การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากกากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสทางการค้า

ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์[1]*, ไพลิน เพ็ชรทวีพรเดช[2], อรพิน เกิดชูชื่น[1] และ กนก รัตนะกนกชัย[1]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี แขวงท่าข้าม เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ 10150

บทคัดย่อ

การผลิต hydrolysate vegetable protein (HVP) จากกากถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า เพื่อผลิตเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ชนิดผง โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 (w/v) และเวลาย่อยสลาย 6, 9 และ 12 ชม. ร่วมกับการใช้วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว และการประเมินทางประสาทสัมผัส พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการผลิต HVP คือการใช้ Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 24 (w/v) ใช้เวลาย่อยสลาย 12 ชม. ซึ่งภาวะดังกล่าวมีระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis: DH) ค่าเกลือ (NaCl ก./100 มล.) และคะแนนการยอมรับด้านรสหวาน รสขม กลิ่นเนื้อสัตว์ และความชอบโดยรวมสูงสุด เมื่อนำมาทำให้เข้มข้นพบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 63.62 (w/v) ซึ่งกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงได้แก่ อาร์จินีน ลูซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน และเซอรีน สำหรับการพัฒนาสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จาก HVP เข้มข้นที่ผลิตด้วย Flavourzyme® ความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/v) พบว่าสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จาก HVP เข้มข้นที่ผลิตด้วย Flavouryzme® ร้อยละ 10 (w/v) ได้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสไก่สูง เมื่อนำสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จากเอนไซม์ Flavouryzme® มาประยุกต์เป็นผงรสไก่เปรียบเทียบกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้า® ความเข้มข้นร้อยละ 3, 6 และ 9 (w/v) พบว่าผลิตภัณฑ์สารปรุงแต่งผงรสไก่ที่ได้จากการเติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 6 (w/v) มีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นรสไก่สูงที่สุด และไม่แตกต่างจากผลิตภัณฑ์ที่ใช้สารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้า ($P \leq 0.05$)

คำสำคัญ : สารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ / กากถั่วเขียว / เอนไซม์โปรติเอส / Flavourzyme®

* *Corresponding author: E-mail: nutta.lao@kmutt.ac.th*

[1] *รองศาสตราจารย์ สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

[2] *นักศึกษา สายวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี*

Flavoring Agent Produced from Mungbean Meal by Protease

Natta Laohakunjit[1]*, Pailin Phetaveeporndet[2], Orapin Kerdchoechuen[1], and Khanok Ratanakhanokchai[1]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Tha Kham, Bang Khun Thian, Bangkok 10150

Abstract

The enhancement of flavoring agent produced from mungbean meals was conducted to produce the chicken flavoring agent (as powder and soup) by a commercial proteases, Flavourzyme®. Enzyme concentration was varied at 6 different levels at 1, 2, 3, 6, 12 and 24% (w/v) and 3 different times of hydrolysis at 6, 9 and 12 hrs. The result was evaluated by using response surface methodology integrated with sensory evaluation. The best condition to produce hydrolysed vegetable protein (HVP) by Flavourzyme® was at 24% (w/v) for 12 hrs which perceptions of degree of hydrolysis (DH), %salt, sensory scores of sweetness, bitterness, animal flavored, and overall acceptance were high. After the Flavourzyme® HVP was concentrated, it contained 63.62% of protein and the high amino acids content are arginine, leucine, lysine, phenylalanine and serine. The concentrated HVP produced by Flavourzyme® was developed to processed chicken flavor by various concentrations of concentrated HVP at 5, 10 and 15% (w/v). The best concentration of the Flavourzyme® HVP processed chicken flavor for sensory evaluation was at 10%. The Flavourzyme® HVP at concentration of 10%, were applied to the processed chicken powder and soup at 3 different concentrations of 3, 6 and 9% (w/v). The results showed that the chicken powder and chicken soup produced by concentrated Flavourzyme® HVP at 6% (w/v) had the highest score of sensory of chicken flavor taste, which is similar to the commercial chicken flavoring agent.

Keywords : Chicken Flavour / Mungbean Meals / Proteinase / Flavourzyme®

* *Corresponding author: E-mail: nutta.lao@kmutt.ac.th.*

1 *Associate Professor, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

2 *Graduate Student, Division of Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology.*

1. บทนำ

Hydrolysed vegetable protein (HVP) เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหารทั่วโลก มีคุณสมบัติในการปรับปรุงและเสริมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ เนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของ HVP คล้ายคลึงกับสารประกอบที่เกิดขึ้นระหว่างการหุงต้มเนื้อ กระบวนการผลิต HVP นิยมใช้กรดที่มีความเข้มข้นและอุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดจากกระบวนการผลิต (by product) คือ 3-monochloro-propanediols (3-MCPD) ซึ่งจัดเป็นสารพิษในกลุ่มของ chlorohydrins ที่ก่อให้เกิดมะเร็งในร่างกายได้ [1] ปัจจุบันการย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมาก ให้โปรตีนที่มีเพปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและ pH ที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีคุณภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ [2] โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ เรียกว่า enzymatic hydrolysate vegetable protein (e-HVP) ซึ่งมีคุณสมบัติเสริมกลิ่นและรสชาติเช่นเดียวกับ HVP ที่ได้จากกระบวนการผลิตที่ใช้กรด และมีข้อดีคือปริมาณเกลือและสาร 3-MCPD ต่ำ สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับอาหารมังสวิรัติและอาหารสุขภาพ โดยเฉพาะสำหรับผู้ป่วยเป็นโรคหัวใจ เบาหวาน และความดันโลหิตสูง [3] มีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยการย่อยสลายโปรตีนจากพืชและสัตว์ เช่น การย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลืองใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® [4] โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนไอโซเลทจากถั่วเหลือง (soy protein isolate) โดยใช้เอนไซม์แพนครีเอทิน (pancreatin) [5] โปรตีนไฮโดรไลเซทจากถั่วชิคพี (chick-pea hydrolysates: CPHs) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® ร่วมกับเอนไซม์ Flavourzyme® [6] Krzysztof และคณะ [7] ใช้เอนไซม์ Protamex และ Neutrase® ย่อยสลาย extruded soy flour (ExSF) ส่วน Wu และคณะ [8] พัฒนาสารปรุงแต่งกลิ่นรสเนื้อสัตว์จากกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® นอกจากนี้มีการใช้เอนไซม์ Flavourzyme® ในการย่อยสลายโปรตีนจากสารละลายปลาเข้มข้น [9] การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ Neutrase® (0.5 ยูนิตต่อกรัม) เพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร [10] การผลิตซอสกุ้งจากน้ำต้มกุ้งด้วยเอนไซม์ Neutrase® [11] ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาฉลามด้วยเอนไซม์ Alcalase® [12]

HVP ได้จากการย่อยสลายหรือไฮโดรไลซ์เมล็ดพืชที่มีโปรตีนสูงและผ่านการสกัดน้ำมันออกแล้ว (defatted vegetable protein) เช่น ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าว เมล็ดทานตะวัน และถั่วต่างๆ โดยเฉพาะถั่วเขียว (mungbean) (*Vigna radiata* L.) ซึ่งใช้ประกอบอาหารต่างๆ เช่น ขนม ได้แก่ แป้งซาหริ่ม เพาะถั่วงอกและวุ้นเส้น เป็นต้น [13] แต่การใช้ประโยชน์จากถั่วเขียวส่วนใหญ่ใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมผลิตวุ้นเส้น โดยแยกแป้งออกจากเมล็ดถั่วเขียว ส่วนที่เหลือซึ่งมีโปรตีนสูงมักนำไปเป็นอาหารสัตว์หรือทิ้งไป ซึ่งโปรตีนในถั่วเขียวมีประมาณร้อยละ 20–30 มีกรดอะมิโนจำเป็นอยู่ครบถ้วน โดยเฉพาะกรดอะมิโนไลซีน (lysine) [14] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเขียวซึ่งเป็นส่วนของวัสดุเหลือใช้ที่มีสารอาหารเช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรท และเกลือแร่ ในปริมาณมาก โดยนำมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เช่น Flavourzyme® เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซท enzymatic Mungbean Meal Protein Hydrolysate (e-MPH) ในการเป็นสารตั้งต้นและองค์ประกอบหลักในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส นอกจากเป็นการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่ง เนื่องจาก HVP มีราคาสูงและปัจจุบันประเทศไทยมีการนำเข้า HVP เพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นอุตสาหกรรมหลักภายในประเทศ รวมทั้งการใช้เอนไซม์ในการผลิตยังช่วยลดปริมาณสาร 3-MCPD ด้วย

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเตรียมวัตถุดิบตั้งต้นและวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

กากถั่วเขียวที่ผ่านการสกัดแป้งจากโรงงานวุ้นเส้น

สิทธินันท์ จังหวัดปทุมธานี นำมาสกัดไขมันด้วยเฮกเซน เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นกรองแยกและระเหยตัวทำละลายออก นำกากถั่วเขียวที่ผ่านการสกัดไขมันแล้วมานึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 120°C นาน 20 นาที วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และคาร์โบไฮเดรท [15]

เอนไซม์ Flavourzyme® ประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสสองชนิด คือเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดส มีกิจกรรมของเอนไซม์ (activity) เท่ากับ 2.22 ยูนิต/มล. มีค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) 500 LAPU/g (Leucine amino peptidase units per gram) และมีภาวะเหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ pH 7.0 และอุณหภูมิ 50°C [16]

2.2 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเขียวด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

กากถั่วเขียว 50 ก. เติมน้ำปริมาตร 250 มล. ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 0.1 M NaOH เติมเอนไซม์ Flavourzyme® ความเข้มข้น 6 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 2, 3, 6, 12 และ 24 (w/v) และเวลาการย่อยสลายที่ 3 ระดับ คือ 6, 9 และ 12 ชม. ที่อุณหภูมิ 50°C จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองแยกเอาส่วนที่เป็นตะกอนออก นำส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซทมาวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis, DH) ตามวิธีของ Edward และ Shipe [17] คำนวณดังนี้ ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ) = (10% TCA soluble-N×100)/Total-N

โดย Total N = ร้อยละไนโตรเจนในวัตถุดิบ ส่วน 10% TCA soluble N = ร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ใน TCA และค่าเกลือ (NaCl ก./100 มล.) ด้วย salinity refractometer (รุ่น S-28E บริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น) [18] ทดลอง 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ 6X3 factorial in completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SAS (1997)

นำค่า DH และค่าเกลือของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด มาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยใช้วิธีการแสดงผลตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิว (Response Surface Methodology; RSM) นำค่าแต่ละค่ามาเข้าสมการ multiple linear regression ดังนี้

$$Y = b_o + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + b_{11}x^2_1 + b_{22}x^2_2 \quad \textbf{(1)}$$

เมื่อ Y เป็นตัวแปรตาม (response variable) ได้แก่ค่า DH และค่าเกลือส่วน x_1 และ x_2 เป็นตัวแปรอิสระ (independent variables) ในที่คือ ค่าความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อยสลาย ส่วนค่า b_0 เป็นค่าสัมประสิทธิ์คงที่ ซึ่ง b_1 และ b_2 เป็นสัมประสิทธิ์เชิงเส้นของปัจจัยหลัก และ b_{12} และ b_{13} เป็นสัมประสิทธิ์ของ interaction ระหว่าง 2 ปัจจัย เมื่อได้สมการ นำค่าที่ได้มาสร้างเป็นกราฟ response surface methodology (RSM) นำกราฟที่ได้มาซ้อนทับกัน (overlay) โดยใช้โปรแกรม Statistica Version 5.0 [19]

การทดสอบทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทจากทุกภาวะของการย่อยสลาย มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่มีความชื้นร้อยละ 30 บรรจุขวดแก้วสีชา เก็บไว้ที่ 10°C นำมาประเมินการยอมรับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสด้านรสหวาน รสขม กลิ่นรสเนื้อสัตว์ และกลิ่น-รสชาติโดยรวม ใช้วิธีทดสอบแบบ qualitative descriptive analysis (QDA) scoring test ให้คะแนนตั้งแต่ 0-9 โดย 9 คะแนน หมายถึง ได้รับคะแนนความเข้มของรสหวาน รสขม กลิ่นรสเนื้อสัตว์ และการยอมรับกลิ่นรสชาติโดยรวมของผลิตภัณฑ์ สูงที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ได้รับคะแนนต่ำที่สุด ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 15 คน ทดสอบ 3 ครั้ง วางแผนการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลแบบ randomized complete block design (RCBD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี DMRT โดยใช้โปรแกรม SAS (1997)

2.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของ e-MPHs ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

จากภาวะที่เหมาะสมที่สุดจาก RSM ในข้อ 2.2 นำ e-MPHs ที่ได้จากภาวะย่อยสลายด้วย Flavourzyme® มาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง vacuum rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 60°C วิเคราะห์สมบัติทางกายภาพและเคมี ได้แก่ ค่าสีด้วย Minolta color reader ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า เกลือ และปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

2.4 การพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ (chicken flavor)

นำ HVP เข้มข้นผลิตจาก Flavourzyme® จากภาวะที่ได้จากการย่อยสลายที่เหมาะสมที่สุดและมีการยอมรับกลิ่นรสที่ดี ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 5, 10 และ 15 w/v ปรับ pH ให้เป็น 6.0 ด้วย 0.1 N HCl หรือ 0.5 N NaOH และเติมส่วนผสมอื่นๆ ได้แก่ แอล-ซีสทีอีน 0.5 mM น้ำตาลไรโบส 0.5 mM และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1.5 ชม. [8] สุ่มตัวอย่างสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ในแต่ละภาวะ ปริมาณร้อยละ 2 v/v เติมลงในน้ำร้อนอุณหภูมิ 95°C บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดปริมาตร 20 มล. นำมาวิเคราะห์ค่าสี ค่าเกลือ และประเมินผลการยอมรับทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ด้านความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ กลิ่นไก่ กลิ่นหอม ความน่ารับประทาน รสเค็ม รสหวาน รสขมและการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์ ใช้ 9-point hedonic scale กำหนดระดับคะแนน 1–9 โดย 9 คะแนน หมายถึง ชอบมากที่สุด และ 1 คะแนน หมายถึง ชอบน้อยที่สุด ใช้ผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝนจำนวน 15 คน ทดสอบ 2 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCBD) วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย วิธี DMRT ใช้โปรแกรม SAS (1997)

2.5 การเปรียบเทียบสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จากโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้าในรูปผลิตภัณฑ์ผงรสไก่

เตรียมสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ชนิดผงรสไก่เข้มข้นของ e-MPHs จาก Flavourzyme® ที่ดีที่สุดจากข้อ 2.4 แปรความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ร้อยละ 3, 6 และ 9 w/w เติมเกลือ น้ำตาล ซีอิ๊วผง และกระเทียมผงร้อยละ 41, 20, 18.5 และ 6.5 ตามลำดับ ผสมส่วนประกอบให้เข้ากัน นำมาเปรียบเทียบกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้าซึ่งผ่านการปรุงรสโดยใช้ผงไก่ โดยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส เตรียมผงรสไก่จากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่แต่ละชนิดปริมาณร้อยละ 2 ละลายในน้ำร้อน บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดปริมาตร 20 มล. นำมาประเมินผลโดยการวิเคราะห์คุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสเช่นเดียวกับข้อ 2.4 ใช้วิธีทดสอบแบบ 9-point hedonic scale โดยผู้ทดสอบกึ่งฝึกฝน 15 คน วางแผนการทดลองแบบ RCBD วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย DMRT ใช้โปรแกรม SAS (1997)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 สมบัติทางเคมีของกากถั่วเขียวเริ่มต้น

กากถั่วเขียวหลังการสกัดไขมันและนึ่งด้วยความดันไอมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีเขียว และมีกลิ่นถั่วอ่อนๆ มีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า เยื่อใยและคาร์โบไฮเดรต เท่ากับ ร้อยละ 12.67 ± 0.62, 70.47 ± 0.33, 2.31 ± 0.01, 2.46 ± 0.03, 1.08 ± 0.25 และ 11.01 ± 2.54 (wet basis) ตามลำดับ กากถั่วเขียวที่เตรียมได้นี้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 70.47 เหมาะสำหรับเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายเพื่อให้ได้เป็นสารให้กลิ่นรส ซึ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ควรมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 30 (dry basis) [20] สำหรับปริมาณไขมันในวัตถุดิบควรมีปริมาณต่ำที่สุด เนื่องจากไขมันในวัตถุดิบอาจเกิด cross link กับโปรตีน อาจไปขัดขวางการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ [21] สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกากถั่วเขียวนี้มีปริมาณต่ำกว่าในงานวิจัยอื่น ซึ่งมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณร้อยละ 12-25 [22-24] เนื่องจากกากถั่วเขียวที่นำมาใช้ได้มาจากกระบวนการผลิตวุ้นเส้น ทำให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตเหลืออยู่ในกากถั่วเขียวต่ำ ถ้าวัตถุดิบมีคาร์โบไฮเดรตมากเกินไปอาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ทำให้กรดอะมิโนสูญเสียไป [21]

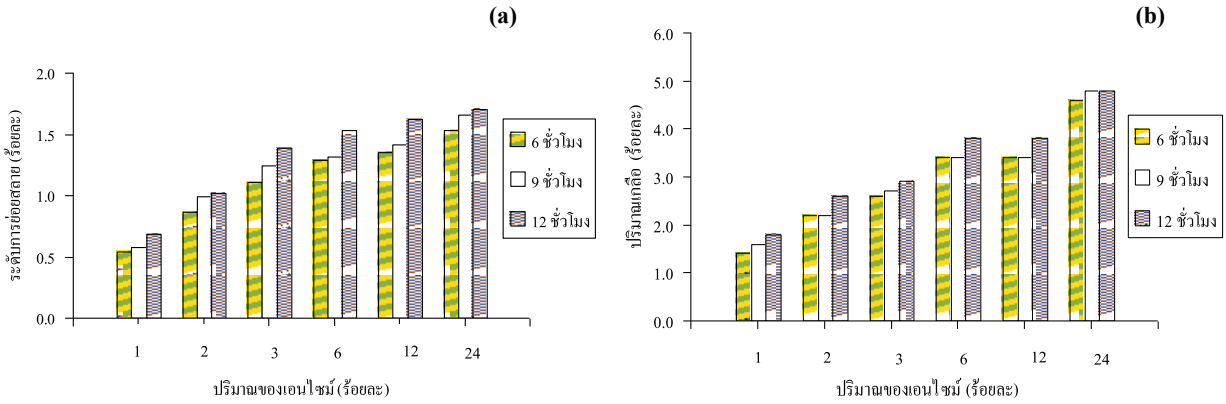
3.2 ภาวะที่เหมาะสมในการใช้กากถั่วเขียวผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วย Flavourzyme®

ปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณเกลือใน e-MPH ($P \leq 0.05$) จากรูปที่ 1a และ 1b แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ปริมาณ Flavourzyme® ร้อยละ 1 ย่อยสลายเป็นเวลา 6 ชม. มีระดับการย่อยสลายและค่าเกลือต่ำสุด ร้อยละ 0.53 และ 1.40 ตามลำดับ โดยที่ปริมาณ Flavourzyme® ร้อยละ 24 ย่อยสลายเป็นเวลา 12 ชม. มีระดับการย่อยสลายและเกลือสูงสุด คือ ร้อยละ 1.70 และ 4.80 ตามลำดับ ($P \leq 0.05$) เห็นได้ว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นโอกาสที่เอนไซม์จะจับกับโมเลกุลของโปรตีนมีมากขึ้น จึงเกิดการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นจนกระทั่งปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เพียงพอกับปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ ค่าระดับการย่อยสลายมีค่าคงที่ จากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® ได้ e-MPH ที่มีระดับการย่อยสลายต่ำนั้น เนื่องจาก Flavourzyme® ที่ใช้นี้ มีกิจกรรมจำเพาะต่ำเท่ากับ 500 LAPU/g (Leucine amino peptidase units per gram) จึงควรใช้ปริมาณเอนไซม์มากขึ้น และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากถั่วเขียวมีปริมาณน้อยที่ pH 6.5 จึงควรแยกเป็นโปรตีนไอโซเลตก่อนนำมาย่อยสลาย รวมทั้งกากถั่วเขียวมีองค์ประกอบทางเคมีอื่นนอกจากโปรตีน เช่น คาร์โบไฮเดรท และไขมัน โดยเฉพาะไขมันอาจขัดขวางการย่อยสลายโปรตีน โดยไขมันอาจเกิด cross link กับโมเลกุลของโปรตีน เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไขมันและโปรตีน (lipo-protein complex) ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวสามารถทนต่อการย่อยด้วยกรดและเอนไซม์ [21] ส่วนคาร์โบไฮเดรตที่มีมากเกินไป ทำให้กรดอะมิโนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนเกิดการสูญเสียไปกับปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เกิดสารประกอบกลิ่นรส [25] ซึ่งถ้าเกิดมากเกินไปทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีเข้มขึ้นและมีกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ ส่วนปริมาณเกลือของ e-MPH จาก Flavourzyme® ที่เพิ่มขึ้นส่วนหนึ่งอาจเกิดจากการปรับ pH ด้วยกรดหรือด่างเพื่อให้มีค่าที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ นอกจากนี้เกลือที่วัดได้ อาจเป็นผลมาจากพันธะไอออนิกที่เกิดขึ้นระหว่างกรดหรือด่างกับกรดอะมิโนที่มีประจุที่ได้จากการย่อยสลาย เช่น โพรลีน กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก และอาร์จินีน เกิดเป็นเกลืออนินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ [26, 27] รวมทั้งเอนไซม์ Flavourzyme® ที่เติมเข้าไปมีเกลือเป็นส่วนประกอบ เมื่อเติมปริมาณมากขึ้นในการย่อยสลายโปรตีนกากถั่วเขียว ทำให้ปริมาณเกลือของไฮโดรไลเซทเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณของเอนไซม์จึงมีผลให้ทั้งระดับการย่อยสลายและปริมาณเกลือในโปรตีนไฮโดรไลเซทเพิ่มขึ้นด้วย

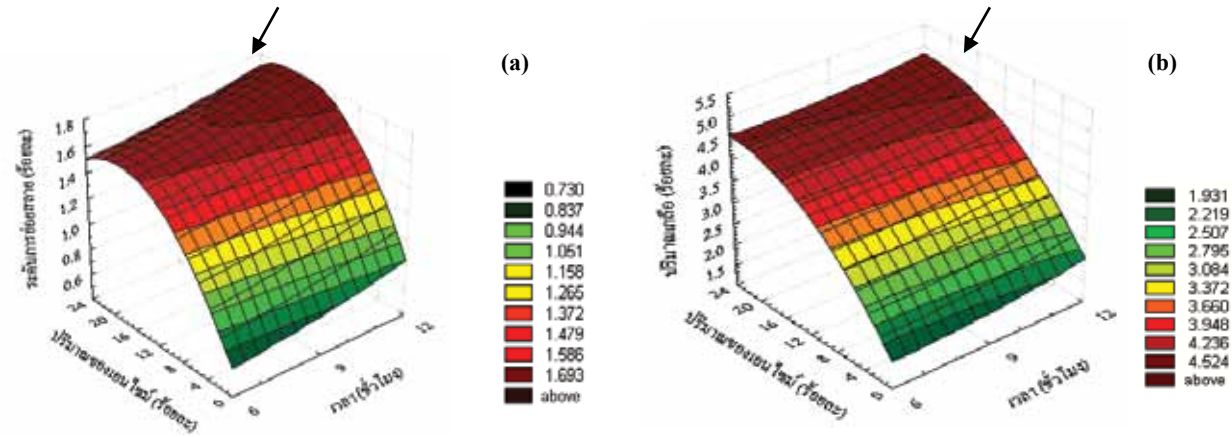
เมื่อนำค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณเกลือมาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต e-MPHs ด้วย Flavourzyme® โดยใช้ RSM ซึ่งเป็นวิธีแสดงผลตอบสนองต่อผลจากตัวแปรต่างๆ [28] เพื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาย่อยสลายต่อค่าของระดับการย่อยสลายและปริมาณเกลือ รูปที่ 2 โดยขอบเขตของกราฟที่มีสีเข้มที่สุดและเป็นช่วงที่สูงที่สุดในกราฟ เป็นขอบเขตของภาวะการผลิตที่เหมาะสม มีระดับการย่อยสลายสูงสุดคือ ช่วงภาวะที่ใช้ปริมาณ Flavourzyme® ร้อยละ 11-24 ย่อยสลายเป็นระยะเวลา 10-12 ชม. (รูปที่ 2a) และขอบเขตของภาวะการผลิตที่เหมาะสมมีปริมาณของเกลือสูงสุดในช่วงด้านบนของกราฟซึ่งมีสีเข้มที่สุด (รูปที่ 2b) คือ ช่วงภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 16-24 ย่อยสลายเป็นเวลา 6-12 ชม. เมื่อทำการซ้อนทับกราฟ surface plot เพื่อกำหนดขอบเขตของภาวะการผลิตที่ให้ผลของระดับการย่อยสลายและปริมาณเกลือสูงที่สุด พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ ภาวะที่ใช้ปริมาณ Flavourzyme® ร้อยละ 16-24 ย่อยสลายเป็นเวลา 10-12 ชม. ถึงแม้ว่าภาวะที่เหมาะสมนี้ทำให้ e-MPH มีค่าเกลือที่สูงขึ้น (ร้อยละ 4-5) แต่เป็นระดับปริมาณเกลือที่น้อยกว่าการย่อยสลายโปรตีนด้วยกรด (มีค่าเกลือร้อยละ 20) อย่างไรก็ตาม เกลือที่มีอยู่ช่วยเพิ่มรสชาติของ e-MPH ในการเป็นสารตั้งต้นการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสด้วย

ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านรสหวาน รสขม กลิ่นรสเนื้อสัตว์ และการยอมรับโดยรวมของ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ทั้ง 18 ทรีตเมนต์ พบว่า e-MPH จากภาวะทดลองที่

ปริมาณ Flavourzyme® ร้อยละ 24 ย่อยสลายเป็นเวลา 12 ชม. มีคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านรสขมต่ำที่สุด (P≤0.01) เท่ากับ 3.33 และมีคะแนนด้านรสหวาน กลิ่นเนื้อสัตว์ และความชอบโดยรวมสูงที่สุด (P≤0.01) เท่ากับ 8.67, 8.33 และ 8.67 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) แสดงว่า e-MPH เข้มข้นที่ผลิตได้จาก Flavourzyme® ในภาวะนี้มีผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มของรสหวาน ขม กลิ่นรสเนื้อสัตว์ และความชอบโดยรวมที่ดีที่สุด เนื่องจาก Flavourzyme® มีปริมาณเอนไซม์เอกโซเปปติเดสชนิดคาร์บอกซิเปปทิเดสที่ตัดตำแหน่งของกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำอยู่ปริมาณมาก ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีปริมาณเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำทางด้านปลายสาย (C-terminal) ในระดับต่ำ โดยเฉพาะลิวซีน อาร์จีนีน และฟีนิลอะลานีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสขม ดังนั้น e-MPH ที่ผลิตได้จึงมีรสขมน้อยมาก [29, 30] ดังนั้นจึงเลือก eMPHs ผลิตได้จากเอนไซม์ Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 24 เวลาย่อยสลาย 12 ชม. ไปใช้ในการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและการพัฒนาเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสต่อไป



รูปที่ 1 ค่าระดับการย่อยสลาย (a) และปริมาณเกลือจากการย่อยสลาย (b) โดยใช้ Flavourzyme®



รูปที่ 2 การตอบสนองแบบโครงร่างพื้นผิวของอิทธิพลระหว่างปริมาณ Flavourzyme® และระยะเวลาย่อยสลาย 6, 9 และ 12 ชั่วโมงต่อระดับการย่อยสลาย (a) และปริมาณเกลือ (b) ในโปรตีนไฮโดรไลเซท

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของ e-MPH เข้มข้นที่ย่อยสลายด้วย Flavourzyme®

ภาวะการย่อยสลายด้วย Flavourzyme®	รสหวาน	รสขม	กลิ่น-รสเนื้อสัตว์	ยอมรับโดยรวม
ปริมาณร้อยละ 1 ย่อยสลาย 6 ชม.	2.33k	8.67m	1.00l	2.00n
ปริมาณร้อยละ 1 ย่อยสลาย 9 ชม.	2.67k	8.00lm	1.33l	2.33nm
ปริมาณร้อยละ 1 ย่อยสลาย 12 ชม.	4.33j	7.67kl	2.33k	2.67lmn
ปริมาณร้อยละ 2 ย่อยสลาย 6 ชม.	4.37ij	7.33jkl	2.67k	3.33klm
ปริมาณร้อยละ 2 ย่อยสลาย 9 ชม.	5.33hi	7.33jkl	3.00jk	3.67jkl
ปริมาณร้อยละ 2 ย่อยสลาย 12 ชม.	5.33hi	7.00ijk	3.67ij	4.00ijk
ปริมาณร้อยละ 3 ย่อยสลาย 6 ชม.	5.67gh	6.67hij	4.00hi	4.67hij
ปริมาณร้อยละ 3 ย่อยสลาย 9 ชม.	5.67gh	6.33ghi	4.33hi	5.00ghi
ปริมาณร้อยละ 3 ย่อยสลาย 12 ชม.	6.30fg	6.00fgh	4.67gh	5.33fgh
ปริมาณร้อยละ 6 ย่อยสลาย 6 ชม.	6.30fg	5.67efg	5.33fg	5.67fgh
ปริมาณร้อยละ 6 ย่อยสลาย 9 ชม.	6.67ef	5.33def	5.33fg	6.00efg
ปริมาณร้อยละ 6 ย่อยสลาย 12 ชม.	6.67ef	5.00cde	5.67ef	6.33def
ปริมาณร้อยละ 9 ย่อยสลาย 6 ชม.	7.00def	5.00cde	5.67ef	7.00cde
ปริมาณร้อยละ 9 ย่อยสลาย 9 ชม.	7.33cde	4.67cd	6.33de	7.33bcd
ปริมาณร้อยละ 9 ย่อยสลาย 12 ชม.	7.67bcd	4.67cd	6.67cd	7.67abc
ปริมาณร้อยละ 12 ย่อยสลาย 6 ชม.	8.00abc	4.33bc	7.33bc	8.00abc
ปริมาณร้อยละ 12 ย่อยสลาย 9 ชม.	8.33ab	3.67ab	7.67ab	8.33ab
ปริมาณร้อยละ 12 ย่อยสลาย 12 ชม.	8.67a	3.33a	8.33a	8.67a
F-test	**	**	**	**
C.V. (%)	8.99	9.19	11.12	12.24

หมายเหตุ a, b, c, ... ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
**ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง

3.3 สมบัติทางกายภาพและเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้จากภาวะที่เหมาะสมที่สุด

โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายจากภาวะที่ดีที่สุดด้วย Flavourzyme® มีสีน้ำตาลเข้มและมีกลิ่นหอมกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ไม่ผ่านการทำให้เข้มข้น โดย e-MPH เข้มข้นจาก Flavourzyme® มีค่า L*, a* และ b* เท่ากับ 30.1, 2.3 และ 8.7 ตามลำดับ การที่ e-MPH มีสีน้ำตาลเข้ม เนื่องจากเกิดผลิตภัณฑ์จากการทำปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลที่ได้จากการให้ความร้อนระหว่างการทำให้เข้มข้น ทำให้เกิดสารให้กลิ่นรสและมีสีเข้มขึ้น [31] และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีหมู่แอลฟาของกรดอะมิโน (alpha amino group) สูง ซึ่งเกิดขึ้นในขณะการย่อยสลายและในขั้นตอนการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยความร้อน [27]

e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจากภาวะที่ดีที่สุดจาก Flavourzyme® (ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 24 เวลาย่อยสลาย 12 ชม.) มีความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน คาร์โบไฮเดรท และค่าเกลือ ร้อยละ 30.10, 63.62, 2.85, 0.05, 3.38 และ 8.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนและสารที่ให้กลิ่นและรส และโปรตีนยังมีส่วนช่วยในการตรึงกลิ่นสารที่ระเหยได้ [32] ซึ่งสอดคล้องกับผลการประเมินคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ทางประสาทสัมผัสของ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ซึ่งมีค่าอยู่ในระดับสูง (ตารางที่ 1) ปริมาณไขมันใน e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Flavourzyme® มีค่าต่ำกว่าปริมาณไขมันที่มีอยู่ในกากถั่วเขียว รวมทั้งในงานวิจัยอื่นๆ ซึ่งมีปริมาณไขมันประมาณร้อยละ 0.5-3.88 [27, 10] อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการแยกส่วนของแข็งออกจากส่วนของเหลว สามารถกำจัดไขมันซึ่งติดอยู่กับส่วนที่ไม่ละลายน้ำออกไปได้มาก

สำหรับปริมาณคาร์โบไฮเดรทของ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจากเอนไซม์ Flavourzyme® ต่ำกว่าปริมาณที่พบในกากถั่วเขียว อาจเนื่องมาจากระหว่างการทำให้เข้มข้นเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด และ strecker degradation โดยคาร์โบไฮเดรทที่มีอยู่ในวัตถุดิบทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนและเพปไทด์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ได้สารระเหยที่ให้กลิ่นหอมหลายชนิด [33, 34, 35] ทำให้ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีคาร์โบไฮเดรทร้อยละ 3.38 และกากถั่วเขียวมีร้อยละ 11.01

e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีค่าเกลือร้อยละ 8.00 ซึ่งสูงกว่าปริมาณเกลือใน e-MPH ก่อนการทำให้เข้มข้น (ร้อยละ 4.80) เนื่องจากหลังการระเหยน้ำออกทำให้สารประกอบต่างๆ ใน e-MPH เพิ่มขึ้น จึงทำให้ปริมาณเกลือ e-MPH เข้มข้นสูงขึ้น โดยปริมาณเกลือใน e-MPH ช่วยเพิ่มรสชาติของสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่ได้จากการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นสารตั้งต้น

กรดอะมิโนใน e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® โดยไม่ผ่านขั้นตอนการย่อยสลายด้วยกรดก่อนวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC มีชนิดของกรดอะมิโนอิสระ 17 ชนิด ได้แก่ แอสพาร์ติก เซอรีน กลูตามิก ไกลซีน ฮีสทิดีน อาร์จินีน ทรีโอนีน อะลานีน โพรลีน ซิสทีอีน ไทโรซีน วาลีน เมทไธโอนีน ไลซีน ไอโซลูซีน ลูซีน และฟีนิลอะลานีน (ตารางที่ 2) ซึ่งกรดอะมิโนอิสระใน e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าในกากถั่วเขียว (ย่อยด้วยกรด HCL 6 นอร์มัล 24 ชม.) ได้แก่ เซอรีน ฮีสทิดีน อาร์จินีน ทรีโอนีน ไทโรซีน วาลีน เมทไธโอนีน ไลซีน ไอโซลูซีน ลูซีน และฟีนิลอะลานีน ซึ่งทั้งนี้อาจเป็นเพราะความร้อนที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและในขั้นตอนยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในระหว่างขั้นตอนการย่อยสลาย รวมทั้งการแยกส่วนของเหลวซึ่งเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทออกจากกากถั่วเขียวในขั้นตอนการย่อยสลาย โดยความร้อนทำลายโครงสร้างของโปรตีนขนาดใหญ่ ได้เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กลง ซึ่งมีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซท ทำให้มีปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทมากกว่าในวัตถุดิบ [36] ซึ่งสอดคล้องกับ Netto และคณะ [5] ที่รายงานว่าปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทมีปริมาณมากกว่าในวัตถุดิบ เป็นปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นซึ่งพบในโปรตีนไฮโดรไลเซทและมีความจำเพาะกับเอนไซม์ Flavourzyme® โดยกรดอะมิโนใน e-MPH มีปริมาณอาร์จินีนสูงที่สุด ร้อยละ 11.24 รองลงมา คือ ลิวซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน เซอรีน พบปริมาณร้อยละ 11.10, 9.90, 9.51 และ 9.06 ตามลำดับ โดยกรดอะมิโนอาร์จินีนให้รสชาติหอมหวาน ส่วนลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ให้รสขม และเซอรีนให้รสชาติหวานและเปรี้ยว

สอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสของ e- MPH ที่มีรสชาติหอมหวานและมีรสขม

กรดอะมิโนซิสทิอีนในกากถั่วเขียวมีปริมาณน้อยมาก (ร้อยละ 0.71) และไม่พบใน e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® อาจเนื่องจากซิสทิอีนเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ระหว่างซีสทีอีน 2 โมเลกุล ได้เป็นซีสทีน (cystine) ซึ่งสามารถเกิดได้ง่าย อีกทั้งความร้อนเป็นตัวเร่งในการเกิดพันธะอีกด้วย [37]

ปริมาณไกลซีนและอะลานีนใน e-MPH ที่ผลิตจาก Flavourzyme® (ตารางที่ 3) เท่ากับร้อยละ 1.90 และปริมาณอะลานีนใน e-MPH ที่ผลิตจาก Flavourzyme® เท่ากับร้อยละ 3.86 โดยที่ไกลซีนและอะลานีนเป็นสารตั้งต้นในการเกิดกลิ่นรสกับสารประกอบประเภทไดคีโตนในปฏิกิริยาเมลลาร์ด เกิดเป็นสารประกอบไพราซีน ซึ่งเป็นสารประกอบที่มักพบในโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตด้วยเอนไซม์ เช่น trimethylpyrazine, 3-ethyl-2,5-dimethyl-pyrazine และ 6-ethyl-2,3,5-trimethylpyrazine เป็นต้น [38, 39] สอดคล้องกับคะแนนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของ e-MPH ที่ผลิตจาก Flavourzyme® ซึ่งมีคะแนนสูง สำหรับปริมาณโพรลีนใน e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีค่าเท่ากับร้อยละ 1.55 ซึ่งสอดคล้องกับ Aaslyng และคณะ [40] ที่รายงานว่า Flavourzyme® ไม่สามารถย่อยสลายเพปไทด์ที่มีโพรลีนอยู่ในสายพอลีเพปไทด์ได้

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางกายภาพและเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตได้จาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 24 เวลาย่อยสลาย 12 ชม.

องค์ประกอบทางกายภาพและเคมี		โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้น โดยเอนไซม์ Flavourzyme® (ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน)
ค่าสี	L* value	30.10 ± 0.15
	a* value	2.30 ± 0.10
	b* value	8.70 ± 0.05
ค่าเกลือ NaCl (มก./100 มล.)		8.00 ± 1.10
ความชื้น		30.10 ± 0.53
โปรตีน (%)		63.62 ± 0.17
เถ้า (%)		2.85 ± 0.12
ไขมัน (%)		0.05 ± 0.01
คาร์โบไฮเดรท (%)		3.38 ± 0.27

ตารางที่ 3 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 24 เวลาย่อยสลาย 12 ชม. และกากถั่วเขียวเริ่มต้น

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (ร้อยละ)	
	โปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นย่อยสลายด้วย Flavourzyme®	กากถั่วเขียว
กรดแอสพาร์ติก	2.32	12.15
เซอรีน	9.06	7.22
กรดกลูตามิก	5.90	18.92
ไกลซีน	1.90	4.58
ฮีสทิดีน	7.53	2.34
อาร์จินีน	11.24	8.46
ทรีโอนีน*	4.47	3.58
อะลานีน	3.86	4.59
โพรลีน	1.55	5.50
ซิสทิอีน	0.00	0.71
ไทโรซีน	6.21	3.38
วาลีน*	6.94	3.38
เมทไธโอนีน*	2.07	1.33
ไลซีน*	9.90	7.73
ไอโซลูซีน*	6.44	3.38
ลิวซีน*	11.10	6.64
ฟีนิลอะลานีน*	9.51	6.12

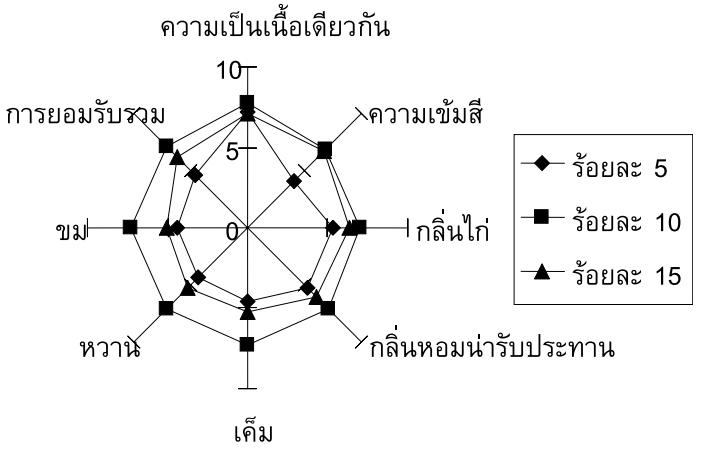
หมายเหตุ * = กรดอะมิโนจำเป็นที่ร่างกายต้องการ

3.4 การพัฒนาโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ (chicken flavor)

e-MPH จากชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายและปริมาณ e-MPH เข้มข้นที่เติมเพื่อผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่มีอิทธิพลร่วมกันต่อคะแนนการยอมรับของผลิตภัณฑ์ในด้านความเป็นเนื้อเดียวกัน กลิ่นไก่ กลิ่นหอมน่ารับประทาน รสหวาน เค็ม ขม และความชอบโดยรวมอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีผลร่วมกันต่อคะแนนการยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้านความเข้มสีของผลิตภัณฑ์ การใช้ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 10 มีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติสูงที่สุด เมื่อเทียบกับ e-MPH เข้มข้นจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 5 และ 15 โดยได้คะแนนความเป็นเนื้อเดียวกัน ความเข้มของผลิตภัณฑ์กลิ่นไก่ กลิ่นหอมน่ารับประทาน รสเค็ม รสหวาน รสขม และความชอบโดยรวมเท่ากับ 7.75, 6.94, 7.00, 7.19,

7.25, 7.06, 7.31 และ 7.19 ตามลำดับ (รูปที่ 4) การเพิ่มปริมาณของ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 15 พบว่าค่าเฉลี่ยของคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติลดลง ซึ่งอาจเนื่องจากปริมาณของ e-MPH เข้มข้นที่ใช้มากเกินไปจนเหม็นกลิ่นคาวไก่ ดังนั้นจึงเลือกภาวะในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ซึ่งใช้ e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 10 สำหรับศึกษาขั้นต่อไป

แม้ว่า e-MPH เข้มข้นที่ผลิตจาก Flavourzyme® มีกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น เมทไธโอนีน (ตารางที่ 3) รวมทั้งซิสทิอีนที่เปลี่ยนเป็นซิสทีน ซึ่งมีบทบาทในการเป็นสารตั้งต้นของปฏิกิริยาการเกิดกลิ่นรสเนื้อสัตว์ [34] โดยเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวซ์หรือสารประกอบคาร์บอนิลที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซทในภาวะที่อุณหภูมิสูง แต่ปริมาณที่มีอยู่เป็นปริมาณที่ไม่สามารถทำให้เกิดกลิ่นรสเนื้อเฉพาะได้ ในการทดลองมีการเติมซิสทิอีนเพิ่มอีก 0.005 โมล เนื่องจากต้องการให้เกิดปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบสซึ่งเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่เติมลงไป เพื่อให้เกิดกลิ่นรสไก่ที่เด่นชัด เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทมีกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์หลายชนิด เมื่อให้ความร้อนเพื่อเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ดอาจได้กลิ่นรสเนื้อสัตว์ ที่ไม่สามารถบ่งชี้ประเภทของกลิ่นรสเนื้อสัตว์ได้ [41] อย่างไรก็ตาม กลิ่นรสเนื้อสัตว์ยังขึ้นอยู่กับสภาวะการผลิต ชนิด และระดับของสารตั้งต้นในการเกิดกลิ่นรสเนื้อสัตว์แต่ละชนิด [42] ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงเป็นส่วนผสมที่สำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส โดยเฉพาะการผลิตสารให้กลิ่นรสเนื้อ สารสำคัญที่ให้กลิ่นไก่ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาเมลลาร์ดได้แก่ 2-methyl-3-furanthiol, 2-furfurylthiol, methionol, 2,4,5-trimethyl-thiazole, nonanol และ 2-trans-nonenal รวมทั้งรสชาติที่เกิดขึ้นในโปรตีนไฮโดรไลเซทซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนชนิดต่างๆ



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติของสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ จากโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นจากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme®

3.5 การเปรียบเทียบสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จากโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้าในรูปผลิตภัณฑ์ผงรสไก่

ชนิดและปริมาณของสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ชนิดผงรสไก่ที่ได้จาก Flavourzyme® มีอิทธิพลร่วมกัน ($p \leq 0.05$) ต่อคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะทางกายภาพ กลิ่นไก่ กลิ่นหอม ความน่ารับประทาน รสหวาน รสเค็ม รสขม และการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์ แต่ไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($p > 0.05$) ต่อคะแนนการยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้านความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์

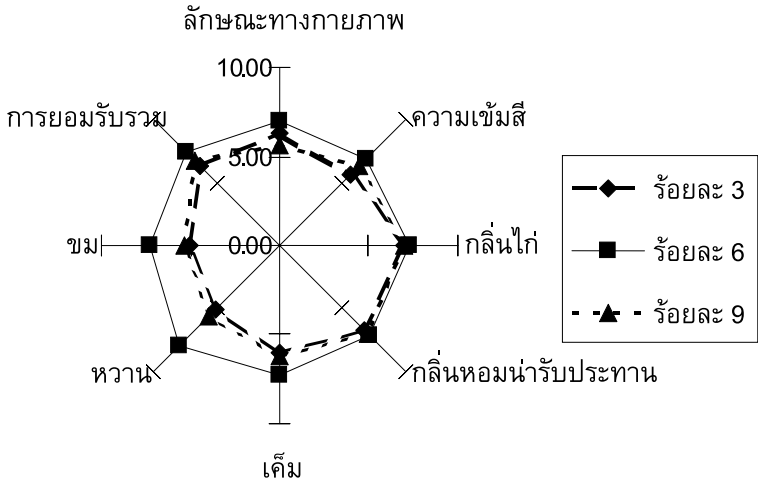
การผลิตผงรสไก่จากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ซึ่งผลิตจาก e-MPH เข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® โดยเติมปริมาณร้อยละ 3, 6 และ 9 ผสมเข้ากับส่วนประกอบอื่นๆ พบว่าคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นด้านความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 5) โดยผงรสไก่ที่เติมสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่จาก e-MPH เข้มข้นที่ได้จากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 6 ได้คะแนนด้านลักษณะทางกายภาพเท่ากับ 7.00 ความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.94 กลิ่นไก่เท่ากับ 7.31 กลิ่นหอมน่ารับประทานเท่ากับ 7.19 รสเค็มเท่ากับ 7.26 รสหวานเท่ากับ 7.92 รสขมเท่ากับ 7.24 และความชอบโดยรวมเท่ากับ 7.37 ซึ่งได้คะแนนความชอบทุกด้านสูงกว่าผงปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ที่เติม e-MPH ปริมาณร้อยละ 3 และ 9

ส่วนการผลิตผงรสไก่จากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้าจากผงรสไก่ โดยเติมปริมาณร้อยละ 3, 6 และ 9 ผสมกับส่วนประกอบอื่นๆ พบว่าคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ยกเว้นด้านรสหวานที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาตินำซุปผงรสไก่ ดังรูปที่ 6 พบว่าภาวะการผลิตผงสำหรับทำน้ำซุปรสไก่ที่เติมสารปรุงแต่งผงกลิ่นรสไก่ทางการค้าปริมาณร้อยละ 6 มีคะแนนสูงที่สุด ดังนี้ คะแนนด้านลักษณะทางกายภาพเท่ากับ 6.92 ความเข้มของสีของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.86 กลิ่นไก่เท่ากับ 7.30 กลิ่นหอมน่ารับประทานเท่ากับ 7.20 รสเค็มเท่ากับ 7.31 รสหวานเท่ากับ 7.95 รสขมเท่ากับ 7.25 และความชอบโดยรวมเท่ากับ 7.38

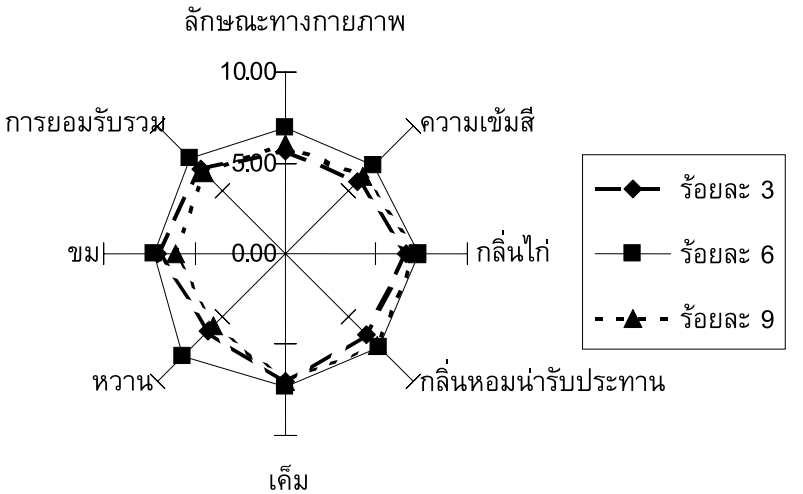
เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติผงรสไก่ (รูปที่ 5-6) พบว่า สารปรุงแต่งกลิ่นรส e-MPH เข้มข้นจากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 10 ผสมกับเกลือ น้ำตาล ซีอิ๊วผง และกระเทียมผง นำมาปริมาณร้อยละ 6 ผสมในน้ำร้อน ได้สารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ชนิดผง ที่มีคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติที่ดีที่สุดและไม่แตกต่างกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้าปริมาณร้อยละ 6

4. สรุป

ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในกากถั่วเขียวหลังการสกัดไขมันเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีกลิ่นดีที่สุด และ %DH สูง คือ ย่อยสลายด้วย Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 24 ที่อุณหภูมิ 50°C pH 7.0 เป็นเวลา 12 ชม. ซึ่ง e-MPHs เข้มข้นที่ได้มีโปรตีนร้อยละ 63.62 เถ้าร้อยละ 2.85 ไขมันร้อยละ 0.05 คาร์โบไฮเดรทร้อยละ 3.38 และเกลือร้อยละ 8.00 มีกรดอะมิโน 17 ชนิด เรียงจากปริมาณมากไปน้อยดังนี้ อาร์จินีน ลิวซีน ไลซีน ฟีนิลอะลานีน เซอรีน ฮีสทิดีน วาลีน ไอโซลูซีน ไทโรซีน กลูตามิก ทรีโอนีน อะลานีน เมทไธโอนีน ไกลซีน โพรลีน ซิสทีอีน และแอสพาร์ติก เมื่อนำ e-MPHs เข้มข้นจากภาวะที่ดีที่สุดที่ผลิตจาก Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 10 ผสมกับแอล-ซีสทีอีน 0.5 มิลลิโมล น้ำตาลไรโบส 0.5 มิลลิโมล ที่ pH 6.0 ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1.5 ชม. ได้สารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ที่มีรสขมต่ำที่สุด และรสหวานกลิ่นเนื้อสัตว์ และความชอบโดยรวมดีที่สุด หลังจากนั้นนำสารปรุงแต่งแต่ละชนิดมาประยุกต์เป็นผงปรุงแต่งรสไก่ ปริมาณร้อยละ 6 ผสมกับเกลือ น้ำตาล ซีอิ๊วผง และกระเทียมผง ร้อยละ 41, 20, 18.5 และ 6.5 น้ำหนักต่อน้ำหนัก ตามลำดับ สรุปได้ว่า e-MPHs เข้มข้นที่ผลิตจากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® มีศักยภาพในการใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ชนิดผงรสไก่ ซึ่งได้กลิ่นรสไก่ใกล้เคียงกับสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้า



รูปที่ 5 ค่าเฉลี่ยการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติของผงรสไก่จากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ผลิตจากโปรตีนไฮโดรไลเซทเข้มข้นได้จากการย่อยสลายกากถั่วเขียวด้วย Flavourzyme® ปริมาณร้อยละ 3, 6 และ 9



รูปที่ 6 ค่าเฉลี่ยการยอมรับทางประสาทสัมผัสด้านกลิ่นและรสชาติของผงรสไก่จากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ผลิตจากสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ทางการค้า ปริมาณร้อยละ 3, 6 และ 9

5. เอกสารอ้างอิง

1. Sahasakmontri, K., 2001, *Process Development of Seasoning Sauce using Enzyme to Reduce 3-MCPD Substance*, Master Thesis, Major Field Agro-Industrial Product Development, Department of Product Development, Kasetsart University. (In Thai)

2. Trakanchaiwong, R., 2002, *The Production of Low Fat Protein Hydrolysate from Surimi Industry By-Product*, Master Thesis, Major Field Food Science, Department of Food Science and Technology, Kasetsart University. (In Thai)

3. Cigic, B. and Zelenik-Blatnik, M., 2004, "Preparation and Characterization of Chicken Egg White Hydrolysate", *Acta Chimica Slovenica*, Vol. 51, pp. 177-188.

4. Wu, Y.F. and Cadwallader, K. R., 2002, "Characterization of the Aroma of a Meatlike Process Flavoring from Soybean-Based Enzyme-Hydrolyzed Vegetable Protein", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, pp. 2900-2907.

5. Netto, F.M. and Galeazzl, M.A.M., 1998, "Production and Characterization of Enzymatic Hydrolysate from Soy Protein Isolate", *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, Vol. 31, pp. 624-631.

6. Clemente, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F., 1999, "Protein Quality of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Protein Hydrolysates", *Food Chemistry*, Vol. 67, pp. 269-274.

7. Krzysztof, S., Daniel, Z., Miroslaw, F., Ryszard, M., and Wieslaw, L., 2004, "New Protein Preparations from Soy Flour Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis of Extrudates", *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, Vol. 5, pp. 225-234.

8. Wu, Y.F., Baek, H.H., Gerard, P.D., and Cadwallader, K.R., 2000, "Development of a Meat-like Process Flavoring from Soybean-Based Enzyme-Hydrolyzed Vegetable Protein (E-HVP)", *Journal of Food Science*, Vol. 65, No. 7, pp. 1220-1227.

9. Suthasinee, N., Sittiwat, L., Manop, S., and Apinya, A., 2004, "Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases", *Journal of Food Engineering*, Vol. 70, No. 4, pp. 571-578.

10. Sukcharoensakkul, A., 1992, *Production of Protein Hydrolysate from Tuna Precooking Water for Food Flavor*, Master Thesis, Department of Food Technology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. (In Thai)

11. Yeneng, S., 2001, *Production of Shrimp Sauce from Shrimp Cooking Water*, Master Thesis, Major Field Fishery Products, Department of Fishery Products, Kasetsart University. (In Thai)

12. Diniz, F.M. and Martin, A.M., 1997, "Effects of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Functional Properties of Shark Protein Hydrolysate", *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, Vol. 30, pp. 266-272.

13. Oupadissakoon, C., Nayvikul, O., and Prabhavat, S., 1995, "Utilization of Mungbean", *Proceeding of the Sixth Mungbean Workshop*, Nakhon Ratchasima, Thailand, pp. 348-363. (In Thai)

14. Thompson, L.U., 1977, "Preparation and Evaluation of Mungbean Protein Isolates", *Journal of Food Science*, Vol. 46, No. 1, pp. 202-206.

15. AOAC, 2000, *Official Methods of Analysis*, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.

16. Novozyme, 2002c, *Flavourzyme® Food Grade*, Special Food Product Sheet, Denmark, pp. 1-3.

17. Edward, J.H. and Shipe, W.F., 1978, "Characterization of Plastein Reactions Products Formed by Pepsin, alpha-Chymotrypsin and Papain Treatment of Egg Albumin Hydrolysates", *Journal of Food Science*, Vol. 43, pp. 1215.

18. Parkerson, C.K. 1951, "Determination of Saturation Temperatures of Inorganic Salt Solution: Refractive Index Measurements, *Analytical Chemistry*, Vol. 23, No. 4, pp. 610-613.

19. StatSoft's Ltd., USA, 1995.

20. Baerbel, L., Gerd, K., and Wigbert, S., 1985, "Taste-Modified Protein Hydrolysate", *Chemical Abstract*, Vol. 103, pp. 10095.

21. Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., and Kilara, A., 1996, "Functional Properties of Hydrolysates from Proteolysis of Heat-Denatured Whey Protein Isolate", *Journal of Food Science*, Vol. 61, pp. 270–274, 303.

22. Jomduang, S., 1985, *Production and Characterization of Vegetable Protein Products from Mungbean and Soybean*, Master Thesis, Major Field Food Science, Department of Food Science and Technology, Kasetsart University. (In Thai)

23. Chindapan, R. and Anprung, P., 2001, "*Production of Foaming Agent from Mungbean Protein by Enzyme*", Food, Vol. 31, pp. 105-118. (In Thai)

24. Kanuekrat, U., 2005, *Production of Protein Hydrolysate from Soybean and Mungbean Meals for Flavoring Agents*, Master Thesis, Biochemical Technology, School of Bioresources and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi. (In Thai)

25. Manley, C.H. and Fagerson, I.S., 1971, "Aspects of Aroma and Taste Characteristics of Hydrolyzed Vegetable Protein", *Flavour Industry*, Vol. 2, No. 12, pp. 686-690.

26. Simon-Sarkadi, L., Kocsy, G., Sebestyen, Z., 2002., "Effect of Salt Stress on Free Amino Acid and Polyamide Content in Cereals", *Acta Biologica Szegediensis*, Vol. 46, pp. 73-75.

27. Aspmo, S.I., Horn, S.J., and Eijsink, V.G.H, 2005, "Enzymatic Hydrolysis of Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.) viscera", *Process Biochemistry*, Vol. 40, No. 5, pp. 1957-1966.

28. Montgomery, D.C., 1991, *Design and Analysis of Experiments*, 3rd ed., John Wiley & Sons Inc., USA

29. Smyth, M. and FitzGerald, R.J., 1998, "Relationship between Some Characteristics of WPC Hydrolysates and the Enzyme Complement in Commercially Available Proteinase Preparations", *International Dairy Journal*, Vol. 8, pp. 819-827.

30. Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2005, "Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases", *Journal of Food Engineering*, Vol. 70, No. 4, pp. 571-578.

31. Danehy, J.P. and Pigman, W.W., 1951, "Reaction between Sugars and Nitrogeneous Compounds and Their Relationship to Certain Food Problems", *Advances in Food Research*, Vol. 3, pp. 241-281.

32. Charalambous, G., 1980, *The Analysis and Control of Less Desirable Flavors in Foods and Beverages*, Academic Press Inc., New York, pp. 95-131.

33. Chatdecha, S., 1990, *Production and Utilization of Protein Hydrolysate from Defatted Soybean Meal and Glass Noodle Industry By-Product*, Master Thesis, Major Field Food Science, Department of Food Science and Technology, Kasetsart University. (In Thai)

34. Pendergast, K., 1973, "Versatility of Proteins Hydrolysate", *Food Manufacture*, Vol. 48, No. 4, pp. 37-39, 57.

35. Deman, J.M., 1980, *Principles of Food*

Chemistry, AVI Publishing, New York, 426 p.

36. Ishikawa, M., Mori, S., Watanabe, H., and Sakai, Y., 1987, "Relation between Softening Rate and Solubilization Rate of Organic from Fish Bone", *Journal of Food Processing and Preservation*, Vol. 11, pp. 277-287.

37. Alasksena, M., Romarheima, O., Storebakkena, T., and Shrede, A., 2006, "Evaluation of Content and Digestibility of Disulfide Bonds and Free Thiols in Unextruded and Extruded Diets Containing Fish Meal and Soy Protein Sources", *Animal Feed Science and Technology*, Vol. 128, No. 3-4, pp. 320-330.

38. Rizzi, G.P., 1972, "A Mechanistic Study of Alkylpyrazine Formation in Model Systems", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 20, pp. 1081-1085.

39. Manley, C.H., McCann, J.S., and Swaine, R.L. Jr., 1981, *The Chemical Base of the Taste and Flavor Enhancing Properties of Hydrolyzed Protein. In The Quality of Food and Beverages*: *Chemistry and Technology*, Charalalambous, G., Inglett, G., Eds.; Academic Press: New York, pp. 61-82.

40. Aaslyng, D.M., Magni, M., Poll, L., Nielsen, P.M., Flyge, H., and Larsen, L.M., 1998b, "Chemical and Sensory Characterization of Hydrolyzed Vegetable Protein, A Savory Flavoring", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, pp. 481-489.

41. Varavinit, S., Shobsngob, S., Bhidyachakorawat, M., and Suphantharika, M., 2000, "Production of Meat-Like Flavor", *Science Asia*, Vol. 26, pp. 219-224.

42. Hofmann, T. and Schieberle, P., 1997, "Identification of Potent Aroma Compounds in Thermally Treated Mixtures of Glucose/Cysteine and Rhamnose/Cysteine Using Aroma Extract Dilution Techniques", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 45, pp. 898-906.