บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ กากถั่วเหลืองซึ่งเป็นส่วนเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำมันพืชของบริษัท ธนากรผลิตภัณฑ์น้ำมันพืช จำกัด มีลักษณะเป็นกากที่ค่อนข้างหยาบ นำมาบดลดขนาดด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้า และกากถั่วส่วนที่เป็นโปรตีนถั่วเขียวซึ่งเป็นส่วนเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตวุ้นเส้นของ บริษัท ไทยวา จำกัด (มหาชน) มีลักษณะเป็นกากที่ค่อนข้างละเอียดกว่ากากถั่วเหลืองจึงไม่ต้องบดลดขนาดอีก นำวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด มาร่อนผ่านตะแกรงขนาด 25 mesh เพื่อให้วัตถุดิบเริ่มต้นมีขนาดใกล้เคียงกันมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 4.1 จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ และทดลองตามขั้นตอนต่างๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่ว

5.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ปริมาณกรดอะมิโนและตรวจหาอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบ

5.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากถั่วเหลือง และโปรตีนถั่วเขียว

กากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียวที่ใช้ในงานวิจัยนี้ เป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำมันพืชและโรงงานอุตสาหกรรมวุ้นเส้น ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (ตารางที่ 4.1) พบว่า กากถั่วเหลืองมีปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมันอยู่ 10.56, 49.16 และ 0.56% โดยน้ำหนักเปียกตามลำดับ เมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้งจะมีโปรตีนและไขมันอยู่ 54.96% และ 0.63% ตามลำดับ ส่วนโปรตีนถั่วเขียวมีความชื้น โปรตีน และไขมันอยู่ 7.34, 78.51 และ 2.54% โดยน้ำหนักเปียกตามลำดับ เมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้งจะมีโปรตีนและไขมันอยู่ 84.73 และ 2.74% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกากถั่วเหลือง และโปรตีนถั่วเขียวที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำซอสปรุงรสในงานวิจัยของ อรสา สุริยาพันธ์ (2531) โดยกากถั่วเหลืองที่ใช้ผลิตซอสมีโปรตีน 52.29% และมีไขมัน 0.96% โดยน้ำหนักแห้ง ส่วนโปรตีนถั่วเขียวที่ใช้ในงานวิจัยของอรสา สุริยาพันธ์ (2531) มีโปรตีนอยู่ 82.74% และมีไขมันอยู่ 0.39%โดยน้ำหนัก

แห้ง จะเห็นได้ว่า โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ มีปริมาณมากกว่าองค์ประกอบทางเคมีอื่นๆ ดังนั้น ทั้งกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียว จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่ว ส่วนไขมันเป็นองค์ประกอบที่มีปริมาณน้อยในวัตถุดิบ โดยเฉพาะในกากถั่วเหลืองมีปริมาณน้อยมาก ซึ่งจุดนี้เป็นผลดีต่อการย่อยสลายโปรตีน เพราะถ้ามีไขมันอยู่มาก ไขมันจะรวมตัวกับโปรตีน เกิดลักษณะโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นและซับซ้อน ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลายโปรตีน (Roach และ Gehrke, 1970) การที่ในโปรตีนถั่วเขียวมีโปรตีนมากกว่าในกากถั่วเหลืองมากนั้น ก็เนื่องมาจากโปรตีนถั่วเขียวเป็นผลที่ได้จากการนำน้ำโปรตีนที่เหลือจากการแยกแป้งไปทำวุ้นเส้น มาตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดเกลือ ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้โปรตีนตกตะกอนลงมาในการผลิต protein concentrate (สมชาย จอมดวง,2528) การที่โปรตีนตกตะกอนลงมาเป็นเพราะที่ช่วง pH 4-5 ซึ่งเป็น Isoelectric region โปรตีนจะเกิดการละลายได้น้อยที่สุด (Shehata และคณะ, 1981)

สำหรับลักษณะทางกายภาพ โปรตีนถั่วเขียวที่ได้จากโรงงานผลิตวุ้นเส้นจะมีกลิ่นฉุน มีสีคล้ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากทางโรงงานเก็บโปรตีนถั่วเขียวในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น เก็บในที่อับอากาศถ่ายเทไม่สะดวก เป็นต้น ของผสมระหว่างโปรตีนถั่วเขียวกับน้ำในอัตราส่วนกากบ่นะน้ำเท่ากับ 1:9 มี pH อยู่ในช่วง 4.88-4.91 ซึ่งค่อนข้างเป็นกรด ส่วนกากถั่วเหลืองจะมีกลิ่นคล้ายถั่วที่ถูกความร้อนและมีสีเหลืองอ่อน ของผสมระหว่างกากถั่วเหลืองกับน้ำในอัตราส่วนกากบ่นะน้ำ เท่ากับ 1:9 มี pH อยู่ในช่วง 6.32-6.38

5.1.2 วิเคราะห์กรดอะมิโนในกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียว

จากผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.2) พบว่า กรดอะมิโนที่มีค่อนข้างมากในกากถั่วเหลือง ได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, leucine,serine, lysine และ proline ซึ่งกรดอะมิโน glutamic acid และ aspartic acid จะมีรสเปรี้ยว กรดอะมิโน serine และ lysine จะมีรสหวานขมเปรี้ยวและหวานขมตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโน leucine และ proline เป็นกรดอะมิโนที่มีรสขม และหวานขมตามลำดับ ในโปรตีนถั่วเขียวกรดอะมิโนที่มีค่อนข้างมาก ได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, leucine, phenylalanine, lysine, proline และ serine ซึ่งคล้ายคลึงกับในกากถั่วเหลือง มีกรดอะมิโนที่ให้รสขม คือ leucine และ phenylalanine ส่วน proline จะ

ให้รสหวานขม (Shallenberger, 1993) ซึ่งโปรตีนที่มีกรดอะมิโนซึ่งให้รสขมนี้เมื่อถูกย่อยสลายออกมาก็จะเป็นผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เกิดรสขมขึ้น ส่วนกรดอะมิโนที่มีน้อยมาก ได้แก่ กรดอะมิโน cysteine มีน้อยมากในกากถั่วเหลือง และตรวจไม่พบในโปรตีนถั่วเขียว ซึ่งอาจเป็นเพราะว่ามีน้อยเกินกว่าวิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เลือกใช้จะตรวจวัดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากในขั้นตกตะกอนโปรตีน กรดอะมิโน cysteine อาจถูกทำลายจากสภาพที่เป็นกรด กรดอะมิโนที่มีน้อยอีกชนิดหนึ่ง คือกรดอะมิโน methionine ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้สอดคล้องกับผลในงานวิจัยของ อรสา สุริยาพันธ์ (2531) ที่ได้ตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนถั่วเขียวและกากถั่วเหลืองซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตซอสปรุงรส และพบว่ากรดอะมิโน cysteine และ methionine มีปริมาณน้อยกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่นในกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียว สำหรับกรดอะมิโน tryptophan จะถูกทำลายเมื่อย่อยสลายด้วยกรด(Haschemeyer และ Haschemeyer, 1973) ดังนั้น ในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน ซึ่งใช้วิธีย่อยตัวอย่างด้วยกรดก่อนวิเคราะห์ จึงไม่สามารถตรวจวิเคราะห์กรดอะมิโน tryptophan ได้

5.1.3 ตรวจหาอะฟลาทอกซินในกากถั่วเหลืองและโปรตีนถั่วเขียว

จากการที่สารพิษอะฟลาทอกซินพบในอาหารประเภทถั่ว และเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับตับขึ้น (ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต, 2525) จึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจหาอะฟลาทอกซินในวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตเป็นอาหาร ผลการวิเคราะห์ (ตารางที่ 4.3) พบว่า ในกากถั่วเหลืองมีปริมาณของอะฟลาทอกซินรวม เท่ากับ 2.9 ppb ซึ่งไม่เกินกำหนดค่าความปลอดภัย (ค่าที่ยอมให้มีได้ในอาหาร) คือ 20 ppb ในน้ำนมถั่วเหลือง (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, มอก. 1018-2533) จึงสามารถนำมาผลิตเป็นอาหารได้โดยไม่เป็นอันตราย ส่วนในโปรตีนถั่วเขียวมีปริมาณของอะฟลาทอกซินรวม เท่ากับ 41.1 ppb ซึ่งเกินกำหนดของค่าความปลอดภัย คือ 20 ppb ในผลิตภัณฑ์วุ้นเส้น (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, มอก. 444-2525) จึงไม่สมควรจะนำโปรตีนถั่วเขียวมาผลิตเป็นอาหาร แต่เนื่องจากในช่วงที่ส่งวัตถุดิบไปวิเคราะห์ซึ่งใช้เวลานานหลายเดือนกว่าจะได้รับผลการวิเคราะห์จากกองเกษตรเคมี ในระหว่างนั้นได้ทำการทดลองในขั้นต่อไป คือ ข้อ 3 ในบทที่ 3 ควบคู่ไปด้วย โดยได้ทำการย่อยสลายกากถั่วด้วยสารละลายเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) ซึ่งได้ผลดังแสดงในข้อ 4.2 ในบทที่ 4 การที่ในกากถั่วเหลืองมีปริมาณอะฟลาทอกซินน้อยนั้น เป็น

เพราะในกระบวนการผลิตน้ำมันพืช มีการใช้ตัวทำละลาย hexane เพื่อสกัดน้ำมันเป็นผลให้อะฟลาทอกซินถูกสกัดออกไปด้วย (ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต, 2525) สำหรับกากถั่วเหลืองจะถูกแยกเอาตัวทำละลายออก เพื่อนำเอาตัวทำละลายกลับไปใช้อีก ดังนั้น ในกากถั่วเหลืองจึงปลอดภัยจากปัญหาเรื่อง hexane (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) ส่วนการที่ในโปรตีนถั่วเขียวมีปริมาณอะฟลาทอกซินมาก อาจเนื่องมาจากถั่วเขียวที่ใช้ผลิตวุ้นเส้นมีอะฟลาทอกซินอยู่มาก หรืออาจมาจากการเก็บโปรตีนถั่วเขียวในสภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อรา ซึ่งอาจมีเชื้อราปนเปื้อนมา เจริญเติบโตและสร้างสารพิษขึ้นได้ สภาพที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อราตระกูล *Aspergillus* คือ ที่ช่วงอุณหภูมิ 25-32 °C (มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร, 2527) ความชื้นตั้งแต่ 7% ขึ้นไป (ทรงศักดิ์ ศรีอนุชาต, 2525)

5.2 <u>ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายกากถั่วด้วยเอนไซม์</u>

5.2.1 ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่ใช้ในการย่อยสลายกากถั่ว

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนในกากถั่วด้วยเอนไซม์ Neutrase® ซึ่งมีภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 45-55 °C และช่วง pH 5.5-7.5 (Novo Industri A/S,1990) โดยในการทดลองขั้นนี้ได้แปรอุณหภูมิเป็น 45, 50, 55 และ 60 °C และแปร pH เริ่มต้นที่ใช้ในการย่อยสลายกากถั่วเป็น 5.5, 6.0, 6.5 และ 7.0 ได้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ amino acid nitrogen (ซึ่งเป็นผลต่างระหว่างฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจนกับแอมโมเนียคัลไนโตรเจน ซึ่งหากมีการย่อยสลายเกิดมากขึ้น ปริมาณ amino acid nitrogen ก็จะมากขึ้นด้วย จึงใช้ปริมาณ amino acid nitrogen ที่เกิดขึ้นในโปรตีนไฮโดรไลเซตมาตัดสินภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลาย) และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณ amino acid nitrogen ดังแสดงในตารางที่ 4.4-4.5 และรูปที่ 4.2 พบว่า ชนิดของกากถั่ว อุณหภูมิ pH และอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสามอย่างมีผลต่อปริมาณ amino acid nitrogen ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่อุณหภูมิ 50 °C จะเห็นได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเหลืองมีปริมาณ amino acid nitrogen สูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น แสดงว่า ที่อุณหภูมิ 50 °C มีความเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) ในการย่อยสลายโปรตีนของกากถั่วเหลืองมากกว่าที่อุณหภูมิ 45,

55 และ 60 °C ส่วน pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 50 °C คือ ที่ pH 5.5 และ 6.5 ในการทดลองจะเลือก pH ที่ 6.5 สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป เพราะมีค่าใกล้เคียงกับ pH เริ่มต้นของของผสมระหว่างกากถั่วเหลืองและน้ำที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการย่อย ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนถั่วเขียว มีปริมาณ amino acid nitrogen น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเหลืองในการย่อยทุกภาวะ แสดงว่าโปรตีนถั่วเขียวถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ Neutrase® ได้น้อยกว่าโปรตีนถั่วเหลือง ทั้งนี้อาจเนื่องจากโปรตีนถั่วเขียวควรใช้ภาวะในการย่อยสลายที่ต่างออกไป Conrad (1983) ได้ใช้เอนไซม์หลายชนิดในการย่อยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนของธัญพืชต่างๆ เพื่อใช้เติมในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น เครื่องดื่ม ขนมปัง เป็นต้น สำหรับในช่วงการย่อยโปรตีนมีการใช้เอนไซม์ Neutrase® ย่อยวัตถุดิบต่างกันที่อุณหภูมิต่างกัน เช่น ย่อยข้าวสาลีบดที่อุณหภูมิ 50 °C ย่อยข้าวบาร์เลย์บดที่อุณหภูมิ 22 °C เป็นต้น จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 จะเห็นได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนถั่วเขียวซึ่งถูกย่อยที่อุณหภูมิ 45 °C pH 7.0 มีปริมาณ amino acid nitrogen มากกว่าที่ภาวะอื่นๆเมื่อเทียบกับในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนถั่วเขียวด้วยกัน และผลการทดลองมีแนวโน้มว่า โปรตีนถั่วเขียวจะถูกย่อยได้ดีขึ้นเมื่ออุณหภูมิต่ำลงและ pH สูงขึ้น ดังนั้น ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนถั่วเขียวด้วยเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) น่าจะเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 45 °C และ pH สูงกว่า 7.0 แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณ amino acid nitrogen ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วทั้งสองชนิดแล้ว ได้เลือกภาวะการย่อยสลายโดยใช้กากถั่วเหลือง ที่อุณหภูมิ 50 °C pH 6.5 สำหรับใช้ในการทดลองในขั้นต่อไปตามที่ได้กล่าวมาแล้ว เนื่องจากมีปริมาณ amino acid nitrogen สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) คือ ประมาณ 2.15 g/l

5.2.2 ศึกษาเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายกากถั่ว

โดยแปรเวลาเป็น 30, 60, 90 และ 120 นาที และแปรปริมาณสารละลายเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) เป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5% โดยปริมาตร ได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณ amino acid nitrogen และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 4.6-4.7 และรูปที่ 4.3 จะเห็นว่า ทั้งเวลาและปริมาณของสารละลายเอนไซม์ และอิทธิพลของปัจจัยร่วมระหว่างเวลา และปริมาณสาร

ละลายเอนไซม์มีผลต่อปริมาณ amino acid nitrogen อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยที่ภาวะการย่อยสลายกากถั่วเหลืองด้วยสารละลายเอนไซม์ 2.5% โดยปริมาตร เป็นเวลานาน 120 นาที ให้ค่า amino acid nitrogen สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ซึ่งมีค่าประมาณ 3.21 g/l ทั้งนี้ เนื่องจากปริมาณเอนไซม์ที่มากขึ้นสามารถทำการย่อยสลายสารตั้งต้นได้มากขึ้น และเวลาการย่อยสลายที่นานขึ้น ทำให้เกิดการย่อยสลายได้มากขึ้น ดังนั้น จึงได้ทดลองเพิ่มเวลาในการย่อยสลายเป็น 150 นาที เทียบกับ 120 นาที ใช้ปริมาณสารละลายเอนไซม์ 2.5% โดยปริมาตรย่อยที่อุณหภูมิ 50 °C pH 6.5 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.8 ปริมาณ amino acid nitrogen ในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อย 120 และ 150 นาที มีค่าประมาณ 3.11 และ 3.19 g/l ตามลำดับ เห็นได้ว่าเมื่อย่อยที่เวลานาน 150 นาที จะให้ค่า amino acid nitrogen สูงกว่าเมื่อย่อยที่ 120 นาที แต่ก็สูงกว่าไม่มากนัก จึงได้เลือกภาวะการย่อยด้วยปริมาณสารละลายเอนไซม์ 2.5% โดยปริมาตร เป็นเวลา 120 นาที สำหรับการทดลองในขั้นต่อไปเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องดื่ม จากการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (total nitrogen x 6.25)ที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตที่ภาวะการย่อย 50°C pH 6.5 ด้วยสารละลายเอนไซม์ 2.5% โดยปริมาตร เป็นเวลานาน 120 นาที ดังผลในตารางที่ 4.9 พบว่า มีปริมาณโปรตีนอยู่ 2.55% และเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของจตุพร เหมสุวรรณ์ (2531) ที่ได้ทำการย่อยกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและปาเปน เพื่อผลิตเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส พบว่าเมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซ์โบรมิเลน (Merck 2 m Anson-E/mg, pH 6.0, 35.5 °C) และเอนไซม์ปาเปน (Merck 30,000 USP-U/mg, pH 6.0, 40 °C, 60 นาที) ที่ความเข้มข้น 1% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 50-55 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะได้ไฮโดรไลเซตที่มีโปรตีน 2.50% และ 2.19% ตามลำดับ และเมื่อย่อยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้ไฮโดรไลเซตที่มีโปรตีน 3.57 และ 2.87% ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนในไฮโดรไลเซตใกล้เคียงกับในงานวิจัยนี้ โดยในงานวิจัยนี้ใช้เวลาในการย่อยน้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ 2.55%ในไฮโดรไลเซตก็ยังไม่มากเท่าที่ควร จึงได้ทดลองผลิตโปรตีนไอโซเลตจากกากถั่ว เพื่อเป็นวัตถุดิบในการย่อย โดยคาดว่าน่าจะให้ผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนสูงกว่าการใช้กากถั่วเป็นวัตถุดิบ

5.3 วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลต

ผลการวิเคราะห์โปรตีนไอโซเลตที่ผลิตเอง(ตารางที่ 4.10)จากปริมาณโปรตีน

ที่คิดเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้ง เมื่อนำกากถั่วเหลืองที่มีโปรตีน 54.96%โดยน้ำหนักแห้ง มาผลิตเป็นโปรตีนไอโซเลต จะได้โปรตีนไอโซเลตจากกากถั่วเหลืองที่มีโปรตีนสูงถึง 82.22% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีปริมาณมากกว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากกากถั่วเหลืองในงานวิจัยของ สมชาย จอมดวง (2528) ซึ่งมีโปรตีนอยู่ 65.13% โดยน้ำหนักแห้ง แต่น้อยกว่าโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากถั่วเหลืองซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่มีชื่อว่า "Supro® 500E" ของบริษัท วิคกี้ คอนโซลิเดท จำกัด ซึ่งมีปริมาณโปรตีนอยู่อย่างน้อย 90% โดยน้ำหนักแห้ง (บริษัท วิคกี้ คอนโซลิเดท จำกัด, 2538) สำหรับโปรตีนถั่วเขียวที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีโปรตีนอยู่สูง คือ 84.73% โดยน้ำหนักแห้ง แต่เมื่อนำมาผลิตเป็นโปรตีนไอโซเลต กลับทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงกว่าเดิม คือ มีอยู่ 79.05% โดยน้ำหนักแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากสารละลายของเหลือ(น้ำโปรตีนถั่วเขียว) จากโรงงานวุ้นเส้นในงานวิจัยของ สมชาย จอมดวง (2528) แล้ว พบว่า โปรตีนไอโซเลตจากสารละลายของเหลือจากโรงงานวุ้นเส้นในงานวิจัยของสมชาย มีโปรตีนอยู่ประมาณ 83.74% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีค่ามากกว่าในงานวิจัยนี้ การที่ผลิตโปรตีนไอโซเลตแล้วมีปริมาณโปรตีนลดลงน้อยกว่าในวัตถุดิบ อาจเนื่องมาจากภาวะในการผลิตโปรตีนไอโซเลตในการทดลองไม่เหมาะกับโปรตีนถั่วเขียว และขั้นตอนการผลิตโปรตีนไอโซเลตอาจมีผลทำให้โปรตีนถั่วเขียวบางส่วนสูญเสียไป นอกจากนี้ โปรตีนถั่วเขียวที่นำมาใช้ผลิตโปรตีนไอโซเลต ได้ผ่านขั้นตอนการตกตะกอนมาแล้วจากโรงงาน ซึ่งอาจมีผลทำให้สมบัติของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไปและโปรตีนมีคุณภาพลดลง นอกจากนี้ โปรตีนไอโซเลตจากถั่วเขียวยังมีกลิ่นเหม็นฉุน และมีสีน้ำตาลคล้ำ ลักษณะปรากฏดังแสดงในรูปที่ 4.4 ซึ่งไม่เหมาะจะนำไปพัฒนาเป็นเครื่องดื่ม ดังนั้น การทดลองขั้นต่อไปจึงใช้แต่โปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากกากถั่วเหลือง

5.4 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลตด้วยเอนไซม์

5.4.1 ศึกษาอุณหภูมิและ pH ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลต

โดยแปรอุณหภูมิในการย่อยสลายเป็น 45, 50, 55 และ 60 °C และแปร pH เป็น 5.5,6.0,6.5 และ 7.0 ใช้สารละลายเอนไซม์ Neutrase®(0.5 unit/g) ปริมาณ 1% โดยปริมาตร ย่อยเป็นเวลานาน 10 นาที ได้ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ DH และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าดังกล่าว ดังแสดงในตารางที่ 4.11-4.12 และในรูปที่ 4.5 จะเห็นว่า ทั้งอุณหภูมิ pH และอิทธิพลร่วมของปัจจัยทั้งสองปัจจัยต่างก็มีผลต่อค่า DH อย่าง

มีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากตารางที่ 4.10 พบว่า ภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ Neutrase® ในการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลตจากกากถั่วเหลืองที่ผลิตเองในการทดลองนี้ คือ ที่อุณหภูมิ 55 °C pH 7.0 ซึ่งเป็นภาวะที่ให้ค่า DH สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) มีค่า DH 55.65% ซึ่งผลการทดลองในข้อนี้ บางส่วนมีความคล้ายกับภาวะที่ Olsen และ Adler-Nissen (1979) ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยย่อยสลายโปรตีนเข้มข้น (protein concentrate)ที่เตรียมจาก defatted soy flour แต่ใช้เอนไซม์คนละชนิดกัน โดย Olsen และ Adler-Nissen ได้ใช้เอนไซม์ Alcalase® 0.6 L มาย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นที่อุณหภูมิ 50-55 °C pH 8 เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตสำหรับผสมใน soft drink ส่วนผลการทดลองที่ได้ในข้อนี้ พบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลตที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ Neutrase® คือ ที่อุณหภูมิ 55 °C pH 7.0 ดังนั้น จึงได้เลือกภาวะนี้สำหรับการทดลองในขั้นต่อไป

5.4.2 ศึกษาเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนไอโซเลต

แปรปริมาณสารละลายเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) ในการย่อยเป็น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5%โดยปริมาตร และแปรเวลาในการย่อยเป็น 30, 60,90 และ 120 นาที ย่อยที่อุณหภูมิ 55 °C pH 7.0 วิเคราะห์หาปริมาณ DH และวิเคราะห์หาความแปรปรวน ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13-4.14 และรูปที่ 6 พบว่า การย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์ 2.5% โดยปริมาตร เป็นเวลา 120 นาที ให้ค่า DH สูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และจากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า เวลา ปริมาณสารละลายเอนไซม์ และอิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยทั้งสองมีผลต่อค่า DH อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แสดงว่า เมื่อเวลาในการย่อยสลายนานขึ้นและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้มากขึ้น โอกาสที่โปรตีนจะถูกย่อยสลายจะมีมากขึ้น จึงควรที่จะทำการทดลองเพิ่มเติม โดยเพิ่มเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย แต่เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายในการทดลองนี้มีรสเค็ม เพราะในการผลิตโปรตีนไอโซเลตมีการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกจึงเป็นผลให้เกิดโซเดียมคลอไรด์ขึ้นในผลิตภัณฑ์ ซึ่งรสเค็มที่เกิดขึ้นนี้มากกว่าที่คาดไว้ เป็นผลทำให้รสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไม่เหมาะที่จะนำไปพัฒนาเป็นเครื่องดื่มต่อไป จึงไม่ได้ทำการทดลองเพิ่มเติมในการเพิ่มเวลาและปริมาณเอนไซม์ในการย่อยสลาย เพื่อหาภาวะที่ให้ค่า DH สูงสุด

นอกจากนี้ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในของผสมก่อนการย่อยที่เตรียมให้มีโปรตีน 4% เมื่อย่อยแล้ว โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จะมีลักษณะเจลเกิดขึ้น เนื่องจากเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วย disulfide bonds และ sulfhydryl-disulfide interchange รวมทั้ง intramolecular disulfide bonding ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างตาข่ายของโปรตีนขึ้น (protein network) (Wolf, 1978) ซึ่งหากลดปริมาณโปรตีนเริ่มต้นในของผสมก่อนการย่อยจาก 4% เป็น 3% เพื่อลดการเกิดเจล ก็จะมีปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตใกล้เคียงกับในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากกากถั่วเหลือง คือ ประมาณ 2.55% (จากตารางที่ 4.9) ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ Sugimoto และคณะ (1971)ที่ได้ย่อยโปรตีนไอโซเลตจากกากถั่วเหลือง (มีชื่อทางการค้าว่า "Promine D") ด้วยเอนไซม์ acid protease ที่เตรียมจาก *Trametes sanguinea* โดยใช้ปริมาณโปรตีนไอโซเลตเริ่มต้น 5%โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (มีปริมาณโปรตีนในของผสมระหว่างโปรตีนไอโซเลตกับน้ำคิดเป็น 4.64%) และในการย่อยใช้น้ำมะนาวเข้มข้นปรับ pH ให้เป็นกรด เมื่อนำไปผลิตเป็นเครื่องดื่มจะเจือจางไฮโดรไลเซตลงจนมีปริมาณโปรตีน 2% จะได้เครื่องดื่มที่มีกลิ่นรสและลักษณะปรากฏคล้ายน้ำมะนาว ดังนั้นในงานวิจัยนี้สำหรับการย่อยโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากกากถั่วเหลือง จึงไม่นำไปพัฒนาเป็นเครื่องดื่มต่อไป เนื่องจากมีความไม่เหมาะสมดังได้กล่าวมาแล้ว ในการพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นเครื่องดื่มได้กลับไปใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตจากกากถั่วเหลือง เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

5.5 <u>ศึกษาปริมาณกรดและสารให้ความหวานในเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซต</u>

โปรตีนไฮโดรไลเซตได้ถูกจัดเตรียมขึ้น โดยเตรียมตัวอย่างตามภาวะที่สรุปได้จากข้อ 5.3 คือกากถั่วเหลืองนำมาย่อยที่ 50°C pH 6.5 ด้วยสารละลายเอนไซม์ Neutrase® (0.5 unit/g) 2.5% โดยปริมาตร เป็นเวลานาน 120 นาที นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาผสมกับกรดซิตริกปริมาณ 0.01 และ 0.05% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และผสมกับน้ำตาล 4, 8 และ 12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ได้ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดังในรูปที่ 4.7 ทดสอบทางประสาทสัมผัสได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.15-4.16 โดยที่ลักษณะปรากฏและสีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่กลิ่น รสชาติและการยอมรับรวมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$) ตัวอย่างเครื่องดื่มที่ได้คะแนนการยอมรับในด้านกลิ่น รสชาติ และการยอมรับรวมสูงที่สุด คือ

ตัวอย่างที่ผสมกรด 0.01% และผสมน้ำตาล 12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งการยอมรับในด้านกลิ่น และรสชาติของตัวอย่างนี้อยู่ในระดับที่ผู้บริโภคชอบเล็กน้อย กลิ่นของผลิตภัณฑ์จะมีกลิ่นคล้ายถั่วนึ่ง ได้มีผู้บริโภคบางคนให้ความเห็นว่าตัวอย่างยังมีรสขมที่ผู้บริโภครู้สึกได้ ส่วนการยอมรับรวมอยู่ในระดับที่ผู้บริโภคชอบปานกลาง เมื่อนำตัวอย่างไปหาปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในเครื่องดื่มได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.17 เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตมีปริมาณโปรตีนอยู่ 2.58% โดยน้ำหนัก ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่ Yokotsuka และคณะ (1975) ได้เคยทำไว้โดยใช้วัตถุดิบเริ่มต้นเป็นกากถั่วเหลืองเหมือนกัน แต่ใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน โดยเอนไซม์ที่ใช้ในงานของ Yokotsuka และคณะเป็นเอนไซม์ acid protease นำมาย่อยสลายกากถั่วเหลืองที่ pH 2.5-6.0 ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายประมาณ 3-10 ชั่วโมงซึ่งการทดลองนี้ใช้เวลาในการย่อยสลายน้อยกว่า

สำหรับผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผสมกรด 0.01% และผสมน้ำตาล 12% เมื่อเปรียบเทียบกับในของผสมก่อนย่อยระหว่างกากถั่วเหลืองกับน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.18 พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากตัวอย่างของผสม ทางศูนย์เครื่องมือวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ได้ใช้แต่ส่วนที่เป็นของเหลวไปวิเคราะห์และเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่มีในกากถั่วเหลือง (ตารางที่ 4.2) จะเห็นได้ว่า ในเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตถึงแม้ว่าจะมีปริมาณกรดอะมิโนน้อยกว่าในกากถั่วมาก แต่ก็มีชนิดของกรดอะมิโนเหมือนกับในกากถั่ว ยกเว้นกรดอะมิโน cysteine ซึ่งตรวจไม่พบ เนื่องจากปริมาณเริ่มต้นในกากถั่วก็มีน้อยมากอยู่แล้วแสดงว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ค่อนข้างจะรักษาคุณค่าทางอาหารเอาไว้ได้พอสมควร ถึงแม้ว่าจะไม่เทียบเท่ากับที่มีในวัตถุดิบก็ตาม

5.6 ปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นของเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่ว

เนื่องจากกลิ่นของผลิตภัณฑ์ได้รับการยอมรับในระดับที่ชอบเล็กน้อย ดังนั้น จึงพัฒนาคุณภาพด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น และมีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น จึงศึกษาถึงลำดับความชอบของกลิ่นต่อไปนี้ คือ กลิ่นวานิลลา กาแฟ และกล้วยหอม เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกลิ่นใดๆ ใช้วิธีทดสอบแบบ Ranking test สำหรับในการทดสอบลำดับความชอบ ได้เลือกกลิ่นวานิลลามาทำการทดสอบ เพราะเป็นกลิ่นที่มีการใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพที่มี

จำหน่ายในท้องตลาด และเนื่องจากผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาล จึงได้เลือกกลิ่นกาแฟและกล้วยหอมมาทดสอบลำดับความชอบ เพราะสีและกลิ่นน่าจะเข้ากันได้ สำหรับผลการทดสอบได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.19 พบว่า กลิ่นวานิลลาผู้บริโภคชอบเป็นลำดับที่ 1 มีคะแนนเฉลี่ยรวมของลำดับความชอบด้านกลิ่นแตกต่างจากกลิ่นกล้วยหอม กลิ่นกาแฟ และไม่เติมกลิ่น โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จึงได้เลือกกลิ่นวานิลลาไปทดลองในขั้นต่อไป โดยเปรียบเทียบการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้านต่างๆ ของเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ปรับปรุงคุณภาพด้านกลิ่นแล้วกับตัวอย่างที่ไม่ได้ปรับปรุง ใช้วิธีทดสอบแบบ 9-point Hedonic scale test ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.20 และ 4.21 พบว่าการยอมรับในด้านรสชาติไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยตัวอย่างที่เติมกลิ่นวานิลลา ได้รับการยอมรับด้านรสชาติอยู่ในระดับความรู้สึกเฉยๆ ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกลิ่นใดๆ ได้รับการยอมรับอยู่ในระดับชอบเล็กน้อยเหมือนเดิม มีผู้บริโภคบางคนให้ความเห็นว่า ตัวอย่างที่เติมกลิ่นมีรสชมกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมกลิ่น อาจเป็นเพราะกลิ่นวานิลลามีผลต่อการยอมรับทางประสาทสัมผัส จากการที่กลิ่นวานิลลานิยมใช้ในอาหารที่มีรสหวาน เช่น ไอศครีม เค้ก เป็นต้น เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ที่มีรสชม จึงทำให้ผู้บริโภคเกิดความรู้สึกว่า ผลิตภัณฑ์ที่เติมกลิ่นชมกว่าผลิตภัณฑ์เดิมที่ไม่ได้เติมกลิ่น ดังนั้น จึงได้เลือกผลิตภัณฑ์ที่ไม่เติมสารแต่งกลิ่นไปศึกษาอายุการเก็บต่อไป

5.7 ศึกษาอายุการเก็บของเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่ว

เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตสูตรที่นำมาศึกษาอายุการเก็บ เป็นเครื่องดื่มสูตรที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดจากข้อ 5.5 คือ สูตรที่ผสมกรดซิตริก 0.01% และผสมน้ำตาล 12% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการศึกษาโดยเก็บที่อุณหภูมิ 5-8 °C เป็นเวลา 30 วัน ใช้เกณฑ์ตัดสินคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ ที่มีความใกล้เคียงกับเครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตมากที่สุด คือ นมสดที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์ จะต้องมีบักเตรีไม่เกิน 50,000 โคโลนี/นม 1 มิลลิลิตร (กระทรวงสาธารณสุข, 2522) ผลการหาอายุการเก็บดังแสดงในตารางที่ 4.22 จะเห็นได้ว่าเมื่อเก็บไปเป็นเวลา 30 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีประมาณ 11,780 โคโลนี/มิลลิลิตร ของเครื่องดื่ม ซึ่งยังไม่เกินข้อกำหนดคุณภาพสำหรับนมสดที่พาสเจอไรซ์ แสดงว่า ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเหลืองมีอายุการเก็บอย่างน้อย 30 วัน (ประมาณ 4 สัปดาห์) ซึ่งผลในข้อนี้สอดคล้องกับงานของ Adler-Nisssen (1978) ที่ผลิตเครื่องดื่มโปรตีน

ไฮโดรไลเซตจาก soy protein isolate และ soy protein concentrate โดยย่อย ด้วยเอนไซม์ Alcalase® เครื่องดื่มที่ได้เติมน้ำตาลซูโครส 9-10%และเมื่อนำไปพาสเจอร์ไรซ์ สามารถเก็บในที่อุณหภูมิต่ำ (ในตู้เย็น) ได้หลายสัปดาห์ โดยไม่มีการตกตะกอนและไม่มีการเจริญของจุลินทรีย์ สำหรับผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกากถั่วเหลืองในงานวิจัยนี้ เมื่อสังเกตลักษณะปรากฏเป็นเวลา 30 วัน พบว่า ลักษณะปรากฏเป็นของเหลวใสสีน้ำตาล เหมือนเดิม ไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่มีการตกตะกอนที่ก้นขวดเล็กน้อย เมื่อเก็บไปได้ 2 วัน ซึ่ง คาดว่าน่าจะเป็นส่วนของกากถั่วละเอียดที่ปั่นแยกออกไม่หมด จึงติดมาในเครื่องดื่ม