บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

เลือดโคและกระบือจากโรงฆ่าสัตว์ บริษัท สหสามัคคีค้าสัตว์ จำกัด นำโคและกระบือที่สลบแล้วมาทำความสะอาดโดยใช้น้ำฉีดล้าง ปาดคอวัวด้วยมีดปลายแหลม ใช้ภาชนะที่สะอาดรองรับเลือดวัวครั้งละประมาณ 10 ลิตร เติมสารละลาย sodium citrate เข้มข้น 40 % จำนวน 10 มิลลิลิตรต่อเลือด 1 ลิตร ผสมให้เข้ากันแล้ว แบ่งเลือดใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 2000 มิลลิลิตรทันที นำตัวอย่างมาที่ห้องทดลอง เก็บโดยแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการทดลองทำให้น้ำแข็งละลายที่อุณหภูมิประมาณ 8-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง แล้วทำให้มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้องอีก 30 นาที

สารเคมี

Alcalase 0.6 L (0.6 unit /g)	NOVO Industri A/S Copenhegen/Denmark
Bovine Serum Albumin	(A.R.)
Coomassie Brilliant Blue G 250	(A.R.)
Copper Sulfate	(A.R.)
Hydrochloric Acid	(A.R.)
Sodium Hydroxide	(A.R.)
Sodium Citrate	(A.R.)
Sodium Potassium Tartrate	(A.R.)
Total Plate Count Agar	(Difco Laboratories)
95% Ethyl Alcohol	(A.R.)
95% Phosphoric Acid	(A.R.)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุดิบอาหารสัตว์น้ำ

ปลาป่น จากบริษัทป.เจริญพันธ์จำกัด (โปรตีน 65.53%,ไขมัน 5.16%,ความชื้น 8.66%)

ปลาหมึกป่น จากบริษัทป.เจริญพันธ์จำกัด(โปรตีน 62.99%,ไขมัน 4.27%,ความชื้น 12.17%)

หัวกุ้งป่น จากบริษัทป.เจริญพันธ์ จำกัด(โปรตีน32.94%,ไขมัน 0.71%,ความชื้น 8.01%)

กากถั่วเหลือง จากบริษัทป.เจริญพันธ์จำกัด(โปรตีน40.33%,ไขมัน 4.05%,ความชื้น,10.25%)

รำละเอียด จากบริษัทป.เจริญพันธ์ จำกัด(โปรตีน15.69%,ไขมัน 0.24%,ความชื้น,11.44%)

น้ำมันข้าวโพด Mazola (ไขมัน 100.00 %)

วัสดุและอุปกรณ์

Shaking Water Bath (Forma Scientific , 2563)

Double Beam Spectrophotometer (Shimadzu , UV 240 (P/N 204- 5800))

pH Meter (Corning , M220)

Autoclave (Tomy , SS-320)

เครื่องผสม (Kenwood , A907D)

ตู้อบแห้งแบบมีลมเป่าผ่าน (Scientific Instrument Development & Service Center Chulalongkorn University , SC 1086)

ตู้อบแห้งแบบสุญญากาศ (Hotpack Corp. , 273600)

เครื่องวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (Hitachi , 835-50)

เครื่องปิดผนึกบรรจุแบบสุญญากาศ (Multivac (Thailand) , A8 500)

เครื่องอัดเม็ดอาหารขนาดกำลัง motor 1 แรงม้า เส้นผ่านศูนย์กลางรูแม่แบบ 2.2 มิลลิเมตร (ไม่มีรุ่นและแหล่งผลิตปรากฏ) (รูปที่ 3.1)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.1 เครื่องอัดเม็ดอาหาร

เครื่องชั่ง analytical (Sartorius , A200S)

เครื่องชั่ง top loading (Sartorius , B3100S)

ถาดอลูมิเนียมขนาด 17.7 x 25.3 x 2.5 เซนติเมตร

ถุง Eval Film ขนาด 16.5 x 25.4 เซนติเมตร หนา 0.0075 เซนติเมตร

ถุง High Density Polyethylene (HDPE) ขนาด 10.2 x 17.7 เซนติเมตร หนา 0.0025 เซนติเมตร

อุปกรณ์วิเคราะห์ค่าความคงตัวของอาหารในน้ำ เป็นกล่องสี่เหลี่ยมทำจากตะแกรงอลูมิเนียม 16 ช่องต่อตารางเซนติเมตร พร้อมฝาปิด ขนาด กว้าง x ยาว x สูง 6.0 x 9.0 x 1.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร

เครื่องเขย่าร่อน (Retsch ,VIBRO 335)

วิธีทดลอง

3.1 การย่อยสลายเลือดด้วยกรด

ผสมเลือด 100 กรัม กับกรด hydrochloric เข้มข้น 4 M.ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างใน shaking water bath ที่ความเร็วรอบ 160 รอบ/นาที หลังการย่อยสลายทำให้เป็นกลางด้วย sodium hydroxide 4M.ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่

- ปริมาณกรด hydrochloric 4 M. 2 , 4 และ 6% โดยน้ำหนัก
- เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 2, 4 และ 6 ชั่วโมง
- อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส

เลือกภาวะที่ดีที่สุดโดยการวิเคราะห์ค่าต่อไปนี้

- ค่า Degree of Hydrolysis (DH) ใช้วิธีของ Scopes (30) และ Christensen (9) ซึ่งใช้ปฏิกิริยา biuret ในการวัดปริมาณโปรตีน และคำนวณค่า DH (ภาคผนวก ก.1)

- ค่าความคงตัวของอาหารในน้ำ (water stability) ศึกษาความคงตัวในน้ำของอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงกุ้งทะเลโดยวิธีของ Hastings (31) โดยผลิตอาหารตามสูตร

017543

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (% โดยน้ำหนัก)
ปลาป่น	27.5
ปลาหมึกป่น	10.0
หัวกุ้งป่น	10.0
กากถั่วเหลือง	20.0
รำละเอียด	27.0
น้ำมันข้าวโพด	3.0
สารเชื่อม	2.5

ใช้ blood hydrolysate แต่ละตัวอย่างเป็นสารเชื่อมในปริมาณ 2.5% โดยน้ำหนัก เปรียบเทียบกับตัวอย่างเลือดที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย วิธีการผลิตอาหารมีขั้นตอนและรายละเอียดตามแผนภูมิต่อไปนี้

วัตถุดิบอาหารแห้ง

↓

บดและร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช

↓

ผสมให้เข้ากันในเครื่องผสม โดยใช้ความเร็ว 60 รอบ/นาทีเป็นเวลา 3 นาที

↓

เติมน้ำมันข้าวโพดจนครบปริมาณที่ต้องการ

↓

ผสมอีก 4 นาที

↓

เติมน้ำ 60% ของน้ำหนักที่ใช้ในสูตร ผสมอีก 3 นาที

↓

ผ่านเครื่องอัดเม็ดอาหาร 3 ครั้ง

↓

อบแห้งที่ 60°C จนถึงความชื้นสุดท้าย 10%

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศึกษาความคงตัวของเม็ดอาหารในน้ำ โดยคัดเฉพาะเม็ดที่มีความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร ชั่งให้ได้น้ำหนัก 5 กรัม (น้ำหนักเปียก) ใส่กล่องอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด วางในภาชนะ (เส้นผ่านศูนย์กลาง 30 เซนติเมตร ลึก 13 เซนติเมตร) ซึ่งบรรจุน้ำ 3000 มิลลิลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำขึ้นมาทิ้งให้สะเด็ดน้ำ 5 นาที อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105-110 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง นำออกมาใส่ใน desiccator ทิ้งให้เย็น ชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณค่าความคงตัวของอาหารในน้ำ (ภาคผนวก ก.2)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 3x3x2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.2 การย่อยสลายเลือดด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายเอนไซม์ alcalase (0.06 unit/g) โดยละลายเอนไซม์ alcalase (0.6 unit/g) ในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร

ปรับ pH ของเลือดเป็น 8.5 ด้วย sodium hydroxide 1 M. แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ alcalase ในปริมาณที่กำหนด เขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 160 รอบต่อนาที หยุดปฏิกิริยาโดยปรับ pH เป็น 4 ด้วยกรด hydrochloric 4 M. จากนั้นทำให้เป็นกลางด้วย sodium hydroxide 4 M. ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่

- ปริมาณสารละลายเอนไซม์ alcalase (0.06 unit / g) แปรเป็น 0.5, 1.0 และ 1.5% โดยปริมาตร
- เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 5, 10, 15 และ 20 นาที

เลือกภาวะที่ดีที่สุดโดยใช้วิเคราะห์ค่าต่อไปนี้

- ค่าDHใช้วิธีของ Scopes (30)ซึ่งใช้ปฏิกิริยา coomassie blue binding (ภาคผนวก ก.3)ในการวัดปริมาณโปรตีน คำนวณค่าDHโดยใช้วิธีเดียวกับข้อ3.1
- ความคงตัวของอาหารในน้ำ ใช้วิธีเดียวกับข้อ 3.1

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 3 x 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเซทตัวอย่างที่ดีที่สุดที่สรุปได้และเลือดสด ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเนื่องจากต้องการทราบปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการทดลอง ดังนั้นการเตรียมตัวอย่างขั้นต้นก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน จึงไม่ต้องผ่านการย่อยสลายด้วยกรด hydrochloric 6 M. เหมือนวิธีการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนโดยทั่วไป

3.4 การทำแห้งเลือดสดและโปรตีนไฮโดรไลเซท

ศึกษาวิธีทำแห้งผลิตภัณฑ์ตัวอย่างที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.1,3.2 และเลือดสด รวม 2 วิธีคือ อบแห้งด้วยตู้อบแห้งแบบมีลมเป่าผ่าน โดยอบแห้งตัวอย่าง 250 มิลลิลิตร ในถาดอะลูมิเนียมขนาด 17.7 x 25.3 x 2.5 เซนติเมตร ครั้งละ 4 ถาด และอบแห้งด้วยตู้อบแบบสุญญากาศ โดยอบแห้งตัวอย่าง 250 มิลลิลิตร ในถาดอลูมิเนียม ขนาดเท่ากัน ครั้งละ 2 ถาด ในแต่ละวิธีตัวแปรที่ศึกษาได้แก่

- อุณหภูมิในการทำแห้ง แปรเป็น 3 ระดับคือ 60,70 และ80 องศาเซลเซียส
- ปริมาณความชื้นสุดท้าย แปรเป็น 2 ระดับ คือ 10% และ 20%
- ชนิดของเลือด แปรเป็น เลือดสด เลือดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรด และเลือดที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

อบแห้งโปรตีนไฮโดรไลเซทและเลือดสดที่อุณหภูมิ 60,70 และ80 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ตำแหน่งต่างๆ ของถาดทุกครึ่งชั่วโมง จนผลิตภัณฑ์มีความชื้นต่ำกว่า 10% วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (32) ที่แต่ละเวลาอบแห้งแล้วเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณความชื้นกับเวลาในการอบแห้ง จากนั้นประมาณเวลาในการอบแห้งจนอาหารมีปริมาณความชื้นสุดท้าย 10% และ 20% จากกราฟดังกล่าว อบแห้งอาหารตามเวลาที่ประมาณได้ที่แต่ละอุณหภูมิ

เลือกภาวะทำแห้งที่ดีที่สุดโดยการวัดความสามารถในการเชื่อมเม็ดอาหารกุ้งโดยผลิตอาหารและหาค่าความคงตัวของอาหาร เช่นเดียวกับข้อ 3.1 ใช้ตัวอย่างไฮโดรไลเซทที่ผ่านการทำแห้งแล้วบดร่อนผ่านตะแกรงขนาด 50 เมช เป็นสารเชื่อมในสูตรอาหาร 2.5 %

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 3x2x3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.5 ศึกษาอายุการเก็บผลิตภัณฑ์

ศึกษาอายุการเก็บตัวอย่างที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.4 โดยบรรจุในถุงพลาสติก 2 ชนิดคือถุง HDPE ขนาด 10.2 x 17.7 เซนติเมตร หนา 0.0025 เซนติเมตร กับถุง Eval Film ขนาด 16.5 x 25.4 เซนติเมตร หนา 0.0075 เซนติเมตร บรรจุภายใต้ภาวะสุญญากาศ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ระหว่างเก็บสุ่มตัวอย่างทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือนเพื่อวิเคราะห์ ปริมาณความชื้น (32) และจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด(33) โดยปริมาณความชื้นและจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน 12 % (34) และ 1 X 10^{5} โคโลนี / กรัมตัวอย่าง (35) ตามลำดับ

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 2 x 4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย