บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

น้ำนึ่งปลาทูน่าจากบริษัท แรงค์แคนนิ่ง จำกัด 2 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ skipjack ได้จากการนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ skipjack และน้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์รวม ได้จากน้ำเหลือทิ้งจากการนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ skipjack, tonggol, yellow fin, bonito และ albacore รวมกัน ในอัตราส่วน 1:1:1:1:1 (โดยน้ำหนัก) การเก็บตัวอย่างทำโดยใช้ภาชนะสะอาดรองรับน้ำนึ่งปลาชนิดละประมาณ 20 ลิตร นำตัวอย่างมาที่ห้องทดลองปั่นแยกสารแขวนลอยออก โดยเครื่องปั่นแยก (Heraeus-Christ, Verifuge K) ใช้ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 °C เวลา 15 นาที ได้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่มีลักษณะเป็นสารละลายใสเป็นวัตถุดิบสำหรับงานวิจัย แบ่งตัวอย่างใส่ถุงพลาสติก ถุงละ 1000 มิลลิลิตร และเก็บโดยการแช่แข็งที่ -20 °C ทันที ก่อนการทดลองละลายตัวอย่างโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 8-10 °C เป็นเวลา 15-20 ชั่วโมง จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนน้ำนึ่งปลาทูน่ามีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 30 นาที

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

Boric acid	(A.R.)
Copper sulfate	(A.R.)
Ferric alum indicator	(A.R.)

019156

Methyl red	(A.R.)
Methylene blue	(A.R.)
Nitric acid	(A.R.)
Potassium sulfate	(A.R.)
Potassium thiocyanate	(A.R.)
Petroleum ether	(A.R.)
Silver nitrate	(A.R.)
Sodium hydroxide	(A.R.)
Sulfuric acid	(A.R.)

สารเคมีที่ใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาทูน่า

Activated carbon powder, particle size 75 % < 40 μ (A.R.)

Alcalase ® 0.6 L (0.6 unit/g) Novo Industri A/S Copenhagen Denmark

Bovine serum albumin	(A.R.)
Coomassie Brilliant Blue G 250	(A.R.)
Hydrochloric acid	(A.R.)

Neutrase ® 0.5 L (0.5 unit/g) Novo Industri A/S Copenhagen Denmark

Sodium hydroxide	(A.R.)
95 % Ethyl alcohol	(A.R.)
95 % Ortho-phosphoric acid	(A.R.)

สารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาทูน่าทางการค้า (Skipjack Extract ®)

ผลิตโดยบริษัท ยูนิคอร์ด จำกัด มีลักษณะข้นหนืดไหลได้เล็กน้อย สีน้ำตาลเข้ม ความเข้มข้น 65 °Brix องค์ประกอบทางเคมีแสดงดังตารางที่ 4.25

อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบและผลิตภัณฑ์

ชุดย่อยโปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest 1, Gerhardt, KT 85)

ชุดสกัดไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic, S-166)

ตู้อบลมร้อน ช่วงอุณหภูมิ 0-250 °C (WTE Binder, E 53)

Muffle Furnace ช่วงอุณหภูมิ 500-700 °C (Carbolite, MEL 11-2)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสปลาทูน่า

เครื่องชั่ง Analytical balance (Sartorius, A 200S)

เครื่องชั่ง Top loading (Sartorius, B 3100S)

Double beam spectrophotometer (Shimadzu, UV 240 (P/N 204-5800))

Shaking water bath (DT Hetotherm, CB 60)

Refrigerated centrifuge ช่วงอุณหภูมิ (-30)-40 °C (Heraeus-Christ, Verifuge K)

pH meter (Corning, M 220)

Vacuum rotary evaporator (Heiholph, VV2000)

Hand refractometer 0-32 ° Brix (Atago NO 1)

Hand refractometer 28-32 ° Brix (Atago NO 99444)

Hand refractometer 58-90 ° Brix (Atago NO 3)

วิธีทดลอง

3.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์ skipjack และน้ำนึ่งปลาทูน่าพันธุ์รวม ตามวิธีของ Association of Official Analytical Chemists (1980) สมบัติที่วิเคราะห์ได้แก่

ปริมาณความชื้น ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ AOAC-6.004

รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.1

ปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ AOAC-7.024

รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.2

ปริมาณไขมัน ใช้วิธีวิเคราะห์ของ AOAC-7.062

รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.3

ปริมาณเถ้า ใช้วิธีวิเคราะห์ของ AOAC-7.009

รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.4

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต โดยการคำนวณจากการนำผลรวมของ

องค์ประกอบที่กล่าวมาแล้วทั้งหมด หักออกจาก 100

ปริมาณเกลือ ดัดแปลงจากวิธีวิเคราะห์ AOAC-18.034

รายละเอียดการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก ก.5

3.2 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยเอนไซม์</u>

3.2.1 ปริมาณเอนไซม์และอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย

เอนไซม์ Neutrase ® (0.5 unit/g) มีความหนาแน่น 1.25 g/ml ที่อุณหภูมิ 20 °C เตรียมสารละลายโดยละลายเอนไซม์ Neutrase (0.5 unit/g) ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร

เอนไซม์ Alcalase ® (0.6 unit/g) มีความหนาแน่น 1.25 g/ml ที่อุณหภูมิ 20 °C เตรียมสารละลายโดยละลายเอนไซม์ Alcalase (0.6 unit/g) ในน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:9 โดยปริมาตร

ปรับ pH ของน้ำนึ่งปลาทูน่าแต่ละพันธุ์จาก 6.0 เป็น 6.5 ด้วย sodium hydroxide เข้มข้น 1 M. จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ Neutrase® ในปริมาณที่กำหนด เขย่าใน shaking water bath ใช้ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยา โดยให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 2 นาที

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่

- ปริมาณสารละลายเอนไซม์ Neutrase ® (0.5 unit/g) แปรเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 % โดยปริมาตร

- อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 45, 50, 55 และ 60 °C

เลือกภาวะที่ดีที่สุดโดยวิเคราะห์ค่า DH ตามวิธีของ Scopes (1987) ซึ่งใช้ปฏิกิริยา coomassie blue binding ในการวัดปริมาณโปรตีนและคำนวณค่า DH (แสดงดังภาคผนวก ข)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 5x4 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.2.2 ค่า pH และเวลาในการย่อยสลาย

เติมสารละลายเอนไซม์ Neutrase ® ตามปริมาณที่สรุปได้จากข้อ 3.2.1 ลงในน้ำนึ่งปลาทูน่าแต่ละพันธุ์ เขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิเหมาะสมซึ่งสรุปได้จากข้อ 3.2.1 ใช้ความเร็วเครื่องเขย่า 125 รอบต่อนาที หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนใน water bath ที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 2 นาที

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่

- pH ของน้ำนึ่งปลาทูน่าแปรเป็น 5.5 6.5 และ 7.5

- เวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย 10 และ 20 นาที

เลือกภาวะที่ดีที่สุดโดยการวิเคราะห์ค่าต่อไปนี้

- ค่า DH เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

- คะแนนการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส ประเมินกลิ่นของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ คุณลักษณะที่ต้องการคือ กลิ่นปลาที่ผู้บริโภคยอมรับได้ ใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนโดยสามารถบอก ความแตกต่างของสารปรุงแต่งกลิ่นรสทางการค้าได้ จำนวน 10 คน ใช้วิธีทดสอบแบบ scoring มีระดับคะแนนตั้งแต่ 0-10 โดย 10 คะแนน หมายถึง มีกลิ่นหอมของปลาทูน่ามากที่สุด และ 0 คะแนน หมายถึง ไม่มีกลิ่นหอมของปลาทูน่า (แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค.1)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 3x2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยกรดเกลือ

3.3.1 ปริมาณกรดเกลือและอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย

ผสมน้ำนึ่งปลาทูน่าแต่ละพันธุ์จำนวน 100 มิลลิลิตร กับกรดเกลือเข้มข้น 6 M. ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าใน shaking water bath ใช้ความเร็ว 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยทำให้เป็นกลางด้วย sodium hydroxide เข้มข้น 6 M.

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ได้แก่

- ปริมาณกรดเกลือเข้มข้น 6 M. แปรเป็น 5, 10, 15, 20 และ 25 % โดยปริมาตร
- อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยสลาย 50 และ 60 °C

เกณฑ์ในการเลือกภาวะที่ดีที่สุด เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Asymmetric Factorial Experiment ขนาด 5x2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.3.2 เวลาในการย่อยสลาย

เติมกรดเกลือเข้มข้น 6 M. ลงในน้ำนึ่งปลาทูน่าแต่ละพันธุ์ตามปริมาณที่สรุปได้จากข้อ 3.3.1 เขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิเหมาะสมซึ่งสรุปได้จากข้อ 3.3.1 ใช้ความเร็ว 125 รอบต่อนาที หยุดปฏิกิริยาโดยทำให้เป็นกลางด้วย sodium hydroxide เข้มข้น 6 M.

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้คือเวลา แปรเป็น 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง

เลือกภาวะที่ดีที่สุดโดยการวิเคราะห์ค่าต่อไปนี้

- ค่า DH เช่นเดียวกับข้อ 3.2.1

- คะแนนการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงกลิ่นของโปรตีนไฮโดรไลเซท

3.4.1 โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยสลายด้วยสารละลายเอนไซม์ ตามภาวะที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.2.2 เติม activated carbon powder ตามปริมาณที่กำหนด เขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C ใช้ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 6

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้ ได้แก่

- ชนิดของน้ำนึ่งปลาทูน่า พันธุ์ skipjack และพันธุ์รวม

- ปริมาณ activated carbon powder ใช้ 0.01 และ 0.02 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

- เวลาในการดูดซับสารที่ให้กลิ่นไม่ดี แปรเป็น 30 และ 60 นาที

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกภาวะที่ดีที่สุดคือ คะแนนการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัส เช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Symmetric Factorial Experiment ขนาด 2x2x2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.2 โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายด้วยกรดเกลือ

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยสลายด้วยกรดเกลือตามภาวะที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.3.2 เติม activated carbon powder ตามปริมาณที่กำหนด เขย่าใน shaking water bath ที่อุณหภูมิ 50 °C ใช้ความเร็ว 125 รอบต่อนาที ตามเวลาที่กำหนด จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 6

ตัวแปรที่ศึกษา การประเมินผล การวางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้วิธีเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1

3.5 <u>การทำโปรตีนไฮโดรไลเซทให้เข้มข้น</u>

ศึกษาการทำให้เข้มข้น โดยเตรียมตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท ตามภาวะที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.4.1 และ 3.4.2 ระเหยน้ำออกโดยใช้เครื่อง vacuum rotary evaporator ที่ความเร็ว 240 รอบต่อนาที จนผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความเข้มข้น 65° Brix นำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาทดสอบทางประสาทสัมผัสเปรียบเทียบกับ Skipjack Extract ®

ตัวแปรที่ศึกษาในขั้นตอนนี้คือ อุณหภูมิ แปรเป็น 50 และ 60 ° C

เกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกภาวะที่ดีที่สุดคือ คะแนนการทดสอบผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

3.6 <u>วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นเปรียบเทียบกับ Skipjack Extract ®</u>

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตตามภาวะดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.5 เปรียบเทียบกับ Skipjack Extract ® สมบัติที่วิเคราะห์ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณไขมัน ปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้าทั้งหมด และปริมาณเกลือ (ตามวิธีในข้อ 3.1)

3.7 การใช้ประโยชน์โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้

3.7.1 ศึกษาปริมาณที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทตัวอย่างที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.4.1 และข้อ 3.4.2 ทำให้เข้มข้นตามภาวะที่ดีที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 5 เติมลงในผลิตภัณฑ์แซนด์วิชปลาทูน่า ปริมาณ 0, 1.5, 2.5 และ 3.5 % โดยน้ำหนัก

เกณฑ์ที่ใช้ในการประเมินผลคือ คะแนนการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยตรวจสอบลักษณะด้านกลิ่นและรสชาติ ใช้ผู้ทดสอบชนิดผู้บริโภคทั่วไปจำนวน 20 คน ใช้วิธีทดสอบแบบ 9-point hedonic scale โดย 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด (แบบทดสอบแสดงดังภาคผนวก ค.2)

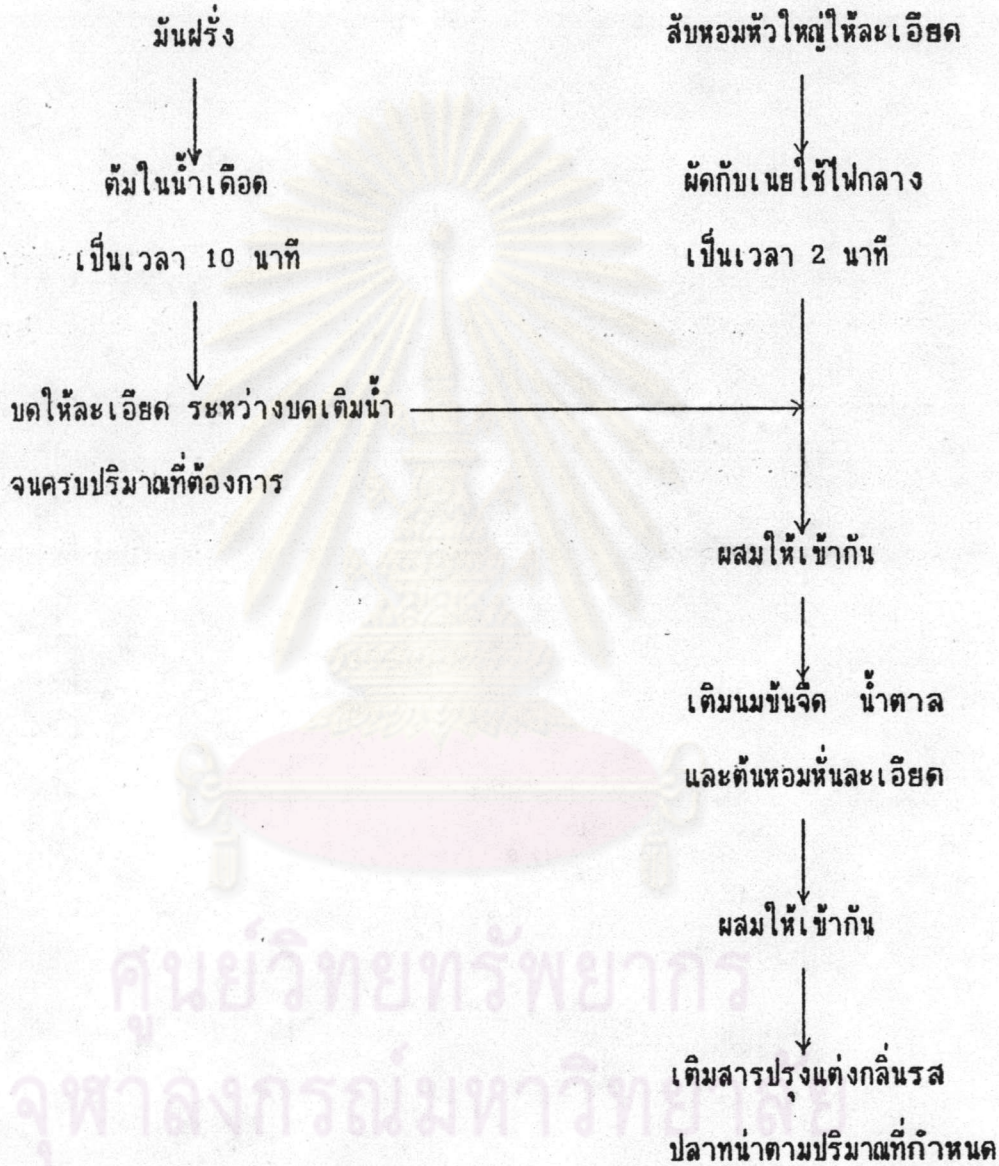
วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ทดลองสองซ้ำ

ส่วนประกอบของแซนด์วิชปลาทูน่าซึ่งดัดแปลงจากสูตรของ ศรีสมร (2532) มีดังนี้

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
มันฝรั่ง	76.0
น้ำ	16.0
นมข้นจืด	3.0
น้ำตาล	2.0
ต้นหอม	1.5
หอมหัวใหญ่	1.0
เนย	0.5
โปรตีนไฮโดรไลเซท	

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีผลิตแชนด์วิชปลาทูน่ามีรายละเอียดตามแผนภูมิต่อไปนี้



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.2 เปรียบเทียบคุณภาพโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้กับ Skipjack Extract ®

เปรียบเทียบคุณภาพด้านการใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกรดเกลือกับ Skipjack Extract ® เติมโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นแต่ละตัวอย่างในปริมาณเหมาะสมที่สุดที่สรุปได้จากข้อ 3.7.1 และเติม Skipjack Extract ® ปริมาณ 2.5 % โดยน้ำหนัก ในแซนด์วิชปลาทูน่า ทดสอบคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติเปรียบเทียบกับตัวอย่างแซนด์วิชที่ไม่ได้เติมโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Randomized Complete Block Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan ´s New Multiple Range test ทดลองสองซ้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย