บทที่ 3

การทดลอง

วัตถุดิบ

ถั่วเขียว (สายพันธุ์ *Vigna radiata* ; ถั่วเขียวธรรมดาหรือถั่วเขียวเมล็ดด้าน)

เอนไซม์

โบรมีเลน (EC 3.4.22.4) : Sigma Lot 81HO527

From Pineapple stem

Contains approx. 50% Protein (Biuret)

2290 Units / g solid

3650 Units / g protein

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

Sulfuric acid	A.R.
Boric acid	A.R.
Hydrochloric acid	A.R.
Potassium hydrogenphthalate	A.R.
Methyl red	A.R
Methyllene blue	A.R
Kjeltabs	A.R
Petroleum ether	A.R

สารเคมีที่ใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่าง

Hydrochloric acid	A.R

Sodium hydroxide	A.R

สารเคมีที่ใช้ในกระบวนการผลิตและวัดระดับการย่อยสลาย

Trichloroacetic acid	A.R
Carboxymethylcellulose	A.R
Dry ice	Commercial grade
Alcohol 95%	Commercial grade
Egg albumen	Food grade

<u>อุปกรณ์</u>

เครื่องชั่งหยาบ ทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius type 1518)

เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Mettler Toledo AB 204)

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Horiba, pH Meter F-21)

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Varifuge K, Heraeus Christ)

ชุดวิเคราะห์โปรตีน (Kjeldatherm and Vapodest 1, Gerhardt, KT85)

ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Gerhardt Soxtherm Automatic)

เตาเผา (Isotemp® Muffle Furnace , Fisher Scientific)

เครื่องระเหยแบบหมุน (Eyela New Rotary Vacuum Evaporator NE)

ตู้อบลมร้อน (WTB Binder, Hot Air Oven)

เตาให้ความร้อน (Hot Plate)

เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Sartorius, Moisture Analyzer MA 30)

เครื่องโม่หิน (Stone Mill)

ชุดเครื่องร่อน(Type Vibro, Retsch)

เครื่องตีไข่ (Phillip)

เครื่องกวน (Agimatic – N)

เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Yamato Freeze – Dryer, Model DC-35)

รีเฟรคโตมิเตอร์ (Atago 1A ,Refractometer)

เตาอบ (Teba)

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.1 การเตรียมและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

3.1.1 การสกัดโปรตีนถั่วเขียว (ดัดแปลงจากวิธีของ Thompson, 1977)

นำถั่วเขียวมาทำความสะอาดแยกกรวด หิน ดิน ทรายออก บดให้ละเอียดด้วยเครื่องโม่หิน (Stone mill) และร่อนผ่านตะแกรงขนาด 70 เมช ส่วนที่ผ่านตะแกรงเรียกว่าแป้งถั่วเขียว จากนั้นนำแป้งถั่วเขียวที่เตรียมได้ มาละลายในน้ำกลั่นด้วยอัตราส่วนแป้งถั่วเขียวต่อน้ำกลั่น 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย 1N NaOH ที่ pH 9 กวนนาน 20 นาที จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกตะกอนออกด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบ/นาที นาน 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำส่วนใสมาปรับ pH เป็น 4.48-4.50 ด้วยสารละลายของ 1N HCl และนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เก็บส่วนตะกอนที่ได้นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วนตะกอนโปรตีนสกัดต่อน้ำกลั่น 1:15 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 2 รอบ โดยใช้ความเร็วรอบและเวลาในการเหวี่ยงแยกตะกอนเท่าเดิม ส่วนของตะกอนที่ได้นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ความชื้น ด้วยเครื่องวิเคราะห์ความชื้น

3.1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

โดยนำตะกอนโปรตีนที่สกัดได้ จากข้อ 3.1.1 มาละลายในน้ำกลั่นความเข้มข้น10 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับ pH เป็น 7.0 จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง และวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ดังนี้

3.1.2.1 ความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.1)

3.1.2.2 โปรตีน ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.2)

3.1.2.3 ไขมัน ตามวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.3)

3.1.2.4 เถ้า ตามวิธีการของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก.4)

3.1.2.5 คาร์โบไฮเดรต ได้จากการนำปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า มารวมกัน แล้วลบออกจาก องค์ประกอบรวมทั้งหมด ซึ่งกำหนดให้เป็น 100 เปอร์เซ็นต์

3.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตสารให้ฟองจากโปรตีนถั่วเขียวสกัดโดยการย่อยสลายอย่างจำกัดด้วยเอนไซม์โบรมีเลน

3.2.1 ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวสกัดที่ให้ค่ากำลังการเกิดฟองสูงสุด

โดยการทดลองแปรความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนถั่วเขียวที่สกัดได้ เป็นร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปรับ pH 7.0 ด้วย 1N NaOH กวนจนละลาย

ประเมินผลการทดลองโดย คำนวณค่ากำลังการเกิดฟอง ตามวิธีของ Coffmann และ Gracia (1977) (ภาคผนวก ก.7.1)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan & New Multiple Range Test

3.2.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์โบรมีเลนในการย่อยสลายโปรตีนถั่วเขียวสกัด

ก. ศึกษาหา pH profile ของเอนไซม์โบรมีเลนเมื่อใช้โปรตีนถั่วเขียวสกัด เป็นสับสเตรท กำหนดให้อัตราส่วนของ E/S เป็น 1/200 เท่า โดยเติมเอนไซม์เข้มข้น 0.5 mg/100mg ของโปรตีนสกัด (0.5 % w/w ของโปรตีนสกัด) ย่อยสลายโปรตีนถั่วเขียวสกัด (เตรียมโปรตีนถั่วเขียวสกัดตามความเข้มข้นที่เลือกได้จากข้อ 3.2.1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร อุณหภูมิขณะย่อย 40 ^{0}C แปร pH 5, 6, 7 และ 8 กวนตลอดเวลา เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน 90 ^{0}C นาน 10 นาที ทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิ 25 ^{0}C

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TCA Index ตามวิธีของ Kim, Park, and Rhee (1990) (ภาคผนวก ก.5)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan & New Multiple Range Test

ข. **ศึกษาหา** Temperature profile ของเอนไซม์โบรมีเลนเมื่อใช้โปรตีนถั่วเขียวสกัดเป็นสับสเตรท โดยกำหนดให้อัตราส่วนของ E/S เป็น 1/200 เท่า เติมเอนไซม์ 0.5 mg/100 ของโปรตีนสกัด ย่อยสลายโปรตีนถั่วเขียวที่สกัดได้ (เตรียมโปรตีนถั่วเขียวสกัดตามความเข้มข้นที่เลือกได้จากข้อ 3.2.1) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเลือก pH ที่ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดจากข้อ 3.2.2.ก แปรอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 35, 45, 55, 60, 65, 70และ75 องศาเซลเซียส เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที และยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ทำให้อุณหภูมิลดลงถึง 25 องศาเซลเซียส

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TCA Index ตามวิธีของKim et al. (1990) (ภาคผนวก ก.5)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

ค. **ศึกษาหาอัตราส่วนของ E/S ที่เหมาะสม** โดยการกำหนดให้ความเข้มข้นของสับสเตรทตามที่เลือกได้จากข้อ 3.2.1 ควบคุม pH และอุณหภูมิ ตามที่เลือกได้จากการทดลองในข้อ 3.2.2. ก และ 3.2.2.ข ตามลำดับ จากนั้นทำลองแปรอัตราส่วนของ E/S โดยแปรการเติมเอนไซม์เข้มข้น 0.5, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 และ 2.00 mg/100mg ของโปรตีนสกัด ตามลำดับ เวลาในการทำปฏิกิริยา 30 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ 90 องศาเซลเซียส นาน10 นาที ลดอุณหภูมิลงถึง 25 องศาเซลเซียส

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TCA Indexตามวิธีของ Kim et al. (1990) (ภาคผนวก ก.5)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 2 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

3.2.3 ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลายและปริมาณ Nitrogen solubility ต่อเวลาในการย่อยสลาย

ย่อยสลายโปรตีนถั่วเขียวสกัด ตามความเข้มข้นตามที่เลือกจากข้อ 3.2.1 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ภายใต้สภาวะที่ควบคุม pH อุณหภูมิ และ E/S ตามข้อ 3.2.2 ก, 3.2.2. ข และ 3.2.2. ค ตามลำดับ แปรเวลาในการย่อยเป็น 0, 2, 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อนอุณหภูมิ 90 ^{0}C นาน 10 นาที ทำให้เย็น 25 ^{0}C

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TCA Index ตามวิธีของ Kim et al. (1990) (ภาคผนวก ก.5) และปริมาณ Nitrogen solubility (ภาคผนวก ก.6)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

3.2.4.การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการผลิตสารให้ฟองจากโปรตีนถั่วเขียวสกัดโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมีเลน

ย่อยสลายโปรตีนถั่วเขียวสกัด โดยใช้ความเข้มข้นตามที่เลือกจากข้อ 3.2.1 ภายใต้สภาวะที่ควบคุม pH อุณหภูมิ และ E/S ตามข้อ 3.2.2 ก, 3.2.2.ข และ 3.2.2.ค ตามลำดับ จากนั้นแปรเวลาในการย่อยเป็น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 นาที ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อน 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงถึง 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างไว้ 10 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายด้วยวิธี TCA Index ส่วนที่เหลือนำไปเหวี่ยงแยกส่วนของโปรตีนที่เสียสภาพออกด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปวัดปริมาณของแข็งด้วย รีเฟรคโตมิเตอร์และทำให้เข้มข้น 10 องศาบริกซ์ ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}C (ภาคผนวก ก.9) สุดท้ายนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) เก็บตัวอย่างในบรรจุภัณฑ์ที่ปิดสนิทและเก็บใน desiccator

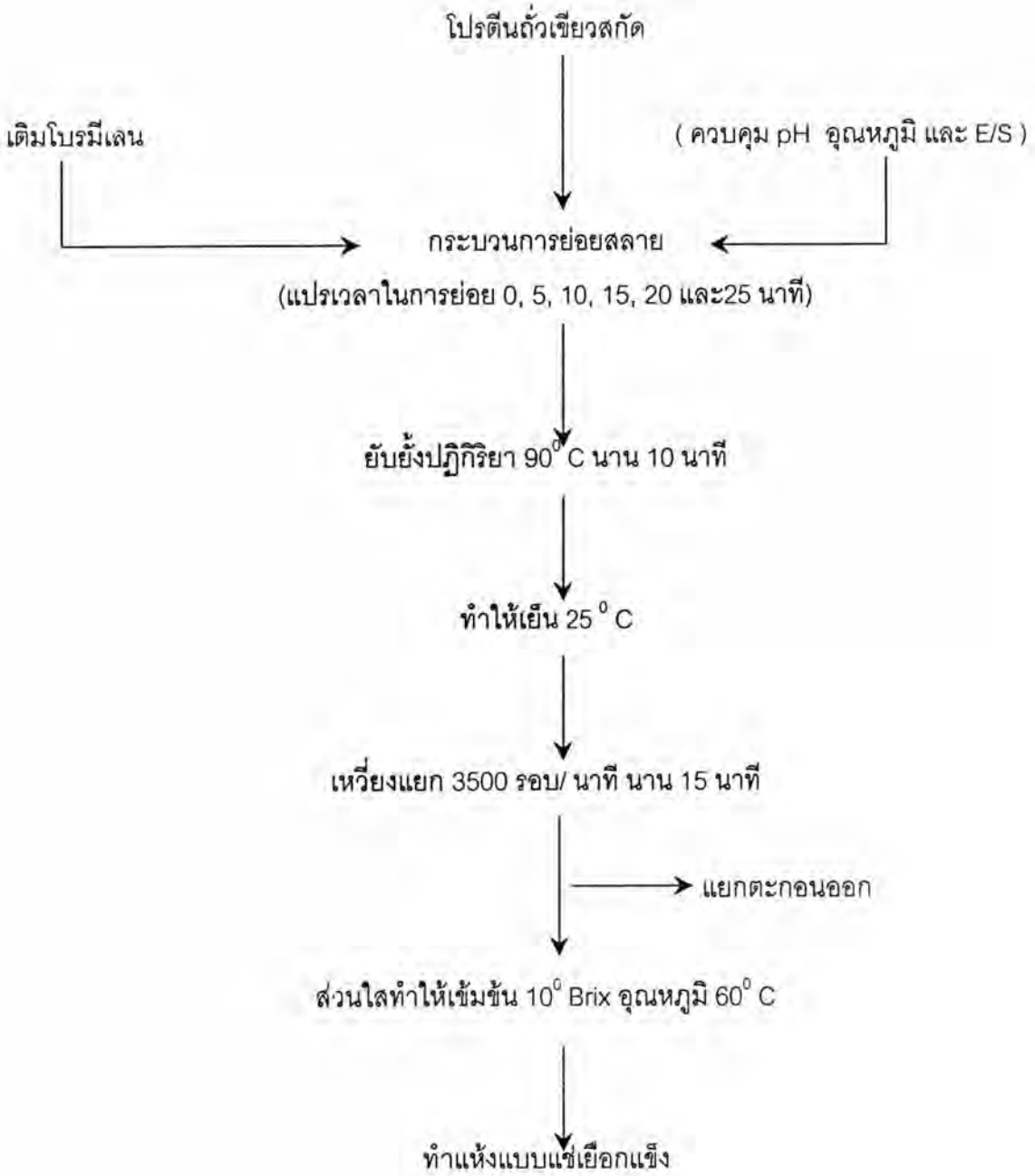
ประเมินผลการทดลองโดย

- วิเคราะห์ค่ากำลังการเกิดฟอง ตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977) (ภาคผนวก ก.7.1)
- ความคงตัวของฟอง โดยหาค่า เปอร์เซ็นต์ Drip loss ตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977)

(ภาคผนวก ก.7.2)

- Nitrogen solubility pH 4.5 ตามวิธีของ Were et al.,(1997) (ภาคผนวก ก.7.3)
- Nitrogen solubility p H 7.0 ตามวิธีของ Were et al.,(1997) (ภาคผนวก ก.7.3)

วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan & New Multiple Range Test



ภาพที่ 3.1 กระบวนการผลิตสารให้ฟองจากโปรตีนถั่วเขียวสกัดโดยการย่อยสลายอย่างจำกัดด้วยเอนไซม์โบรมีเลน

3.3 การศึกษาเปอร์เซ็นต์ของผลผลิต (%Yield)

ศึกษาหาเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตโดยการแปรความเข้มข้นของโปรตีนถั่วเขียวสกัดเป็นร้อยละ 2, 4, 6, 8, 10, และ 12 ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมีเลน โดยควบคุม pH อุณหภูมิ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และเวลาในการย่อยสลาย คงที่จากข้อ 3.2.2 ก, 3.2.2.ข, 3.2.2.ค และ 3.2.4 ตามลำดับ ยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90 ^{0}C นาน 10 นาที จากนั้นเหวี่ยงแยกด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปทำให้เข้มข้น 10 ^{0} Brix อุณหภูมิ 60 ^{0}C (ภาคผนวก ก.9) และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze drying) ชั่งน้ำหนักสารให้ฟองผงที่ผลิตได้

ประเมินผลการทดลองโดย คำนวณหาร้อยละของผลผลิต (ภาคผนวก ก.8)

วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

3.4 การศึกษาการเติม Carboxymethylcellulose (CMC) เพื่อเป็น stabilizer หรือเป็น co-drying ในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในการผลิตสารให้ฟอง

3.4.1 การศึกษาอิทธิพลของการเติม CMC ร่วมกับการให้ความร้อนต่อสมบัติของสารให้ฟองผง

ภาพที่ 3.2 ขั้นตอนการศึกษาอิทธิพลของการเติม CMC ร่วมกับการให้ความร้อน

ศึกษาอิทธิพลของการเติม CMC ร่วมกับการให้ความร้อน 85 ^{0}C เวลา 1-2 นาที โดยการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทตามขั้นตอนในภาพที่ 3.1 โดยควบคุม pH อุณหภูมิ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และเวลาในการย่อยสลาย คงที่จากข้อ 3.2.2 ก, 3.2.2.ข, 3.2.2.ค และ 3.2.4 จากนั้นทำการทดลองตามขั้นตอนในภาพที่ 3.2 สุดท้ายนำตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บตัวอย่าง

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ค่ากำลังการเกิดฟองตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977) (ภาคผนวก ก.7.1) และความคงตัวของฟองโดยวัดค่า Drip loss ตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977) (ภาคผนวก ก.7.2)

วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

3.4.2. การศึกษาหาปริมาณการเติม CMC ที่เหมาะสม

โดยการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น 10 ^{0}Brix ตามภาพที่ 3.1 โดยควบคุม pH อุณหภูมิ อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และเวลาในการย่อยสลาย คงที่จากข้อ 3.2.2 ก, 3.2.2.ข, 3.2.2.ค และ 3.2.4 แปรปริมาณการเติม CMC เป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 กรัม/100กรัมของโปรตีนไฮโดรไลเซท (dry basis) ร่วมกับการให้ความร้อน 85 ^{0}C เวลา 1-2 นาที ก่อนนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เก็บตัวอย่าง

ประเมินผลการทดลองโดย วิเคราะห์ค่ากำลังการเกิดฟอง ตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977) (ภาคผนวก ก.7.1) และความคงตัวของฟองโดยวัดค่า % Drip loss ตามวิธีของ Coffmann และ Garcia (1977) (ภาคผนวก ก.7.2)

วางแผนการทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ CRD ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test

3.5 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารให้ฟอง

ทำการผลิตสารให้ฟอง โดยควบคุมสภาวะและกระบวนการผลิตตามข้อ 3.2-3.4 ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของสารให้ฟองที่เตรียมได้ โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และคาร์โบไฮเดรท ตามวิธีในข้อ 3.1.2

3.6 ศึกษาการใช้ประโยชน์สารให้ฟองในผลิตภัณฑ์เบเกอรี

ทดสอบสมบัติในการเป็นสารให้ฟองในอาหาร โดยทดลองเติมในแองเจิลฟูดเค้ก ซึ่งมีส่วนผสมดังนี้

<u>ส่วนผสมแองเจิลฟูดเค้ก</u> (สูตรควบคุม)
(ดัดแปลงจากสูตรของจิตธนา แจ่มเมฆ และ อรอนงค์ นัยวิกุล, 2541)

<u>ส่วนผสม</u>	<u>ปริมาณ</u> (กรัม)
ไข่ขาวผง	3.08
น้ำตาลทรายผงละเอียด	13.88
เกลือ	0.15
ครีมออฟทาร์ทาร์	0.36
แป้งเค้ก	20.84
น้ำตาลทรายผงละเอียด	13.88
น้ำ	24.67

การผลิตแองเจิลฟูดเค้ก ทำโดย ละลายไข่ขาวผงกับน้ำตามสูตร ตีจนขึ้นฟอง ค่อยๆเติมน้ำตาลทรายผงละเอียด เกลือ และครีมออฟทาร์ทาร์ ตีจนตั้งยอดใช้เวลาในการตีประมาณ 3 นาที 30 วินาที จากนั้นร่อนแป้งเค้กกับน้ำตาลผงละเอียดลงไป ใช้พายกวนจนเข้ากันดี ตั้งใส่พิมพ์ปริมาณ 40 กรัม นำเข้าเตาอบอุณหภูมิ 175 ^{0}C นาน 20 นาที จากนั้นนำออกจากเตาอบ คว่ำพิมพ์ลงบนถาด ทิ้งไว้ให้เย็น จึงนำออกจากพิมพ์

การทดแทนไข่ขาวผงด้วยสารให้ฟองผงที่ผลิตได้

โดยการทดลองแทนไข่ขาวผงด้วยสารให้ฟองดังนี้ 1.55, 1.25, 0.95 และ 0.65 กรัม คิดเป็นปริมาณร้อยละ 2.07, 1.67, 1.27 และ 0.87 ตามลำดับ ทำการผลิตเช่นเดียวกับสูตรควบคุม

ประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์โดยการทดสอบทางประสาทสัมผัส ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 12 คน ทดลอง 1 ซ้ำ ใช้แบบทดสอบชนิด Multiple Comparison Test โดยให้ตัวเลขคะแนนแทนคำอธิบาย ดังนี้ คือไม่มีความแตกต่าง เท่ากับ 5 แข็งกว่า R มากพิเศษ เท่ากับ 9 และอ่อนกว่า R มากพิเศษ เท่ากับ 1(ภาคผนวก ข. 1)

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan ' & New Multiple Range Test