริมาตร 5 μ L ลงใน 96 well microtiter plate จากนั้นเติม Reagent A ปริมาตร 25 μ L และ reagent B ปริมาตร 200 μ L ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630 nm นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของโปรตีนโดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นกราฟมาตรฐาน วิธีการสร้างกราฟมาตรฐานแสดงในภาคผนวก ก.2 เพื่อได้ค่าปริมาณโปรตีน (mg/mL) และคำนวณระดับการย่อยด้วยสมการที่ 3.1 คัดเลือกตัวอย่างที่มีระดับการย่อยสูงที่สุดเพื่อนำไปวิเคราะห์ในขั้นตอนที่ 3.2.1.5-3.2.1.7

$$\%DH = \frac{20\% \text{ TCA soluble protein in sample}}{\text{Total protein in sample}} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.1})$$

ตารางที่ 3.1 แผนการทดลองศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย

Treatments	Independent variables					
	Code			Actual values		
	X_1	X_2	X_3	E/S (LAPU/g protein)	Temperature (°C)	pH
1	-1	-1	-1	5	45	6
2	1	-1	-1	15	45	6
3	-1	1	-1	5	55	6
4	1	1	-1	15	55	6
5	-1	-1	1	5	45	8
6	1	-1	1	15	45	8
7	-1	1	1	5	55	8
8	1	1	1	15	55	8
9	-1.68	0	0	1	50	7
10	1.68	0	0	20	50	7
11	0	-1.68	0	10	40	7
12	0	1.68	0	10	60	7
13	0	0	-1.68	10	50	5
14	0	0	1.68	10	50	8.5
15	0	0	0	10	50	7
16	0	0	0	10	50	7
17	0	0	0	10	50	7

3.2.1.5 วิเคราะห์รูปแบบและขนาดมวลโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสเสตโดยใช้ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจาก Laemmli (1970) และ เตรียมตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสเสต มาวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนโดยใช้ DC protein assay จากนั้นทำการที่เจือจางให้โปรตีนมีความเข้มข้น 6 mg/mL นำสารละลายโปรตีน 100 μ L ผสมกับ lithium dodecyl sulfate (LDS) sample buffer 25 μ L และ reducing agent 10 μ L นำไปให้ความร้อนที่ 70°C เป็นเวลา 10 นาทีและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 \times g อุณหภูมิ 4°C 10 นาที จากนั้นเติม 2-morpholinoethanesulphonic acid (MES) buffer 500 มิลลิ ลิตร และ antioxidant agent 500 mL ลงใน chamber ของเครื่อง XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis จากนั้นนำตัวอย่างปริมาตร 15 μ L เติมลงในช่องเจล Bis-Tris precast gel โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-235 kDa และเปิดเครื่องจ่าย กระแสไฟฟ้า 120 V 40 mA เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง 35 นาที เมื่อครบเวลาล้างเจลด้วยน้ำ กลั่น จากนั้นย้อมสีแถบโปรตีนด้วย coomassie blue R-250 แช่เจลไว้ในน้ำย้อมสีเจล เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีย้อมด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ และล้างน้ำย้อมสีเจลออกด้วย destaining solution แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณโมเลกุลและสัดส่วนการกระจายของแถบ โปรตีน

3.2.1.6 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (free amino acid) ด้วยเทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) ดัดแปลงจากวิธีการของ Foh et al. (2010) เตรียมตัวอย่างโดยการนำโปรตีนไฮโดรไลสเสตปริมาตร 10 mL ตกตะกอนด้วย 10% TCA พักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Nilsang et al., 2005) จากนั้น นำไปปั่นเหวี่ยงแยกส่วนใสและนำไปกรองผ่าน nylon syringe filter ขนาด 0.45 μ m และ นำตัวอย่างปริมาตร 10 μ L ฉีดเข้าเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Agilent Poroshell HPH-C18 ขนาดอนุภาค 4 μ m คอลัมน์ขนาด 4.6 \times 100 mm และใช้กรดอะมิโน 16 ชนิด ได้แก่ อะลานีน อาร์จินีน แอสปาร์ติก ซิสเตอีน กลูตามิก ไกลซีน ฮีสติดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมธไทโอนีน ฟีนอลอะลานีน ซีรีน ทรีโอนีน ไทโรซีน และ วาลีน ที่ระดับความเข้มข้น 25, 100, 250 และ 1000 pmol สร้างเป็นกราฟมาตรฐาน จากนั้นนำพื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง ที่วิเคราะห์ได้มาใช้ในการคำนวณปริมาณความเข้มข้นของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่พบใน ตัวอย่างและรายงานผลในหน่วย mg/ 100 g protein

3.2.1.7 การทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่น กลิ่นรส และรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสม โดยแบ่งเป็นการทดสอบ 2 ประเภท คือการทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์และการทดสอบความเข้มของแต่ละลักษณะ (attribute) ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งได้รับการอนุมัติให้ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสำนักงานคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน ชุดที่ 1 (COA 241/2564)

การทดสอบความชอบของผลิตภัณฑ์ด้วยวิธี 9-point hedonic test ดัดแปลงจากวิธีการของ Juyun Lim (2011) และ Yang et al. (2019) ใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เริ่มต้นเตรียมตัวอย่างโดยนำน้ำต้มกึ่ง (วิธีการเตรียมตัวอย่างแสดงในภาคผนวก ก.3) และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสภาวะที่เหมาะสมนำมาให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90 °C ให้ความร้อนเป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบระยะเวลานำลดอุณหภูมิด้วยน้ำเย็นที่มีอัตราส่วนน้ำ 1 ส่วน น้ำแข็ง 2 ส่วน จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตเจือจางด้วยน้ำที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 (ตัวอย่างปริมาตร 15 mL ในน้ำปริมาตร 100 mL) ก่อนแล้วจึงจัดแบ่งปริมาตร 10 mL ลงในถ้วยพลาสติกแบบมีฝาปิดและติดรหัสของตัวอย่างแบบสุ่มไม่เรียงตามลำดับ เสิร์ฟให้ผู้ทดสอบชิมและทำแบบประเมินคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น กลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์

การทดสอบแบบพรรณนาเชิงปริมาณความเข้ม (intensity) ของลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธี quantitative descriptive analysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Cheung et al. (2015) และ Qi et al. (2017) ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน (ชาย 7 คนและหญิง 5 คน) ที่ผ่านการฝึกฝน ประเมินโดยใช้สเกลแบบเส้น 15-cm structured line scale โดยแบ่งออกเป็นสองขั้นตอน คือการฝึกฝนผู้ทดสอบและการประเมินให้คะแนนของแต่ละตัวอย่าง

การฝึกฝนผู้ทดสอบทั้ง 12 คนโดยเริ่มจากให้ผู้ทดสอบทำการดมและชิมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตและอธิบายลักษณะ (attribute) ต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ จากนั้นกำหนดนิยาม คำจำกัดความของแต่ละลักษณะพร้อมทั้งให้ผู้ทดสอบลงมตร่วมกันเพื่อคัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิงและกำหนดระดับคะแนนความเข้มของลักษณะนั้นๆ และฝึกฝนผู้ทดสอบชิมและดมตัวอย่างให้คะแนนระดับความเข้ม เพื่อให้ผู้ทดสอบมีระดับคะแนน

อยู่ในมาตรฐานเดียวกันทั้ง 12 คนโดยใช้เวลาในการฝึกฝนทั้งหมด 18-20 ชั่วโมง และทำการประเมินให้คะแนนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตและตัวอย่างน้ำตาลัมกึ่ง (เตรียมตามวิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อทดสอบความชอบด้วยวิธี 9-point hedonic test) โดยเสิร์ฟตัวอย่างให้ผู้ทดสอบดมและชิมตัวอย่างและประเมินให้คะแนนความเข้มของแต่ละลักษณะ

3.2.2 การศึกษาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย

หาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย ดัดแปลงจากวิธีการของ Wongsangasri et al. (2015) นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.2.1 มาทำให้เข้มข้นด้วยวิธีการระเหยน้ำออกโดยใช้ evaporator ควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำให้ได้ 6°Brix เตรียมมอลโทเดกซ์ทรินในอัตราส่วนมอลโทเดกซ์ทริน 30% (%w/w) ต่อน้ำหนักโปรตีนไฮโดรไลเสต (Silva et al., 2012a) จากนั้นผสมลงในโปรตีนไฮโดรไลเสต และทำให้เป็นอิมัลชันด้วย homogenizer ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 15 นาที แล้วนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย โดยกำหนดอุณหภูมิขาเข้าเป็นตัวแปรต้น (ปัจจัย) 3 ระดับ คือ 120°C, 150°C และ 180°C ควบคุมอุณหภูมิขาออกและอัตราการป้อนให้อยู่ในช่วง 85 °C ถึง 95 °C และอัตราการป้อน 10 ถึง 12 mL/min เก็บผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ในถุงอลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Al-met/LLDPE ปิดผนึกสุญญากาศเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต ดังนี้

3.2.2.1 คำนวณผลผลิตของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต นำผงโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้งหมดที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอยมาชั่งน้ำหนัก คำนวณดังสมการที่ 3.2 และรายงานผลเป็นร้อยละของผลผลิต (%yield)

$$\%yield = \frac{\text{weight of sample powder}}{\text{weight of total solid}} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.2})$$

3.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยใช้ air oven method ดัดแปลงจากวิธีของ AOAC (2005) โดยชั่งตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 2 g ลงในถ้วยอะลูมิเนียม นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C ระยะเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลานำออกมาพักไว้ในโถดูดความชื้น 30 นาที และชั่งน้ำหนัก นำไปอบต่อเนื่องจนน้ำหนักคงที่ นำน้ำหนักที่คงที่หลังอบมาคำนวณหาปริมาณความชื้นของตัวอย่างโดยใช้สมการที่ 3.3 โดยกำหนดให้ W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อน

อบ (g) W_2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g) และรายงานผลเป็นค่าร้อยละปริมาณความชื้น (%moisture content)

$$\% \text{ moisture content} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100 \quad (\text{สมการที่ 3.3})$$

3.2.2.3 วิเคราะห์ค่า water activity (a_w) วิเคราะห์โดยใช้ water activity meter (Aqualab, รุ่น 4te) นำตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 3 g ใส่ลงใน water activity cup เกลี่ยให้ตัวอย่างกระจายทั่วถ้วยเท่า ๆ กัน จากนั้นนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ water activity meter

3.2.2.4 วิเคราะห์ค่าสีวัดด้วยเครื่องวัดสี chroma meter (Model CR-400 series, Minolta, Japan) โดยนำตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 5 g ใส่ลงในช่องใส่ตัวอย่าง จากนั้นนำ chroma meter มาตั้งค่าโดยใช้กระดาษสีขาวเป็นสีมาตรฐาน จากนั้นวางหัววัด Chroma meter ไว้บนกระจกใสที่คลุมตัวอย่างอยู่แล้วจดบันทึกค่าที่ได้และรายงานผลเป็นค่าความสว่าง (L^*) ค่าความเป็นสีแดงหรือสีเขียว (a^*) และค่าความเป็นสีเหลืองหรือน้ำเงิน (b^*) คำนวณค่าความขาว (whiteness) ได้จากสมการที่ 3.4

$$\text{whiteness} = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}} \quad (\text{สมการที่ 3.4})$$

3.2.2.5 ศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้นของตัวอย่าง ดัดแปลงจากวิธีการของ Muzaffar and Kumar (2016) นำตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 2 g ใส่ในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอน จากนั้นนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (desiccator) ที่มีสารละลายเกลืออิ่มตัว 6 ชนิด คือ LiCl , MgCl_2 , K_2CO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, NaCl , และ KNO_3 เพื่อให้ได้สถานะที่มีค่า water activity เป็น 0.11, 0.33, 0.44, 0.52, 0.75, และ 0.93% ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °C ชั่งน้ำหนักทุกๆ 2 วัน จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปหาความชื้นตามวิธีของ (AOAC, 2005)

3.2.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและกายภาพ องค์ประกอบและปริมาณของสารให้กลิ่น และคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างการเก็บรักษา

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งด้วยสถานะที่เหมาะสมจากขั้นตอนที่ 3.2.2 มาเก็บรักษาในถุงอลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Al-met/LLDPE แสงปิดสนิทแบบสุญญากาศที่อุณหภูมิ 25°C จากนั้นติดตามผลการเปลี่ยนแปลงในช่วง 0 ถึง 3 เดือน โดยการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 2 สัปดาห์นำไปวิเคราะห์

3.2.3.1 วิเคราะห์ปริมาณความชื้น ตามขั้นตอนที่ 3.2.2.2

3.2.3.2 วิเคราะห์ค่า water activity a_w ตามขั้นตอนที่ 3.2.2.3

3.2.3.3 วิเคราะห์ค่าสี ตามขั้นตอนที่ 3.2.2.4 โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความขาว (whiteness) ตามสมการที่ 3.4 และการเปลี่ยนแปลงสี (ΔE^*) ตามสมการที่ 3.6

$$\Delta E^* = \sqrt{\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2}} \quad (\text{สมการที่ 3.6})$$

3.2.3.4 วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารให้กลิ่น ด้วยเทคนิค gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) ดัดแปลงวิธีการจาก Mall and Schieberle (2016) วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญและติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารระเหยให้กลิ่นในระหว่างการเก็บรักษาด้วย GC-MS โดยสกัดตัวอย่างจากผงโปรตีนไฮโดรไลเสตวิธีการการสกัดแสดงในภาคผนวก ก.4 นำตัวอย่างที่สกัดแล้วฉีดเข้าระบบของ GC-MS ด้วยระบบการฉีดแบบ splitless mode โดยตั้งอุณหภูมิ injector เป็น 230 °C ระบบจะปล่อยสารระเหยให้เข้าสู่คอลัมน์ โดยใช้ capillary คอลัมน์ ชนิด DB-WAX (30 m x 0.25 μm i.d. x 0.25 μm film thickness; J&W, Agilent, USA) ตั้งโปรแกรมอุณหภูมิ oven ที่อุณหภูมิเริ่มต้น 40°C ระยะเวลา 5 นาทีแล้วเพิ่มขึ้นในอัตราเร็ว 3°C/min จนถึง 240°C และคงไว้ 5 นาที ใช้ฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา โดยมีอัตราการไหล 2 mL/min และ ionize voltage 70 eV ใช้ mass range ตั้งแต่ 40-350 m/z โดยมีอุณหภูมิ detector 280 °C แปรผลโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล (NIST version 17) ร่วมกับการคำนวณค่า linear retention index (LRI) โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอัลเคน (C_{11} - C_{23}) คำนวณปริมาณของสารระเหยได้จากสมการที่ 3.7 จากนั้นเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารนั้น ๆ กับ 2,4,6-trimethylpyridine ความเข้มข้น 1,000.447 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ที่ใช้

เป็น internal standard ซึ่งจะรายงานเป็นความเข้มข้นสัมพัทธ์ของสารระเหยชนิดนั้นต่อน้ำหนักตัวอย่าง (ppm) และคำนวณหาค่า odor activity value (OAV) ด้วยสมการที่ 3.8 จากนั้นคัดเลือกสารให้กลิ่นสำคัญที่มีค่า OAV ≥ 1 เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารในระหว่างการเก็บรักษาในช่วง 0-12 สัปดาห์

$$\text{ปริมาณสารระเหยในตัวอย่าง (mg)} = \frac{(\text{พื้นที่ใต้กราฟของสารระเหย} \times \text{ปริมาณ internal standard ที่เติมลงไปในตัวอย่าง (mg)})}{\text{พื้นที่ใต้พีคของ internal standard}} \quad (\text{สมการที่ 3.7})$$

$$\text{OAV} = \frac{\text{ปริมาณสารระเหยที่คำนวณได้ (ppm)}}{\text{odor threshold value in water}} \quad (\text{สมการที่ 3.8})$$

3.2.3.5 ทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธีการทดสอบแบบพรรณนาเชิงปริมาณความเข้ม (intensity) ของลักษณะต่างๆ ด้วยวิธี quantitative descriptive analysis ดัดแปลงจากวิธีการของ Cheung et al. (2015) ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 12 คน (ชาย 7 คนและหญิง 5 คน) อายุ 24-35 ปี จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเมินโดยใช้สเกลแบบเส้น 15 cm structured line scale โดยเริ่มต้นจากการฝึกฝนผู้ทดสอบและการประเมินให้คะแนนของแต่ละตัวอย่าง ฝึกฝนผู้ทดสอบทั้ง 12 คนโดยเริ่มจากให้ผู้ทดสอบทำการดมและชิมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตและอธิบายลักษณะ (attribute) ต่างๆ ของผลิตภัณฑ์ จากนั้นกำหนดนิยาม คำจำกัดความของแต่ละลักษณะพร้อมทั้งให้ผู้ทดสอบลงมติร่วมกันเพื่อคัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นตัวอย่างอ้างอิง จากนั้นให้ผู้ทดสอบเลือกและกำหนดคะแนนความเข้ม (intensity) ของตัวอย่างอ้างอิงที่ใช้แสดงคุณลักษณะนั้น ๆ และฝึกฝนผู้ทดสอบชิมและดมตัวอย่างให้คะแนนระดับความเข้ม เพื่อให้ผู้ทดสอบมีระดับคะแนนอยู่ในมาตรฐานเดียวกันทั้ง 12 คนโดยใช้เวลาในการฝึกฝนทั้งหมด 18-20 ชั่วโมง จากนั้นให้ผู้ทดสอบทำการประเมินให้คะแนนความเข้มลักษณะต่าง ๆ ของตัวอย่าง

3.2.4 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ โดยรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละชุดข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA) และ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี duncan multiple range tests (DMRT) สำหรับการทดสอบทาง
ประสาทสัมผัสวางแผนการทดลองแบบ Randomized complete block design (RCBD) วิเคราะห์
ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบคะแนนเฉลี่ยของการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้วยวิธี
least significant difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p \leq 0.05$) โดยใช้โปรแกรม SPSS
version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, USA)



บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย

4.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (proximate composition) ของกุ้งฝอย

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบหลักของกุ้งฝอย ซึ่งแสดงผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.1 โดยรายงานเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง พบว่ากุ้งฝอยประกอบด้วย ความชื้น $75.24 \pm 0.52\%$ โปรตีน $14.85 \pm 0.31\%$ ไขมัน $5.59 \pm 0.30\%$ และเถ้า $2.6 \pm 0.06\%$ โดยปริมาณโปรตีนที่พบในกุ้งฝอยมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนที่พบในกุ้งขาวแวนนาไมด์ (*Litopenaeus vannamei*) ซึ่งมีโปรตีน $13.8 \pm 0.27\%$ (Cao et al., 2009) เมื่อคำนวณปริมาณโปรตีนเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนักแห้งของกุ้งฝอยพบว่าโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก 64.45% ซึ่งปริมาณโปรตีนที่พบในกุ้งฝอยสามารถใช้เป็นแหล่งในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตได้ จากงานวิจัยของ Dey and Dora (2014) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และวิเคราะห์องค์ประกอบหลักที่พบในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น ($72.3 \pm 0.04\%$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ($13.7 \pm 0.91\%$)

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบหลัก (proximate composition) ของกุ้งฝอย

composition	content (%wb)
ความชื้น	75.24 ± 0.52
โปรตีน	14.85 ± 0.31
ไขมัน	5.59 ± 0.30
เถ้า	2.60 ± 0.06

หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3)

%wet basis (%wb) หมายถึง รายงานเป็นค่าร้อยละโดยคำนวณจากน้ำหนักเปียกของตัวอย่าง

4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย

กระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีน ระดับการย่อยของโปรตีน (degree of hydrolysis, DH) เป็นค่าที่บ่งบอกถึงการถูกย่อยของพันธะเปปไทด์ ในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่าง ๆ จะต้องพิจารณาถึงค่าระดับการย่อยของโปรตีนประกอบด้วย (Aspevik et al., 2016) การใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนนั้นจะต้องควบคุมสภาวะการย่อยให้เหมาะสมเพื่อให้เอนไซม์สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตรงตามวัตถุประสงค์ จากการศึกษาปัจจัยในการกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอย โดยแปรอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (enzyme/substrate ratio) (5-15 LAPU/g protein) อุณหภูมิ (45-55 °C) และ pH (6-8) ที่มีความเหมาะสมต่อกระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยวิธีวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ response surface methodology (RSM) ใช้การออกแบบการทดลองแบบ central composite design (CCD) กำหนดระดับปัจจัยเป็น 3 ระดับ และกำหนดสภาวะอื่นๆ ในการไฮโดรลิซิสให้คงที่ เช่น ระยะเวลาในการย่อย ปริมาณบัฟเฟอร์ เป็นต้น จากผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยของโปรตีนพบว่า มีค่าระดับการย่อยของโปรตีนมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 14.0 ถึง 21.9 แสดงในตารางที่ 4.2 เมื่อนำข้อมูลระดับการย่อยโปรตีนและค่าที่ใช้ในการทดลองของแต่ละปัจจัยมาสร้างสมการถดถอยเชิงเส้นโค้ง (quadratic regression equation) โดยใช้ค่าจริง (actual value) ได้สมการทำนายค่าระดับการย่อยของโปรตีน ดังแสดงในสมการที่ 4.1

$$DH = -193.785 + 0.004 x_1 + 4.364 x_2 + 29.011 x_3 - 0.032 x_1^2 - 0.044 x_2^2 - 2.064 x_3^2 + 0.025 x_1 x_2 - 0.026 x_1 x_3 - 0.009 x_2 x_3 \quad (\text{สมการที่ 4.1})$$

กำหนดให้ x_1 คือ อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น
 x_2 คือ อุณหภูมิ
 x_3 คือ ค่า pH

ตารางที่ 4.2 ระดับการย่อยของโปรตีน (degree of hydrolysis, DH) จากสภาวะการย่อยต่างกัน

Treatments	Independent variable						Dependent variable
	Code			Actual values			
	X_1	X_2	X_3	E/S (LAPU/g protein)	Temperature (°C)	pH	DH (%)
1	-1	-1	-1	5	45	6	15.3±0.33
2	1	-1	-1	15	45	6	17.2±0.55
3	-1	1	-1	5	55	6	14.7±0.19
4	1	1	-1	15	55	6	21.2±0.52
5	-1	-1	1	5	45	8	14.0±0.39
6	1	-1	1	15	45	8	17.5±0.56
7	-1	1	1	5	55	8	15.3±0.24
8	1	1	1	15	55	8	19.1±0.98
9	-1.68	0	0	1	50	7	14.3±0.32
10	1.68	0	0	20	50	7	21.9±0.74
11	0	-1.68	0	10	40	7	14.8±0.28
12	0	1.68	0	10	60	7	18.1±0.14
13	0	0	-1.68	10	50	5	14.2±0.60
14	0	0	1.68	10	50	8.5	14.4±0.76
15	0	0	0	10	50	7	21.6±0.87
16	0	0	0	10	50	7	20.6±0.55
17	0	0	0	10	50	7	20.7±0.17

หมายเหตุ ค่าระดับการย่อยของโปรตีน (DH (%)) แต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

สำหรับการพิจารณาความเหมาะสมของสมการสามารถพิจารณาได้จากค่า coefficient of determination (R^2) เป็นค่าที่ใช้ในการอธิบายว่าสมการถดถอยที่ได้สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าสมการที่ 4.1 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.967 หมายถึงสมการนี้สามารถอธิบายความผันแปรของค่าตัวแปรตอบสนองได้ 96.7% ซึ่งสมการสามารถทำนายค่าระดับการย่อยของโปรตีนได้ใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการทดลอง อย่างไรก็ตามในการหาสถานะที่เหมาะสมโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นโค้งมีความจำเป็นต้องพิจารณาความเหมาะสมของสมการจากค่า lack of fit ร่วมกับค่า p-value ควบคู่ไปด้วย ซึ่งค่า lack of fit ที่เหมาะสมจะต้องมากกว่า 0.05 และค่า p-value ที่เหมาะสมจะต้องมีค่า ≤ 0.05 ซึ่งสมการที่ 4.1 มีค่า p-value เท่ากับ 0.001 ซึ่งน้อยกว่า 0.05 และมีค่า lack of fit เท่ากับ 0.294 แสดงว่าสมการมีความเหมาะสมในการอธิบายสถานะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรลิซิส ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.3 p-value ของปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อระดับการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสต

source	p-value
model	0.001*
x_1 - E/S	0.996
x_2 - temperature	0.001*
x_3 - pH	0.000*
x_1^2	0.065
x_2^2	0.001*
x_3^2	0.000*
x_1x_2	0.069
x_1x_3	0.664
x_2x_3	0.880
lack of fit	0.294

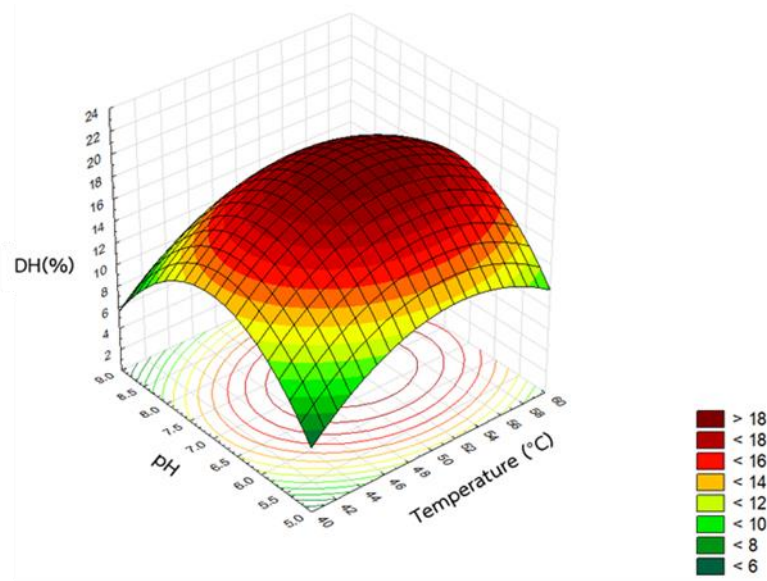
หมายเหตุ * หมายถึง เป็นปัจจัยที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p\text{-value} \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ในตารางที่ 4.3 พบว่าปัจจัยด้านอัตราส่วนความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S) ไม่ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อระดับการย่อยของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ (p-value > 0.05) ส่วนปัจจัยด้านอุณหภูมิและค่า pH มีค่า p-value น้อยกว่า 0.05 ซึ่งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงต่อระดับการย่อยของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ (p-value ≤ 0.05) จึงแทนค่า E/S เป็นค่าคงที่ลงในสมการที่ 4.1 จะได้เป็นสมการที่ 4.2 นำสมการที่ 4.2 ประกอบด้วย 2 ปัจจัยคืออุณหภูมิและค่า pH หาสมการที่เหมาะสมโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองเพื่อวิเคราะห์ผลของแต่ละตัวแปรต่อระดับการย่อยของโปรตีนต่อไป จากรูปที่ 4.1 เป็นกราฟที่แสดงพื้นผิวตอบสนอง surface plot (ก) และ contour plot (ข) ที่ได้จากความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและค่า pH ตามลำดับ โดยกำหนดให้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S) คงที่ที่ 10 LAPU/g protein พบว่าอุณหภูมิประมาณ 50 °C และ pH ประมาณ 7 จะให้ค่าระดับการย่อยของโปรตีนสูงที่สุด

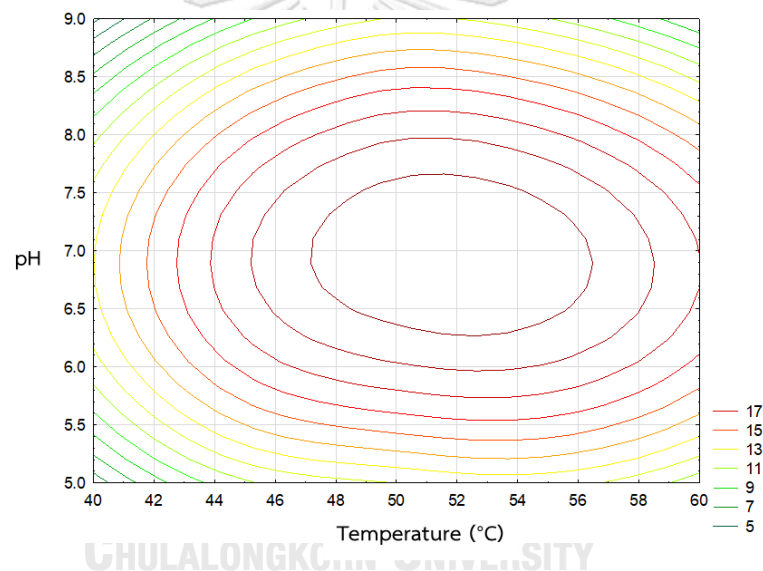
$$DH = -196.47 + 4.61 x_2 + 28.75 x_3 - 0.04 x_2^2 - 2.06 x_3^2 - 0.009 x_2 x_3 \quad (\text{สมการที่ 4.2})$$

ในการตรวจสอบความถูกต้องของสมการ (validation) สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของค่า DH ที่ได้จากการทดลองที่สภาวะเหมาะสมจากการทำนายโดยใช้สมการที่ 4.1 ทดลองโดยใช้สภาวะในกระบวนการไฮโดรลิซิสของโปรตีนที่ทดลองจริงคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ 10 LAPU/g protein อุณหภูมิ 50 °C และ pH 7 ได้ค่าเฉลี่ยของระดับการย่อยโปรตีนคือ 20.97 ± 0.86% และเมื่อเทียบจากการแทนค่าในสมการซึ่งได้ค่าเท่ากับ 21.4% และเมื่อพิจารณาค่าความแตกต่างของค่าที่ได้จากการทดลองและค่าที่ได้จากการแทนค่าในสมการพบว่าค่าทั้ง 2 นี้มีความแตกต่างเท่ากับ 0.43% โดยความคลาดเคลื่อนโดยเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยสมการแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ กับค่าที่ได้จากการทดลองจริงคิดเป็นร้อยละ 2.06 ซึ่งไม่เกินร้อยละ 10 ดังนั้น สมการที่ 4.1 เป็นสมการที่สามารถนำไปใช้ในการทำนายและอธิบายผลของตัวแปรทั้งสองตัวแปรคือ อุณหภูมิและค่า pH ได้

ก)



ข)



รูปที่ 4.1 ก) surface plot และ ข) contour plot ของระดับการย่อยของโปรตีน (DH) ที่แปรปัจจัยระหว่าง อุณหภูมิและค่า pH

จากการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอยและนำสภาวะดังกล่าวไปทดสอบพบว่า ระดับการย่อยของโปรตีนที่วิเคราะห์ได้มีค่าเป็น $20.97 \pm 0.86\%$ ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Huang et al. (2010) ที่รายงานผลการย่อยโปรตีนจากกุ้งโดยใช้ฟลาโวไซม์ควบคุมสภาวะการย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิ 50 °C พบว่าที่ระยะเวลา 5 ชั่วโมง ระดับการย่อยของโปรตีนมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอยู่ในช่วง 20-25% ในขณะที่งานวิจัยของ Nilsang et al. (2005) ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการดัดแปรกลิ่นรสของโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาหูนาที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตปลาหูนากระป๋องด้วยฟลาโวไซม์ โดยใช้ response surface

methodology กำหนด 3 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ (45-60°C) ความเข้มข้นของเอนไซม์ (1-5 %w/w) และระยะเวลาในการเกิดไฮโดรลิซิส (1-6 ชั่วโมง) พบว่าการย่อยโปรตีนจากน้ำนิ่งปลาโดยใช้ความเข้มข้นของฟลาโวไซม์ 50 LAPU/g Protein ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นระยะเวลาในการย่อย 6 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการไฮโดรลิซิส เนื่องจากมีค่าระดับการย่อยของโปรตีนสูงที่สุดเป็นร้อยละ 62 แสดงให้เห็นว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อระดับการย่อยของโปรตีน ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราเร็วในการย่อยโปรตีนเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ให้มากขึ้นจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น ในขณะที่เดียวกันในสภาวะที่มีปริมาณเอนไซม์ที่มากเกินไปปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่และลดลงตามลำดับเนื่องจากปริมาณโปรตีนตั้งต้นลดลงและเปลี่ยนรูปเป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์, สำหรับปัจจัยด้านอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์เพราะอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะผันแปรตามอุณหภูมิ และอุณหภูมียังมีอิทธิพลต่อความคงตัวของเอนไซม์ หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและมิผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสูญเสียไปด้วย เนื่องจากโครงสร้างที่ตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไป, ปัจจัยของค่า pH จะมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ส่งผลต่อการแตกตัวของไอออนบริเวณเร่งของเอนไซม์องค์ประกอบของโปรตีนตั้งต้น

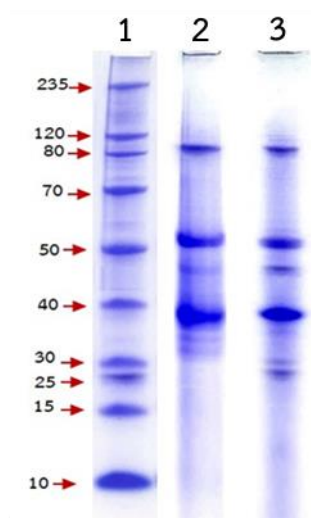
นอกจากนี้ปัจจัยด้านความจำเพาะของเอนไซม์เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญต่อระดับการย่อยโปรตีน จากการรายงานของ Merz et al. (2015) และ Grossman et al. (2019) อธิบายถึงความจำเพาะของฟลาโวไซม์ว่า เป็นเอนไซม์แบบผสมโดยที่เอนไซม์กลุ่ม aminopeptidases, dipeptidyl peptidases และ endopeptidases เป็นกลุ่มที่มีการทำงานแบบ endoprotease และ exopeptidase ซึ่งเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนภายในโมเลกุลโปรตีนอย่างสุ่มเพื่อให้เกิดเปปไทด์สายสั้น จากนั้นจึงเกิดการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายสายทำให้มวลโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดเล็กลงอีกทั้งยังได้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการนี้เป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ (Imm et al., 1999; Fu et al., 2019) ค่าระดับการย่อยของโปรตีนจึงเป็นตัวแปรหนึ่งที่ใช้บ่งบอกถึงการถุกย่อยของโปรตีนกลายเป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นที่สามารถบ่งบอกถึงการถุกย่อยของโปรตีน เช่น การวิเคราะห์การกระจายตัวและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE, การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) และ การวิเคราะห์โดยใช้วิธีการทดสอบทางประสาทสัมผัส เป็นต้น

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยของโปรตีนที่สภาวะที่เหมาะสมร่วมกับการการกระจายตัวของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานเพื่อให้สามารถระบุชนิดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง โดยใช้หลักการเคลื่อนที่ของโมเลกุลโปรตีนซึ่งเป็นโปรตีนที่ละลายในบัฟเฟอร์ที่มีประจุเป็นลบ เมื่อให้กระแสไฟฟ้าทำให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการเคลื่อนที่บนแผ่นเจลตามประจุไฟฟ้าไปสู่ขั้วบวก ทำให้เกิดการกระจายตัวแยกกันตามขนาดของโมเลกุล โดยที่โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยจะเคลื่อนที่บนเจลได้เร็วกว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก สำหรับการวิเคราะห์การกระจายตัวของโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเริ่มต้นจากการนำโปรตีนมาเจือจางเพื่อให้มีปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 6 mg/mL จากนั้นผสมกับบัฟเฟอร์เพื่อให้โปรตีนมีสภาพขั้วเป็นประจุลบ จากนั้นให้กระแสไฟฟ้าเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของโปรตีน

จากผลการวิเคราะห์ซึ่งแสดงในรูปที่ 4.3 โดยแถวที่ 1 แสดงแถบโปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-235 kDa แถวที่ 2 แสดงแถบโปรตีนจากกึ่งฝอยที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส และแถวที่ 3 แสดงแถบโปรตีนจากกึ่งฝอยที่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยพลาโวไซม์ที่สภาวะเหมาะสม พบว่าโปรตีนกลุ่มหลักที่พบในแถวที่ 2 และ 3 พบว่าประกอบด้วยโปรตีนหลัก 4 แถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ดังนี้ 109 kDa, 53 kDa, 44 kDa และ 38 kDa โดยสามารถระบุชนิดของโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล ดังนี้ paramyosin (90-110 kDa), actin (40-55 kDa) และ tropomyosin (34-38 kDa) ตามลำดับ ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในสัตว์น้ำเปลือกแข็งกลุ่มครัสเตเชียน (Srinroch et. al., 2015) สำหรับโปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิสในแถวที่ 3 ปรากฏแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน 6 แถบ ได้แก่ 109 kDa, 53 kDa, 44 kDa, 38 kDa, 31 kDa และ 26 kDa โดยแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31 และ 26 kDa เป็นแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นเพิ่มเติมแตกต่างจากโปรตีนไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส ซึ่งแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นมีความเป็นไปได้ว่าจะเป็นโปรตีนประเภท sarcoplasmic calcium-binding protein และ myosin light chain (Wu et al., 2015; Iwaniak et al., 2016) เนื่องจากเกิดการเสียสภาพธรรมชาติและกระบวนการไฮโดรลิซิสของโปรตีน โดยที่ระหว่างกระบวนการย่อยโปรตีนมีการใช้อุณหภูมิที่สูงเป็นเหตุให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ นอกจากนั้น การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิส่งผลให้โปรตีนเกิดการคลายตัวทำให้อาจมีโปรตีนขนาดเล็ก เปปไทด์สายสั้น หรือกรดอะมิโนอิสระหลุดออกมาและทำให้เห็นแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยลง ในขณะที่เดียวกันโปรตีนบางส่วนอาจถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์กลายเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลเล็ก เปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระ จึงทำให้พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนัก

โมเลกุลเล็กเกิดขึ้นได้ ซึ่งผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ ศรีภาพรณ ธาระนารถ และคณะ (2563) ที่ศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนที่สกัดได้จากกุ้งกุลาดำด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่ากุ้งกุลาดำประกอบด้วยโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล ดังนี้ 104 kDa, 74 kDa, 58 kDa, 28 และ 23 kDa และงานวิจัยของ Shao et al. (2018) ที่ศึกษาอิทธิพลของการใช้ความร้อนและความดันในกระบวนการแปรรูปอาหารต่อการเปลี่ยนแปลงด้านเนื้อสัมผัส รูปแบบการกระจายตัวของโปรตีน และสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนจากกุ้งแดงหรือกุ้งญี่ปุ่น (*Procambarus clarkia*) ซึ่งเป็นกุ้งน้ำจืด จำพวกเครย์ฟิช จากการรายงานผลการวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของแถบโปรตีนพบว่า โปรตีนหลักที่พบในกุ้งแดงประกอบด้วย 2 ชนิด คือ myosin heavy chain (MHC) 220 kDa และ actin 44.3 kDa และยังปรากฏแถบโปรตีนชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นแถบสีอ่อน ได้แก่ paramyosin ที่ 100 kDa, tropomyosin ที่ 36 kDa, troponin ที่ 33 kDa, และ myosin light chains (MLC) ที่ 15-24 kDa และแถบสีของโปรตีนจะมีสีจางลงในตัวอย่างที่ได้รับความร้อนและความดันเพิ่มมากขึ้น (200-500 MPa) ซึ่งเกิดจากการที่โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไปจากสภาพธรรมชาติในระหว่างกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนร่วมกับความดัน เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับโปรตีนจากกุ้งแดงที่ไม่ผ่านกระบวนการให้ความร้อน

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาและอธิบายเกี่ยวกับอิทธิพลของกระบวนการไฮโดรลิซิสที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบการกระจายตัวและน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักจากงานวิจัยของ Pongsetkul et al. (2017) ได้รายงานรูปแบบการกระจายตัวของโปรตีนของกุ้งฝอยที่วิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE และระบุชนิดของโปรตีนหลักที่พบ 2 ชนิด คือ myosin heavy chain (205 kDa) และ actin (45 kDa) เมื่อนำกุ้งฝอยแปรรูปเป็นกะปิ ด้วยกระบวนการหมักเกลือเป็นเวลา 30 วัน พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 30 kDa เพิ่มขึ้น โดยในระหว่างกระบวนการหมักเกิดกระบวนการ autolysis ของโปรตีนโดยที่ myosin heavy chain จะถูกย่อยเป็นโปรตีนโมเลกุลเล็ก เช่น actin, troponin และ tropomyosin เป็นต้น กระบวนการไฮโดรลิซิสทำให้โปรตีนจากสัตว์น้ำปรากฏแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลต่ำในช่วง 16-66 kDa เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนตั้งต้น (Choi et al., 2009; Cai et al., 2016)



รูปที่ 4.2 การกระจายตัวของโมเลกุลโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

หมายเหตุ แถวที่ 1 โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 10-235 kDa, แถวที่ 2 โปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส และแถวที่ 3 โปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิสด้วยสภาวะเหมาะสม

องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระที่พบในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งผู้บริโภคสามารถรับรู้รสชาติของผลิตภัณฑ์ที่มีกรดอะมิโนอิสระได้มากกว่าการที่กรดอะมิโนอยู่ในรูปของส่วนประกอบบนสายเปปไทด์หรือภายในโครงสร้างของโปรตีน สำหรับการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เทคนิค high-performance liquid chromatography (HPLC) และคำนวณปริมาณกรดอะมิโนที่พบในตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดอะมิโนแต่ละชนิดแสดงผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่พบในตัวอย่างควบคุมซึ่งใช้น้ำต้มกึ่ง และตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสม แสดงผลในตารางที่ 4.4 พบว่าในตัวอย่างมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ alanine, arginine, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, proline, serine, threonine, tyrosine และ valine โดยหลังจากกระบวนการไฮโดรลิซิสพบว่า ผลรวมของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดของโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้นเป็น 142.53 ± 5.08 mg/ 100 g protein เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำต้มกึ่งที่เป็นตัวอย่างควบคุม 48.84 ± 2.68 mg/ 100 g protein เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการย่อยด้วยฟลาโวไซม์ แสดงว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดเล็กที่เกิดขึ้นอาจจะเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ โดยที่กรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) ที่พบในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณเพิ่มขึ้น เช่น

glycine (11.52 ± 1.04), leucine (17.47 ± 1.75), isoleucine (6.91 ± 0.63), proline (7.90 ± 0.20), methionine (8.91 ± 0.45), phenylalanine (10.28 ± 0.89) และ valine (6.90 ± 0.17) เป็นต้น จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Imm and Lee (1999) ที่ศึกษาการใช้ฟลาโวไซม์ในการย่อยโปรตีนจากเนื้อปลา red hake เพื่อผลิตสารให้กลิ่นรสทะเล โดยนำโปรตีนที่สกัดได้จากส่วนหัวและไส้ปลา red hake มาย่อยด้วยเอนไซม์ที่สภาวะ pH 6.8 อุณหภูมิ 55°C และอัตราส่วนบัฟเฟอร์ต่อสารตั้งต้นเป็น 2:5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระพบว่า การใช้ฟลาโวไซม์ในการย่อยโปรตีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยกรดอะมิโนกลุ่มที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ เช่น alanine, leucine, isoleucine และ methionine เป็นต้น และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี descriptive analysis พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีระดับคะแนนความเข้มข้นรสอูมามิและรสหวานเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำอาจเกิดจากอิทธิพลของการใช้เอนไซม์ในกระบวนการไฮโดรลิซิส (Grossman et al., 2019) จากการรายงานของ Cheung et al. (2015) อธิบายว่าเอนไซม์กลุ่ม aminopeptidase ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แบบ exopeptidase มีความจำเพาะต่อตำแหน่งเร่ง โดยเอนไซม์จะเข้าจับกับบริเวณปลายสายเปปไทด์ กรดอะมิโนที่อยู่บริเวณปลายสายเปปไทด์โดยส่วนใหญ่จะเป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำจะหลุดออกเป็นกรดอะมิโนอิสระ ดังนั้น โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยฟลาโวไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์แบบผสมที่มีกิจกรรมเอนไซม์ทั้งแบบ endoproteases และ exopeptidase จึงส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยฟลาโวไซม์การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำที่บริเวณปลายสายเปปไทด์ได้ (Idowu and Benjakul, 2019; Yang et al., 2019; Zhang et al., 2019) ซึ่งผลของการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำในตัวอย่างเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต สอดคล้องกับงานวิจัยของ Qi et al. (2017) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้ฟลาโวไซม์ในการผลิตสารให้กลิ่นรสทะเลด้วยวิธีการย่อยโปรตีนจากสาหร่าย *Undaria pinnatifida* โดยใช้ response surface methodology กำหนดปัจจัยด้านระยะเวลา 1- 24 ชั่วโมง ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ต่อตัวอย่าง 1-10% (%w/w) กำหนดตัวแปรอิสระเป็นระดับการย่อยของโปรตีนและปริมาณผลผลิต พบว่าการใช้เอนไซม์ 7% ที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย โดยที่กรดอะมิโนอิสระที่เพิ่มสูงที่สุด 5 ชนิด ได้แก่ alanine, glutamic acid, aspartic acid, proline และ glycine เป็นต้น จะเห็นว่า alanine, proline และ glycine เป็นกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำมีปริมาณเพิ่มขึ้นซึ่งเกิดจากความจำเพาะต่อตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาของฟลาโวไซม์ที่บริเวณปลายของสายเปปไทด์ การใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนยังส่งผลให้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ด้วยวิธี descriptive analysis พบว่า โปรตีนที่ผ่านการย่อยด้วยฟลาโวไซม์มีระดับความเข้มข้น (intensity) ด้านกลิ่นสาหร่ายและรสอูมามิเพิ่มสูงขึ้นซึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระ glutamic acid และ aspartic acid ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีรสอูมามิ และนอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนอิสระส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่นและรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวานของกุ้ง ได้แก่ glycine และ proline เพิ่มขึ้นเป็น 11.52 ± 1.04 และ 7.90 ± 0.20 mg/100 g protein ตามลำดับ รวมถึงกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นจะเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการเกิดกลิ่นกุ้งปรุงสุกของสารให้กลิ่นกลุ่ม ketone ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา strecker degradation ของกรดอะมิโนในระหว่างกระบวนการให้ความร้อน



ตารางที่ 4.4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ (mg/ 100 g protein) ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

compound	control	hydrolysate
alanine	8.78±1.20	7.23±0.62
arginine	9.51±0.65	12.58±1.12
aspartic acid	0.75±0.11	2.48 ±0.18
cysteine	0.08±0.09	0.25±0.02
glutamic acid	3.38±0.52	6.32±0.39
glycine	6.90±0.30	11.52±1.04
histidine	0.34±0.06	7.01±9.65
isoleucine	1.98±0.44	6.91±0.63
leucine	3.87 ±0.24	17.47±1.75
lysine	3.56±0.06	10.20 ±1.31
methionine	3.05±0.90	8.91±0.45
phenylalanine	2.91±0.60	10.28 ±0.89
proline	2.06±0.33	7.90±0.20
serine	1.95±0.24	4.25±0.39
threonine	1.13±0.95	5.10 ±0.26
tyrosine	2.64±0.39	4.19±0.23
valine	2.70±0.38	6.90±0.17
total	48.84±2.68	142.53±5.08

หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3)

4.1.3 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสต

กระบวนการย่อยของโปรตีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่นรสและรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสต การทดสอบทางประสาทสัมผัสเป็นวิธีการที่ใช้บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่นและกลิ่นรสและรสชาติของผลิตภัณฑ์ได้จากการประเมินของผู้ทดสอบ ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจะทำการทดสอบ 2 วิธี ได้แก่ วิธี 9-point hedonic test ซึ่งเป็นการทดสอบทั้งด้านความชอบของผู้บริโภค และวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) เพื่อใช้ในการอธิบายถึงลักษณะของตัวอย่างอีกทั้งยังเป็นวิธีการที่สามารถประเมินเชิงปริมาณโดยใช้ระดับความเข้มของลักษณะนั้นๆ

สำหรับผลการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จากสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธี 9-point hedonic test โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน (ชาย 17 คนและหญิง 13 คน) อายุ 20-35 ปี จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างน้ำตาลมุกซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสถานะที่เหมาะสมไปให้ความร้อนด้วยวิธีการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรส์ จากนั้นบรรจุลงในถ้วยพลาสติกแบบมีฝาปิด ตีรหส์ของตัวอย่าง และเสิร์ฟให้ผู้ทดสอบชิมและประเมินให้คะแนนตามความชอบโดยกำหนดช่วงระดับคะแนน 1 ถึง 9 คะแนน ผลการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น กลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวมของตัวอย่างควบคุมและโปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงในตารางที่ 4.5 พบว่าตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตได้รับคะแนนความชอบในด้านกลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยที่โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคะแนนความชอบในระดับชอบปานกลางด้านกลิ่นรสและความชอบโดยรวมมีคะแนนเป็น 7.10 ± 1.12 และ 7.82 ± 1.07 ตามลำดับ สำหรับความชอบด้านรสชาติมีคะแนนความชอบในระดับชอบมาก 8.03 ± 0.57 ซึ่งมีระดับคะแนนที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับคะแนนของตัวอย่างควบคุมซึ่งมีคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสในระดับไม่ชอบเล็กน้อย 4.37 ± 0.96 ส่วนความชอบด้านรสชาติ และความชอบโดยรวมอยู่ในระดับเฉยๆ 5.24 ± 0.79 และ 5.76 ± 0.33 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการย่อยโปรตีนด้วยฟลาโวไซม์ด้วยสถานะที่เหมาะสมส่งผลต่อผลคะแนนความชอบด้านต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งเกิดจากการที่โปรตีนไฮโดรไลเสตผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้มีเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นโดยพิจารณาพร้อมกับผลของการวิเคราะห์การกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุล และการวิเคราะห์

ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่พบในตัวอย่าง โดยที่เปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระทำหน้าที่เป็นสารที่ให้กลิ่นและรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสต จึงทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตมีระดับคะแนนด้านกลิ่นรสและรสชาติที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งตัวอย่างควบคุมที่ใช้เป็นน้ำตาลัมกึ่งที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนแต่ไม่ผ่านกระบวนการย่อยโปรตีนซึ่งมีปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงทำระดับความชอบในด้านรสชาติอยู่ในระดับไม่ชอบเล็กน้อย จากผลการทดลองแสดงให้เห็นถึงการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จากสภาวะที่เหมาะสม

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

attribute	control	hydrolysates
appearance ^{ns}	6.14±0.52	6.31±0.19
aroma ^{ns}	6.11±0.48	6.59±0.80
flavor [*]	4.37±0.96	7.10±1.12
taste [*]	5.24±0.79	8.03±0.57
overall acceptability [*]	5.76±0.33	7.82±1.07

หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SD (n=3), ^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และ * หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบระหว่างตัวอย่างน้ำตาลัมกึ่งและโปรตีนไฮโดรไลเสต ด้วยวิธีการทดสอบแบบ t-test ($p\leq 0.05$)

สำหรับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยการทดสอบเชิงพรรณนาซึ่งประเมินความเข้ม (intensity) ของลักษณะต่าง ๆ ด้วยวิธี quantitative descriptive analysis ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน (ชาย 7 คนและหญิง 5 คน) อายุ 24-35 ปี จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ผ่านการฝึกฝนโดยการชิมและดมตัวอย่างที่เกี่ยวข้องและมีลักษณะใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเสต กำหนดคำนิยามของลักษณะนั้น ๆ และคัดเลือกผลิตภัณฑ์อ้างอิงพร้อมกำหนดระดับคะแนนความเข้มของผลิตภัณฑ์อ้างอิง เพื่อความแม่นยำในการประเมินจะต้องฝึกฝนผู้ทดสอบทำการประเมินเพื่อปรับระดับคะแนนให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันก่อนจากนั้นจึงจะให้ผู้ทดสอบได้ทำการประเมินให้คะแนนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต จากการรวบรวมแนวคิด กำหนดคำนิยามในการอธิบายลักษณะต่างๆ และผู้ทดสอบทั้ง 12 คนลงมติร่วมกันสามารถระบุลักษณะที่สำคัญของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตได้ทั้งหมด 5 ลักษณะ ได้แก่ กลิ่นกะปิ กลิ่นคาวอาหารทะเล กลิ่นกึ่งดัม

รสเค็ม และรสอูมามิ ซึ่งผลิตภัณฑ์อ้างอิงและระดับคะแนนความเข้มของลักษณะนั้นๆแสดงในตารางที่ 4.6 และให้ผู้ทดสอบได้ฝึกฝนให้คะแนนความเข้มแต่ละลักษณะของผลิตภัณฑ์อ้างอิงให้อยู่ในมาตรฐานเดียวกันก่อน จากนั้นให้ผู้ทดสอบได้ทำการประเมินให้คะแนนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากการประเมินระดับความเข้มของแต่ละลักษณะของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งแสดงในตารางที่ 4.7 พบว่า ระดับคะแนนความเข้มทั้ง 5 ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความแตกต่างกับน้ำต้มกุ้งซึ่งใช้เป็นตัวอย่างควบคุมในการทดลองนี้ โดยที่โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคะแนนความเข้มของลักษณะกลิ่นกะปิ 7.22 ± 0.65 , กลิ่นคาวอาหารทะเล 4.32 ± 0.77 , กลิ่นกุ้งต้ม 8.41 ± 0.92 , รสเค็ม 3.60 ± 1.02 และรสอูมามิ 5.30 ± 0.72 เพิ่มสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยผลจากการทดสอบทางประสาทสัมผัสมีความสอดคล้องกับการผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (ตารางที่ 4.4) ซึ่งพบว่าในตัวอย่างที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส ซึ่งกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นนั้นเป็นสารตั้งต้นสำคัญที่ทำให้ลักษณะกลิ่นกะปิ กลิ่นคาวอาหารทะเล กลิ่นกุ้งต้ม รสเค็ม และรสอูมามิของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีระดับความเข้มเพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้การให้ความร้อนในระหว่างการผลิตยังส่งผลให้กรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้น และองค์ประกอบอื่นๆ ถูกใช้เป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่น Maillard reaction, thermal decarboxylation และ deamination เป็นต้น ทำให้เกิดสารประกอบของสารระเหยให้กลิ่นทำให้เกิดกลิ่นที่มีความเฉพาะตัวของอาหารนั้น ๆ เพิ่มขึ้น (Fu et al., 2019) การเพิ่มขึ้นของกลิ่น กลิ่นรส และรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นเกิดจากอิทธิพลของกระบวนการไฮโดรลิซิสที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดอะมิโนอิสระซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดกลิ่น กลิ่นรส และรสชาติ

ตารางที่ 4.6 คุณลักษณะ คำอธิบาย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อ้างอิง และระดับความเข้มที่ใช้สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ modified quantitative descriptive analysis (QDA) ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

ลักษณะ	คำอธิบาย	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์	วิธีการเตรียมตัวอย่าง ^a	ปริมาณตัวอย่าง ^a	ระดับความเข้ม ^b
กลิ่น					
กะปิ	กลิ่นกุ้งหมัก	กะปิ (กุ้งไทย [®] , ประเทศไทย)	ตักแบ่งตัวอย่างลงในถ้วยพลาสติก	1 g ในถ้วยพลาสติก	14
คาวอาหารทะเล	กลิ่นคาวของอาหารทะเลสด	น้ำล้างกุ้งสด	กุ้งผอยสด 20 g แช่ด้วยน้ำอุณหภูมิ 4°C ปริมาตร 100 mL เป็นเวลา 20 นาที	2 mL ในถ้วยพลาสติก	6
กุ้งต้ม	กลิ่นเนื้อกุ้งต้มสุก	กุ้งที่ผ่านการต้ม 3 นาที	กุ้งผอยสด 20 g ต้มด้วยน้ำอุณหภูมิ 95±2°C เป็นเวลา 3 นาที	2 g ในถ้วยพลาสติก	11
รสชาติ					
เค็ม	รสเค็มจากการสารถะลายเกลือ	เกลือ (บริสุทธิ์ [®] , ประเทศไทย)	เกลือ 0.5 g ละลายในน้ำ 50 mL	5 mL ในถ้วยพลาสติก	4
อูมามิ	รสอูมามิจากสารถะลายผงชูรส	ผงชูรส (อากิโนโมโตะ [®] , ประเทศไทย)	ผงชูรส 1 g ละลายในน้ำ 50 mL	5 mL ในถ้วยพลาสติก	7

หมายเหตุ ^a เตรียมตัวอย่างในถ้วยพลาสติกสำหรับชิมและไม่มีปิด,

^b ประเมินด้วยระดับความเข้มบนสเกล 15-cm line scale โดยกำหนดให้ระดับคะแนน 0 = ไม่มี และ 15 = มากที่สุด

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Simpson et al. (1998) ที่ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการย่อยโปรตีนจากเนื้อกึ่งด้วยเอนไซม์ไคโมซินและทริปซิน ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระพบว่า aspartic acid ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีรสอูมามีเพิ่มสูงขึ้นในขณะเดียวกัน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีรสขม เช่น arginine leucine และ lysine เป็นต้น ก็มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าโปรตีนจากเนื้อกึ่งที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มข้นของกลิ่นพบว่า กลิ่นของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อกึ่งมีแนวโน้มความเข้มข้นสูงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิส จากงานวิจัยของ Nilsang et al. (2005) ซึ่งรายงานผลการใช้ฟลาโวไซม์เพื่อตัดแปรกลิ่นรสของโปรตีนจากน้ำนิ่งปลาทูน่าที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการผลิตปลาทูน่ากระป๋องและประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยการให้คะแนนระดับความเข้มข้นของแต่ละลักษณะเปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง พบว่าการใช้ฟลาโวไซม์ส่งผลให้ระดับคะแนนความเข้มข้นของรสขมเป็น 3.45 ± 1.8 ซึ่งต่ำกว่าระดับความเข้มข้นของรสขมของสารละลายคาเฟอีนมาตรฐานที่มีคะแนน 5.60 ± 1.2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอยที่ได้จากการทดลองนี้เมื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสแล้วพบว่าไม่มีรสขมในตัวอย่างอาจเกิดจากการที่มีปริมาณกรดอะมิโนที่ทำให้รสขมมีปริมาณต่ำกว่า ในระดับที่ผู้ทดสอบตรวจวัดได้หรืออาจเกิดจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีรสขมบนสายเปปไทด์ที่มีการจัดเรียงตัวอยู่ในโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีน รวมถึงขนาดของเปปไทด์สายสั้นที่ได้มีขนาดที่ไม่พอดีกับตำแหน่งของตัวรับรสขมที่อยู่บริเวณลิ้นอาจทำให้ผู้ทดสอบไม่ได้รับรสขมระหว่างการทดสอบตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต (Idawu and Benjakul, 2019) จากการรายงานของ Laohakunjit et al. (2014) ได้อธิบายว่า โปรตีนตั้งต้นที่นำมาใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์นั้นมีส่วนประกอบและการจัดเรียงตัวของโครงสร้างที่แตกต่างกันจึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกลิ่นรสและรสชาติที่แตกต่างกัน การใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมกลิ่นรสได้ โดยงานวิจัยของ Sinthusamran et al. (2019) ได้มีการนำผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งขาวแวนนาไมต์ไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมกลิ่นรสในขนมอบกรอบเมื่อทำการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์พบว่า การเติมโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นส่วนผสมในสูตรการผลิตขนมอบกรอบช่วยเพิ่มระดับคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสและความชอบโดยรวมของขนมอบกรอบได้ นอกจากนี้ยังมีการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา (Aspevik et al., 2016) หอยแมลงภู่ (Breternitz et al., 2017) สาหร่าย (Laohakunjit et al., 2011; Qi et al., 2017) ไปประยุกต์ใช้เป็นสารเสริมกลิ่นรสอาหารทะเลในผลิตภัณฑ์อาหารได้

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธี quantitative descriptive analysis

attributes	control	hydrolysate
กลิ่น		
กะปิ*	3.28 ± 0.36	7.22 ± 0.65
คาวอาหารทะเล*	2.24 ± 0.81	4.32 ± 0.77
กุ้งต้ม*	9.22 ± 0.43	11.03 ± 0.29
รสชาติ		
เค็ม*	1.07 ± 0.67	3.60 ± 1.02
อูมามิ*	1.83 ± 0.52	5.30 ± 0.72

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3), * หมายถึง ค่าเฉลี่ยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบระหว่างตัวอย่างนำต้มกุ้งและโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธีการทดสอบแบบ t-test (p<0.05)

4.2 การศึกษาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยการทำแห้งแบบพ่นฝอย

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่อยู่ในรูปแบบของของเหลวมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักสามารถเกิดการเสื่อมเสียได้ง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาวะแวดล้อม เช่น ความร้อน ออกซิเจน แสง และจุลินทรีย์ เป็นต้น การห่อหุ้มด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบพ่นฝอยจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยรักษาเสถียรภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตและช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์หลังจากการทำแห้ง จึงได้มีการหาสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยของโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยกำหนดปัจจัยอุณหภูมิเข้าของกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย 3 ระดับ คือ 120, 150 และ 180°C จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสภาวะที่เหมาะสมมาผสมกับมอลโทเดกซ์ทรินที่ใช้เป็นสารห่อหุ้มในอัตราส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตต่อมอลโทเดกซ์ทรินเป็นร้อยละ 70:30 (%w/w) ทำส่วนผสมเป็นอิมัลชันด้วย homogenizer จากนั้นนำไปทำแห้งและวิเคราะห์คุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

4.2.1 วิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

ผลการวิเคราะห์ปริมาณผลผลิตและคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ ปริมาณความชื้นและกิจกรรมของน้ำ (a_w) แสดงในตารางที่ 4.8 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยอุณหภูมิขาเข้าของกระบวนการทำแห้งแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 120, 150 และ 180°C พบว่า ปริมาณร้อยละผลผลิตของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อยู่ในช่วงร้อยละ 62.08 ถึง 72.41 โดยที่อุณหภูมิ 150 °C มีปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุด (72.41±0.53) ปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 3.83 ถึง 8.24 และค่ากิจกรรมของน้ำอยู่ในช่วง 0.124 ถึง 0.211 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งมีผลต่อคุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยที่การใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณความชื้นที่พบในตัวอย่างลดลง ซึ่งเกิดจากการที่เพิ่มอุณหภูมิจะช่วยให้เพิ่มอัตราการระเหยของน้ำในระหว่างการทำแห้ง ผลการทดลองนี้มีแนวโน้มที่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kurozawa et al. (2009) ศึกษาสภาวะการทำแห้งแบบพ่นฝอยของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไก่โดยกำหนดปัจจัยด้านอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้ง 120-180°C เมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพของผงพบว่า การใช้อุณหภูมิในการทำแห้ง 120-150°C ทำให้มีปริมาณความชื้นของผงอยู่ในช่วง 3.25-8.46% และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 168-180°C ปริมาณความชื้นของผงลดลงอยู่ในช่วง 0.25-5.05% และนอกจากนี้ปริมาณความชื้นที่ลดลงยังมีอิทธิพลจากอัตราการไหล (feed flow) และปริมาณความเข้มข้นของมอลโทเดกซ์ทรินอีกด้วย นอกจากนี้ Reineccius (2004) ได้อธิบายเกี่ยวกับอุณหภูมิขาออกจะส่งผลต่อปริมาณความชื้นสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ โดยเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขาออกให้สูงขึ้น มีผลให้ปริมาณความชื้นที่เหลือลดลง ดังนั้นการกำหนดอุณหภูมิลมร้อนขาออก จึงขึ้นกับปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นสำคัญ ซึ่งผลของความชื้นในผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะส่งผลต่อคุณภาพในด้านต่าง ๆ เช่น การละลาย (solubility) ความหนาแน่นปรากฏ (bulk density) ขนาด (particle size) การดูดความชื้น (hygroscopicity) และ อายุการเก็บรักษา (shelf life)

ตารางที่ 4.8 ค่าร้อยละปริมาณผลผลิต ปริมาณความชื้น และค่ากิจกรรมของน้ำของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะต่างกัน

treatment	yield (%)	moisture content (%)	water activity (a_w)
120°C	70.01 ^b ± 0.11	6.40 ^a ± 0.38	0.211 ^a ± 0.001
150°C	72.41 ^a ± 0.53	4.29 ^b ± 0.36	0.159 ^b ± 0.002
180°C	62.08 ^c ± 0.18	3.83 ^c ± 0.25	0.124 ^b ± 0.001

หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3) และ ^{a,b,c} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)



รูปที่ 4.3 ลักษณะปรากฏของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะการทำแห้งแตกต่างกัน (อุณหภูมิเข้า 120, 150 และ 180 °C)

ลักษณะปรากฏของตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในรูปที่ 4.3 พบว่าลักษณะของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีลักษณะเป็นผงแห้ง ไม่จับตัวกันเป็นก้อน มีสีขาวขุ่น การใช้อุณหภูมิที่สูงขึ้นส่งผลให้ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่าสีเหลือง (b^*) ซึ่งหมายถึงตัวอย่างมีสีเหลืองออกไปทางเหลืองเพิ่มขึ้น แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับค่าสีอื่น ๆ (L^* และ a^*) ของตัวอย่างในตารางที่ 4.9 และคำนวณค่าความขาวพบว่าตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการทำแห้งด้วยอุณหภูมิต่างกัน 3 ระดับมีค่าความขาวที่แตกต่างกัน ซึ่งการใช้อุณหภูมิสูง เช่น ที่ 180°C ส่งผลให้ตัวอย่างที่ได้มีค่าความขาวเป็น 68.94 ± 0.09 ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะปรากฏของตัวอย่างที่แสดงในรูปที่ 4.3 จากผลที่เกิดขึ้นนี้ เห็นได้ว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อคุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยเมื่อ

อุณหภูมิที่ใช้ทำแห้งต่ำจนเกินไปจะส่งผลต่ออัตราการระเหยน้ำบริเวณผิวของละอองฝอย (droplet) ของตัวอย่างที่ซาลง ส่งผลให้ลักษณะของผงที่ได้จะมีความชื้นสูงเป็นเหตุให้เกิดการรวมตัว (agglomeration) ของผงในระหว่างการเก็บรักษาได้ ซึ่งจากการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิ 150-220°C จะเกิดการระเหยน้ำออกอย่างรวดเร็วบริเวณผิวของละอองฝอย ทำให้ตัวอย่างผงที่ได้แห้งไม่มีประสิทธิภาพในการห่อหุ้มที่สูง (Reineccius, 2004) อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิที่สูงจนเกินไปส่งผลต่อคุณภาพของโปรตีนและกลีโคโปรตีนที่ถูกห่อหุ้มไว้ภายใน เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีส่วนประกอบของเปปไทด์และกรดอะมิโนที่ถูกห่อหุ้มด้วยมอลโตเดกซ์ตริน ซึ่งสามารถเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนสูง การใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยยังส่งผลให้โปรตีนเสียสภาพ หรือเกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการทำแห้ง (Lan et al., 2010; Mohan et al., 2015) จากงานวิจัยของ Hamid et al. (2002) ซึ่งศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยต่อคุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาไนล (*Oreochromis mossambicus*) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาไนลมาทำแห้งแบบพ่นฝอย กำหนดให้อุณหภูมิขาเข้าและอุณหภูมิขาออกที่ใช้ในการทำแห้งเป็น 2 สภาวะ ดังนี้ 150 °C/76 °C และ 180 °C/ 90 °C เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (proximate composition) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาไนล พบว่า การใช้สภาวะในการทำแห้งด้วยอุณหภูมิขาเข้า 180°C และอุณหภูมิขาออก 90°C ทำให้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตมีปริมาณโปรตีนรวม (crude protein) ลดลง 23.9% เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ใช้อุณหภูมิขาเข้า 150°C และอุณหภูมิขาออก 76°C อีกทั้งยังส่งผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ได้แก่ ไลซีน ลิวซีน ทรีโอนีน ไทโรซีน และ ฟีนิลอะลานิน ที่พบในตัวอย่างมีปริมาณลดลง

ตารางที่ 4.9 ค่าสี (L^* , a^* , และ b^*) และค่าความขาวของผงโปรตีนไฮโดรไลเสดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่สภาวะต่างกัน (อุณหภูมิเข้า 120, 150 และ 180 °C)

treatment	color parameter			whiteness index
	L^*	a^*	b^*	
120°C	70.61 ^a ±0.18	0.24 ±0.02	5.13 ^a ±0.09	70.16 ^a ±0.37
150°C	70.28 ^{ab} ±0.32	0.28±0.02	5.21 ^a ±0.11	69.83 ^{ab} ±0.50
180°C	69.36 ^b ±0.20	0.23 ±0.06	5.09 ^b ±0.04	68.94 ^b ±0.09

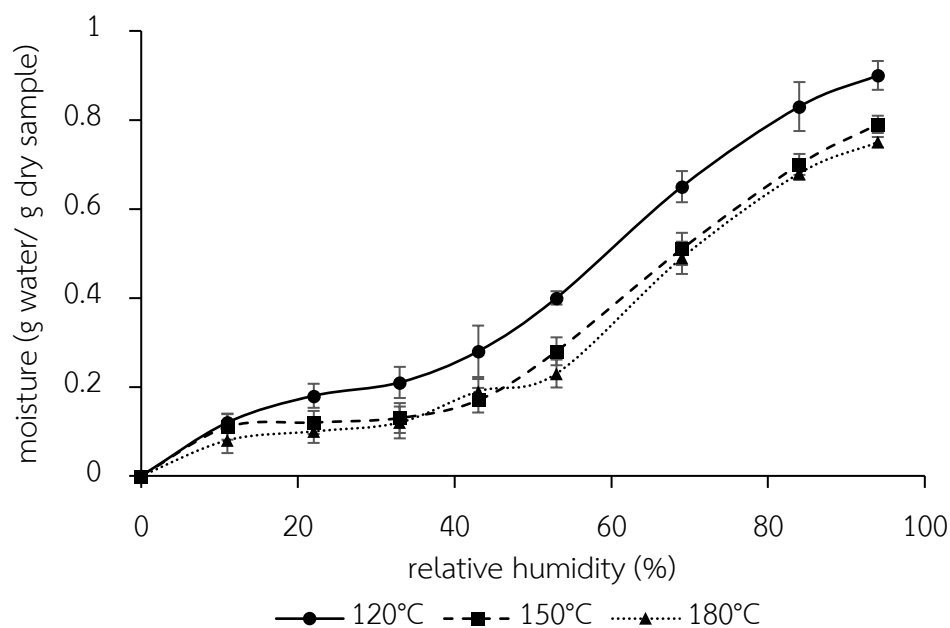
หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3), ค่า L^* หมายถึง ค่าความสว่าง, a^* หมายถึง ค่าสีมีแนวโน้มไปทางสีแดง ($+a^*$) และค่าสีมีแนวโน้มไปทางสีเขียว ($-a^*$) และ ค่า b^* หมายถึง ค่าสีมีแนวโน้มไปทางสีเหลือง ($+b^*$) และ ค่าสีมีแนวโน้มไปทางสีน้ำเงิน ($-b^*$), ^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และ ^{a,b} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$)

4.2.2 พฤติกรรมการดูดความชื้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสด

โปรตีนไฮโดรไลเสดที่ผ่านกระบวนการทำแห้งจะมีลักษณะเป็นผงแห้งที่มีปริมาณความชื้นต่ำ โดยทั่วไปอาหารที่มีความชื้นต่ำ จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้เกิดความสมดุลกับสภาวะแวดล้อม เมื่อถูกเก็บไว้ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ที่สูงกว่า จะเกิดการดูดความชื้นจากสภาวะแวดล้อมเข้าไปอยู่ภายในโมเลกุลเพื่อให้อยู่ในสภาวะที่สมดุล

จากผลการวิเคราะห์พฤติกรรมการดูดความชื้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสดจากการทำแห้ง 3 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 120, 150 และ 180°C พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเสดที่ผ่านการทำแห้งด้วยอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับมีเส้นพฤติกรรมการดูดความชื้นเป็นแบบ sigmoidal shape ซึ่งเป็นลักษณะการดูดความชื้นที่พบในอาหารทั่วไป แสดงในรูปที่ 4.5 ซึ่งเป็นกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความชื้นของตัวอย่างกับค่าความชื้นสัมพัทธ์สมดุล (equilibrium relative humidity) ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นของตัวอย่างที่สภาวะความชื้นสัมพัทธ์สมดุลเป็น 11%, 33%, 44%, 52%, 75%, และ 93% พบว่าเมื่อตัวอย่างอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์ในช่วง 11-33% ผงโปรตีนไฮโดรไลเสดจะดูดความชื้นต่ำทำให้ปริมาณความชื้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในสภาวะนี้ และเมื่อเข้าสู่สภาวะแวดล้อมที่มีปริมาณความชื้นสัมพัทธ์สูงขึ้นในช่วง 52-93% พบว่าผงโปรตีนไฮโดรไลเสดจะเกิดการดูดความชื้นเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเกิดการถ่ายเทความชื้น (moisture migration) ระหว่างตัวอย่างกับสภาวะแวดล้อมที่มีความชื้นสัมพัทธ์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ผงโปรตีน

ไฮโดรไลสเกิดการดูดความชื้น และการดูดความชื้นยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง เช่น เกิดการตกผลึก (crystalization), จับตัวกับเป็นก้อน (caking) เป็นต้น (Muzaffar and Kumar, 2016; Justus et al., 2022) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jardim et al. (1999) ที่ศึกษาพฤติกรรมการดูดความชื้นของโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาไนล (*Oreochromis niloticus*) โดยนำโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการทำแห้งแล้ว 2 กรัม เก็บไว้ในโถดูดความชื้นโดยควบคุมปริมาณความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วง 11-75% ที่อุณหภูมิในการเก็บรักษา 25°C จากนั้นติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้นในตัวอย่าง พบว่า พฤติกรรมการดูดความชื้นของตัวอย่างมีลักษณะเป็น sigmoidal shape โดยที่โปรตีนไฮโดรไลสดูดความชื้นเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีค่าความชื้นสัมพัทธ์ 43% ขึ้นไป และจากงานวิจัยของ Masuma et al. (2020) รายงานว่า สภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของนมผง โดยที่การเก็บรักษาไว้ในสภาวะอุณหภูมิ 22°C ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ในช่วงร้อยละ 23 ผลิตภัณฑ์นมผงมีความคงตัว ไม่จับตัวกับเป็นก้อน และมีความสามารถในการละลายได้ดี เมื่อเปรียบเทียบกับเก็บรักษาในสภาวะอุณหภูมิ 40°C ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 54 พบว่านมผงมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน ความสามารถในการละลายลดลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของนมผงในช่วงค่าความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 54 สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลสที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 52 (รูปที่ 4.5) ซึ่งเป็นสภาวะที่ผงโปรตีนไฮโดรไลสมีการดูดความชื้นสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจึงทำให้มีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นของตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลสที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะที่มีความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 52 และนอกจากนี้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพที่เกิดขึ้นมีความสอดคล้องกับพฤติกรรมการดูดความชื้นของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสชนิดผง เช่น โปรตีนไฮโดรไลสจากอกไก่ (Kurozawa et al., 2009), หอยแมลงภู่ (Silva et al., 2012a) และกากถั่วเหลือง (Justus et al., 2022) เป็นต้น



รูปที่ 4.4 พฤติกรรมการดูดความชื้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ด้วยอุณหภูมิเข้า 3 ระดับ ได้แก่ 120°C (●), 150°C (■) และ 180°C (▲)

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยของโปรตีนสูงจะส่งผลต่อพฤติกรรมการดูดความชื้นของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากโปรตีนที่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิสจะประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระกลุ่มไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นส่งผลต่อสภาพชื้นและความสามารถในการละลาย กรดอะมิโนอิสระกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำจะจับกับโมเลกุลของน้ำทำให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นสูงขึ้น สภาพที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพสมบัติเชิงหน้าที่ รวมถึงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตชนิดผงที่ใช้อุณหภูมิเข้าสำหรับการทำแห้งแบบพ่นฝอยแตกต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 120°C, 150°C และ 180°C รวมถึงเมื่อพิจารณาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของผงปรุงรส (มพช. 494/2547) ที่ได้ระบุว่า ผงปรุงรสจะต้องมีลักษณะเป็นผงแห้ง ไม่จับตัวกันเป็นก้อน ต้องมีสีและกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของสว่นประกอบที่ใช้ปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น กลิ่นหืน กลิ่นอับ กลิ่นไหม้ ปริมาณความชื้นต้องไม่เกินร้อยละ 13 โดยน้ำหนัก ค่ากิจกรรมของน้ำต้องไม่เกิน 0.65 ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้คัดเลือก

อุณหภูมิเข้าในกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่ 150 °C เป็นสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย ซึ่งเป็นสภาวะอุณหภูมิที่ให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูง มีค่าปริมาณความชื้นอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนด

4.3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางเคมีและกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา

ผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่จากสภาวะที่เหมาะสมที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 4.2 แล้วนำมาเก็บไว้ในถุงอลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Al-met/LLDPE ปิดผนึกแบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และสุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษา จากตารางที่ 4.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าความขาว, ค่าความแตกต่างของสีตัวอย่างกับตัวอย่างเริ่มต้น (ΔE^*), ปริมาณความชื้น และค่ากิจกรรมของน้ำ (a_w) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่าความขาวในสัปดาห์เริ่มต้นของการเก็บรักษา 69.83 ± 0.50 และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มเวลาการเก็บรักษา สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าความแตกต่างของสีตัวอย่างกับตัวอย่างเริ่มต้น (ΔE^*) ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า L^* , b^* และ a^* ของตัวอย่างก่อนการเก็บรักษา พบว่าค่า ΔE เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในช่วงสัปดาห์ที่ 6 เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของความชื้นของตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างมีความชื้นเริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 0 เป็น 4.29 ± 0.38 % และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ช่วงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 12 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอาจมีสาเหตุเกิดจากบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาเป็นถุงอลูมิเนียมลามิเนต (PET/Al-met/LLDPE) 3 ชั้น ซึ่งประกอบด้วย Polyethylene terephthalate (PET), aluminum metallization (AL-met) และ linear low density polyethylene (LLDPE) โดยความหนาของแต่ละชั้นเป็น 12, 8 และ 7 μm ตามลำดับ เมื่อพิจารณาค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำ (water vapor transmission rate, WVTR) พบว่าบรรจุภัณฑ์ชนิดนี้มีค่าอัตราการซึมผ่านของไอน้ำอยู่ในช่วง 0.006 – 0.03 กรัม/ตารางเมตร/วัน แสดงว่าไอน้ำสามารถซึมผ่านเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้และอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ความชื้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา และปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นนี้ยังทำให้ลักษณะทางกายภาพด้านความขาวลดลง รวมถึงค่า ΔE เพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 6 เนื่องจากระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 25 °C สามารถเกิดปฏิกิริยาซึ่ง

ส่งผลต่อสมบัติทางเคมีกายภาพของตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตได้ เช่น ปฏิกริยาออกซิเดชันและปฏิกริยามเมลลาร์ด เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังกล่าว การเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตมีแนวโน้มสอดคล้องไปในทางเดียวกับงานวิจัยของ Ruttanapornvareesakul et al. (2006) ที่ศึกษาตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวกุ้งและเก็บรักษาด้วยระยะเวลา 180 วัน จากผลการทดลองพบว่าค่าความขาวในผลิตภัณฑ์ลดลง เนื่องจากค่า L^* ที่ลดลงและค่า b^* ที่เพิ่มขึ้น และนอกจากนี้ Kurozawa et al. (2009) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากอกไก่ผงที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยพบว่าลักษณะทางกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตเปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอกไก่ผงจะเริ่มจับตัวกันเป็นก้อน (caking) และมีค่า L^* ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตประกอบด้วยเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่มีมวลโมเลกุลต่ำและปริมาณความชื้นของตัวอย่างต่ำกว่าสภาวะแวดล้อม ในระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่างจะเกิดการดูดความชื้นเพื่อทำให้ความชื้นของตัวอย่างเท่ากับสภาวะแวดล้อม จึงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของตัวอย่าง

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่าความขาว ความแตกต่างของสีตัวอย่างกับตัวอย่างเริ่มต้น (ΔE^*) ความชื้น และกิจกรรมของน้ำ (a_w) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา

storage time (week)	whiteness index	total color difference (ΔE^*)	moisture content (%)	water activity ^{ns}
0	69.83 ^a ±0.50	-	4.29 ^b ±0.38	0.159±0.002
2	68.72 ^{ab} ±0.46	0.32 ^e ±0.07	4.88 ^{ab} ±0.06	0.166±0.002
4	70.33 ^a ±0.70	0.51 ^d ±0.02	4.72 ^{ab} ±0.35	0.163±0.001
6	67.65 ^b ±0.18	2.14 ^c ±0.11	5.04 ^a ±0.82	0.165±0.003
8	65.08 ^c ±0.61	3.72 ^b ±0.15	5.12 ^a ±0.31	0.168±0.006
10	64.16 ^c ±0.22	5.02 ^a ±0.15	5.30 ^a ±0.71	0.166±0.003
12	65.41 ^c ±0.37	4.89 ^a ±0.29	5.42 ^a ±0.22	0.165±0.003

หมายเหตุ ^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยในคอลัมน์นี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) และ ^{a,b,c...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$)

4.3.2 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงสารระเหยให้กลิ่นของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา

กลิ่นของอาหารเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากกระบวนการแปรรูปด้วยวิธีการให้ความร้อน การหมัก และการทำแห้ง โดยที่องค์ประกอบทางเคมีภายในอาหาร เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น สามารถเกิดอันตรกิริยากับสารอื่น ๆ ทำให้เกิดสารให้กลิ่น ซึ่งผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมีเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเกิดเป็นสารระเหยให้กลิ่น โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาวะต่าง ๆ เช่น ความร้อน ความดัน ออกซิเจน แสง เป็นต้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นกลุ่มต่าง ๆ เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบ และปริมาณของสารระเหยของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเทคนิค gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ร่วมกับ gas chromatography-olfactometry (GC-O) โดยเปรียบเทียบผลของ mass spectrum และค่า retention index (RI) กับแหล่งข้อมูลอ้างอิง คำนวณปริมาณสารระเหยสัมพัทธ์โดยเทียบกับ internal standard (2,4,6-trimethylpyridine) จากตารางที่ 4. 11 แสดงชนิด, ความเข้มข้นของสาร (ng/g), ค่า threshold (ppb), ลักษณะกลิ่นของสารและวิธีการระบุชนิดของสารระเหยที่พบในตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 44 ชนิด โดยจะใช้ค่า odor activity value (OAV) ที่คำนวณได้จากความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดกับค่า threshold value in water (ng/g) (สมการที่ 3.8) ซึ่งสารที่มีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 1 เป็นสารให้กลิ่นสำคัญ จากผลการวิเคราะห์ พบว่ามีสารระเหยให้กลิ่นสำคัญที่มีค่า OAV สูง ($OAV \geq 1$) ทั้งหมด 17 ชนิด ได้แก่ N,N-dimethyl-methylamine, 2-methylpropanal, 2-pentanone, 3-hexanone, 2-heptanol, 2-Methyl-3-furanthiol, 2-ethyl-6-methylpyrazine, 2,3-butanediol, 2-furanmethanol, acetophenone, 2(5H)-furanone, benzyl alcohol, maltol, methyl palmitate, 4-ethylphenol, 4-methyl-5-thiazoleethanol และ vanillin เป็นต้น เมื่อพิจารณาตามกลุ่มของสารให้กลิ่น พบว่าสารให้กลิ่นที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสตอาจเกิดจากกระบวนการให้ความร้อน ซึ่งส่วนมากเป็นสารกลุ่ม pyrazine มักพบในอาหารที่ผ่านการให้ความร้อนเนื่องจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด Cai et al. (2016) อธิบายว่าปฏิกิริยาเมลลาร์ดเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสและรสชาติของอาหารทั้งในระหว่างกระบวนการผลิตและระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งในอาหารประเภทโปรตีนที่ผ่านกระบวนการดัดแปรจะประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระซึ่งจะเกิดอันตรกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์ให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารสีน้ำตาลที่ทำให้ลักษณะปรากฏของอาหารเปลี่ยนแปลงไป รวมถึงสารให้กลิ่นรสที่ได้จากปฏิกิริยานี้ยังส่งผลให้กลิ่นและรสชาติของอาหารเปลี่ยนไปด้วยเช่นกัน จากผลการทดลองพบว่า 2-ethyl-6-methyl-pyrazine เป็นสารให้กลิ่นมีลักษณะกลิ่นย่าง (roasted) มันฝรั่งอบ (baked potato) และพบสารกลุ่ม aldehyde คือ 2-methyl-propanal มีลักษณะของกลิ่นมันฝรั่ง (potato) และกลิ่นเนื้อ (meaty) เป็นสารให้กลิ่นสำคัญที่มีค่า OAV สูงและจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังจากผ่านการให้ความร้อน

ซึ่งสารให้กลิ่นในกลุ่ม pyrazine และกลุ่ม aldehyde นี้มักเกิดจากปฏิกิริยา strecker degradation เนื่องจากผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมี กรดอะมิโนอิสระเป็นองค์ประกอบจะถูกใช้เป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยา strecker degradation ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารในกลุ่ม pyrazine และ aldehyde (Pan and Kuo, 1994) ทั้งนี้จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่ากรดอะมิโนอิสระ glycine และ lysine เป็นสารตั้งต้นจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารกลุ่ม alkylpyrazines, pyrazines และ furan (Laohakunjit et al., 2014) โดยสารในกลุ่ม pyrazine และ aldehyde ที่พบในตัวอย่างมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Peinada et al. (2016) ที่รายงานผลของการไฮโดรลิซิสในการผลิตสารให้กลิ่นอาหารทะเลจากผลพลอยได้ของกระบวนการแปรรูปเนื้อปลา พบว่าสารกลุ่ม pyrazine และ aldehyde มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างตั้งต้น ซึ่งเกิดจากการที่โปรตีนถูกย่อยเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระเมื่อได้รับความร้อนในระหว่างกระบวนการผลิต จะเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ให้กลิ่นถั่ว (nutty) และกลิ่นย่าง (roasted)

สำหรับปฏิกิริยาออกซิเดชันทำให้เกิดสารให้กลิ่นในกลุ่ม alcohol ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และเกิดจากปฏิกิริยา reduction ของสารกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl group) จากผลการทดลองพบสารให้กลิ่นกลุ่ม alcohol เช่น 2-heptanol, 2,3-butanediol, 2-furanmethanol, benzyl alcohol และ 4-methyl-5-thiazoleethanol เป็นต้น ซึ่ง 2-heptanol และ benzyl alcohol มีลักษณะกลิ่นส้ม (citrus) และดอกไม้ (floral) สำหรับ 2,3-butanediol มีลักษณะกลิ่นครีมและคาราเมล เป็นสารสำคัญที่ให้กลิ่นเนื้อปูต้ม และلوبสเตอร์ (Cadwallader et al., 1995; Laohakunjit et al., 2014) และนอกจากนี้ 2-furanmethanol มีลักษณะกลิ่นคาราเมลและ methyl-5-thiazoleethanol มีลักษณะกลิ่นเนื้อ ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่พบในอาหารที่มีน้ำตาลและกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบเมื่อถูกกระตุ้นด้วยความร้อนจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารได้เป็นกลิ่นหอมหวาน คาราเมล และเนื้อต้ม พบว่าเป็นสารสำคัญในเนื้อกุ้งต้ม (Pan and Kuo, 1994; Mall and Schieberle, 2016) สำหรับกลุ่ม ketone พบสารให้กลิ่น 4 ชนิด ได้แก่ 2-pentanone, 3-hexanone, acetophenone และ maltol ซึ่งสารให้กลิ่นกลุ่ม ketone เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยา lipid oxidation และ amino acid degradation มีลักษณะของกลิ่นหวานและกลิ่นผลไม้ นอกจากนี้ ยังมีสารให้กลิ่นสำคัญที่เกิดจากปฏิกิริยาอื่น ๆ เช่น กลุ่ม amine คือ N,N-dimethyl-methylamine หรือ trimethylamine (TMA) เป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาการสลายตัวของ trimethylamine N-oxide (TMAO) มีลักษณะกลิ่นเอมีน กลิ่นคาวปลา ซึ่งพบได้ในสัตว์น้ำ สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำได้ จากรายงานของ Cadwallader et al. (1995) ได้รายงานผลการวิเคราะห์สารให้กลิ่นสำคัญที่พบในล็อบสเตอร์ด้วยวิธี aroma extract dilution analysis (AEDA) และระบุลักษณะกลิ่นด้วย gas chromatography olfactometry (GC-

O) พบว่า trimethylamine เป็นสารให้กลิ่นสำคัญในลีสบสเตอร์ และได้อธิบายว่าสารให้กลิ่นชนิดนี้เมื่อมีปริมาณมากจะให้กลิ่นคาวปลาซึ่งเป็นกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ สำหรับในตัวอย่างลีสบสเตอร์พบ trimethylamine ปริมาณต่ำและเป็นสารสำคัญที่ทำให้เกิดลักษณะกลิ่นลีสบสเตอร์ สำหรับกลุ่ม ester ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชัน (esterification) ของกรดไขมันและ alcohol จากผลการทดลองพบสารกลุ่มนี้คือ methyl palmitate และนอกจากนี้ยังมีสารให้กลิ่นในกลุ่มอื่น ๆ เช่น Vanillin และ 4-ethyl-phenol เป็นต้นที่มีค่า OAV \geq 1 ซึ่งสารให้กลิ่นที่กล่าวมานี้จะถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของสารให้กลิ่นในระหว่างการเก็บรักษาในขั้นตอนถัดไป



ตารางที่ 4.11 สารระเหยที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

No.	RI ^a	compound	concentration (ng/g)	threshold ^c (ng/g)	OAV	odor description	Identification method
1	<1100	N,N-dimethyl-methylamine	663±14	500	1	amine-like, fishy ^f	MS, RI
2	<1100	2-methylpropanal	348±15	1.6	217	fresh, floral, green ^g	MS, RI
3	<1100	2-pentanone	908±6	10	91	acetone-like ^{e,s}	MS, RI
4	<1100	3-hexanone	81±2	41	2	sweet, fruity, rum ^g	MS, RI
5	1161	2-heptanone	1,791±112	3,000	<1	ripe banana, fruity ^{e,s}	MS, RI
6	1298	2-heptanol	254±47	41	6	citrus, grass, herbal ^{f,g}	MS, RI
7	1257	2-isoamyl-6-methylpyrazine	1,049±37	n.a.	n.a.	green, coffee, nutty ^g	MS, RI
8	1290 ^b	unknown	n.d.	n.a.	n.a.	dried prawn, seafood ^d	RI, O
9	1301	1-hydroxy-2-propanone	3,666±171	10,000	<1	Ethereal ^{e,s}	MS, RI
10	1310	2-methyl-3-furanthiol	284±14	6	47	meaty, metallic ^{d,s}	MS, RI, O
11	1334	2,5-dimethylpyrazine	1,179±16	1,700	<1	cocoa ^f , fermented	MS, RI
12	1366	4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	1,713±266	100,000	<1	faint ^e	MS, RI

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) สารระเหยที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

No.	RI ^a	compound	concentration (ng/g)	threshold ^c (ng/g)	OAV	odor description	Identification method
13	1415	2-ethyl-6-methylpyrazine	316±6	40	8	roasted potato ^s	MS, RI
14	1468 ^b	methional	n.d.	1.4	n.a.	potato, vegetable, earthy ^d	RI, O
15	1472	2,3,5,6-tetramethylpyrazine	686±67	1,000	<1	cocoa, lard, fermented soybeans ^s	MS, RI
16	1502	furfural	3,117±93	9,562	<1	sweet, woody, almond ^e	MS, RI
17	1543	pyrrole	192±37	20,000	<1	sweet, nutty ^e	MS, RI
18	1556	2,3-butanediol	27,579±641	20,000	1	fruity, creamy, buttery ^s	MS, RI
19	1590	methyl-2-furoate	93,332±218	n.a.	n.a.	musty, sweet caramel ^{e,s}	MS, RI
20	1594 ^b	unknown	n.d.	n.a.	n.a.	metallic ^d	RI, O
21	1608	5-methyl-2-furancarboxaldehyde	123±18	500	<1	almond, burnt sugar ^s	MS, RI
22	1620	dihydro-3-methylene-2(3H)- furanone	27,436±235	n.a.	n.a.		MS, RI
23	1640 ^b	unknown	n.d.	n.a.	n.a.	seabreeze, seafood, salty ^d	RI, O

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) สารระเหยที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

No.	RI ^a	compound	concentration (ng/g)	threshold ^c (ng/g)	OAV	odor description	Identification method
24	1651	levomenthol	430±87	950	<1	peppermint, cooling menthol ^{d,e}	MS, RI, O
25	1654	undecyl butyrate	1,635±112	n.a.	n.a.	fruity waxy ^e	MS, RI
26	1659	2-furanmethanol	2,184±207	12.3	178	alcoholic, musty, caramel ^d	MS, RI, O
27	1670	butyrolactone	2,254±145	20,000	<1	creamy, oily, caramel ^e	MS, RI
28	1730 ^b	unknown	n.d.	n.a.	n.a.	sweat, fermented ^d	RI, O
29	1737	acetophenone	580±85	65	9	sweet, pungent, almond ^{e,s}	MS, RI
30	1733	citronellyl butyrate	1,209±36	n.a.	n.a.	fruity, floral, waxy ^s	MS, RI
31	1770	2(5H)-furanone	8,165±233	800	10	buttery, oily, lard ^d	MS, RI, O
32	1891	dimethyl sulfone	1,455±521	n.a.	n.a.	sulfurous burnt ^e	MS, RI
33	1892	benzyl alcohol	5,309±383	620	9	rose, floral ^{e,f}	MS, RI
34	1948	phenol	893±84	5,900	<1	Medicinal ^{e,s}	MS, RI
35	2010	maltol	4,077±37	210	19	sweet, cotton candy ^d	MS, RI, O

ตารางที่ 4.11 (ต่อ) สารระเหยที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

No.	RI ^a	compound	concentration (ng/g)	threshold ^c (ng/g)	OAV	odor description	Identification method
36	2096	2-piperidinone	1,725±4	n.a.	n.a.	ammoniacal, pepper-like ^s	MS, RI
37	2159	3,5-dimethylphenol	812±26	5,000	<1	balsamic, coffee ^s	MS, RI
38	2190 ^b	2-aminoacetaphenone	n.d.	n.a.	n.a.	incense, medicine-like ^d	RI, O
39	2200	3-phenylpyridine	654±39	n.a.	n.a.	bitter, caramel-like ^{s,s}	MS, RI
40	2218	methyl palmitate	1912±132	2,000	1	oily, waxy, fatty ^e	MS, RI
41	2227	4-ethylphenol	345±18	21	16	smoky, grilled ^{d,h}	MS, RI, O
42	2248	4-methyl-5-thiazoleethanol	906±8	100	9	meaty, cooked beef juice ^f	MS, RI
43	2278 ^b	unknown	n.d.	n.a.	n.a.	spice, cinnamon ^d	MS, RI, O
44	2553	Vanillin	1,172±172	210	6	vanilla ^{d,s}	MS, RI, O

หมายเหตุ ^a ค่า RI (retention index) ของสารที่คำนวณได้จาก GC-MS โดยใช้ DB-Wax column ^b ค่า RI (retention index) ของสารที่คำนวณได้จาก GC- Olfactometer โดยค่า RI

ที่ได้จากการทดสอบเทียบเคียงกับค่า RI จาก NIST Library (Version 17) ^c ค่า threshold value in water จาก Leffingwell (1998) และ van Gemert (2011), ^d odor description

บรรยายลักษณะกลิ่นที่ได้จากเครื่อง GC-Olfactometer, ^e Pan and Kuo (1994), ^f Cadwallader et al. (1995), ^g Leffingwell (1998), ^h Mall and Schieberle (2016), n.a. คือ

not available, n.a. คือ not detected

การเปลี่ยนแปลงของสารให้กลิ่นสำคัญที่พบในผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการเก็บรักษา ช่วง 0 ถึง 12 สัปดาห์ นำผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่บรรจุในถุงอลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Almet/LLDPE ปิดสนิทแบบสุญญากาศเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง 25°C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และวิเคราะห์คุณภาพของตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์ โดยนำตัวอย่างมาสกัดด้วยตัวทำละลาย จากนั้นวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารระเหยให้กลิ่นสำคัญด้วยเทคนิค GC-MS คำนวณปริมาณความเข้มข้นของสาร (ng/g) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นของสาร (ng/g) จากผลการวิเคราะห์ค่า OAV แสดงในตารางที่ 4.11 พบสารให้กลิ่นที่สำคัญที่มีค่า OAV ≥ 1 ในตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตประกอบด้วยสาร 17 ชนิด จากผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารให้กลิ่น 17 ชนิดที่พบในตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลา 0 ถึง 12 สัปดาห์แสดงในตารางที่ 4.12 พบว่าสารให้กลิ่นที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ได้แก่ 2-methylpropanal, 2-pentanone, 2-heptanol, 2-methyl-3-furanthiol, 2-ethyl-6-methylpyrazine, 2,3-butanediol, 2-furanmethanol, acetophenone, 2-(5H)-furanone, benzyl alcohol, maltol, methyl palmitate, 4-ethylphenol, 4-methyl-5-thiazoleethanol และ vanillin

จากผลการทดลองพบว่าสารในกลุ่ม aldehyde เช่น 2-methylpropanal และ vanillin เป็นต้น มีลักษณะกลิ่นหอมหวาน กลิ่นผลไม้ และกลุ่ม ketone เช่น 2-pentanone และ acetophenone มีความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งอาจเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมัน เนื่องจากผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น linoleic acid และ linolenic acid เป็นองค์ประกอบจึงสามารถเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้ นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม aldehyde และ ketone มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu et al. (2019) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างซอสกุ้งในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ปี พบว่าสารให้กลิ่นสำคัญในกลุ่ม aldehyde และ ketone เช่น 3-methylbutyral, 2-methyl butyral และ 2-heptanone มีปริมาณเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของซอสกุ้ง นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม ketone ยังเกิดขึ้นได้จากปฏิกิริยา amino acid degradation โดยกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นสารตั้งต้นสำคัญเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนซึ่งมีรายงานว่าสารให้กลิ่นกลุ่ม ketone ที่ได้จากปฏิกิริยานี้เมื่อมีความเข้มข้นมากจะให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Tanchotikul and Hsieh, 1989; Peinado et al., 2016) และพบว่าสารในกลุ่ม alcohol เช่น 2,3-butanediol, benzyl alcohol และ 4-methyl-5-thiazoleethanol ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะกลิ่นครีม ไขมัน น้ำมัน และเนื้อ ตามลำดับ มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันโดยที่สารให้กลิ่นในกลุ่มแอลกอฮอล์ที่มีการจัดเรียงตัวกันแบบไม่อิ่มตัว

(unsaturated alcohols) เมื่อมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้กลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (Peinado et al., 2016; Zhu et al., 2019) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของสารกลุ่ม furans เช่น 2-furanmethanol และ 2(5H)-furanone เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาเมลลาร์ดของกรดอะมิโน serine กับน้ำตาล โมเลกุลเดียวเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา (Tinchan et al., 2015; Peinado et al., 2016) โดยผลการวิเคราะห์มีความสอดคล้องกับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) รายงานผลการประเมินระดับความเข้มข้นของรสหวานเพิ่มขึ้นแปรผันตามระยะเวลาในการเก็บรักษา สำหรับ 4-ethylphenol มีลักษณะกลิ่นยางและกลิ่นควิน มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งมีรายงานพบว่าสารกลุ่ม phenol พบได้ในกึ่งปฏุงสุกซึ่งเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยา thermal degradation ของสารที่มีโครงสร้างเป็น carboxyl group (Pan and Kuo, 1994) โดยที่สารในกลุ่ม phenol เมื่อมีปริมาณเพิ่มขึ้นอาจส่งผลต่อกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ (Cha and Cadwallader, 1995) และนอกจากนี้ยังมีปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชันระหว่างกรดไขมันและ alcohol ที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของสารให้กลิ่นกลุ่ม ester คือ methyl palmitate ที่มีปริมาณความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา

สำหรับสารให้กลิ่นที่มีแนวโน้มลดลงในระหว่างการเก็บรักษา ได้แก่ N,N-dimethyl-methylamine และ 3-hexanone โดยมีแนวโน้มที่ลดลงในตั้งแต่ช่วงสัปดาห์ 4 โดยที่ N,N-dimethyl-methylamine เป็นสารให้กลิ่นกลุ่มเอมีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำสามารถเกิดการระเหยได้ง่ายสำหรับการลดลงของ 3-hexanone อาจเกิดจากการที่สารกลุ่มนี้ถูกใช้เป็นส่วนตั้งต้นในการเกิดออกซิเดชันในขั้นเริ่มต้น (primary oxidation) (Zhu et al., 2019) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารให้กลิ่นสำคัญที่พบในตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตทั้ง 17 ชนิดเกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณความเข้มข้นในระหว่างการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์แบบถุงออลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Al-met/LLDPE ปิดผนึกแบบสุญญากาศที่มีอัตราการซึมผ่านของออกซิเจน (oxygen transmission rate, OTR) อยู่ในช่วง 0.06-0.12 cm³/m²/day และอัตราการซึมผ่านของไอน้ำอยู่ในช่วง 0.006 – 0.03 g/m²/day เมื่อพิจารณาพร้อมกับผลการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีกายภาพ (ตารางที่ 4.10) จะพบว่าปริมาณความชื้น ค่าความขาว และ ค่า ΔE^* เพิ่มขึ้นและแปรผันตามระยะเวลาการเก็บรักษา ปัจจัยด้านการซึมผ่านของไอน้ำและออกซิเจนนี้อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้องค์ประกอบของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน เป็นต้น เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ปฏิกิริยาเมลลาร์ด และปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชัน ส่งผลให้ความเข้มข้นของสารระเหยให้กลิ่นที่พบในตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษา จากงานวิจัยของ Pongsetkul et al. (2022) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของสารให้กลิ่นสำคัญของกะปิอบแห้งและบรรจุลงในถุงที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ PP, PET และ LLDPE/Nylon ปิดผนึกแบบสุญญากาศ และติดตามการเปลี่ยนแปลงของ

สารให้กลิ่นสำคัญโดยใช้ gas chromatography-mass spectrometry พบว่า N,N-dimethyl-methylamine ของตัวอย่างที่บรรจุในถุงทั้ง 3 ชนิดลดลง อีกทั้งยังพบว่าตัวอย่างที่บรรจุในถุง PP และ PET มีปริมาณสารกลุ่ม ketone ลดลงมากกว่าตัวอย่างที่บรรจุในถุง LLDPE/Nylon ซึ่งเกิดจากการที่ถุง LLDPE/Nylon สามารถป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจนและความชื้นได้ดีกว่าอีกทั้งยังเป็น การบรรจุแบบสุญญากาศซึ่งช่วยป้องกันการเกิดออกซิเดชันได้ดีกว่าบรรจุภัณฑ์อีก 2 ชนิด จาก งานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับผลการทดลองของตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงให้เห็นถึงการ เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นสำคัญในระหว่างการเก็บรักษาช่วง 0 ถึง 12 สัปดาห์ ซึ่งจะต้องพิจารณาร่วมกับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี QDA เพื่อยืนยันถึงการ เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นสำคัญของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่อาจส่งผลต่อลักษณะ ปรากฏ การรับรู้ด้านกลิ่น กลิ่นรส และรสชาติของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต



ตารางที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารให้กลิ่นสำคัญของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการรักษาช่วง 0-12 สัปดาห์

No.	compound	concentration (ng/g)						
		0 week	2 week	4 week	6 week	8 week	10 week	12 week
1	N,N-dimethyl-methylamine	663 ^a ±14	610 ^a ±8	569 ^b ±41	240 ^c ±34	83 ^d ±5	44 ^d ±12	52 ^d ±11
2	2-methylpropanal	348 ^e ±15	1,332 ^d ±71	1,314 ^d ±18	2,383 ^c ±141	4,640 ^b ±495	6,286 ^a ±363	6,416 ^a ±231
3	2-pentanone	908 ^e ±6	1,587 ^d ±151	7,353 ^c ±72	9,081 ^b ±69	11,407 ^a ±1329	10,491 ^{ab} ±1,179	11,445 ^a ±1,583
4	3-hexanone	81 ^{ab} ±2	84 ^a ±2	78 ^b ±6	52 ^c ±10	66 ^{bc} ±3	40 ^d ±6	43 ^{cd} ±7
5	2-heptanol	254 ^e ±47	2,066 ^c ±81	1,255 ^d ±214	4,524 ^b ±453	4,657 ^b ±375	11,378 ^a ±1,408	11,454 ^a ±1,549
6	2-methyl-3-furanthiol	284 ^d ±14	253 ^d ±16	861 ^b ±327	610 ^c ±25	862 ^b ±59	1,084 ^a ±64	1,256 ^a ±139
7	2-ethyl-6-methylpyrazine	316 ^d ±6	275 ^d ±27	1,169 ^c ±171	1,463 ^b ±4	1,843 ^b ±147	3,979 ^a ±71	4,081 ^a ±63
8	2,3-butanediol	27,579 ^c ±641	25,091 ^c ±790	32,596 ^b ±70	43,735 ^b ±2,121	44,146 ^b ±2,102	41,934 ^a ±958	47,095 ^a ±778
9	2-furanmethanol	2,184 [±] 207	4,127 ^e ±138	5,986 ^d ±366	7,532 ^c ±207	8,091 ^b ±87	8,413 ^b ±129	8,255 ^a ±281
10	acetophenone	580 ^d ±85	2520 ^c ±566	1900 ^c ±40	2,384 ^c ±147	4,484 ^a ±277	3,107 ^b ±122	3,137 ^b ±153
11	2(5H)-furanone	8,165 ^f ±233	10,020 ^e ±1,158	13,911 ^d ±1,440	15,865 ^c ±2,879	19,292 ^a ±1,399	17,377 ^b ±1,393	18,110 ^{ab} ±769
12	benzyl alcohol	5,309 ^e ±383	10,627 ^d ±575	11,881 ^d ±705	16,323 ^c ±1,316	18,878 ^b ±2,116	22,020 ^a ±245	20,871 ^{ab} ±1001
13	maltol	4,077 ^e ±37	6,371 ^c ±171	5,657 ^d ±375	7,325 ^{bc} ±33	9,355 ^b ±1,452	13,851 ^a ±2157	12,459 ^a ±2974
14	methyl palmitate	1912 ^d ±132	2,242 ^d ±298	3,619 ^c ±284	7,437 ^b ±1,423	13,604 ^a ±457	12,498 ^a ±1873	13,965 ^a ±2348
15	4-ethylphenol	345 ^f ±18	626 ^e ±23	1,809 ^d ±33	2,550 ^c ±28	3,197 ^b ±134	4,672 ^a ±355	4,570 ^a ±9
16	4-methyl-5-thiazoleethanol	906 [±] 8	1,170 ^e ±187	1,343 ^d ±354	1,579 ^c ±212	1,956 ^b ±88	3,157 ^a ±192	3,525 ^a ±327
17	vanillin	1,172 ^c ±172	3,152 ^b ±1,086	3,107 ^b ±121	3,951 ^{ab} ±33	4,824 ^a ±147	4,876 ^a ±74	4,793 ^a ±322

หมายเหตุ ^{a,b,c...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

4.3.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางประสาทสัมผัสระหว่างการรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยเก็บตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในถุงอลูมิเนียมลามิเนตแบบ PET/Almet/LLDPE ปิดผนึกแบบสุญญากาศ โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างทุก 2 สัปดาห์เพื่อทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) โดยใช้ผู้ทดสอบ 12 คน (ชาย 7 คนและหญิง 5 คน) อายุ 24-35 ปี จากภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ผ่านการฝึกฝน ซึ่งผู้ทดสอบได้กำหนดลักษณะที่จะใช้ในการประเมินตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 9 ลักษณะ ดังนี้ สี, การจับตัวกันเป็นก้อน, กลิ่นกึ่งต้ม, กลิ่นคาวอาหารทะเล, กลิ่นรสกุ้ง, กลิ่นรสทะเล, รสเค็ม, รสอูมามิ และรสหวาน ซึ่งคำอธิบายลักษณะของตัวอย่าง ตัวอย่างอ้างอิง และระดับความเข้มของตัวอย่างอ้างอิงของแต่ละลักษณะแสดงในตารางที่ 4.13 จากนั้นให้ผู้ทดสอบประเมินให้คะแนนระดับความเข้มของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เก็บรักษาไว้ในทุก ๆ 2 สัปดาห์

จากผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 4.14 พบว่าระดับความเข้มของลักษณะปรากฏด้านสีของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตได้มีค่า 4.91 ± 0.11 และมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นสูงในระหว่างเก็บรักษา ซึ่งมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์การคุณภาพทางเคมีกายภาพด้านการเปลี่ยนแปลงของค่าความขาว และ ΔE รวมถึงปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (ตารางที่ 4.10) สำหรับคุณลักษณะด้านกลิ่นกึ่งต้ม กลิ่นรสกุ้ง และกลิ่นคาวอาหารทะเล มีแนวโน้มที่ลดลงในระหว่างเก็บรักษา โดยระดับความเข้มของแต่ละลักษณะมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการวิเคราะห์ด้วย GC-MS (ตารางที่ 4.12) พบว่าสารให้กลิ่นสำคัญ เช่น N,N-dimethyl-methylamine ลักษณะกลิ่นคาวปลาและ 3-hexanone มีลักษณะกลิ่นหอมหวานมีความเข้มข้นลดลงในระหว่างเก็บรักษาตั้งแต่ช่วงสัปดาห์ที่ 4 ของการเก็บรักษา นอกจากนี้สารในกลุ่มแอลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ เอสเตอร์ และฟีนอลซึ่งมีค่า OAV สูง เช่น 2-methylpropanal, 2-methyl-3-furanthiol, 2-furanmethanol, 2(5H)-furanone, 4-ethyl-phenol, methyl palmitate เป็นต้น มีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้งนี้กลิ่นดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์เมื่อมีปริมาณความเข้มข้นเพิ่มสูงขึ้น (Peinado et al., 2016; Zhu et al., 2019; Pongsetkul et al., 2022) จึงส่งผลต่อคะแนนความเข้มด้านกลิ่นกึ่งต้มและกลิ่นรสของกุ้งและกลิ่นรสทะเลลดลง ในขณะที่ระดับความเข้มของกลิ่นรสหวานมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เนื่องจากในระหว่างการเก็บรักษามีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นในช่วงสัปดาห์ที่ 6 และผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสยังมีความสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณความเข้มข้นของสารให้กลิ่นสำคัญพบว่า 2-furanmethanol, maltol และ vanillin ซึ่งเป็นสารให้กลิ่นที่มีลักษณะกลิ่นหวาน คาราเมล และวานิลา ตามลำดับ มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาจึงอาจส่งผลกระทบต่อการรับรู้ด้านกลิ่นรสหวานของตัวอย่างเพิ่มขึ้นทำให้ระดับความเข้มข้นด้านกลิ่นรสหวานเพิ่มขึ้น สำหรับลักษณะด้านรสชาติพบว่าระดับคะแนนความเข้มข้นด้านรสเค็มและรสอูมามีพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีระดับความเข้มข้นของรสเค็มอยู่ในช่วง 7.20-8.39 และระดับความเข้มข้นของรสอูมามีอยู่ในช่วง 5.82-7.25 ระดับความเข้มข้นของรสเค็มและรสอูมามีแนวโน้มที่สอดคล้องกับการรายงานของ Kleekayai et al. (2016) รายงานผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) ของตัวอย่างกึ่งหมักในระหว่างการเก็บรักษา 6 เดือน พบว่าระดับความเข้มข้นของลักษณะด้านรสชาติ ได้แก่ รสเค็ม และรสอูมามีของตัวอย่างเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากปริมาณของกรดอะมิโนที่มีรสเค็มและรสอูมามีคงที่จึงอาจทำให้ลักษณะด้านรสเค็มและรสอูมามีของตัวอย่างเกิดการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยในระหว่างการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.13 คุณลักษณะ คำอธิบาย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อ้างอิง และระดับความเข้มที่ใช้สำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ quantitative descriptive analysis (ODA) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

attribute	description	product	reference product ^a	intensity ^b
ลักษณะปรากฏ				
สี	สีขาวขุ่นของผงครีมเทียม	ครีมเทียม (coffee-mate) (Nestle®, Thailand)	1 g ในถ้วยพลาสติก	4
การจับตัวเป็นก้อน	การจับตัวกันเป็นก้อนของผง	ผงปรุงรส (Knorr®, Thailand)	ผงปรุงรสเมื่อวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 วัน	6
กลิ่น				
กึ่งต้ม	กลิ่นเนื้อกึ่งต้มสุก	กึ่งผอยสดต้มด้วยน้ำอุณหภูมิ 95±2°C เป็นเวลา 3 นาที	2 g ในถ้วยพลาสติก	11
คาวอาหารทะเล	กลิ่นคาวของอาหารทะเลสด	กึ่งผอยสด 20 g แช่ในน้ำอุณหภูมิ 4°C ปริมาตร 100 mL เป็นเวลา 20 นาที	2 mL ในถ้วยพลาสติก	6
กลิ่นรส				
กึ่ง	กลิ่นรสกึ่งในข้าวเกรียบกึ่งทางการค้า	ข้าวเกรียบกึ่ง (Friendship Co., Ltd)	3 ชิ้นในถ้วยพลาสติก	12
กลิ่นรสทะเล	กลิ่นรสทะเลจากผงปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลทางการค้า	ผงปรุงแต่งกลิ่นรสทะเล (R&B food supply republic company limited, Thailand)	1 g ในถ้วยพลาสติก	10
หวาน	รสหวานจากสารละลายน้ำตาล	น้ำตาล (มิตรผล®, ประเทศไทย)	ละลายน้ำตาล 1 g ในน้ำ 50 mL	6
รสชาติ				
เค็ม	รสเค็มจากการสารถละลายเกลือ	เกลือ (ปรุทิพย์®, ประเทศไทย)	ละลายเกลือ 0.5 g ในน้ำ 50 mL	4
อูมามิ	รสอูมามิจากการละลายผงชูรส	ผงชูรส (อากิโนโมโต®, ประเทศไทย)	ละลายผงชูรส 1 g ในน้ำ 50 mL	7

หมายเหตุ^a เตรียมตัวอย่างในถ้วยพลาสติกสำหรับชิมและไม่มีปิด และ^b ประเมินด้วยระดับความเข้มบนสเกล 15-cm scale โดยกำหนดให้ระดับคะแนน 0 = ไม่มี และ 15= มากที่สุด

ตารางที่ 4.14 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ quantitative descriptive analysis (QDA) ของผงโปรตีนไฮโดรไลเสต

attribute	storage time (week)											
	0	2	4	6	8	10	12					
ลักษณะปรากฏ												
สี ^{ns}	4.91±0.11	5.31±0.49	5.70±1.37	5.24±0.92	6.03±0.26	5.71±0.63	5.58±0.70					
การจับตัวเป็นก้อน ^{ns}	3.04±0.76	3.35±0.29	3.26±0.23	3.42±0.71	3.57±1.04	3.11±0.50	3.40±0.15					
กลิ่น												
กึ่งต้ม	4.60 ^a ±0.45	4.12 ^{ab} ±0.72	3.58 ^b ±1.09	3.36 ^{bc} ±0.54	3.11 ^c ±0.67	2.77 ^{cd} ±0.52	2.58 ^{cd} ±0.45					
คากอาหารทะเล	4.78 ^a ±0.23	4.16 ^{ab} ±0.20	3.52 ^b ±0.83	2.84 ^c ±1.15	2.59 ^{cd} ±0.50	2.33 ^d ±0.19	2.11 ^d ±0.62					
กลิ่นรส												
กุ้ง	14.11 ^a ±1.27	12.37 ^{ab} ±1.06	12.05 ^b ±0.68	10.53 ^c ±0.81	8.72 ^c ±0.44	8.03 ^{cd} ±0.43	8.19 ^{cd} ±0.25					
อาหารทะเล	8.52 ^{ab} ±1.04	9.59 ^a ±0.64	7.32 ^b ±1.19	6.57 ^{bc} ±0.43	6.02 ^c ±0.11	5.94 ^{cd} ±0.81	5.40 ^{cd} ±0.37					
หวาน	7.02 ^b ±1.12	7.19 ^b ±0.54	8.05 ^{ab} ±0.31	8.31 ^{ab} ±0.14	8.64 ^a ±0.57	9.07 ^a ±1.05	9.21 ^a ±0.72					
รสชาติ												
เค็ม ^{ns}	8.39±0.36	7.94±0.18	8.25±0.57	7.91±1.06	7.20±0.93	7.49±0.27	8.11±0.66					
อูมามิ ^{ns}	7.25±0.21	5.82±0.37	6.99±1.10	6.42±1.55	7.16±0.45	6.53±0.88	6.93±0.80					

หมายเหตุ ค่าแต่ละค่าแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SD (n=3), ^{ns} หมายถึง ค่าเฉลี่ยแต่ละแถวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) และ ^{a,b,c...} หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแต่ละ

แถวมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p≤0.05)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนจากกุ้งฝอยด้วยฟลาโวไซม์ โดยกำหนดตัวแปรคือ อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S; 5-15 LAPU/g protein), อุณหภูมิ (45-55 °C) และ pH (6-8) พบว่ากระบวนการไฮโดรลิซิสโปรตีนด้วยฟลาโวไซม์ เป็นกระบวนการที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนด้านกายภาพ ด้านเคมี รวมถึงด้านประสาทสัมผัส โดยที่ปัจจัยด้านอุณหภูมิและค่า pH เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับการย่อยโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการใช้อัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 10 LAPU/g protein อุณหภูมิ 50°C และ pH 7 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่ให้ค่าระดับการย่อยของโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ $20.97 \pm 0.86\%$ จากผลการวิเคราะห์ค่าการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 48.3 kDa ซึ่งมีค่าที่ต่ำกว่าโปรตีนที่ไม่ผ่านกระบวนการไฮโดรลิซิสที่มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยเป็น 61 kDa และเมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนอิสระพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีค่าผลรวมทั้งหมดของปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นเป็น 142.53 ± 5.08 mg/ 100 g protein ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมที่มีค่า 48.84 ± 2.68 mg/ 100 g protein โดยที่ฟลาโวไซม์มีกิจกรรมจำเพาะต่อตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยของโปรตีนที่บริเวณปลายสาย โดยที่กรดอะมิโนอิสระในกลุ่มไม่ชอบน้ำจะจัดเรียงตัวอยู่บริเวณปลายสายของเปปไทด์ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสต เมื่อถูกเอนไซม์ย่อยกลายเป็นกรดอะมิโนอิสระระดับรสขมจะลดลงอีกทั้งยังมีกรดอะมิโนอิสระที่มีรสชาติหวาน เค็ม อูมามีเพิ่มขึ้น จึงทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ส่งผลให้การทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic test มีคะแนนความชอบในด้านกลิ่นรส รสชาติ และความชอบโดยรวมสูงกว่าตัวอย่างควบคุม รวมถึงผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตมีระดับความเข้มข้นด้านกลิ่นกะปิ กลิ่นคาวอาหารทะเล รสเค็ม และรสอูมามีสูงกว่าตัวอย่างควบคุม แสดงให้เห็นว่ากรดอะมิโนอิสระเป็นสารตั้งต้นสำคัญในการเกิดกลิ่นรสและรสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสต

การศึกษาหาสภาวะการทำแห้งที่เหมาะสมโดยกำหนดอุณหภูมิในการทำแห้งที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 120, 150 และ 180°C และพิจารณาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากลักษณะทางเคมีกายภาพ พบว่าการใช้อุณหภูมิ 150 °C ควบคุมอัตราการป้อน 10 ถึง 12 ml/min เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งแบบพ่นฝอย เนื่องจากเป็นสภาวะอุณหภูมิที่ทำให้ได้ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณความชื้น ค่ากิจกรรมของน้ำอยู่ในเกณฑ์ที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เรื่อง ผงปรุงรส กำหนดไว้

การศึกษาเสถียรภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตพบว่า ในระหว่างการเก็บรักษาในช่วง 0 ถึง 12 สัปดาห์ผงโปรตีนไฮโดรไลเสตมีปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น ค่าความขาวลดลง ปริมาณสารให้กลิ่นสำคัญกลุ่ม amine และ ketone บางชนิดลดลง และสารกลุ่ม alcohol, aldehyde และ pyrazine เพิ่มขึ้น สำหรับผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี quantitative descriptive analysis (QDA) พบว่ามีระดับคะแนนความเข้มข้นของกลิ่นกุ้งต้ม กลิ่นควาอาหารทะเล กลิ่นรสกุ้ง กลิ่นรสอาหารทะเลมีแนวโน้มที่ลดลง และความเข้มข้นของรสหวานเพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากปริมาณความชื้นและออกซิเจนอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตในระหว่างการเก็บรักษา

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรใช้สารห่อหุ้มชนิดอื่น ๆ ร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการห่อหุ้มสารให้กลิ่นได้ดียิ่งขึ้น เช่น gum arabic, cyclodextrin, pectin, calcium silicate เป็นต้น

5.2.2 ควรศึกษาอิทธิพลของปัจจัยด้านอัตราส่วนความเข้มข้นของสารห่อหุ้ม และศึกษาลักษณะทางอณูชีววิทยาเพื่ออธิบายประสิทธิภาพในการห่อหุ้มของสาร

บรรณานุกรม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาษาไทย

- กาญจนา มัทธนทวี. (2552). ความสำคัญของกลิ่นรสอาหารกับการตรวจวิเคราะห์กลิ่นอาหารโดยเทคนิค Gas Chromatography-Olfactometry (GC-O). วารสารเทคโนโลยีการอาหาร. มหาวิทยาลัยสยาม. 5(1), 13-17.
- กัญญาณัฐ สุนทรประสิทธิ์, ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์ และ ลลิตา ช่วงบุญ. (2562). ชีวิตวิทยาบางประการของกุ้งฝอยเพื่อการจัดการทรัพยากรในพื้นที่ชุ่มน้ำกว๊านพะเยาจังหวัดพะเยา. แก่นเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 47(1), 21-32.
- นภาพร ศรีพุดนิพนธ์ และสุริยา จงโยธา. (2540). ชีวิตวิทยาบางประการของกุ้งฝอย *Macrobrachium lanchesteri* de Man ในบึงทุ่งสร้างจังหวัดขอนแก่น. [เอกสารวิชาการ]. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- บัญชา ทองมี. (2553). การเพาะเลี้ยงกุ้งฝอยในเชิงพาณิชย์.[เอกสารวิชาการ]. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติเครือข่ายภาคเหนือ. มหาวิทยาลัยแม่โจ้เชียงใหม่.
- ปราณี อ่านเบรื่อง. (2558). เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 5 กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 470 หน้า.
- วณิชยา น้อยวังคลัง และ สมศักดิ์ ปัญญา. (2544). อนุกรมวิธานของกุ้งน้ำจืดสกุล *Macrobrachium* *bate*, 1868 ในลุ่มน้ำภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- วุฒิวัฒน์ เรืองชัย ประดิษฐ์ แสงทอง และ เลิศลักษณ์ เงินศิริ. (2552). ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกุ้งฝอยน้ำจืด (*Macrobrachium lanchesteri*). การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ
- สุวลี มะอนันต์ และ จิราพร โรจน์ทินกร. จุลกายวิภาคระบบย่อยอาหารของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, 13(2), 12-24.
- ศรีภาพรณ ธาระนารถ, บัลลังก์ เนืองแสง, วศิน ยูวนะเดมิย์ และ รชนิมุข หิรัญสัจจาเลิศ. (2563). การศึกษาขนาดและรูปแบบของโปรตีนไวเทลลินในแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับอาหารผสมฮอร์โมน 17เบต้า-เอสตราไดออล.วารสารวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี. 17(1), 11-23.

ภาษาอังกฤษ

- AOAC. 2005. Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed., Gaithersberg, MD, USA: AOAC International.
- Aspevik, T., Totland, C., Lea, P. & Oterhals, A. (2016). Sensory and surface-active properties of protein hydrolysates based on Atlantic salmon (*Salmo salar*) by-products. *Process Biochemistry*, 51(8), 1006-1014.
- Boukil, A., Perreault, V., Chamberland, J., Mezdour, S., Pouliot, Y. & Doyen, A. (2020). High hydrostatic pressure-assisted enzymatic hydrolysis affect mealworm allergenic proteins. *Molecules*, 25(11), 1-14.
- Breternitz, N. R., Fidelis, C. H. V., Silva, V. M., Eberlin, E. M. & Hubinger, M. D. (2017). Volatile composition and physicochemical characteristics of mussel (*Perna perna*) protein hydrolysate microencapsulated with maltodextrin and n-OSA modified starch. *Food and Bioprocess Technology*, 105, 12-25.
- Cadwallader, K., Tan, Q., Chen, F. & Meyers, S. P. (1995). Evaluation of the aroma of cooked spiny lobster tail meat by aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2432-2437.
- Cai, L., Li, D., Dong, Z., Cao, A., Lin, H. & Li, J. (2016). Change regularity of the characteristics of Maillard reaction products derived from xylose and Chinese shrimp waste hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 65, 908-916.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P & Ji, W. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 109, 176–183.
- Carneiro, H. C. F., Hoster, K., Reineccius, G. & Prata, A. S. (2022). Flavoring properties that affect the retention of volatile components during the encapsulation process, *Food Chemistry*, 13, 100230.
- Cha, Y. J. & Cadwallader, K. R. (1995). Volatile compounds in salt-fermented fish and shrimp pastes. *Journal of Food Science*, 60, 19-27.

- Cheung, L. K. Y., Aluko, R. E., Cliff, M. A. & Lichan, E. C. Y. (2015). Effects of exopeptidase treatment on antihypertensive activity and taste attributes of enzymatic whey protein hydrolysates. *Journal of Functional Food*, 13, 262-275.
- Choi, Y. J., Hur, S., Choi, B. D., Konno, K. & Park, J. W. (2009). Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small croaker and functional properties of its hydrolysates. *Journal of Food Science*, 74 (1), 17-24.
- Dey, S. S., & Dora, K. C. (2014). Optimization of the production of shrimp waste protein hydrolysate using microbial proteases adopting response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*, 51(1), 16-24.
- Dong, Z. Y., Liu, W., Zhou, Y. J., Ren, H., Li, M. Y. & Liu, Y. (2019). Effects of ultrasonic treatment on Maillard reaction and product characteristics of enzymatic hydrolysate derived from mussel meat. *Journal of Food Process Engineering*, 42(6), 13206.
- Foh, M. B. K., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T. & Xia W. (2010). Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1851-1869.
- Fu, Y., Chen, J., Bak, K. H. & Lametsch, R. (2019). Valorisation of protein hydrolysates from animal by-products: perspectives on bitter taste and debittering methods: a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 54(4), 978-986.
- Grossmann, K. K., Merz, M., Appel, D. & Fischer, L. (2019). A fast and novel approach to evaluate technical enzyme preparations for an efficient protein hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 245, 1695–1708.
- Grossmann, K. K., Merz, M., Appel, D., Araujo, M. M. D. & Fischer, L. (2021). New insights into the flavoring potential of cricket (*Acheta domesticus*) and mealworm (*Tenebrio molitor*) protein hydrolysates and their Maillard products. *Food Chemistry*, 364, 130336.
- Hamid, A. A., Bakar, J. & Bee, G. H. (2002). Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Food Chemistry*, 78, 69-74.

- Huang, G.R., Zhao, J. & Jiang, J.X. (2010). Effect of defatting and enzyme type on antioxidative activity of shrimp processing byproducts hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 20(3), 651-657.
- Holthuis, L. B. (2000). Freshwater prawn culture. Nomenclature and taxonomy. In New, M. B.; Valenti, W. C. (ed.), *Freshwater Prawn Culture*, pp 12-16. USA: Blackwell Science.
- Idowu, A. T. & Benjakul, S. (2019). Bitterness of fish protein hydrolysate and its debittering prospects. *Journal of Food Biotechnology*, 43(1), e12978.
- Imm, J. Y. & Lee, C. M. (1999). Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47(6), 2360-2366.
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M. & Hryniewicz, M. (2016). Food protein-originating peptides as tastants: Physiological, technological, sensory, and bioinformatic approaches. *Food Research International*, 89, 27-38.
- Jardim, D. C. P., Candido, L. M. B. & Netto, F. M. (1999) Sorption isotherms and glass transition temperatures of fish protein hydrolysates with different degrees of hydrolysis. *International Journal of Food Properties*, 2(3), 227-242.
- Julmanlik, T. & Kongruang, S. (2019). Functional properties and applications of egg white protein hydrolysates. *Journal of Food Technology, Siam University*, 14(1), 69-87.
- Justus, A., Ida, E. I. & Kurozawa, L. E. (2022). Microencapsulation of okara protein hydrolysate by spray drying: physicochemical and nutritive properties, sorption isotherm, and glass transition temperature. *Drying Technology*, 40(10), 2116-2127.
- Kiewiet, M. B. G., Faas, M. M. & Vos, P. (2018). Immunomodulatory protein hydrolysates and their application. *Nutrients*, 10(7), 904.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102, 1317-1327.

- Kishimura, H. (2019). Effect of proteases and alcohols used for debittering on characteristics and antioxidative activity of protein hydrolysate from salmon frames. *Journal of Food Science and Technology*, 57(2), 473–483.
- Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 657–666.
- Kurozawa, L. E., Morassi, A. G., Vanzo, A. A., Park, K. J. & Hubinger, M. P. (2009). Influence of spray drying conditions on physicochemical properties of chicken meat powder, *Drying Technology*, 27(11), 1248-1257.
- Latorres, J. M., Rios, D. G., Saggiomo, G., Ji, W. W. & Hernandez, C. H. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Journal of Food Science and Technology*, 55(2), 721–729.
- Lan, X., Liu, P., Xia, S., Jia, C., Mukunzi, D., Zhang, X., Xia, W., Tian, H. & Xiao, Z. (2010). Temperature effect on the non-volatile compounds of Maillard reaction products derived from xylose–soybean peptide system: Further insights into thermal degradation and cross-linking. *Food Chemistry*, 120, 967–972.
- Laohakunjit, N., Selamassakul, O., & Kerdchoechuen, O. (2014). Seafood-like flavor obtained from the enzymatic hydrolysis of the protein by-products of seaweed (*Gracilaria* sp.). *Food Chemistry*, 158, 162-170.
- Leffingwell, J.C. (1998). Flavor-Base version 1998. Flavor-Base Database, Version date July 01, 1998.
- Lopata, A. L., O'Hehir, R. E., & Lehrer, S. B. (2010). Shellfish allergy. *Clinical and experimental allergy*, 40(6), 850–858.
- Masuma, A. K. M., Chandrapala, J., Huppertz, T., Adhikaria, B. & Zisue, B. (2020). Influence of drying temperatures and storage parameters on the physicochemical properties of spray-dried infant milk formula powders. *International Dairy Journal*, 105, 104696.

- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J. & Desobry, S. (2006). Flavor encapsulation and controlled release. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Mall, V. & Schieberle, P. (2016). Characterization of key aroma compounds in raw and thermally processed prawns and thermally processed lobsters by application of aroma extract dilution analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64, 6433–6442.
- Merz, M., Eisele, T., Berends, P., Appel, D., Rabe, S., Blank, I., Stressler, T. & Fischer, L. (2015). Flavourzyme, an enzyme preparation with industrial relevance: automated nine-step purification and partial characterization of eight enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 5682–5693.
- Mohan, A., Rajendran, S. R., He, Q. S., Bazinet, L. & Udenigwe, C. C. (2015). Encapsulation of food protein hydrolysates and peptides: a review. *Royal Society of Chemistry*, 5, 79270-79278.
- Muzaffar, K. & Kumar, P. (2016). Moisture sorption isotherms and storage study of spray dried tamarind pulp powder. *Powder Technology*, 291, 322-327.
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H., & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., & Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*, 70, 571–578.
- Peinado, I., Koutsidis, G. & Ames, J. (2016). Production of seafood flavor formulations from enzymatic hydrolysates of fish by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 66, 444-452.
- Pereira, N. L. A., Fangio, M. F., Rodriguez, Y. E., Bonadero, M. C., Haran, N. S. & Gimenez, A. V. F. (2021). Characterization of liquid protein hydrolysates shrimp industry

- waste: analysis of antioxidant and microbiological activity, and shelf life of final product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), 15526.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S., Sampavapol, P., Osako, K., & Faithong, N. (2017). Characterization of endogenous protease and the changes in proteolytic activity of *Acetes vulgaris* and *Macrobrachium lanchesteri* during Kapi production. *Journal of Food Biochemistry*, 6, 155–166.
- Pongsetkul, J., Benjakul, S. & Boonchuen, P. (2022). Changes in volatile compounds and quality characteristics of salted shrimp paste stored in different packaging containers. *Fermentation*, 8, 69.
- Qi, H., Xu, Z., Li, Y., Ji, X., Dong, X. & Yu, C. (2017). Seafood flavourings characterization as prepared from the enzymatic hydrolysis of *Undaria pinnatifida* sporophyll by-product. *International Journal of Food Properties*, 20(12), 2867-2876.
- Reineccius, G. A. (2004). The Spray Drying of Food Flavors. *Drying Technology*, 22(6), 1289-1324.
- Saifullaha, M., Shishirc, M. R. I., Ferdowsid, R., Rahmane, R. T. & Vuonga, Q. V. (2019). Micro and nano encapsulation, retention and controlled release of flavor and aroma compounds. *Trends in Food Science and Technology*. 86, 230-251.
- Sarabandi, K., Gharehbeiglou, P. & Jafari, S. M. (2020). Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: opportunities and challenges. *Drying Technology*, 38(5-6), 577-595.
- Selamassakul, O., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O. & Bunjongsinsiri, P. (2010). Production of seasoning sauce from acid-seaweed protein hydrolysate. *Journal of Agricultural Science*, 41(3), 697-700.
- Shao, Y., Xiong, G., Ling, J., Hu, Y., Shi, L., Qiao, Y., Yu, J., Cui, Y., Liao, L., Wu, W., Li, X., Ding, A. & Wang, L. (2018). Effect of ultra-high-pressure treatment on shucking and meat properties of red swamp crayfish (*Procambarus clarkia*). *Journal of Food Science and Technology*, 87, 234-240.

- Sinthusamran, S., Benjakul, S., Kijroongrojana, K., & Prodpran, T. (2019). Chemical, physical, rheological and sensory properties of biscuit fortified with protein hydrolysate from cephalothorax of pacific white shrimp. *Journal of Food Science and Technology*, 56, 1145-1154.
- Silva, V. M., Kurozawa, L. E., Park, K. J. & Hubinger, M. D. (2012a). Water sorption and glass transition temperature of spray-dried mussel meat protein hydrolysate. *Drying Technology*. 30(2), 175-184.
- Silva, V. M., Kurozawa, L. E., Park, K. J. & Hubinger, M. D. (2012b). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of mussel protein hydrolysate powder. *Drying Technology*, 30(6), 653-663.
- Srinroch, C., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Punyarit, P. & Phiriyangkul, P. (2015). Identification of novel allergen in edible insect, *Gryllus bimaculatus* and its cross-reactivity with *Macrobrachium* spp. allergens. *Food Chemistry*, 184, 160-166.
- Sukkhown, P., Jangchud, K., Lorjaroenphon, Y., & Pirak, T. (2018). Flavored-functional protein hydrolysates from enzymatic hydrolysis of dried squid by-products: Effect of drying method. *Food Hydrocolloids*, 76, 103-112.
- Suppavorasatit, I., De Meija, E. G., Cadwallader, K. R. (2011). Optimization of the enzymatic deamidation of soy protein by protein-glutaminase and its effect on the functional properties of the protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(21), 11621-11628.
- Suppavorasatit, I., Lee, S. Y. & Cadwallader, K. R. (2013). Effect of enzymatic protein deamidation on protein solubility and flavor binding properties of soymilk. *Journal of Food Science*. 78, 1-7.
- Suppavorasatit, I. (2014). Flavor-Protein Interactions. *Journal of Food Technology, Siam University*, 9(1), 21-30.
- Tanchotikul, U. & Hsieh, T. C. Y. (1989). Volatile flavor components in crayfish waste. *Journal of food science*. 54(6), 1515-1520.
- Tinchan, P., Lorjaroenphon, Y., Cadwallader, K. R. & Chaiseri, S. (2015). Changes in the profile of volatiles of canned coconut milk during storage. *Journal of Food*

Science, 80, 49-54.

- Vijaykrishnaraj, M., Roopa, B. S., & Prabhasankar, P. (2016). Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel flavour. *Food Chemistry*, 211, 715-725.
- Wongsangasri, P., Thumthanaruk, B. & Saehor, S. (2015). production of protein hydrolysate powder from jellyfish using spray drying. *King Mongkut's Agricultural Journal. King Mongkut's University*, 33(1), 11-20.
- Wu, L. S., Li, Z. X., Lu, Z. C., Sun, M. Jamil, K., Lin, H. & Wang, G.Y. (2015). In-vitro simulated gastric fluid digestion and immunogenicity of different crustacean protein extracts. *International Journal of Food Properties*, 18, 43–53.
- Yang, Y., Wang, W., & Liu, Y. (2019). Umami and bitterness profile of enzymatic protein hydrolysates from cultured *Takifugu obscurus* by-products. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14, 476-484.
- Zhang, X., Jiang, D., Li, D., Yu, C., Dong, X. & Qi, H. (2019). Characterization of a seafood-flavoring enzymatic hydrolysate from brown alga (*Laminaria Japonica*). *Journal of Food Measurement and Characterization*, 13(2), 1185-1194.
- Zhu, W., Luan, H., Bu, Y., Lia, X., Li, J. & Ji, G. (2019). Flavor characteristics of shrimp sauces with different fermentation and storage time. *Journal of Food Science and Technology*, 110, 142–151.

ภาคผนวก ก

ก.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) (AOAC, 2005)

ก.1.1 ปริมาณความชื้น (Moisture content)

วัสดุอุปกรณ์

1. ถ้วยอะลูมิเนียม (Moisture can)
2. ซ้อนตักสาร
3. ตู้อบลมร้อน
4. โถดูดความชื้น

วิธีการวิเคราะห์

1. นำถ้วยอะลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C ระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำถ้วยอะลูมิเนียมออกมาพักไว้ในโถดูดความชื้น 30 นาที ซึ่งน้ำหนักและจุดบันทึกค่าน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการบดละเอียดปริมาณ 2 กรัมลงในถ้วยอะลูมิเนียมแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาพักไว้ในโถดูดความชื้น 30 นาที ชั่งน้ำหนักตัวอย่างและนำไปอบแห้งจนกว่าน้ำหนักที่แน่นอน
3. นำค่าน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอนหลังจากอบแห้งมาคำนวณปริมาณความชื้นของตัวอย่าง โดยกำหนดให้ W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (g) และ W_2 คือน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (g) และรายงานผลเป็นค่าร้อยละปริมาณความชื้น (%moisture content)

$$\% \text{ moisture content} = \frac{W_1 - W_2}{W_1} \times 100$$

ก.1.2 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด ด้วยวิธี Kjeldahl

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องย่อยโปรตีน (digestor, Buchi รุ่น K-424, Switzerland)
2. เครื่องดักจับไอกรด (scrubber, Buchi รุ่น B-414, Switzerland)
3. เครื่องกลั่นไนโตรเจน (distillation unit, Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

สารเคมี

1. 98% sulfuric acid (A.R. grade, QRèC, New Zealand)

2. M hydrochloric acid (A.R. grade, QR&C, New Zealand)
3. 50% (w/v) sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)
4. 4% (w/v) boric acid (A.R. grade, Merck, Germany)
5. selenium mixture (A.R. grade, Merck, Germany)
6. อินดิเคเตอร์ (เตรียมโดยละลาย methyl red 0.125 g และ methylene blue 0.0825 กรัม ใน 90% (v/v) ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร)

วิธีการวิเคราะห์

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งน้ำหนักแน่นอนประมาณ 1 กรัม ใส่หลอดย่อย
2. เติม selenium mixture 0.5 กรัม และ sulfuric acid 20 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อย
3. ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่างประมาณ 1 มิลลิลิตร แล้ววิเคราะห์ เช่นเดียวกับตัวอย่าง
4. ต่หลอดย่อยเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน แล้วย่อยจนตัวอย่างมีสีน้ำตาลเข้ม (ใช้เวลาประมาณ 30-45 นาที)

ปิดเตา และยกออกจากเครื่องย่อย ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรต

1. กลั่นตัวอย่างที่ผ่านการย่อย โดยเติม 50% (w/v) NaOH ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และ น้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ลงในหลอดย่อยโปรตีน เวลาในการกลั่นเท่ากับ 5 นาที เพื่อให้ทำปฏิกิริยาเกินพอซึ่งสังเกตได้จากสารละลายเปลี่ยนเป็นสีคล้ำ
2. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 4% (w/v) boric acid ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ปลายของอุปกรณ์ควบแน่นแช่ในสารละลายกลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 200 มิลลิลิตร
3. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่ด้วย 0.1 M HCl ที่ทราบความเข้มข้นที่แน่นอนจนถึงจุดยุติ (สารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน) บันทึกปริมาตร HCl ที่ใช้ และคำนวณหาปริมาณไนโตรเจนดังสมการ โดยกำหนดให้ Vs คือ ปริมาตรของ HCl ที่ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร), Vb คือปริมาตรของ HCl ที่ไตเตรต blank (มิลลิลิตร) และ N คือความเข้มข้น HCl (M)

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{[(V_s - V_b) \times N \times 14 \times 100]}{(\text{g sample} \times 1000)}$$

4. คำนวณปริมาณโปรตีน ดังสมการ

$$\text{ปริมาณโปรตีน} = \% \text{Nitrogen} \times 6.25$$

ก.1.3 วิเคราะห์ปริมาณไขมัน

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. เครื่องสกัดไขมัน (Soxhlet extractor, Gerhardt รุ่น HC61, Germany)
3. rotary vacuum evaporator (BUCHI รุ่น Rotavapor R-114, Switzerland)
4. thimble
5. hot air oven (Gen Lab รุ่น PRIME, UK)
6. โถดูดความชื้น

สารเคมี

1. petroleum ether (A.R. Grade, J.T. Baker Neutrasorb, USA)

วิธีวิเคราะห์

1. อบขวดก้นกลมขนาด 250 มิลลิลิตร ในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 °C จนแห้งสนิทและทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนักขวดเปล่าที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 2 กรัม
3. ใส่ตัวอย่างลงใน thimble แล้วปิดด้วยสำลี จากนั้นประกอบเข้ากับชุดสกัดไขมัน โดยใช้ตัวทำละลาย petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ใช้เวลาในการสกัด ประมาณ 3 ชั่วโมง
4. ระเหย petroleum ether ในขวดก้นกลม ด้วยเครื่องระเหยจนหมด
5. อบในตู้อบลมร้อน ที่อุณหภูมิ 105 °C จนแห้งสนิท แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
6. ชั่งน้ำหนักขวดก้นกลมที่อบแห้งแล้วเพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณไขมันทั้งหมด ตามสมการดังนี้ โดยกำหนดให้ W_0 คือน้ำหนักน้ำมันที่สกัดได้ (g) และ W_1 คือน้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (g)

$$\text{ปริมาณไขมันทั้งหมด (\%)} = \frac{W_0}{W_1} \times 100$$

ก.1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า

วัสดุอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น MS304S/01, Switzerland)
2. crucible
3. magnetic stirrer with heating plate (IKA รุ่น C-MAG HS7, Germany)
4. เตาเผา (muffle furnace, Carbolite gero รุ่น CWF 1200, UK)
5. โถดูดความชื้น

สารเคมี

1. 1.25% (w/w) sulfuric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
2. 5% (w/w) sodium hydroxide (A.R. grade, Loba Chemie, India)
3. 1% (w/w) hydrochloric acid (A.R. grade, QRëC, New Zealand)
4. 95% ethanol (A.R. grade, QRëC, New Zealand)

วิธีวิเคราะห์

1. เตา crucible พร้อมฝาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาแล้วทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ ชั่งน้ำหนัก จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (ต่างกันไม่เกิน 0.005 กรัม) แล้วบันทึกผล (W_1)
2. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงใน crucible บันทึกผล (S)
3. เตาตัวอย่างบน hot plate จนได้เถ้าสีดำและหมดควัน
4. จากนั้นนำไปเผาในเตาเผาอุณหภูมิ 550°C จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว นำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้นพักไว้ให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก
5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 5 จนกว่าน้ำหนักจะคงที่หาค่าเฉลี่ยและบันทึกผล (W_2)
6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสมการ โดยกำหนดให้ W_1 คือ น้ำหนัก crucible, W_2 คือ น้ำหนักครุซีเบลและน้ำหนักเถ้า และ S คือน้ำหนักตัวอย่าง

$$\%ash = \frac{(w_2 - w_1)}{s} \times 100$$

ก.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยของโปรตีน (Suppavorasatit et al., 2011)

อุปกรณ์

1. 96 well microtiter plate
2. incubator (Heraeus รุ่น B5042, Germany)
3. microplate reader (ASYS รุ่น UVM340, Biochrom Ltd., UK)

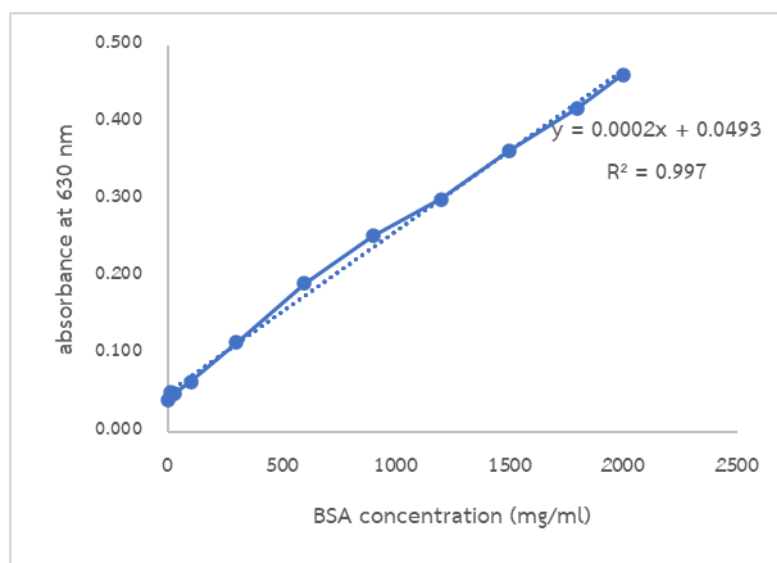
สารเคมี

1. DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) ประกอบด้วย
 - Bovine serum albumin (BSA)
 - Reagent A (alkaline copper tartrate solution)
 - Reagent B (Folin reagent)
2. Tris-buffer saline (TBS)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารสำหรับสร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA เป็นโปรตีนมาตรฐาน เตรียมโดยละลาย BSA ทั้งหมด 9 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 1500, 1200, 900, 600, 300, 100, 30, 10, และ 0 $\mu\text{g/mL}$
2. ใส่สารละลาย BSA และตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 μL ลงใน 96 well microtiter plate
3. เติม reagent A ปริมาตร 25 μL
4. เติม reagent B ปริมาตร 200 μL บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 630 nm ภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเติม reagent B
6. สร้างกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของสารละลาย BSA และคำนวณปริมาณโปรตีนที่ละลายของตัวอย่างจากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟ
7. ค่าระดับการย่อย (DH, %) คำนวณจากปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ละลายจากตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟิวริก 2N ที่อุณหภูมิ 100 $^{\circ}\text{C}$ เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (ย่อยอย่างสมบูรณ์)

กราฟมาตรฐาน



รูปที่ ก.1 กราฟมาตรฐานของปริมาณโปรตีนที่ละลาย

ก.3 การเตรียมน้ำต้มกึ่ง

อุปกรณ์

1. เตามแม่เหล็กไฟฟ้า
2. หม้อ
3. thermocouple
4. ตะแกรง (sieve)

วิธีทำ

1. นำกึ่งฝอยมาละลายน้ำแข็งจากนั้นนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ $90 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ระยะเวลา 10 นาที
2. นำมาแยกส่วนที่เป็นกึ่งฝอยและน้ำออกจากกันผ่านตะแกรง
3. นำน้ำต้มกึ่งมาลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วโดยใช้น้ำเย็นอัตราส่วนน้ำต่อน้ำแข็งเป็น 1:2 (น้ำต้มกึ่งมีค่า pH 7.6)
4. บรรจุใส่ในขวดแก้วทึบแสงที่มีฝาปิดสนิท เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

ก.4 การสกัดสารระเหยด้วยวิธีการ Solvent extraction ดัดแปลงจากวิธีการของ Mall and Schieberle (2016)

อุปกรณ์

1. ปีเปต
2. ขวดก้นกลม
3. vial
4. nylon filter (ขนาด 0.45 μm)
5. shaker
6. separatory funnel
7. sonicator
8. vigreux column
9. water bath

สารเคมี

1. dichloromethane
2. NaCl
3. 2,4,6-trimethylpyridine
4. Na_2SO_4

วิธีการสกัด

1. นำผงโปรตีนไฮโดรไลเสต 50 g ละลายด้วยสารละลายเกลือ (NaCl) อิมิตัวปริมาตร 50 mL เมื่อละลายแล้วนำไป sonicate ระยะเวลา 15 นาที
2. เติม 2,4,6-trimethylpyridine ความเข้มข้น 1,000.447 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เพื่อใช้เป็น internal standard และเติม dichloromethane 100 mL นำไปเขย่าด้วย shaker ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที
3. นำตัวอย่างมาแยกส่วนในไซออกโดยใช้ separatory funnel จากนั้นนำไปสกัดด้วย dichloromethane ตามขั้นตอนที่ 3 จนครบ 3 ครั้ง

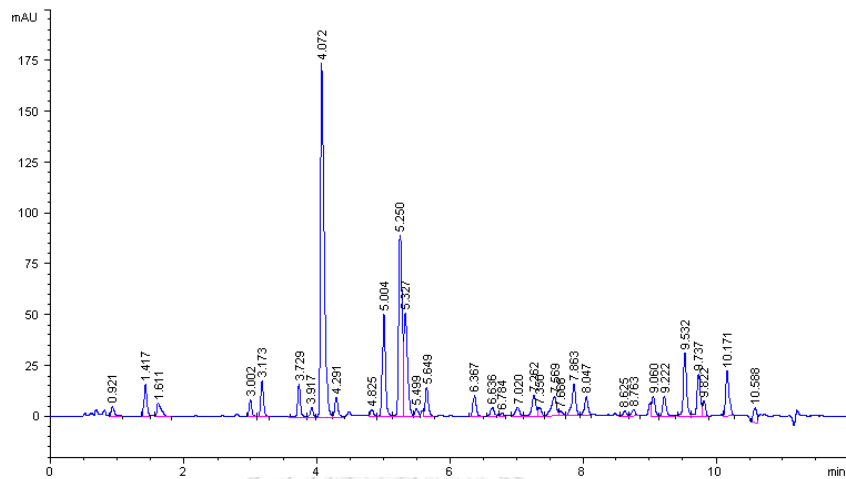


10. นำส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหย dichloromethane ออกโดยนำตัวอย่างใส่ลงในขวดกั่นกลมและต่อเข้ากับ vigreux column จากนั้นให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิ 50-52 °C ให้เหลือตัวอย่างโดยประมาณ 5 mL
5. นำตัวอย่างที่ทำให้เข้มข้นแล้วกรองผ่าน Na_2SO_4 แล้วนำไป purge N_2
11. นำตัวอย่างกรองผ่าน Nylon Syringe Filter ขนาด 0.45 μm ก่อนเติมลงใน μ -vial เตรียมนำไปวิเคราะห์ด้วย GC-MS

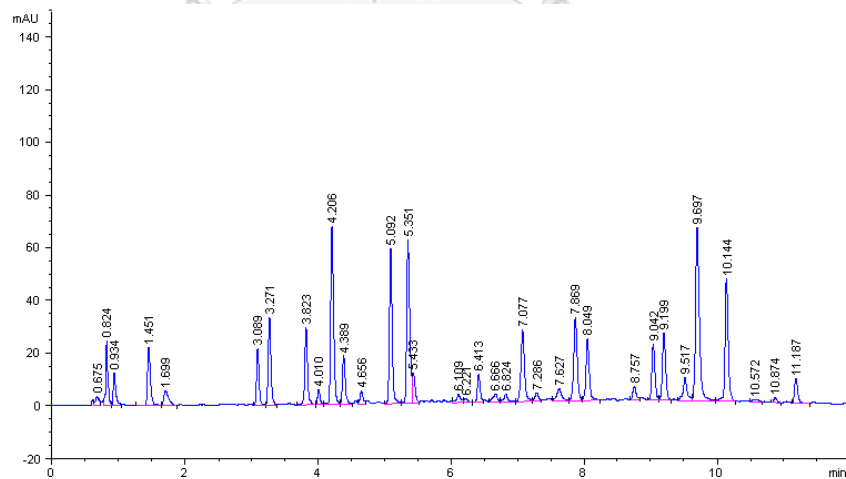


ภาคผนวก ข

ข.1 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้ HPLC ของตัวอย่างควบคุม



ข.2 ตัวอย่างโครมาโตแกรมจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยใช้ HPLC ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสต



ภาคผนวก ค

แบบประเมินทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic

ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตชนิดน้ำจากกุ้งฝอย

แบบประเมินทางประสาทสัมผัสด้านความชอบของผู้บริโภคต่อลักษณะปรากฏ กลิ่น กลิ่นรส รสชาติและความชอบโดยรวมต่อโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย

ผู้ร่วมวิจัย (รหัส)..... อายุ..... เพศ..... วันที่ทดสอบ.....

คำชี้แจง: การทดสอบนี้ใช้เพื่อคัดเลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย โดยทำการทดสอบตัวอย่างต่อไปนี้อีกทางซ้ายไปทางขวาโดยการชิมแล้วประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส ให้คะแนนตามลำดับคะแนนที่กำหนดไว้ด้านล่าง

กำหนดระดับคะแนน 1 ถึง 9 คะแนน ดังนี้

- 9 = ชอบมากที่สุด (like extremely) 6 = ชอบเล็กน้อย (like slightly) 3 = ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately)
 8 = ชอบมาก (like very much) 5 = เฉยๆ (neither like nor dislike) 2 = ไม่ชอบมาก (dislike very much)
 7 = ชอบปานกลาง (like moderately) 4 = ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly) 1 = ไม่ชอบมากที่สุด (dislike extremely)

ลักษณะทางประสาทสัมผัส	รหัสตัวอย่าง	
	423	611
ลักษณะปรากฏ		
กลิ่น		
กลิ่นรส		
รสชาติ		
ความชอบโดยรวม		

ข้อเสนอแนะ.....

แบบประเมินทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี QDA (Quantitative descriptive analysis)

ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตชนิดน้ำจากกุ้งฝอย

แบบประเมินทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาแบบใช้สเกลระดับความเข้มข้นด้านกลิ่นรสของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอยชนิดน้ำและการยอมรับของผู้บริโภคเมื่อประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร

ผู้ร่วมวิจัย (รหัส)..... อายุ.....เพศ.....วันที่ทดสอบ.....รหัสตัวอย่าง.....

คำชี้แจง การทดสอบนี้ใช้คัดเลือกภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอยทดสอบตัวอย่างดังต่อไปนี้ เริ่มทำการประเมินตัวอย่างที่จัดเตรียมไว้ให้ในภาคเสรีฟโดยเรียงลำดับตัวอย่างจากทางซ้ายขวา ด้วยวิธีการการสังเกต ตมกลิ่น และชิมตัวอย่างแล้วประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัส โดยทำเครื่องหมายที่แสดงถึงความเข้มข้นของลักษณะนั้นๆที่สามารถอธิบายได้ดีที่สุดในความรู้สึกของท่าน

ประเมินระดับความเข้มข้นของคุณลักษณะต่างๆ โดยการพิจารณาลักษณะปรากฏ การดมกลิ่น และการชิมตัวอย่าง

1.1 กลิ่นกะปิ



1.2 กลิ่นคาวอาหารทะเล



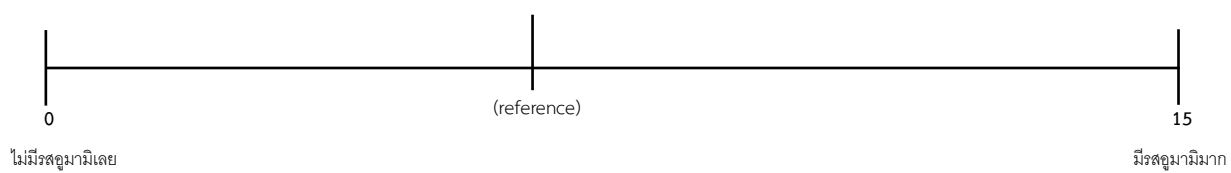
1.3 กลิ่นกุ้งต้ม



1.4 รสเค็ม



1.5 รสจุมามี



ข้อเสนอแนะ.....
.....



แบบประเมินทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี QDA (Quantitative descriptive analysis)

ของตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตชนิดผงจากกุ้งฝอย

แบบประเมินทางประสาทสัมผัสเชิงพรรณนาแบบใช้สเกลระดับความเข้มข้นด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น กลิ่นรสของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอยชนิดผงและการยอมรับของผู้บริโภคเมื่อประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร

ผู้ร่วมวิจัย (รหัส)..... อายุ.....เพศ.....วันที่ทดสอบ.....รหัสตัวอย่าง.....

คำชี้แจง การทดสอบนี้ใช้เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอยชนิดผงทดสอบตัวอย่างดังต่อไปนี้ เริ่มทำการประเมินตัวอย่างที่จัดเตรียมไว้ให้ในภาคเสริมโดยเรียงลำดับตัวอย่างจากทางซ้ายขวา ด้วยวิธีการการสังเกต ตมกลิ่น และชิมตัวอย่างแล้วประเมินลักษณะทางประสาทสัมผัสโดยทำเครื่องหมายที่แสดงถึงความเข้มของลักษณะนั้นๆที่สามารถอธิบายได้ดีที่สุดในความรู้สึของท่าน

ประเมินระดับความเข้มของคุณลักษณะต่างๆ โดยการพิจารณาลักษณะปรากฏ การดมกลิ่น และการชิมตัวอย่าง

1.1 สีขาว



1.2 การจับตัวเป็นก้อน



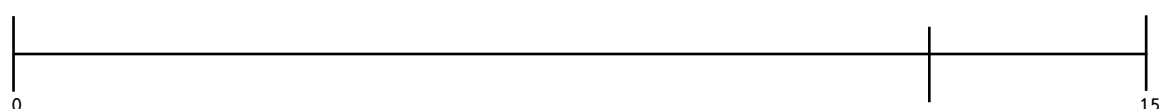
1.3 กลิ่นกุ้งต้ม



1.4 กลิ่นคาวอาหารทะเล



1.5 กลิ่นรสกุ้ง

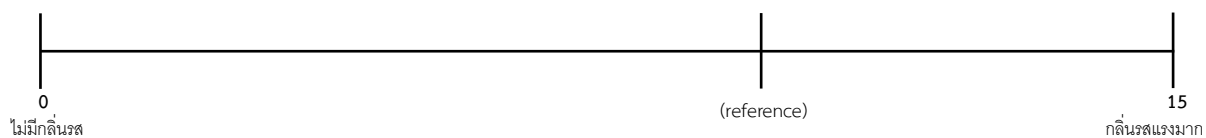


ไม่มีกลิ่นรส

1.6 กลิ่นรสอาหารทะเล

(reference)

กลิ่นรสแรงมาก



1.7 รสเค็ม



1.8 รสอูมามิ



1.9 รสหวาน



ข้อเสนอแนะ.....
.....

ภาคผนวก ง

ใบอนุญาตรับรองยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยสำหรับการทดสอบทางประสาทสัมผัสของ
โปรตีนไฮโดรไลเสต

AF 01-12	
 คณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในคน กลุ่มสหสถาบัน จุดที่ 1 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 254 อาคารจามจุรี 1 ชั้น 2 ถนนพญาไท เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-3202, 0-2218-3049 E-mail: eccu@chula.ac.th	
COA No. 241/2564	
ใบรับรองโครงการวิจัย ยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย	
โครงการวิจัยที่ 144.2/64 :	การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกุ้งฝอย <i>Macrobrachium lanchesteri</i> โครงการทำแห้งแบบพ่นฝอยและเสถียรภาพระหว่างการเก็บรักษา
ผู้วิจัยหลัก :	นางสาวฉัตรชนก โทททองศักดิ์
หน่วยงาน :	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
โครงการวิจัยนี้ได้รับการยกเว้นการทบทวนจริยธรรมการวิจัยโดยใช้อัตลักษณ์ของ Office for Human Research Protections (OHRP Exempt Categories) 45 CFR part 46.101(b) โดยมีเงื่อนไขว่าผู้วิจัยดำเนินการวิจัยอย่างเคร่งครัดตามที่ปรากฏในโครงการวิจัยฉบับที่ส่งให้ คณะกรรมการพิจารณา หากมีการเปลี่ยนแปลงต้องแจ้งคณะกรรมการ ก่อนมีการดำเนินการวิจัยต่อไป	
ลงนาม  (รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ปรีชา พิณวัน ประธาน	ลงนาม  (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ฉวีรัตน์ นิมิตเกียรติ กรรมการและเลขานุการ
วันที่รับรอง :	13 ธันวาคม 2564
<small>หมายเหตุ โครงการวิจัยไม่เกิน 1 ปี ส่วนบรรณาการสิ้นสุดโครงการวิจัย (AF 01-12) และบทยึดถือผลการวิจัยภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยสิ้นสุด สำหรับ โครงการวิจัยที่เป็นวิทยานิพนธ์ใช้บังคับเพียงเฉพาะการวิจัย ภายใน 30 วัน เมื่อโครงการวิจัยเสร็จสิ้น</small>	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ฉัตรชนก ไพบูลย์ศักดิ์
วัน เดือน ปี เกิด	5 พฤษภาคม 2539
สถานที่เกิด	จังหวัดแพร่
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ประมง
ที่อยู่ปัจจุบัน	1484/251 ถนนพหลโยธิน แขวงจันทระเกษม เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
ผลงานตีพิมพ์	Paisansak, C. and Suppavorasatit, I. (2022). Effect of enzymatic hydrolysis by Flavourzyme® on degree of hydrolysis, solubility, and antioxidant properties of freshwater prawn hydrolysates. In Proceedings of the 24nd Food Innovation Asia Conference; 16-17 June 2022; Bangkok, Thailand. p. 87-96.