

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการทำการศึกษาวิจัย

วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์ทดสอบ

ผงทำให้เนื้อมูที่สุ่มซื้อมาจากห้างสรรพสินค้า 1 ตัวอย่าง และผงทำให้เนื้อมูซึ่งเตรียมขึ้นจากโปรตีนโอไลติกเอนไซม์ (ปาเปน) ในวิธีการทดลองนี้ 2 ตัวอย่าง

2. สารเคมี

- 2.1 Papain reference standard powder : มีค่าแอกติวิตี้ 30,000 ยูนิต (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย) เมษายน 2533
- 2.2 Anhydrous dibasic sodium phosphate : (May and Baker) Laboratory Grade
- 2.3 Citric acid monohydrate : (Univar) AR Grade
- 2.4 Hammerstein-type casien : (Sigma) Laboratory Grade
- 2.5 Disodium ethylenediaminetetraacetate : (May and Baker) Laboratory Grade
- 2.6 Trichloroacetic acid (Merck) AR Grade
- 2.7 Cysteine hydrochloride monohydrate : (Sigma) Laboratory Grade
- 2.8 Tricalcium basic phosphate : (Mallindrodt) AR Grade
- 2.9 Hydrochloric acid : (Merck) AR Grade
- 2.10 Sodium hydroxide : (Merck) AR Grade
- 2.11 Tween 65 : (Merck) AR Grade
- 2.12 Acetone : (J.T. Baker) AR Grade
- 2.13 Ethanol 95% : (โรงงานสุราอยุธยา) Laboratory Grade
- 2.14 Dextrose : (Riedel) Laboratory Grade

- 2.15 Corn starch : (Merck) Laboratory Grade
 2.16 Sodium chloride : (Merck) Laboratory Grade

3. เครื่องมือ

- 3.1 Analytical balance : (Sartorius) Model 2443
 3.2 UV Spectrophotometer : (Unicam) Model SP 1800
 3.3 Digital pH meter : (PHM) Model 64
 3.4 Tensile test interface : (Lloyd)
 3.5 Spray dryer : (Buchi) Model 190
 3.6 Freeze dryer : (Hetofrig) Model F 0680
 3.7 Automatic high speed refrigerator centrifuge : (Hitachi)
 Model 20 PR-52D
 3.8 Water bath : (Hotech) Model 905
 3.9 Hot air oven : (Mettler) Model 171627
 3.10 Vacuum hot air oven : (Ehret) Model VTS 70
 3.11 Dialysis tube : (Sigma) Model 49F-0104
 3.12 Vortex-gehi-2 : (Model G-S60E)
 3.13 Blender : (National) Model MX-311N

วิธีการวิจัย

1. การเก็บยางมะละกอ (สรวง จารุประกร, 2493)

การเก็บยางมะละกอ ทำในเดือนเมษายน 2533 ที่สวนมะละกอในจังหวัดนครปฐม นครนายก และ นครสวรรค์ โดยมีวิธีการเก็บดังนี้

- 1.1 ทำการเก็บรวบรวมยางมะละกอจากส่วนของผลมะละกอดิบที่แก่จัดแต่ยังไม่สุก และยังคงติดอยู่กับต้นในช่วงเวลา 7.00 นาฬิกา - 9.00 นาฬิกา
 1.2 ใช้มีดที่เป็นเหล็กกล้าไร้สนิม (Stainless steel) กรีดลงบนผิวของมะละกอดิบตามความยาวของผล ตรงบริเวณใกล้ขั้วที่ติดอยู่กับลำต้นมายังปลายอีกด้านหนึ่ง ให้รอยกรีดมีความลึกประมาณ 1 - 2 มิลลิเมตร ในแต่ละผลกรีดเพียง 3 - 4 รอยเท่านั้น

- 1.3 รongรับยางมะละกอด้วยถ้วยแก้วปากกว้างที่เตรียมไว้แล้ว ปลอยให้ยางไหลออก จากผลตามรอยกรีดนี้จนยางแห้งติดรอยกรีด ใช้มีดที่เป็นเหล็กกล้าไร้สนิมขูดคราบ ยางมะละกอกที่เกาะอยู่ที่ผลตามรอยกรีดนั้น นำมารวมกับยางที่กรีดได้ ปิดฝาแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส

2. การตกตะกอนปาเปนต์ิบจากยางมะละกอ

- 2.1 ชั่งน้ำหนักยางมะละกอ
- 2.2 เติมเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 3 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักยางมะละกอ 1 กรัม แล้วคน ให้เข้ากัน
- 2.3 นำสารละลายของยางมะละกอไปกรองอย่างรวดเร็วด้วย Buchner funnel โดยใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 (Whatman No 1)
- 2.4 นำตะกอนที่ได้มาละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ 95 % อีกครั้ง โดยใช้เอทิล แอลกอฮอล์ 95 % 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักยางมะละกอ 1 กรัมแล้วทำการกรอง เช่นเดียวกับข้อ 2.3
- 2.5 เทอะซีโตนลงบนตะกอนขณะที่ตะกอนยังคงอยู่บนกระดาษกรองใน Buchner funnel โดยใช้อะซีโตน 2 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักยางมะละกอ 1 กรัม ทำเช่นนี้ 2 ครั้ง
- 2.6 นำตะกอนมาเกลี่ยบนจานกระเบื้องบาง ๆ นำไปทำให้แห้งในตู้อบสูญญากาศ ใช้ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 4 - 5 ชั่วโมง
- 2.7 บดปาเปนต์ิบที่ได้ให้ละเอียด เก็บในขวดแก้วสีชา ปิดสนิท นำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ ประมาณ 0 องศาเซลเซียส

3. การสกัดปาเปนต์ิบจากปาเปนต์ิบ

- 3.1 ชั่งน้ำหนักปาเปนต์ิบ
- 3.2 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักปาเปนต์ิบ 1 กรัมและคนให้เข้ากัน
- 3.3 นำสารละลายของปาเปนต์ิบไปตั้งในเครื่องอังน้ำ (Water bath) อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที คนสารละลายบ่อย ๆ นำไปบรรจุในหลอด ไดอะลิซิส (Dialysis tube)
- 3.4 นำสารละลายของปาเปนต์ิบซึ่งบรรจุในหลอดไดอะลิซิสไปไว้ในเครื่องอังน้ำอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 3.5 นำสารละลายของปาเปนติบในข้อ 3.4 ไปหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) แยกเอาส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Automatic high speed refrigerator centrifuge) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000 เท่าของความถ่วง (Gravity) เป็นเวลา 15 นาที ปิดเอาส่วนที่เป็นสารละลายใสแยกเก็บไว้ในขวดแก้วสีชาปิดสนิท
- 3.6 ส่วนของสารละลายใสในข้อ 3.5 นำไปกำจัดน้ำออกให้หมด โดยใช้ Freeze dryer จนได้เป็นผงปาเปน
- 3.7 เก็บปาเปนในขวดแก้วสีชา ปิดสนิท แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 องศาเซลเซียส

4. วิเคราะห์หาค่าแอกติวิตีของปาเปนและปาเปนติบโดยวิธีของเกลส์คัมป์ U.S.P. XXII

4.1 สารเคมี

- 4.1.1 สารละลายเคซีน (Casein substrate) 1% : ชั่งเคซีน (Hammerstein type) 1 กรัมละลายใน 0.05 โมลาร์ ไคเบสิก โซเดียม ฟอสเฟต 50 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปตั้งในเครื่องอ่างน้ำอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที คนสารละลายบ่อย ๆ ตลอดเวลา ตั้งสารละลายทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมกรดซिटริก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ลงไปเพื่อปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 6.0 ± 0.1 ต้องคนสารละลายอย่างแรงตลอดเวลาจนได้พีเอชที่ต้องการ ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น (ต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกวัน)
- 4.1.2 สารละลายบัฟเฟอร์ : ชั่งแอนไฮดรัส ไคเบสิก ฟอสเฟต 3.55 กรัม ไคโซเดียม เอซีลีนไดแอมมีนเตตราอะซีเตต 7.0 กรัมและซีลเตอิน ไฮโดรคอรไรต์ โมโนไฮเดรต 3.05 กรัมละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ตามลำดับ -ปรับพีเอชสารละลายเป็น 6.0 ± 0.1 ด้วย กรดเกลือความเข้มข้น 1 นอร์มอล หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรของสารละลายให้เป็น 500 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น (ต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกวัน)
- 4.1.3 สารละลายของปาเปนมาตรฐาน : ชั่งปาเปนมาตรฐาน 100 มิลลิกรัม ใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปจนครบปริมาตร ปิดสารละลาย 2 มิลลิลิตร ออกมาใส่ขวดปริมาตร

50 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนครบปริมาตร สารละลายของ ปาเปนมาตรฐาน 1 มิลลิลิตรจะมีปาเปนมาตรฐาน 0.04 มิลลิกรัม (ต้องเตรียมสารละลายใหม่ทุกวัน)

- 4.1.4 สารละลายของปาเปนหรือปาเปนดิบที่ต้องการการหาค่าแอกติวิตี้ : ซึ่ง ปาเปนหรือปาเปนดิบที่ต้องการหาค่าแอกติวิตี้ให้มีน้ำหนักประมาณ 100 มิลลิกรัมใส่ขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ ปริมาตร ปิดสารละลาย 2 มิลลิลิตรออกมาใส่ขวดปริมาตร 50 มิลลิ- ลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนครบปริมาตร (ต้องเตรียมสารละลาย ใหม่ทุกวัน)

4.2 วิธีวิเคราะห์

- 4.2.1 นำหลอดทดลองขนาด 18 x 150 มิลลิลิตรมา 12 หลอด ปิดสาร ละลายเคซีน 5 มิลลิลิตรลงไปทุกหลอด นำไปไว้ในเครื่องย้งน้ำอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 5 ชุด โดยมีหลอดทดลองชุดละ 2 หลอด 4 ชุด และมีหลอดทดลองชุดละ 4 หลอด 1 ชุด
- 4.2.2 นำหลอดทดลองชุดที่ 1 ซึ่งมี 2 หลอดออกมาจากเครื่องย้งน้ำ เขียนที่ ข้างหลอดเป็น S_1 ปิดสารละลายของปาเปนมาตรฐานลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์หลอดละ 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำกลับไปไว้ในเครื่องย้งน้ำ จับเวลาเป็นเวลาเริ่มต้น
- 4.2.3 นำหลอดทดลองชุดที่ 2 ซึ่งมี 2 หลอดออกมาจากเครื่องย้งน้ำ เขียนที่ ข้างหลอดเป็น S_2 ปิดสารละลายของปาเปนมาตรฐานลงไปหลอดละ 1.5 มิลลิลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้ เข้ากัน นำกลับไปไว้ในเครื่องย้งน้ำ
- 4.2.4 นำหลอดทดลองชุดที่ 3 ซึ่งมี 2 หลอดออกมาจากเครื่องย้งน้ำ เขียนที่ ข้างหลอดเป็น S_3 ปิดสารละลายของปาเปนมาตรฐานลงไปหลอดละ 2 มิลลิลิตร นำกลับไปไว้ในเครื่องย้งน้ำ
- 4.2.5 นำหลอดทดลองชุดที่ 4 ซึ่งมี 2 หลอดออกมาจากเครื่องย้งน้ำ เขียนที่ ข้างหลอดเป็น U เติมสารละลายของปาเปนหรือปาเปนดิบที่ต้องการ หาค่าแอกติวิตี้ลงไปหลอดละ 1.5 มิลลิลิตรและสารละลายบัฟเฟอร์ หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำกลับไปไว้ในเครื่องย้งน้ำ

- 4.2.6 เมื่อครบเวลา 60 นาทีในแต่ละหลอด เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ลงไปในหลอดทดลองที่อยู่ในเครื่องอ้งน้ำทั้ง 12 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร เขย่าหลอดทดลองทุกหลอดอย่างแรง
- 4.2.7 นำหลอดทดลองชุดที่ 5 ซึ่งมี 4 หลอดออกมาจากเครื่องอ้งน้ำเตรียมเป็นหลอดทดลองที่ไร้สิ่งตัวอย่าง (Blank) โดยเติมสารต่าง ๆ ดังนี้
- หลอดที่ 1 เตรียมเป็นหลอดทดลองไร้สิ่งตัวอย่างสำหรับ S_1 โดยปิเปตสารละลายของปาเปนมาตรฐานไป 1 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร
- หลอดที่ 2 เตรียมเป็นหลอดทดลองไร้สิ่งตัวอย่าง สำหรับ S_2 โดยปิเปตสารละลายของปาเปนมาตรฐานลงไป 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร
- หลอดที่ 3 เตรียมเป็นหลอดทดลองไร้สิ่งตัวอย่างสำหรับ S_3 โดยปิเปตสารละลายของปาเปนมาตรฐานลงไป 2 มิลลิลิตร
- หลอดที่ 4 เตรียมเป็นหลอดทดลองไร้สิ่งตัวอย่างสำหรับ U โดยปิเปตสารละลายของปาเปนดิบที่ต้องการหาค่าแอกติวิตี้ลงไป 1.5 มิลลิลิตร และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดทดลองทั้ง 4 หลอดกลับไปไว้ในเครื่องอ้งน้ำอีก 20 - 40 นาที เพื่อให้ตกตะกอนเต็มที่
- 4.2.8 กรองสารละลายจากหลอดทดลองทั้ง 12 หลอด ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำสารละลายใส่ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Absorbances) ที่ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

4.3 การคำนวณค่าแอกติวิตี้ของปาเปนและปาเปนดิบ

จากค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านจากสารละลายที่เขียนข้างหลอดเป็น S_1 , S_2 และ S_3 กับค่าความเข้มข้นของปาเปนมาตรฐานในแต่ละหลอด นำมาเขียนกราฟมาตรฐาน เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่เขียนข้างหลอดเป็น U มาเทียบกับกราฟมาตรฐานจะทราบความเข้มข้นของปาเปนหรือปาเปนดิบที่ต้องการหาค่าแอกติวิตี้ในหลอด U แล้วคำนวณหาค่าแอกติวิตี้จากสูตร ดังต่อไปนี้

แอมป์คิตวีตี้ = DCA

- D = ค่าที่ได้จากการเจือจางปาเปนหรือปาเปนดิบที่ต้องการหาค่าแอมป์คิตวีตี้
 ดังนี้ $100(50/2)(10/1.5)$
- C = ความเข้มข้นของปาเปนดิบหรือปาเปนที่ต้องการหาค่าแอมป์คิตวีตี้ได้จาก
 กราฟมาตรฐาน
- A = ค่าแอมป์คิตวีตี้ของปาเปนมาตรฐาน

5. การสกัดน้ำมันหอมระเหย (Volatile oil) จากยี่หระ

- 5.1 บดยี่หระให้ละเอียด
- 5.2 ชั่งน้ำหนักผงยี่หระ แล้วนำไปบรรจุขวดแก้วทรงกลม
- 5.3 เติมน้ำกลั่นลงในขวดแก้วทรงกลมจำนวน 5 เท่าของน้ำหนักผงยี่หระ
- 5.4 กลั่นแยกน้ำมันหอมระเหยจากยี่หระโดย Toluene distillation apparatus
- 5.5 น้ำมันหอมระเหยที่ได้จะเติม Butylated hydroxyanisole (BHA)
 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำมันหอมระเหย 1 มิลลิลิตร
- 5.6 เก็บน้ำมันหอมระเหยในขวดแก้วสีชา ปิดสนิท ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 0 องศา
 เซลเซียส

6. การเตรียมผงทำให้เนื้อมูม

- 6.1 การเตรียมผงทำให้เนื้อมูมโดยนำปาเปนผสมกับส่วนประกอบอื่น ๆ โดยตรง

สูตรผงทำให้เนื้อมูม (Shirley et al., 1958)

ปาเปน	3.0	กรัม
โซเดียม คลอไรด์	195.0	กรัม
แป้งข้าวโพด	90.0	กรัม
เต็กซ์โตราล	4.5	กรัม
ผงชูรส	1.5	กรัม
ไตรแคลเซียม เบสิก ฟอสเฟต	3.0	กรัม
ผงยี่หระ	3.0	กรัม
รวม	300.0	กรัม

- 6.1.1 ชั่งปาเปน 3 กรัมละลายน้ำ 3 มิลลิลิตร
- 6.1.2 ชั่งโซเดียม คลอไรด์ 20 กรัมผสมกับสารละลายปาเปนในข้อ 1 โดยใช้
โกร่งเป็นส่วนที่ 1
- 6.1.3 ผสมโซเดียม คลอไรด์ 175 กรัม แบ่งข้าวโพด 20 กรัม เด็กซ์โตรส
4.5 กรัม ผงชูรส 1.5 กรัม ไตรแคลเซียม เบสิก ฟอสเฟต 3 กรัม
และผงยี่หระ 3 กรัม ให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้เครื่องปั่นน้ำผลไม้
(Blender) เป็นส่วนที่ 2
- 6.1.4 นำส่วนที่ 1 ผสมกับส่วนที่ 2 ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.1.5 นำส่วนผสมทั้งหมดไปอบในตู้อบสูญญากาศอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- 6.1.6 ภายหลังการขจัดความชื้น นำส่วนผสมที่ได้มาผสมกับแบ่งข้าวโพด 70
กรัม แล้วเก็บในขวดปิดสนิท
- 6.2 การเตรียมผงทำให้เนื้อมันโดยไมโครเอนแคปซูเลชันเทคนิคด้วยเครื่อง SPRAY
DRYER (U.K. Pat. 1535470, 1978)

สูตรผงทำให้เนื้อมัน

ปาเปน	3.0	กรัม
ทวิน 65 (Tween 65)	6.0	กรัม
น้ำมันหอมระเหยจากยี่หระ	3.0	กรัม
โซเดียม คลอไรด์	195.0	กรัม
แบ่งข้าวโพด	84.0	กรัม
เด็กซ์โตรส	4.5	กรัม
ผงชูรส	1.5	กรัม
ไตรแคลเซียม เบสิก ฟอสเฟต	3.0	กรัม
รวม	300.0	กรัม

- 6.2.1 ละลายทวิน 65 6 กรัมโดยใส่ทวิน 65 ลงในบีกเกอร์ แล้วจุ่มลงใน
เครื่องอ้งน้ำอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
- 6.2.2 ค่อย ๆ เติมน้ำมันหอมระเหยจากยี่หระ 3 กรัมลงในทวิน 65 ซึ่งละลาย
เป็นของเหลวแล้ว คนตลอดเวลา เพื่อให้ได้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- 6.2.3 ละลายปาเปน 3 กรัมในน้ำ 3 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เทผสมลงในส่วนผสม
ของน้ำมันหอมระเหยกับทวิน 65 คนให้เข้ากัน เป็นส่วนที่ 1

- 6.2.4 ละลายโซเดียมคลอไรด์ 195 กรัม เด็กซ์โตรส 4.5 กรัม ผงชูรส 1.5 กรัมในน้ำ 300 มิลลิลิตร แล้วเติมแป้งข้าวโพด 84 กรัม และ ไตรแคลเซียม เบสิก ฟอสเฟต 3 กรัมลงไป คนให้เข้ากัน เป็นส่วนที่ 2
- 6.2.5 นำส่วนที่ 1 ค่อย ๆ เทลงในส่วนที่ 2 คนอย่างแรงให้ทั้ง 2 ส่วนเข้ากันได้ดี
- 6.2.6 นำสารละลายทั้งหมดไปกำจัดน้ำออกโดยเครื่อง Spray dryer ใช้ Inlet 140 องศาเซลเซียส Outlet 80 องศาเซลเซียส อัตราการไหล (Flow rate) 4 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที
- 6.2.7 เก็บผงทำให้เนือมนุ่มที่ได้ในขวดปิดสนิท
7. ตั้งผงทำให้เนือมนุ่มที่เตรียมขึ้น และผงทำให้เนือมนุ่มที่ซื้อมาจากห้างสรรพสินค้า ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 3 เดือน
8. การทดสอบประสิทธิภาพของเอนไซม์ปาเปน
- 8.1 ประเมินผลการสกัดปาเปนจากปาเปนดิบ โดยพิจารณาเปรียบเทียบกับค่าแอกติวิตีของปาเปนที่สกัดได้กับค่าแอกติวิตีของปาเปนดิบ
- 8.2 ประเมินแอกติวิตีของปาเปนในการย่อยเนื้อ
- 8.2.1 นำปาเปนที่สกัดได้เติมลงในเนื้อซึ่งตัดตามขวางของกล้ามเนื้อ มีความหนาของเนื้อประมาณ 0.5 เซนติเมตร ความกว้าง 3 เซนติเมตร และความยาว 7 เซนติเมตร ใช้ปาเปนต่าง ๆ กัน 5 ชนิด ดังนี้
- | |
|--|
| ปาเปน 30 มิลลิกรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม |
| ปาเปน 60 มิลลิกรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม |
| ปาเปน 90 มิลลิกรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม |
| ปาเปน 120 มิลลิกรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม |
| ปาเปน 150 มิลลิกรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม |
- โดยมีเนื้อที่ไม่ได้เติมปาเปนเป็นตัวเปรียบเทียบ
- 8.2.2 เตรียมสารละลายปาเปน โดยนำปาเปนมาละลายด้วยน้ำ ใช้ปาเปน 1 กรัมละลายน้ำ 50 มิลลิลิตร
- 8.2.3 ปิเปตสารละลายปาเปน ใส่ลงในเนื้อ คลุกสารละลายปาเปนให้กระจายทั่วชิ้นเนื้อ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 8.2.4 เติมน้ำ 300 มิลลิลิตรลงในบีกเกอร์ นำไปตั้งในเครื่องอังน้ำ จนน้ำในบีกเกอร์เดือด

- 8.2.5 ใส่เนื้อที่คลุกสารละลายยาเป็นเรียบร้อยแล้วลงในบีกเกอร์ เป็นเวลา 6 นาที จึงนำเนื้อขึ้นจากบีกเกอร์ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- 8.2.6 นำเนื้อไปวัดค่าแรงกดเฉือน โดยใช้เครื่อง Tensile test interface ซึ่งเป็นการวัดแรงที่กระทำต่อเนื้อ เพื่อให้เนื้อขาดจากกัน ค่าของแรงดังกล่าวมีหน่วยวัดเป็นนิวตัน (Newton)
- 8.2.7 เปรียบเทียบค่าแรงกดเฉือน ที่กระทำต่อเนื้อซึ่งเติมยาเป็นในปริมาณต่าง ๆ กัน
- 8.3 ประเมินแอ็คติวิตี้ของผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้นและที่ซื้อมาในการย่อยเนื้อ
- 8.3.1 นำผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้นในวิธีการต่างกันทั้ง 2 วิธีและผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซื้อมาเติมในเนื้อซึ่งได้มาจากการตัดเนื้อตามขวางของกล้ามเนื้อ มีความหนา 0.5 เซนติเมตร ความกว้าง 3 เซนติเมตร และความยาว 7 เซนติเมตร
- 8.3.2 ผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้นซึ่งเติมลงในเนื้อจะมีปริมาณต่าง ๆ กัน 3 ขนาด คือ
- | | | |
|------------------|--------------------|----------|
| ผงทำให้เนื้อนุ่ม | 1 กรัมต่อเนื้อหนัก | 100 กรัม |
| ผงทำให้เนื้อนุ่ม | 3 กรัมต่อเนื้อหนัก | 100 กรัม |
| ผงทำให้เนื้อนุ่ม | 5 กรัมต่อเนื้อหนัก | 100 กรัม |
- ผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซื้อมาเติมลงในเนื้อ โดยใช้ผงทำให้เนื้อนุ่ม 15 กรัมต่อเนื้อหนัก 100 กรัม (ตามขนาดที่บ่งใช้ในฉลาก) มีเนื้อที่ไม่เติมผงทำให้เนื้อนุ่มเป็นตัวเปรียบเทียบ คลุกผงทำให้เนื้อนุ่มให้กระจายทั่วชิ้นเนื้อ ตั้งทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง
- 8.3.3 นำเนื้อทั้งหมดไปอบในเตาอบซึ่งใช้ก๊าซเป็นเชื้อเพลิง ที่อุณหภูมิ 165 องศาเซลเซียส 20 นาที จากนั้นนำออกจากเตาอบมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น
- 8.3.4 นำเนื้อที่ผ่านการอบแล้วไปทดสอบคุณภาพของเนื้อในส่วนของความนุ่ม กลิ่น รส ลักษณะภายนอกของเนื้อ และความชอบโดยการเคี้ยวสัมผัส (Ruth, 1962) ซึ่งทำการตรวจสอบโดยให้เป็นคะแนน (Score test) โดยผู้ให้คะแนนอย่างน้อย 15 คน ตามแบบฟอร์มในตารางที่ 21 (ภาคผนวก ง)
- 8.3.5 นำเนื้อที่ผ่านการอบไปวัดค่าแรงกดเฉือนของเนื้อโดยเครื่อง Tensile test interface ซึ่งวัดแรงที่กระทำต่อเนื้อเพื่อให้เนื้อขาดจากกันมีค่าเป็นนิวตัน
- 8.3.6 เปรียบเทียบค่าแรงกดเฉือน ที่กระทำต่อเนื้อซึ่งเติมผงทำให้เนื้อนุ่มชนิดต่าง ๆ

8.4 เปรียบเทียบค่าแอสติทิซของผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซื้อมากับผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้น
เมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องทุก ๆ 15 วันจนครบ 3 เดือน วันที่เตรียมผงทำให้เนื้อ
นุ่มสำเร็จเป็นวันเริ่มต้น

8.4.1 วิธีวิเคราะห์หาค่าแอสติทิซของผงทำให้เนื้อนุ่ม

8.4.1.1 สารละลายของปาเปนมาตรฐาน : ซึ่งปาเปนมาตรฐาน
 100 มิลลิกรัมใส่ในขวดปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมสาร
 ละลายบัฟเฟอร์ลงไปจนครบปริมาตร ปิเปตสารละลาย 2
 มิลลิลิตรออกมาใส่ในขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสาร
 ละลายบัฟเฟอร์จนครบปริมาตร

8.4.1.2 สารละลายของผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้นและต้องการหาค่า
 แอสติทิซ : ซึ่งผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้น 5 กรัมใส่ใน
 ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปจน
 ครบปริมาตร ปิเปตสารละลาย 2 มิลลิลิตรออกมาใส่
 ขวดปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์จนครบ
 ปริมาตร

8.4.1.3 สารละลายของผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซื้อ มา และต้องการหาค่า
 แอสติทิซ : ซึ่งผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซื้อ มา 7 กรัมใส่ในขวด
 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ลงไปจนครบ
 ปริมาตร เขย่าให้ละลายจนหมด

8.4.1.4 วิธีวิเคราะห์หาค่าแอสติทิซของผงทำให้เนื้อนุ่ม ทำตาม
 วิธีวิเคราะห์ในข้อ 4.2 แต่ในการทำกราฟมาตรฐานของ
 การวิเคราะห์ในครั้งนี้ จะเพิ่มหลอดทดลองที่เขียนข้าง
 หลอดว่า S ขึ้นมาอีก 2 หลอดโดยจะเติมสารละลายของ
 ปาเปนมาตรฐานลงไปหลอดละ 0.3 มิลลิลิตร และสาร
 ละลายบัฟเฟอร์หลอดละ 1.7 มิลลิลิตร ในส่วนของหลอดที่
 เขียนข้างหลอดเป็น U จะเปลี่ยนเป็นเขียนข้างหลอดว่า M_1
 หรือ M_2 หรือ M_3 อย่างละ 3 หลอดโดย
 M_1 ได้จากปิเปตสารละลายของผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมโดย
 การผสมปาเปนกับส่วนผสมอื่น ๆ โดยตรงลงไป 2 มิลลิ
 ลิตร

M_2 ได้จากปิเปตสารละลายของผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมโดย
ไมโคร เอนแคปซูเลชั่นเทคนิคด้วยเครื่อง SPRAY DRYER
ลงไป 2 มิลลิลิตร

M_3 ได้จากปิเปตสารละลายของผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซึ่้อมาลงไป
2 มิลลิลิตร

8.4.2 การคำนวณค่าแอ็คติวิตี้ของผงทำให้เนื้อนุ่ม

จากค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านจากสารละลายใสของหลอดทดลองที่เขียน
ข้างหลอดเป็น S S_1 S_2 และ S_3 กับค่าความเข้มข้นของปาเปนมาตรฐานในแต่ละหลอด
นำมาเขียนกราฟมาตรฐานขึ้น เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่เขียนข้างหลอดเป็น M_1
 M_2 และ M_3 แต่ละหลอดมาเทียบในกราฟมาตรฐาน จะทราบความเข้มข้นของปาเปนในผง
ทำให้เนื้อนุ่มแต่ละหลอด แล้วนำมาคำนวณหาค่าแอ็คติวิตี้ของผงทำให้เนื้อนุ่มจากสูตร

$$\text{แอ็คติวิตี้} = DCA/M$$

- D = ค่าที่ได้จากการเจือจางผงทำให้เนื้อนุ่มที่ต้องการหาค่าแอ็คติวิตี้ โดย
เป็นการเจือจางผงทำให้เนื้อนุ่มที่เตรียมขึ้นจะมีค่ามาจาก 50 (50/2)
(10/2) และถ้าเป็นการเจือจางผงทำให้เนื้อนุ่มที่ซึ่้อมาจะเป็น 50(10/2)
- C = ความเข้มข้นของปาเปนในผงทำให้เนื้อนุ่มจากกราฟมาตรฐาน
- A = ค่าแอ็คติวิตี้ของปาเปนมาตรฐาน
- M = น้ำหนักเป็นมิลลิกรัมของผงทำให้เนื้อนุ่มในสารละลายของผงทำให้เนื้อ
นุ่มที่ต้องการหาค่าแอ็คติวิตี้

9. การวิเคราะห์ข้อมูลและการทดสอบทางสถิติ (เต็มศรี ชำนิจารกิจ, 2531 : วัชรินทร์ สุริยาภิวัฒน์, 2529)
- 9.1 นำคะแนนที่ได้จากการประเมินผลโดยประสาทสัมผัสมาวิเคราะห์ทางสถิติ ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One - Way Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคะแนนโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test
- 9.2 เปรียบเทียบผลที่ได้จากค่าแรงกดเดือนที่มีต่อเนื้อเมื่อเติมผงทำให้เนื้อม้วนทั้ง 3 ชนิดโดยวิเคราะห์ทางสถิติความแปรปรวนแบบทางเดียวและเปรียบเทียบค่าแรงกดเดือนเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test
- 9.3 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ค่าแอ็คติวิตีของผงทำให้เนื้อม้วนทั้ง 3 ชนิด เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน 60 วัน และ 90 วัน