



การสกัดและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่และการประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่

EXTRACTION AND PROPERTIES OF  
GELATIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN FEET AND  
ITS APPLICATION IN CHICKEN SAUSAGE

มัธยัญญี โคมะจะบก

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563



1839633776

BUU iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142



60910022\_1839633776

การสกัดและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากหัวไก่และการประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่

มัธยัญญี โคมจะบก

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา



1839639776

BUU-IThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

EXTRACTION AND PROPERTIES OF  
GELATIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN FEET AND  
ITS APPLICATION IN CHICKEN SAUSAGE

MATTAYANEE LOMJABOK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE  
IN FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
BURAPHA UNIVERSITY

2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

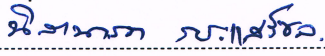



183963776

BUU iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ มัชฌิณี โลมจะบก ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของมหาวิทยาลัย  
บูรพาได้

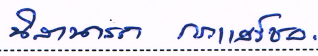
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

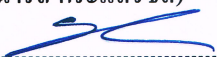
 อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ดร. นิตานารถ กระแสร์ชด)


 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สามารถ สายอูด)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


 ประธาน  
(รองศาสตราจารย์ ดร. อภัสรา แสงนาค)

 กรรมการ  
(ดร. นิตานารถ กระแสร์ชด)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สามารถ สายอูด)

 กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิชมณี ยืนยงพุทธกาล)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร ของมหาวิทยาลัย  
บูรพา

 คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 3 เดือน พฤศจิกายน พ.ศ. 2563



1539693776

BUU iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพา  
ประจำปีงบประมาณ 2562

60910022: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร; วท.ม. (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)  
 คำสำคัญ: เท้าไก่, เอนไซม์, เจลาตินไฮโดรไลเสต, สารต้านอนุมูลอิสระ, ไส้กรอกไก่  
 มัชฌาณีย์ โลมจะบก : การสกัดและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่และการประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่. (EXTRACTION AND PROPERTIES OF GELATIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN FEET AND ITS APPLICATION IN CHICKEN SAUSAGE) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: นิสานารถ กระแสร์ชล, สามารถ สายอุต ปี พ.ศ. 2563.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสกัดเจลาตินจากเท้าไก่และศึกษาชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด โดยเจลาตินจากเท้าไก่ที่ถูกเตรียมด้วยกรดพบว่า มีโปรตีน (84.42%) และไฮดรอกซีโพรลีน (27.03%) สูง เมื่อนำมาศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ (เปปซิน ทริปซิน ปาเปน และอัลคาเลส) ต่อระดับการย่อยคอลลาเจนจากเท้าไก่และพิจารณาด้วยจลนศาสตร์ พบว่าเปปซินมีค่า  $K_m$  ต่ำกว่าอัลคาเลสและปาเปน ( $p > 0.05$ ) รวมทั้งเปปซินมีราคาซึ่งเป็นต้นทุนการผลิตถูกกว่าเอนไซม์อีก 3 ชนิด เปปซินจึงถูกเลือกเพื่อเตรียมเจลาตินไฮโดรไลเสตในขั้นตอนการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Central composite design พบว่าสมการที่ได้มีความสัมพันธ์ที่ดีระหว่างปัจจัยที่ใช้ในการย่อยกับค่าคุณภาพของเจลาตินไฮโดรไลเสต ( $R^2 > 0.90$ ,  $p \leq 0.05$ ) ซึ่งปริมาณเปปซินและระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน ( $Y_1$ ) และปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ ( $Y_3$ ) โดย  $Y_1$  และ  $Y_3$  เพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซิน อีกทั้งยังสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ( $Y_2$ ) ที่เพิ่มมากขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและลดลงเมื่อปริมาณเปปซินและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น และจากการใช้เทคนิคการซ้อนทับกราฟของพื้นที่ผิวตอบสนอง พบว่ามี 4 สภาวะ ได้แก่สภาวะ  $Y_1$ ,  $Y_3$ , และ  $Y_4$  มากที่สุดและสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละค่าคุณภาพ (จุดกึ่งกลางระหว่างค่าคุณภาพทั้ง 3 ค่า) โดยได้เลือกจุด  $Y_4$  ที่สามารถผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด โดยเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากสภาวะที่เหมาะสมนี้ถูกประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ (ในปริมาณ 1%, 3% และ 5%) การเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมากขึ้นส่งผลให้มีค่า TBARS ค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวเพิ่มมากขึ้น แต่มีผลให้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าสีลดลง ในขณะที่การเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตไม่มีผลต่อมีค่า  $a_w$  ค่าการเกาะติดของอาหาร ค่าความยืดหยุ่น ค่าการยึดเกาะกันของอาหาร และการประเมินคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ดังนั้นเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหารทางเลือกที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้

60910022: MAJOR: FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY; M.Sc. (FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY)

KEYWORDS: CHICKEN FEET, ENZYMES, GELATIN HYDROLYSATE, ANTIOXIDANT, CHICKEN SAUSAGE

MATTAYANEE LOMJABOK : EXTRACTION AND PROPERTIES OF GELATIN HYDROLYSATE FROM CHICKEN FEET AND ITS APPLICATION IN CHICKEN SAUSAGE. ADVISORY COMMITTEE: NISANARTH KRASAECHOL, Ph.D., SAMART SAIUT, Ph.D. 2020.

The aims of this study were to gelatin extract from chicken feet, and to optimize the type and amount of enzymes that would provide conditions to obtain a gelatin hydrolysate with the highest antioxidant activity. Gelatin from chicken feet was prepared by acid treatment. Chicken feet gelatin showed high in protein (84.42%) and Hydroxyproline (27.03%). Effect of enzyme types (pepsin, trypsin, papain and alcalase) on degree of hydrolysis of collagen from chicken feet and kinetics were investigated. Pepsin had lower  $K_m$  than alcalase and papain ( $p > 0.05$ ), which was cheaper than the other enzymes. Pepsin was selected to prepare gelatin hydrolysate. The production of gelatin hydrolysate from chicken feet with antioxidative activities were conducted by using central composite design of response surface methodology. The experimental results showed that there was a good correlation between digestion factor and the quality of gelatin hydrolysate ( $R^2 > 90$ ,  $p \leq 0.05$ ). Pepsin concentration and digestion time were related to the protein content ( $Y_1$ ) and the hydrophobicity protein content ( $Y_3$ ). Increasing in pepsin concentration had increased protein content and hydrophobicity value of gelatin hydrolysate. In addition, ABTS radical scavenging activity ( $Y_4$ ) was increased up to a certain level and their had decreased, when the pepsin concentration and digestion time was increased. The super impose technique of response surface plots were 4 conditions:  $Y_1$ ,  $Y_3$ , and  $Y_4$  conditions at maximum and optimal conditions for each quality value (The middle point between the 3 quality values). The  $Y_4$  condition was considered to produce gelatin hydrolysate with the highest ABTS radical scavenger activity. Gelatin hydrolysate produced by the optimum condition was applied in chicken sausages (in the content of 1%, 3% and 5%). Gelatin hydrolysate supplementation affected the TBARS, hardness, gumminess and chewiness increased, while total microbial and color values decreased with increasing gelatin hydrolysate concentration. However,  $a_w$ , adhesiveness, springiness, cohesiveness and sensory evaluation were not affected by gelatin hydrolysate. Therefore, gelatin hydrolysate from chicken feet can be used as an alternative food ingredient with antioxidant.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ ดร.นิสานารถ กระแสร์ชล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ผศ.ดร.สามารถ สายอูด อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ช่วยกรุณาให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะตลอดการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จเป็นรูปเล่มที่สมบูรณ์ นอกจากนี้ยังดูแลเอาใจใส่และให้กำลังใจเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจเป็นอย่างยิ่ง จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ได้แก่ รศ. ดร. อภัสรา แสงนาค และ ผศ.ดร.วิชมณี ยืนขงพุทธกาล ที่ได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำในการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ตลอดจนคณะกรรมการผู้สอบเข้าโครงวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาให้คำแนะนำและให้ข้อคิดเห็นอันเป็นประโยชน์กับงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่าน ที่คอยให้คำแนะนำและให้การช่วยเหลืออย่างดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ ดร.นิสานารถ กระแสร์ชล และ ผศ.ดร.สามารถ สายอูด สำหรับความกรุณาในการให้ความอนุเคราะห์ทุนวิจัยและสารเคมีต่าง ๆ จนสามารถทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ทนุอดหนุนวิทยานิพนธ์และคุณฐิณีพันธ์สำหรับนิติระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยบูรพา และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยบริการนวัตกรรมการทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIF-IN-60910022)

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อนพดล และคุณแม่เสาวนีย์ โลมจะบก ตลอดจนเพื่อน ๆ ที่คอยให้คำปรึกษาและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา จนสามารถทำสิ่งต่าง ๆ ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการีบูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

มัชฌาณี โลมจะบก



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ .....	ช
สารบัญตาราง .....	ฌ
สารบัญภาพ .....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
สมมติฐานของการวิจัย .....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร .....	5
2.1.1 ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก.....	5
2.1.2 การใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้.....	7
2.2 คอลลาเจน (Collagen) .....	9
2.3 เจลาตินไฮโดรไลเสต (Gelatin hydrolysate).....	11
2.4 เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant peptides).....	32
2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสต.....	45
2.6 การประยุกต์ใช้เจลาตินไฮโดรไลเสต.....	48



183963776

BUU-IThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

บทที่ 3.....	51
วิธีดำเนินการวิจัย.....	51
บทที่ 4.....	66
ผลการวิจัยและอภิปรายผล .....	66
บทที่ 5.....	111
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	111
บรรณานุกรม.....	113
ประวัติย่อของผู้วิจัย .....	194



183963776

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและการนำไปใช้.....	6
2-2 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่.....	8
2-3 สมบัติทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเสตของผลพลอยได้ของไก่ที่ แตกต่างกัน.....	9
2-4 โปรตีนเอสที่ใช้กันทั่วไปสำหรับโปรตีนไฮโดรไลเสต.....	18
2-5 สภาวะการย่อยโปรตีนของผลพลอยได้จากสัตว์ที่มีการวิเคราะห์กิจกรรมการต้าน อนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ.....	23
2-6 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากผลพลอยได้ของสัตว์.....	37
2-7 การประยุกต์ใช้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากผลพลอยได้ชนิดต่าง ๆ .	47
3-1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	57
3-2 สิ่งทดลองในการวางแผนการทดลองแบบ CCD หาสภาวะที่เหมาะสมของอัตราส่วน ความเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ ต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชัน.....	59
3-3 ส่วนผสมสำหรับการผลิตไส้กรอกไก่ในแต่ละสิ่งทดลอง.....	64
4-1 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่และเจลาตินจากเท้าไก่.....	67
4-2 กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	68
4-3 จนพลศาสตร์ของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเจลาตินจากเท้าไก่ตามสภาวะที่เหมาะสม ของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	70
4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง ( $Y_{1-6}$ ) กับตัวแปรที่ศึกษา ( $X_{1-2}$ ) แสดงในรูปของ สมการถดถอยแบบพหุ ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ ( $R^2$ ) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า X และ Y (Model Significant) และความคลาดเคลื่อน (%Error).....	75
4-5 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนกับปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการ ย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่.....	79
4-6 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำกับปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลา ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่.....	80

4-7 ความสัมพันธ์ของความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี ATBS กับ ปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาติน ไฮโดรไลเสด จากเต้าไก่..... 81

4-8 ความสัมพันธ์ของ TBARS DPPH และ FRAP กับปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลา ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสดจากเต้าไก่..... 82

4-9 ผลการทวนสอบความแม่นยำของสมการจากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยซัฟทิบ กราฟแล้วกำหนดสภาวะที่ต้องการและแสดงผลของ %Error ของความสัมพันธ์ ระหว่าง  $X_{1-2}$  และ  $Y_{1,3,4}$  ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสดจากเต้าไก่..... 91

4-10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลเสดจากเต้าไก่ที่มีความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด..... 94

4-11 ค่าสีของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสดจากเต้าไก่..... 97

4-12 ค่า  $a_w$  ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสดจากเต้าไก่..... 98

4-13 ลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสด..... 101

4-14 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสด..... 106

4-15 ผลการทดลองคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale ของ ไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสด..... 109

ก-1 ปริมาตรของสารละลายต่อความเข้มข้นของ BSA..... 136

ก-2 ปริมาตรของสารละลายต่อความเข้มข้นของไทโรซีน..... 138

จ-1 ระดับการย่อยของเอนไซม์แต่ละชนิดตามสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินจาก เต้าไก่..... 164

จ-2 ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสด..... 165

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 ปริมาณการผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทย (ปี 2547-2566).....	6
2-2 โครงสร้างของคอลลาเจน.....	10
2-3 การเสียดสภาพธรรมชาติของคอลลาเจนเป็นเจลาติน.....	11
2-4 ลักษณะโครงสร้างของกระบวนการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์หรือเจลาตินไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์จากคอลลาเจนที่สูญเสียธรรมชาติเป็นเจลาติน.....	12
2-5 ภาพรวมของกระบวนการผลิตคอลลาเจนที่ถูกไฮโดรไลเสตหรือเจลาตินไฮโดรไลเสตโดยใช้วิธีร่วมกัน.....	15
2-6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นของซับสเตรตต่าง ๆ.....	29
2-7 Lineweaver-Burk Plot ของปฏิกิริยาของเอนไซม์.....	31
2-8 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ.....	34
2-9 กลไกการออกซิเดชันของโปรตีน.....	35
2-10 ลักษณะของกลไกทางเคมีและทางกายภาพของเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (1) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (2) ดักจับอนุมูลอิสระ (3) ขัดขวางทางกายภาพ (การป้องกัน; การกำจัด).....	41
2-11 โครงสร้างทางเคมีของกรดอะมิโนต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิดที่มีวงแหวน.....	43
4-1 เท้าไก่ (1) และเจลาตินที่ผ่านกระบวนการสกัดจากเท้าไก่ (2).....	67
4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรต (เจลาตินจากเท้าไก่) [S] กับความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (V) แต่ละชนิด.....	71
4-3 กราฟไลน์วีเวอร์-เบอร์ค (Lineweaver-Burk plot) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเจลาตินจากเท้าไก่.....	71
4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรต (เจลาตินจากเท้าไก่) กับระดับการย่อย (%) ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด.....	72
4-5 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot) (1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot) (2) ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (Protein content, $Y_1$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount, $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time, $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า $X_1$ และ $X_2$ เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414).....	87

4-6 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot) (1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot) (2) ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Protein hydrophobicity,  $Y_3$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount,  $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time,  $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)... 88

4-7 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot) (1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot) (2) ของความสัมพันธ์ระหว่างค่า ABTS ( $Y_4$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount,  $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time,  $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)..... 89

4-8 พื้นผิวที่ตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (---) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (- - -) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (—) กับปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยเมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)..... 93

4-9 ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเป็นระยะเวลา 14 วัน ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 3% (SGH 3%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 5% (SGH 5%) และไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%)..... 104

4-10 ไส้กรอกไก่ 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 3% (SGH 3%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 5% (SGH 5%) และไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%)..... 110

จ-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าจากการทำนาย (Predicted values) กับค่าจากการทดลอง (Observed values) ของปริมาณโปรตีน ( $Y_1$ , มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ ( $Y_3$ , Bound BPB,  $\mu\text{g}$ ) และ ABTS ( $Y_4$ ,  $\mu\text{mole TE/ mg protein}$ )..... 166

ช-1 ภาพภาคผนวก ช-1 เท้าไก่ (ภาพซ้าย) และเนื้ออกไก่ไม่มีหนัง (ภาพขวา) จากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี..... 192

ช-2 ลักษณะของเจลาตินจากเท้าไก่ (ภาพซ้าย) และเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ (ภาพขวา)..... 192

ช-3 ไส้กรอกไก่ 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาติน

ไฮโดรไลเสต 3% (SGH 3%) ไม้กรอกไม้เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (SGH 5%) และไม้กรอกไม้ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%).....	193
ช-4 การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสของไม้กรอกไม้ด้วยเครื่อง Texture analyzer (ภาพถ่าย) และภาพแสดงผลการวิเคราะห์ (ภาพขาว).....	193



183963776

BUU-IThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อุตสาหกรรมอาหารทั่วโลกเกิดผลพลอยได้ในระหว่างการแปรรูปอาหารปริมาณมาก ทุก ๆ ปี ประมาณ 38% (Helkar, Sahoo, & Patil, 2016) อุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีกเป็นหนึ่งในกลุ่มเกษตรและอุตสาหกรรมอาหารที่มีการเติบโตอย่างรวดเร็วที่สุดในโลก โดยการผลิตเนื้อไก่ทั่วโลกมีประมาณ 96.3 ล้านตันต่อปี ในช่วงปี 2558-2566 การผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทยมีการคาดการณ์ว่าจะเติบโตต่อเนื่องจากเดิมด้วยอัตราการเติบโตเฉลี่ยสะสม 2.7% ต่อปี (ประสิทธิ์ สุจิรวรรกุล และบุษกร สิริวัฒนเกตุ, 2558) ทำให้เกิดผลพลอยได้เป็นจำนวนมาก ซึ่งทำไก่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นประมาณ 3.9 ล้านตันต่อปี โดยทำไก่อนำมาใช้ในการปรุงอาหาร ผลิตเป็นไขมันหรือทิ้ง ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม (Chakka, Muhammed, Sakhare, & Bhaskar, 2017; Jayathilakan, Sultana, Radhakrishna, & Bawa, 2012) แต่ในขณะที่เดียวกันทำไก่ได้ถือว่าเป็นแหล่งของโปรตีน (Lasekan, Bakar, & Hashim, 2013) เป็นที่น่าสนใจว่าได้มีการนำแร่ธาตุ กรดไขมัน และวิตามินของผลพลอยได้มาใช้ รวมถึงคอลลาเจนและโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งเป็นตลาดที่กำลังเติบโตจึงทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีทางเลือกหนึ่งในการใช้ผลพลอยได้ให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้น (Schmidt et al., 2016) โดยผลพลอยได้จากสัตว์ปีกสามารถใช้เป็นแหล่งทดแทนการผลิตคอลลาเจนและเจลาตินที่มีคุณภาพสูง (Du & Betti, 2016) ทำไก่เป็นวัตถุดิบที่อุดมไปด้วยคอลลาเจนซึ่งมีหนัง เอ็น และกระดูกอ่อนเป็นองค์ประกอบหลักที่ถูกนำมาผลิตเป็นคอลลาเจน (Hashim, Ridzwan, & Baker, 2014; Vittayanont, 2007) เจลาติน (Melanie, Susilowati, Iskandar, & Laelatunur, 2015; Widiasari & Rawdkuen, 2014) คอลลาเจนไฮโดรไลเสต (Mokrejs, Gál, Janacova, Plskova, & Zacharová, 2017) และเจลาตินไฮโดรไลเสต (Iwai et al., 2005)

การดำเนินชีวิตประจำวันของคนเรามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคมามากมายที่อาจมีผลมาจากสิ่งแวดล้อมและกระบวนการเผาผลาญอาหาร ทำให้ร่างกายมีการผลิตอนุมูลอิสระจำนวนมาก รวมถึงอาหารที่มีการออกซิเดชันของไขมันเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งของอุตสาหกรรมอาหารเช่นกัน เนื่องจากทำให้คุณภาพอาหารลดลงและอายุการเก็บรักษาสั้น กระบวนการที่ไม่พึงประสงค์นี้ไม่เพียงแต่ก่อให้เกิดกลิ่นและกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์ อีกทั้งยังลดคุณค่าทางโภชนาการและความ



1839633776



ปลอดภัยของอาหาร ดังนั้นการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันและอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในอาหารจึงเป็นสิ่งสำคัญ ด้วยสาเหตุนี้อาหารบางชนิดจึงมีการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ และยังสามารถยืดอายุในการเก็บรักษาอาหารจากการออกซิเดชัน แต่การใช้สารสังเคราะห์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีข้อจำกัดในการใช้เป็นสารเติมแต่งในอาหาร เนื่องจากอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ ดังนั้นการใช้สารต้านอนุมูลอิสระตามธรรมชาติจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง เช่น เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Cai et al., 2015; Jridi et al., 2014; Li, Chen, Wang, Ji, & Wu, 2007; Nasri et al., 2013) เป็นต้น

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากคอลลาเจนและเจลาตินที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ กลายเป็นหัวข้อที่น่าสนใจอย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมอาหารเพื่อสุขภาพและการแปรรูป (Jridi et al., 2014) โดยคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างในลักษณะของเส้นใยซึ่งมีความเสถียรจะสูญเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส กลายเป็นเกลียวที่ไม่เป็นระเบียบ (เจลาติน) (Sarbon, Badii, & Howell, 2015; สีนินาด สุขไกว, 2555) เมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอยู่ในช่วง 0.3-8 kDa มีชื่อเรียกว่า เจลาตินไฮโดรไลเสต (Gelatin hydrolysate) เจลาตินที่ถูกไฮโดรไลเสต (Hydrolyzed gelatin) คอลลาเจนไฮโดรไลเสต (Collagen hydrolysate) คอลลาเจนที่ถูกไฮโดรไลเสต (Hydrolysed collagen) หรือคอลลาเจนเปปไทด์ (Collagen peptide) (Mohammad, Suhimi, Aziz, & Jahim, 2014; Sibilla, Godfrey, Brewer, Budh-Raja, & Genovese, 2015) โดยกิจกรรมต่าง ๆ ของเปปไทด์นั้นแฝงอยู่ในลำดับของโปรตีนซึ่งจะถูกปลดปล่อยออกมาจากการย่อยด้วยเอนไซม์ (Ghassem et al., 2014) ซึ่งการผลิตเปปไทด์ให้มีการทำงานที่เพิ่มมากขึ้นจึงมีการมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยเอนไซม์ โดยได้จากค่าจลนพลศาสตร์ (เช่น  $V_{max}$  และ  $K_m$ ) ซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ (Jahanbani et al., 2018) โดยชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในการย่อยมีความสำคัญต่อชนิดของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่ได้และมีประสิทธิภาพในการย่อยที่แตกต่างกัน (เสาวภา จันทรเทศ, 2557) รวมถึงความเข้มข้นของเอนไซม์ ซับสเตรต และสภาวะที่ใช้ในการย่อยซึ่งมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

ปัจจุบันมีการใช้เปปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์หลายชนิดมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแต่ก็มีการใช้ในระดับอุตสาหกรรมค่อนข้างน้อย ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากราคาในการผลิตสูงและยังขาดข้อมูลยืนยันประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557) อีกทั้งเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพยังได้รับความสนใจในด้านการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ รวมถึงสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีในด้านต่าง ๆ เช่น การละลาย การเป็นอิมัลชัน การเกิดโฟม การจับน้ำและไขมัน และยังช่วยเพิ่มเสถียรภาพในการเก็บรักษาอาหาร

(Zakaria & Sarbon, 2018) จึงทำให้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารที่หลากหลาย ได้แก่ เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ (สินีนาด สุขไกว, 2555) เครื่องดื่มแก้หวาย (Zhang et al., 2018) และไส้กรอกปลาอิมัดซัน (Intarasirisawat, Benjakul, Visessanguan, & Wu, 2014; Zakaria & Sarbon, 2018) ซึ่งไส้กรอกเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่สะดวกต่อการบริโภค จึงได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง (ธนวัฒน์ มาปายะ, พิราภรณ์ เครือปาละ, นภาพร ดิสนาม, และสุพัฒน์ ใต้เวชศาสตร์, 2557) โดยสมบัติทางเคมีกายภาพของไส้กรอกเป็นลักษณะสำคัญในการกำหนดคุณภาพของไส้กรอก ไม่ว่าจะเป็นลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของไส้กรอกซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค (Zakaria & Sarbon, 2018) และจากการรายงานของ Bhattacharyya (2011) ไส้กรอกใก่อาจเสื่อมคุณภาพลงในระหว่างการเก็บรักษาเนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์และการออกซิเดชันของไขมันทำให้คุณภาพอาหารลดลงและส่งผลกระทบต่อกลิ่นรสทำให้ผู้บริโภคมีการยอมรับที่ลดลง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลสัดโดยเฉพาะเจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อาจช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ อีกทั้งเจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อังไม่มีข้อจำกัดในผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นฮาลาล (Halal) และโคเชอร์ (Kosher) รวมถึงลดปัญหาการใช้เนื้อวัวที่อาจติดเชื้อจากการระบาดของโรควัวบ้าและโรคปากเท้าเปื่อยในโคกระบือ (Mohammad et al., 2014) จึงทำให้เจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจซึ่งอาจช่วยป้องกันจากออกซิเดชัน และยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกใก่อได้

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อ
2. เพื่อศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)
3. เพื่อศึกษาผลของปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสัดจากเท้าใก่อต่อคุณภาพของไส้กรอกใก่อ

### สมมติฐานของการวิจัย

1. ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการย่อยมีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยที่แตกต่างกันของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่
2. เจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน
3. เมื่อนำเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่มาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเท้าไก่ที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและใช้เป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกใหม่ให้กับอุตสาหกรรมอาหาร
2. สามารถหาชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ
3. สามารถนำเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่มาใช้ประโยชน์ในอาหารเพื่อสุขภาพได้

### ขอบเขตของการวิจัย

1. ตรวจสอบชนิดของเอนไซม์เปปซิน ทริปซิน อัลคาเลส และปาเปนในผลิตเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ที่มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อย
2. ตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ 0.02-5 % ร่วมกับระยะเวลา 2-8 ชั่วโมงในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองออกแบบการทดลองแบบ CCD
3. ตรวจสอบปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ 3 ระดับ คือ 1, 3 และ 5% ที่มีผลต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่



183963776

BUU\_1Thesis 60910022 thesis / rev: 29102563 10:55:56 / seq: 142

## บทที่ 2

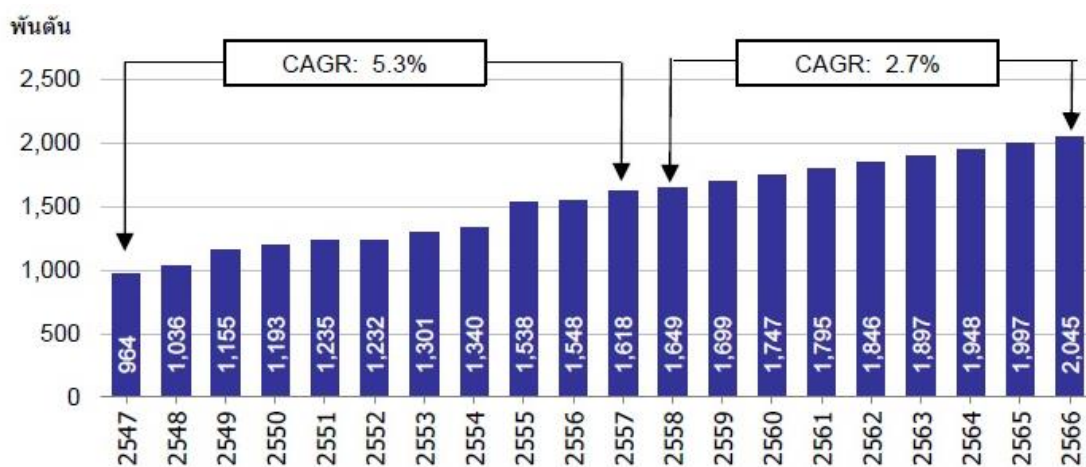
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร

เนื้อสัตว์มีการนำมาใช้ทำเป็นผลิตภัณฑ์จำนวนมากซึ่งได้จากการฆ่าสัตว์ อวัยวะภายใน และของเหลือทิ้งต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นจึงจัดอยู่ในประเภทของผลพลอยได้ (Schmidt et al., 2016) โดยผลพลอยได้จากสัตว์เป็นของเหลือทิ้งจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ โรงฆ่าสัตว์ ร้านอาหาร และครัวเรือน มีการผลิตมากกว่า 20 ล้านตันต่อปีในสหภาพยุโรป (European Union, EU) (Leon et al., 2017) ซึ่งผลพลอยได้นี้มีปริมาณเกือบ 60 – 70% ของซากสัตว์ที่ถูกฆ่า (Ockerman, Basu, & Toldrá, 2017) รวมไปถึง กระดูก เอ็น หนัง เนื้อเยื่อไขมัน เซลล์สัตว์ กีบเท้า เท้า เลือดและอวัยวะภายใน ปริมาณของผลพลอยได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ได้แก่ ชนิด อายุ เพศ และน้ำหนักตัวของสัตว์ โดยโค กระบือ หมูและแกะมีปริมาณร้อยละของผลได้อยู่ในช่วง 10% - 30% และสัตว์ปีกอยู่ในช่วง 5% - 6% (Schmidt et al., 2016)

##### 2.1.1 ผลพลอยได้จากสัตว์ปีก

อุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีกเป็นหนึ่งในกลุ่มเกษตรและอุตสาหกรรมอาหารที่เติบโตเร็วที่สุดในโลก เนื้อไก่ทั่วโลกมีการผลิต 96.3 ล้านเมตริกตันต่อปี ในช่วงปี พ.ศ. 2558-2566 การผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทยมีการคาดการณ์ว่าจะเติบโตต่อเนื่องจากเดิมด้วยอัตราการเติบโตเฉลี่ยสะสม 2.7% ต่อปี ดังภาพที่ 2-1 (ประสิทธิ์ สุจิรวรรกุล และบุษกร สิริวัฒนเกตุ 2558) จากการผลิตทำให้เกิดผลพลอยได้หรือของเหลือทิ้งอินทรีย์จำนวนมาก (Chakka et al., 2017) เท้าไก่เป็นผลพลอยได้ที่เหลือทิ้งประมาณ 3.9 ล้านตันต่อปี (Chakka et al., 2017) ซึ่งผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกประกอบไปด้วยขน หัว เลือด กระเพาะ (กิน) และกระเพาะย่อย เท้า ลำไส้และปอด (ตารางที่ 2-1)



ภาพที่ 2-1 ปริมาณการผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทย (ปี พ.ศ. 2547-2566) (ประสิทธิ์ สุจิรวรรกุล และ บุญกร สิริวัฒนเกตุ, 2558)

หมายเหตุ CAGR (Compound Annual Growth Rate) คือ การวัด % การเปลี่ยนแปลงข้อมูล โดยเฉลี่ยต่อปี

ตารางที่ 2-1 ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกและการนำไปใช้ (Jayathilakan et al., 2012)

ชนิดของผลพลอยได้	น้ำหนักสด (%)	การนำไปใช้
ขน	7-8	วัสดุเครื่องนอน อุปกรณ์ตกแต่ง อุปกรณ์กีฬา ปู่ยมูลฝอยหรือปุ๋ยหมัก ขนป่น
หัว	2.5-3.0	เนื้อป่น
เลือด	3.2-3.7	เลือดป่น
ก้น และกระเพาะย่อย	3.5-4.2	กินได้และเป็นแหล่งเอนไซม์ไคตินเนส (Chitinase)
เท้า	3.5-4.0	ซูบ (ปรุงอาหาร) และไขมันจากสัตว์ปีก
ลำไส้ และปอด	8.5-9.0	เนื้อป่น ไขมันและการนำมาใช้งาน (ฮอว์โมนและเอนไซม์)

ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ (ตารางที่ 2-1) อีกทั้งมีรายงานว่าผลพลอยได้จากสัตว์ปีกยังนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการพัฒนาและวิจัยอย่างกว้างขวาง โดยได้มีการพัฒนาและปรับปรุงกระบวนการต่าง ๆ เช่น การปฏิบัติ การหมัก การวิเคราะห์ทางเคมี จุลินทรีย์ และความชื้น รวมถึงผลพลอยได้จากสัตว์ชนิด

อื่น นอกจากนี้ยังมีวิธีการจัดการกับผลพลอยได้ เช่น การทิ้ง การฝังกลบ และการเผาในพื้นที่ต่าง ๆ ของโลก ในขณะที่ผลพลอยได้จากสัตว์เป็นแหล่งของโปรตีน (Lasekan et al., 2013) จึงได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ

### 2.1.2 การใช้ประโยชน์จากผลพลอยได้

เมื่อพิจารณาถึงปริมาณของผลพลอยได้เหล่านี้ที่เพิ่มมากขึ้น โดยสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งทดแทนได้อย่างมีคุณค่าหากมีการนำมาใช้อย่างถูกต้อง จากการผลิตและการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกที่เพิ่มขึ้นทำให้มีผลพลอยได้ต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปผลพลอยได้จะนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง ๆ ดังตารางที่ 2-1 รวมถึงนำมาใช้ในการผลิตอาหารสัตว์ และเชื้อเพลิง ซึ่งตลาดที่กำลังเติบโตได้มีการนำแร่ธาตุ กรดไขมัน และวิตามินของผลพลอยได้มาใช้ รวมถึงคอลลาเจนและโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งเป็นทางเลือกที่ดีทางเลือกหนึ่งในการใช้ผลพลอยได้ให้เกิดประโยชน์ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น (Schmidt et al., 2016) อีกทั้งผลพลอยได้จากสัตว์ปีกเป็นผลพลอยได้อีกแหล่งหนึ่งที่มีความน่าสนใจ เนื่องจากสามารถใช้เป็นแหล่งทดแทนการผลิตคอลลาเจนและเจลาตินที่มีคุณภาพสูง (Du & Betti, 2016) เท้าไก่นั้นเป็นวัตถุดิบที่อุดมไปด้วยคอลลาเจนซึ่งมีหนัง เอ็น และกระดูกอ่อนเป็นองค์ประกอบแต่ไม่ได้นำมาใช้ประโยชน์อย่างเป็นระบบในอุตสาหกรรมสัตว์ปีก โดยเท้าไก่นำมาใช้ในการปรุงอาหาร ผลิตเป็นไขมัน หรือถูกทิ้ง ซึ่งเป็นสาเหตุในการเกิดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อม (Chakka et al., 2017) ดังนั้นการนำผลพลอยได้จากเท้าไก่มาสกัดเอาคอลลาเจนและผลิตเป็นเจลาตินก่อนย่อยให้ได้เป็นเจลาตินไฮโดรไลเสตที่สามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผู้ประกอบการ อีกทั้งการนำผลพลอยได้จากสัตว์ปีกมาใช้ยังเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ไม่ขัดแย้งกับหลักปฏิบัติที่เป็นฮาลาล (Halal) และ โคเชอร์ (Kosher) ทั้งนี้การระบาดของโรคไวรัสและโรคปากและเท้าเปื่อยในโคกระบือนี้ทำให้การใช้โปรตีนจากโคกระบือและสุกรเป็นไปอย่างจำกัดและต้องเผื่อระวังทำให้ผลพลอยได้จากสัตว์ปีกมีความปลอดภัยและมีประโยชน์ต่อสุขภาพที่ดีสำหรับผู้บริโภค (Mohammad et al., 2014; สีนินาด สุขไกว, 2555)

ผลพลอยได้จากสัตว์ที่เพิ่มมากขึ้นนี้เป็นแหล่งของโปรตีน จากการรายงานของงานวิจัยต่าง ๆ ดังตารางที่ 2-2 แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่ พบว่ามีโปรตีนอยู่ในช่วง 17.42-21.47% แสดงให้เห็นว่าเท้าไก่มีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบอื่น ๆ ในเท้าไก่ ซึ่งพบคอลลาเจนอยู่ในช่วง 9.07-16.3%

ตารางที่ 2-2 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่

องค์ประกอบ	เท้าไก่ <sup>a</sup> (%)	เท้าไก่ <sup>b</sup> (%)	เท้าไก่ <sup>c</sup> (%)	เท้าไก่ <sup>d</sup> (%)
ความชื้น	63.54 ± 0.30	60.66 ± 2.44	65.08 ± 0.90	62.05 ± 0.60
ไขมัน	14.53 ± 0.28	2.19 ± 0.70	3.90 ± 1.16	12.04 ± 0.44
โปรตีน	21.47 ± 0.29	18.69 ± 0.92	20.10 ± 0.98	17.42 ± 0.73
เถ้า	4.66 ± 0.30	0.14 ± 0.13	8.16 ± 1.92	5.98 ± 0.37
คอแลลาเจน	16.3 ± 0.78	-	-	9.07 ± 0.18
	(Hyp × 8)			

<sup>a</sup>Vittayanont (2007); <sup>b</sup>Widyasari and Rawdkuen (2014); <sup>c</sup>Hashim et al. (2014); <sup>d</sup>Liu, Lin and Chen (2001)

ผลพลอยได้จากไก่มีการนำมาศึกษาสมบัติทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ดังตารางที่ 2-3 ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถที่จะนำผลพลอยได้มาใช้ให้เกิดประโยชน์เพิ่มมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors) การต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) ป้องกันการตกผลึก (Cryoprotection) การเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Growth media) อิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) และการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

ตารางที่ 2-3 สมบัติทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเสตของผลพลอยได้จากไก่

ผลพลอยได้	สมบัติทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่	แหล่งอ้างอิง
กระดูกขาไก่	ACE inhibitor	Lasekan et al. (2013)
อวัยวะภายใน	Growth media และ Emulsifier	Lasekan et al. (2013)
	Antioxidant และ ACE inhibitor	Lasekan et al. (2013)
ขนไก่ไฮโดรไลเสต	ACE inhibitor	Lasekan et al. (2013)
ขนไก่ป่น	Antioxidant	Lasekan et al. (2013)
เลือดไก่	ACE inhibitor	Lasekan et al. (2013)
หนังไก่	Cryoprotection	Du and Betti (2016)
	Antioxidant	Onuh, Girgih, Aluko and Aliani (2014); Sarbon, Badii and Howell (2018)
เนื้อไก่	Anti-inflammatory	Offengenden, Chakrabarti and Wu (2018)
เนื้ออกไก่	Antioxidant	Sun, Pan, Guo and Li (2012)
กระดูกไก่	Antioxidant	Centenaro, Centenaro and Hernandez (2011)

## 2.2 คอลลาเจน (Collagen)

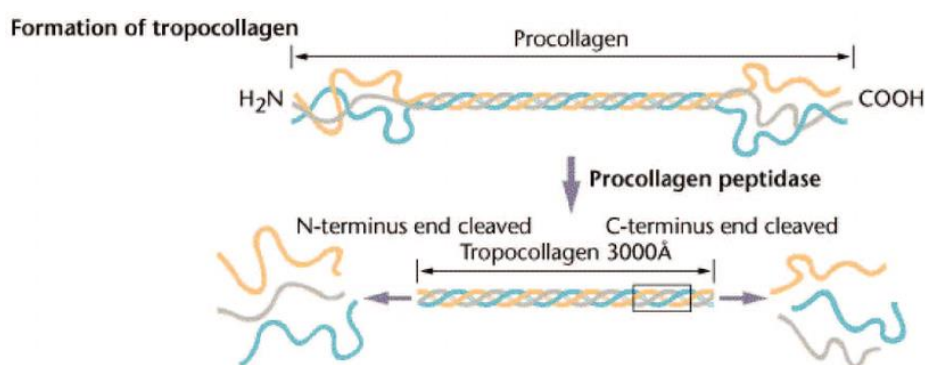
คอลลาเจนมาจากภาษากรีก หมายถึง สิ่งที่ทำให้ผลผลิตเป็นเจลลาตินหรือกาว (หทัยรัตน์ ปิ่นแก้ว, สุทธิ วังเต็ย, กุรอซียะห์ ยามิรุเต็ง, และมณชัย เดชสังกรานนท์, 2549) คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่พบได้ในสัตว์หลายเซลล์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการสนับสนุนโครงสร้างในสัตว์มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 25% ของน้ำหนักของโปรตีนทั้งหมด และเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของหนังเอ็น กระดูกอ่อน กระดูก และเนื้อเยื่อ ในสัตว์ปีกและปลา (Schmidt et al., 2016)

### 2.2.1 โครงสร้างของคอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างในลักษณะของเส้นใย (Fibrous protein) โดยความยาวของโมเลกุลคอลลาเจนประมาณ 280 นาโนเมตร มีมวลโมเลกุล 360,000 Da คอลลาเจนมีความเสถียรโดยการเชื่อมต่อดัวยพันธะไฮโดรเจนและพันธะภายในโมเลกุล โดยเกิดจากการเรียงลำดับ



ของกรดอะมิโนในคอลลาเจนที่มีโมเลกุลสาม โมเลกุลที่ซ้ำกัน (Gly-X-Y) โดยที่ X คือ โพรลีน (Proline) และ Y คือ ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline, Hyp) โดยมีโพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน 20% ของกรดอะมิโนทั้งหมด รวมทั้งมีไกลซีน (Glycine) และ แอลานีน (Alanine) มากกว่า 50% ของกรดอะมิโนทั้งหมด (Schmidt et al., 2016; Vallejos, González, Troncoso, & Zúñiga, 2014) ซึ่ง โมเลกุลของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์จนเกิดเป็นสายโพลีเปปไทด์ เชื่อมต่อกัน โดยสายโพลีเปปไทด์จะบิดเป็นเกลียววนซ้าย (Left-handed-helix) โดยมีพันธะ ไฮโดรเจนเชื่อมอยู่ระหว่างกรดอะมิโนเพื่อทำให้เกิดโครงสร้างที่เป็นเกลียว ซึ่งมีกรดอะมิโน ประมาณ 1,000 ตัวเรียงต่อกัน เรียกว่าสาย  $\alpha$  ทำให้เกิดความคงตัว ดังนั้นคอลลาเจนที่มีกรดอะมิโน เป็นจำนวนมากจะทำให้โครงสร้างคอลลาเจนมีความแข็งแรงและคงตัวมากขึ้น ซึ่งสายโพลีเปปไทด์ จะพันรวมกับสายโพลีเปปไทด์อีก 2 สายในลักษณะเกลียววนขวา (Right-handed-helix) เกิดเป็น โครงสร้างเกลียวโพลีเปปไทด์ 3 สาย (Triple-helix) โดยมีพันธะไฮโดรเจนเชื่อมระหว่างสายโพลี เปปไทด์แต่ละสาย ซึ่งสายโพลีเปปไทด์ 3 สายที่มาบิดรวมกันเป็นเกลียวสามสายที่มีความเสถียร ซึ่งมีขนาดต่างกัน โมเลกุลเกลียวสามสายนี้ยังมีลักษณะกลมเรียกว่า โพรคอลลาเจน (Procollagen) บริเวณที่เป็นทรงกลมเหล่านี้จะถูกตัดที่ระดับที่แตกต่างกันเพื่อให้โครงสร้างเกิดการ polymerized (โทรโปคอลลาเจน, Tropocollagen) ซึ่งเป็นหน่วยพื้นฐานของคอลลาเจน โดยโมเลกุลของโทรโป คอลลาเจนจะถูกทำให้เสถียรโดยปฏิกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) และแรง ดึงดูดระหว่างส่วนที่มีประจุต่างกัน (Electrostatic interaction) (Canty-Laird & Kadler, 2005; Schmidt et al., 2016; Vallejos et al., 2014)



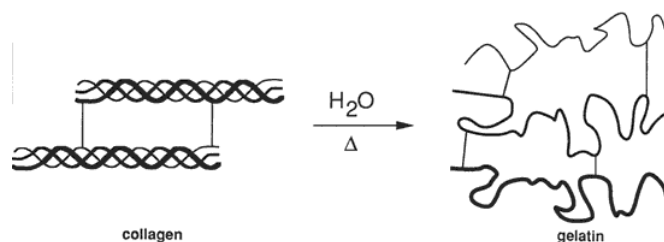
ภาพที่ 2-2 โครงสร้างของคอลลาเจน (Bhattacharjee & Bansal, 2005)

ลักษณะของเกลียวสามสายมีความยาว 300 นาโนเมตร มี Globular domains ที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ซึ่งส่วนเล็ก ๆ ที่ปลายของสาย  $\alpha$  เรียกว่า ทีโลเปปไทด์ (Telopeptides) โดย N- และ C-

propeptides (ปลายสาย  $\alpha$ ) จะไม่แสดงโครงสร้าง Gly-X-Y ซ้ำ เมื่อโมเลกุลของคอลลาเจนสามสาย ถูกย่อย (Proteolytic) ทำให้ที่โพลีเปปไทด์สั้นลงทั้ง 2 ข้าง

### 2.2.2 เจลาติน (Gelatin)

เจลาตินเป็นโพลีเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยคอลลาเจนสามสายบางส่วน โดยเกิดจากการเสถียรภาพของคอลลาเจนเนื่องจากความร้อนด้วยสารละลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Sarbon et al., 2015) ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนไปเป็นเจลาติน ส่วนใหญ่จะเกิดจากการทำลายพันธะนอนโควาเลนต์ทั้งภายในและระหว่าง โมเลกุล รวมถึงพันธะเปปไทด์อีกเล็กน้อยทำให้โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเกลียวที่มีความยืดหยุ่นไม่เป็นระเบียบ (Sarbon et al., 2015; สินีนาถ สุขไกว, 2555) ทำให้เกิด "คอลลาเจนที่ละลายได้ในน้ำอุ่น" หรือก็คือ เจลาติน (Chen, Ma, Zhou, Liu, & Zhang, 2014) เจลาตินจากแหล่งของสัตว์ปีกส่วนใหญ่มาจากไก่ ได้แก่ เท้า หัว และหนัง ซึ่งมีคุณค่าทางโภชนาการสูงสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกของเจลาตินทางการค้า (Yasin, Babji, & Norrakiah, 2017)

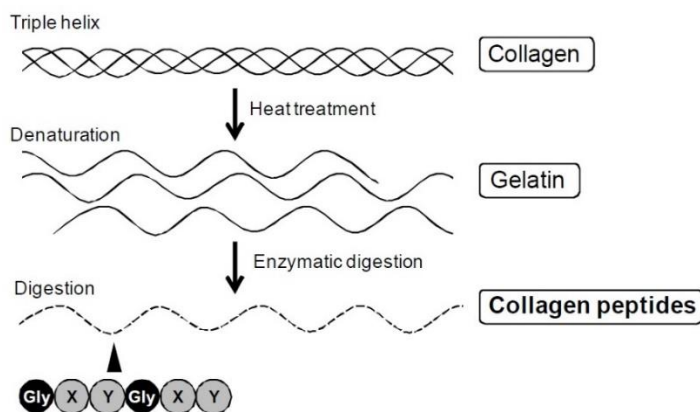


ภาพที่ 2-3 การเสถียรภาพธรรมชาติของคอลลาเจนเป็นเจลาติน (สินีนาถ สุขไกว, 2555)

### 2.3 เจลาตินไฮโดรไลสเสต (Gelatin hydrolysate)

เจลาตินไฮโดรไลสเสตผลิตโดยใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกันกับการผลิตเจลาติน โดยการย่อยของคอลลาเจนหรือเจลาตินซึ่งจะเกิดการสูญเสียเสถียรภาพธรรมชาติ จึงมีชื่อเรียกว่า คอลลาเจนไฮโดรไลสเสต (Collagen hydrolysate) คอลลาเจนที่ถูกไฮโดรไลสเสต (Hydrolysed collagen) คอลลาเจนเปปไทด์ (Collagen peptide) เจลาตินที่ถูกไฮโดรไลสเสต (Hydrolyzed gelatin) หรือ เจลาตินไฮโดรไลสเสต (Gelatin hydrolysate) ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำอยู่ในช่วง 0.3-8 kDa (Mohammad et al., 2014; Sibilla et al., 2015) คุณภาพของคอลลาเจนไฮโดรไลสเสตขั้นสุดท้ายจะขึ้นอยู่กับขนาด โมเลกุลเฉลี่ย ซึ่งอาจแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวิธีการที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจน

โดยทั่วไปโมเลกุลคอลลาเจนจะถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติและถูกย่อยสลายบางส่วนเพื่อผลิตเจลาติน (100 kDa) จากนั้นเจลาตินสามารถย่อยสลายเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กโดยใช้เอนไซม์เฉพาะที่มีกิจกรรมในการย่อย (Proteinase) ทำให้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่มีส่วนผสมของเปปไทด์ซึ่งมีความยาวและกรดอะมิโนอิสระแตกต่างกัน (Lasekan et al., 2013)



ภาพที่ 2-4 ลักษณะโครงสร้างของกระบวนการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์หรือเจลาตินไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์จากคอลลาเจนที่สูญเสียธรรมชาติเป็นเจลาติน (Kouguchi, Zhang, Sato, Takahata, & Morimatsu, 2012)

### 2.3.1 การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสต

เจลาตินไฮโดรไลเสตถูกผลิตในกระบวนการย่อยที่มีการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เพื่อให้ได้เปปไทด์ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งในขั้นต้นวัตถุดิบจะถูกนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมด้วยการล้างทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยกรดหรือด่างเจือจาง กำจัดแร่ธาตุและไขมันก่อนจะถูกนำมาสกัดด้วยน้ำอุ่นกลายเป็นเจลาติน แล้วนำเจลาตินที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์จะได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เรียกว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเสต (Dybka-Stępień & Walczak, 2009) หรือเจลาตินไฮโดรไลเสต

วิธีการเริ่มจากการเตรียมวัตถุดิบในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ไขมัน และนำมาผ่านกระบวนการทำให้พอง (Swelling process) จากนั้นจึงนำคอลลาเจนที่ได้ไปสกัดเจลาติน และสุดท้ายจึงผลิตได้เป็นเจลาตินไฮโดรไลเสต

#### 2.3.1.1 การเตรียมตัวอย่างของวัตถุดิบ

วัตถุดิบถูกเตรียมโดยขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การทำความสะอาด การลดขนาด การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน แร่ธาตุ และไขมัน

### 2.3.1.1.1 การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายต่าง

การเตรียมตัวอย่างด้วยสารละลายต่างเป็นที่นิยมอย่างมากเหมาะสำหรับวัตถุดิบที่มีความหนา เช่น คอลลาเจนในกระดูกวัว (Bovine ossein) หรือหนังวัว (Shavings) โดยสารละลายต่างที่มีการใช้โดยทั่วไป คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์และแคลเซียมไฮดรอกไซด์โดยจะใช้ระยะเวลาหลายวันถึงหลายสัปดาห์ในการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ซึ่งในวัตถุดิบที่เป็นหนังปลาโซเดียมไฮดรอกไซด์สามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนได้ดีที่สุด สารละลายต่างจะทำลายการเชื่อมภายในทำให้เกิดการบวมที่มีส่วนสำคัญในการช่วยเพิ่มอัตราการถ่ายเทมวลในเนื้อเยื่อทำให้ช่วยเพิ่มความสามารถในการสกัดคอลลาเจน กระบวนการนี้ยังสามารถยับยั้งโปรตีนเอสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายคอลลาเจน ซึ่งชนิดของต่างไม่ได้สร้างความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นของต่างเป็นสิ่งสำคัญ สารละลายต่างจะทำลายส่วนของทีโลเปปไทด์ของโมเลกุลคอลลาเจน ดังนั้นคอลลาเจนบางตัวสามารถละลายได้โดยใช้สารละลายต่าง (Pal & Suresh, 2016; Schmidt et al., 2016; พณัฐ กิตติพัฒน์บวร, 2559)

### 2.3.1.1.2 การกำจัดไขมัน

การกำจัดไขมันเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ นอกจากต้องการที่จะทำให้คอลลาเจนบริสุทธิ์แล้วปริมาณไขมันยังมีผลอย่างมากกับสมบัติทางเคมีกายภาพและวิธีการผลิตต่าง ๆ รวมถึงชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของสัตว์จึงจำเป็นต้องมีการลดปริมาณไขมัน อีกทั้งไขมันมีผลกระทบต่อสมบัติเชิงหน้าที่และเพิ่มการหืน ไขมันที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบที่ค่อนข้างสูงโดยไขมันถือเป็นสารชีวโมเลกุลที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยอนุมูลอิสระ เนื่องจากไขมันเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ การที่ไขมันถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระมีผลให้มีการเพิ่มขึ้นของค่ามาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) (มนต์สรวง ยางทอง, 2557) ซึ่งเป็นผลผลิตที่เกิดจากลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation, LPO) จึงจำเป็นต้องมีการลดปริมาณไขมัน ซึ่งปริมาณไขมันของเจลาตินจากเท้าไก่ไม่ควรเกินกว่าที่แนะนำ 5% จากมาตรฐานระดับชาติ (National Standards, SNI) รวมทั้งปริมาณไขมันที่ค่อนข้างสูงในเจลาตินไก่จะมีผลต่อลักษณะของเจลาตินและการประยุกต์ใช้เป็นอาหารเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร การมีของไขมันในเจลาตินจะขัดขวางคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของความสามารถในการยึดจับกับสารประกอบที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ในอาหาร (Melanie et al., 2015) โดยการกำจัดไขมันออกส่วนใหญ่นิยมใช้ บิวทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอล

### 2.3.1.1.3 กระบวนการทำให้พอง

กระบวนการทำให้พองเป็นการเตรียมคอลลาเจนให้พร้อมต่อการนำไปสกัดเป็นเจลาตินได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยกระบวนการทำให้พองจะทำให้เส้นใยในวัตถุดิบเกิดการพองจากการคลายตัวของโปรตีนโดยการทำลายพันธะนอนโควาเลนต์และทำให้คอลลาเจนถูกสกัดและ

ละลายได้ต่อไป (พนัญญ์ กิตติพัฒน์บวร, 2559; สินีนาถ สุขไกว, 2555) ซึ่งกระบวนการทำให้พองด้วยกรด (Acid process) เป็นการเตรียมคอลลาเจนที่ไม่รุนแรงเหมาะกับสัตว์ที่อายุน้อยและวัตถุดิบที่มีความบางจากการเกี่ยวพันกันน้อยของเส้นใยคอลลาเจน เช่น หนังสุกรและหนังปลา ทำให้คอลลาเจนสามารถละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพ การเตรียมตัวอย่างด้วยสารละลายกรดนั้น สารละลายกรดจะแทรกซึมเข้าไปในโครงสร้างของหนังที่มีการควบคุมอุณหภูมิ โดยจะแยกพันธะโคเวเลนต์ทั้งภายในและภายนอกโมเลกุลให้คลายตัวและปล่อยสาย  $\alpha$  ออกทำให้หนังบวมขึ้น 2-3 เท่าจากปริมาตรเริ่มต้น และยังสามารถกำจัดสารอินทรีย์อื่น ๆ นอกจากนี้การทำให้พองด้วยกรดยังสามารถหยุดการทำงานของโปรตีเอสภายในที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายได้บางส่วน (Pal & Suresh, 2016; Schmidt et al., 2016; พนัญญ์ กิตติพัฒน์บวร, 2559)

### 2.3.1.2 การสกัดเจลาติน

ความร้อนจะถูกนำมาใช้ในการเปลี่ยนคอลลาเจนเป็นเจลาตินทำให้เส้นใยคอลลาเจนเล็กลงซึ่งมีความยาวน้อยกว่าหนึ่งในสามของความยาวเดิม เกิดจากการที่โพลีเปปไทด์ที่เป็นเกลียวสามสายในโมเลกุลของคอลลาเจนถูกทำลายลงจากการทำลายพันธะโคเวเลนต์ที่เชื่อมต่อกันของเปปไทด์ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลในแต่ละสายซึ่งส่วนใหญ่เป็นพันธะไฮโดรเจน รวมทั้งพันธะนอนโคเวเลนต์และพันธะเปปไทด์บางตัวที่จะถูกทำลายไปพร้อมกับพันธะโคเวเลนต์ (พนัญญ์ กิตติพัฒน์บวร, 2559; สามารถ ขานวงษ์, 2557) ทำให้โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเกลียวที่มีความยืดหยุ่นไม่เป็นระเบียบ (สินีนาถ สุขไกว, 2555) จากงานวิจัยของ Grommuang (2007) ศึกษาผลของอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) และระยะเวลา (3 - 12 ชั่วโมง) ในการสกัดเจลาตินจากเท้าไก่ พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 60 - 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 - 12 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการตัดย่อยเปปไทด์สายหลัก  $\alpha$ ,  $\beta$  และ  $\gamma$  ในเจลาติน

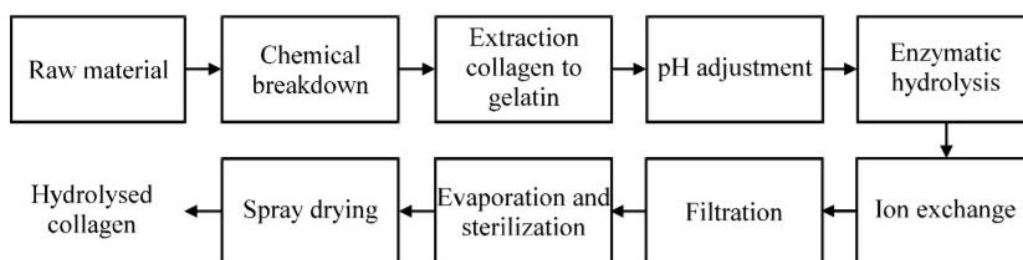
เจลาตินสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท จากกระบวนการเตรียมขึ้นต้น ได้แก่ ประเภท A (Type A gelatin) เป็นส่วนที่เตรียมด้วยกระบวนการที่ใช้กรดนิยมใช้ในวัตถุดิบพวกหนังหมู หนังปลาและกระดูกบางชนิด ส่วนประเภท B (Type B gelatin) ใช้ต่างในการเตรียมสำหรับวัตถุดิบที่มีความหนา เช่น กระดูกวัว (สินีนาถ สุขไกว, 2555)

### 2.3.1.3 การสกัดเจลาตินไฮโดรไลเสต

กรณีของการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตสามารถผลิตได้โดยตรงจากคอลลาเจนหรือเจลาตินทางการค้าเพื่อเป็นการปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน ซึ่งในส่วนของการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากคอลลาเจนไม่ค่อยนิยมเพราะคอลลาเจนมีความแข็งแรงมากและทนต่อโปรตีเอสมากที่สุด ซึ่งโครงสร้างหลักของคอลลาเจนจะไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ เนื่องจากมีเกลียว

สามสายที่แข็งแรง แต่การที่คอลลาเจนสูญเสียสภาพธรรมชาติไปเป็นเจลาตินจะทำให้คอลลาเจนถูกย่อยได้ง่ายด้วยโปรติเอส (Mohammad et al., 2014) ดังนั้นเมื่อนำเจลาตินมาย่อยด้วยเอนไซม์จึงเรียกว่า “เจลาตินไฮโดรไลเสด” เช่น งานวิจัยของ สินีนาถ สุขไกว (2555) ศึกษาการผลิตเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสดจากหนังปลา งานวิจัยของ Sukkwai, Kijroongrojana and Benjakul (2011) ศึกษาการสกัดเจลาตินจากปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา (*Priacanthus tayenus*) สำหรับผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสด และงานวิจัยของ Chen, Hou, Lu, Zhang and Li (2016) ศึกษาประสิทธิภาพของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสดจากหนังปลาแซลมอน

วิธีการส่วนใหญ่ที่มักมีการใช้วิธีการย่อยด้วยเอนไซม์และสารเคมี ในขั้นตอนแรกของการผลิตเริ่มจากการผลิตเจลาตินด้วยการใช้สารเคมีในการย่อยตัววัตถุดิบ จากนั้นจึงนำไปย่อยด้วยเอนไซม์จนได้น้ำหนักโมเลกุลที่ต้องการ (Mohammad et al., 2014)



ภาพที่ 2-5 ภาพรวมของกระบวนการผลิตคอลลาเจนที่ถูกไฮโดรไลเสดหรือเจลาตินไฮโดรไลเสดโดยใช้วิธีร่วมกัน (Mohammad et al., 2014)

### 2.3.2 ประเภทการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสดแบ่งออกเป็น 3 วิธี

#### 2.3.2.1 การเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (ย่อยด้วยตัวเอง)

การย่อยตามธรรมชาติเป็นการย่อยที่บริเวณพื้นระเปปไทด์ โดยอาศัยกระบวนการย่อยตัวเองด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในสัตว์ เช่น เปปซิน (Pepsin) ทริปซิน (Trypsin) ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) เป็นต้น ทำให้เกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็นวิธีที่มีความซับซ้อนเนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์ เครื่องในและโครงกระดูกมีอยู่หลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการย่อยได้และใช้ระยะเวลาในการย่อยนานจึงมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดี เจลาตินไฮโดรไลเสดที่ได้นี้นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา (จิรนาถ ทิพย์รักษา, 2549; เสาวภา จันทรเทศ, 2557)

### 2.3.2.2 การย่อยด้วยสารเคมี

การย่อยด้วยสารเคมี โดยการใช้กรดหรือด่างทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นเพื่อตัดสายเปปไทด์ให้สั้นลงซึ่งเป็นวิธีการที่มีต้นทุนการผลิตต่ำแต่มีข้อจำกัดมากในการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร อีกทั้งยังยากต่อการควบคุมการย่อยทำให้เจลาตินไฮโดรไลเสตที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ (จิรนาถ ทิพย์รักษา, 2549; เสาวภา จันทร์เทศ, 2557) ซึ่งจะลดคุณภาพของโปรตีนและกิจกรรมทางชีวภาพ

#### 2.3.2.2.1 การย่อยด้วยกรด

กรดที่ใช้ในการย่อย เช่น สารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก ซึ่งสารละลายกรดจะทำให้พันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิดกรดแอสพาร์ติก (Aspartic acid) ที่ปลายสายถูกย่อยเร็วกว่าพันธะเปปไทด์อื่น ๆ ประมาณ 100 เท่า ทำให้กรดอะมิโนทริปโตเฟน (Tryptophan) เซอรีน (Serine) ทรีโอนีน (Threonine) กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสเตอีน (Cysteine) และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย อีกทั้งกรดอะมิโนแอสพาราจีน (Asparagine) และกลูตามีน (Glutamine) ถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนชนิดกรดแอสพาร์ติกและกรดกลูตามิก (Glutamic acid) ซึ่งวิธีนี้นิยมในการผลิตเป็นวัตถุดิบปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร หรืออาหารสัตว์ (จิรนาถ ทิพย์รักษา, 2549)

#### 2.3.2.2.2 การย่อยด้วยด่าง

สารละลายด่างที่ใช้ เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งวิธีนี้จะย่อยได้รวดเร็วกว่ากรด ถ้าหากใช้สารละลายด่างในสภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (Racemization) ของกรดอะมิโนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกรดอะมิโนจากรูปแบบแอล (L-Form) เป็นรูปแบบดี (D-Form) ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ และถ้าหากย่อยที่อุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาบีต้า - อีลิมีเนชัน ( $\beta$ -Elimination) ของกรดอะมิโนเซอรีนและซีสเตอีน (Cystine) เป็นผลให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (Dehydroalanine) ขึ้น ซึ่งสารนี้จะทำให้เกิดปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ เช่น ซีสเตอีนและไลซีน (Lysine) เป็นต้น ทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิด เช่น แลนทีโอนีน (Lanthionine) ออนิธิโออะลานีน (Ornithioalanine) ไลซิโนอะลานีน (Lysinoalanine) ที่จะทำให้เกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญและเกิดสารพิษ (จิรนาถ ทิพย์รักษา, 2549)

### 2.3.2.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

การย่อยด้วยเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อซับสเตรต (สารตั้งต้น) ตัวกระตุ้น ตัวยับยั้ง ค่า pH และอุณหภูมิ (เสาวภา จันทร์เทศ, 2557) ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์จะถูกนำมาใช้ในการย่อยของผลพลอยได้เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะทำให้มีระดับการย่อย

(Degree of hydrolysate, DH) และปริมาณผลได้สูง (Lasekan et al., 2013) การย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการตัดเปปไทด์ (Dybka-Stępień & Walczak, 2009) ซึ่งการใช้เอนไซม์ทางการค้าสามารถควบคุมอัตราการเกิดปฏิกิริยาได้ดีกว่าย่อยด้วยตัวเองและย่อยด้วยสารเคมี (Mohammad et al., 2014; เสาวภา จันทรเทศ, 2557)

## ปัจจัยที่มีผลต่อเจลาตินไฮโดรไลสจากการย่อยด้วยเอนไซม์

### 1) ซับสเตรต (Substrate)

ชนิด ความเข้มข้น และวิธีการเตรียมของซับสเตรตมีผลต่อการย่อยเจลาตินไฮโดรไลส ซึ่งการเตรียมวัตถุดิบในการสกัดคอลลาเจนหรือเจลาตินก่อนนำไปผลิตเป็นเจลาตินไฮโดรไลสต้องทำให้โปรตีนมีรูปร่างที่เหมาะสมสำหรับการย่อยด้วยเอนไซม์เนื่องจากโปรตีนที่มีการยึดเกาะกันอย่างหนาแน่นทำให้ไม่เหมาะสมต่อการย่อย โดยทั่วไปจึงมีการเติมน้ำในอัตราส่วนที่เท่ากับซับสเตรตเพื่อให้เอนไซม์เกิดการกระจายตัวทำให้มีประสิทธิภาพของการย่อยสูงขึ้น (เสาวภา จันทรเทศ, 2557) อีกทั้งเอนไซม์แต่ละชนิดมีความจำเพาะต่อซับสเตรตที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างการขดตัวตรงบริเวณแอกทีฟของเอนไซม์นั้น ๆ (จิตติมา เจริญพานิช, 2553)

### 2) ชนิดของเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558; เสาวภา จันทรเทศ, 2557)

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาทางเคมีของซับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ (Product) ซึ่งเป็นกรดอะมิโน เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับสภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั่วไป โดยที่เอนไซม์ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่นแต่เอนไซม์จะถูกทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ด้วยความร้อน สารละลายอินทรีย์ กรดแก่หรือด่างแก่เหมือนโปรตีนทั่วไป เอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน คือ โปรติเอสซึ่งจะสลายพันธะเปปไทด์ (-CO-NH-) ด้วยน้ำ โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ของโปรตีน แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

- ประเภทเอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนอย่างอิสระ (Randomly) ได้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกัน ซึ่งจะให้กิจกรรมสูงสุดถ้าหมู่อนุพันธ์ไม่ใช่  $H^+$ ,  $OH^-$  กล่าวคือ  $H^+$  อาจเป็นหมู่เอซิล (Acyl group) (Acetyl, Benzoyl, Benzyloxycarbonyl เป็นต้น) และ  $OH^-$  เป็นเอไมด์ (Amide) หรือหมู่เอสเทอร์ (Ester group) หรือกรดอะมิโนอิสระ

- ประเภทเอกโซเปปติเดส (Exopeptidase) สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายสายที่ต้องมีความสอดคล้องกับความจำเพาะของเอนไซม์ต่อหมู่อะมิโน



### ประเภทของโปรตีนที่แบ่งตามกลไกการทำงานออกเป็น 4 กลุ่ม

- โปรตีนเอสเซอร์อิน (Serine proteases, Alkali protease, pH 6.7-9) เป็นเอนไซม์ประเภทเอนโคเปปติเดสจะทำปฏิกิริยากับหมู่ OH<sup>-</sup> ของอนุภาคเซรีล (Seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งมีหมู่อิมิดาโซลอยู่ที่บริเวณเร่ง
- โปรตีนเอสซัลไฟดิล (Sulphydryl proteases) หรือโปรตีนเอสไทโธล (Thiol proteases) หรือโปรตีนเอสซีสเทอีน (Cysteine proteases) เป็นเอนไซม์ประเภทเอนโคเปปติเดส ซึ่งจะถูกยับยั้งด้วยสารที่เรียกว่า ซัลไฟไฮดริล (Sulphydryl reagents) หรือหมู่อิมิดาโซล (sulfhydryl group, -SH) ทำให้หมู่อิมิดาโซลที่บริเวณเร่งได้รับผลกระทบอาจสูญเสียกิจกรรมไป
- โปรตีนเอสเมทัล (Metal-containing proteases) เป็นเอนไซม์ประเภทเอนโคเปปติเดสเกือบทั้งหมด ซึ่งมีไอออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในการย่อย หรือก็คืออยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ โดยจะถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ เช่น EDTA
- โปรตีนเอสกรด (Acid proteases) หรือโปรตีนเอสแอสปาดิก (Aspartic proteases) หรือโปรตีนเอสคาร์บอกซิล (Carboxyl proteases) เป็นเอนไซม์ที่มีช่วง pH ในการทำปฏิกิริยาระหว่าง 2-4 และไม่มีการแสดงอย่างชัดเจนถึงกรดอะมิโนที่มีบทบาทในบริเวณเร่ง แต่การพิจารณาถึงช่วง pH ของกิจกรรมของเอนไซม์ชี้ให้เห็นว่ามีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ จากอนุภาคกรดแอสปาดิกอยู่ในบริเวณเร่ง

ตารางที่ 2-4 โปรตีนที่ใช้กันทั่วไปสำหรับการย่อยโปรตีน (Hou, Wu, Dai, Wang, & Wu, 2017)

ประเภทของเอนไซม์	ชื่อเอนไซม์	EC number	ความจำเพาะในการย่อย
Endopeptidases			
Aspartate protease	Chymosin	3.4.23.4	พันธะ Phe-Met, การแข็งตัวของนม
	Pepsin A (pH 1.8–2)	3.4.23.1	กรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติกและไม่ชอบน้ำ
Cysteine protease	Bromelain	3.4.22.4	Ala, Gly, Lys, Phe, Tyr
	(จากสับปะรด)		
	Cathepsin B	3.4.22.1	Arg, Lys, Phe
	Ficain	3.4.22.3	Ala, Asn, Gly, Leu, Lys, Tyr,

## ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

ประเภทของเอนไซม์	ชื่อเอนไซม์	EC number	ความจำเพาะในการย่อย
	(ficin; จากต้นมะเดื่อ)		Val
	Papain (จากมะละกอ)	3.4.22.2	Arg, Lys, Phe
Metallo protease	Bacillolysin ( <i>Bacillus</i> bacteria)	3.4.24.28	กรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติก และ Ile, Leu, Val
	Thermolysin ( <i>Bacillus</i> bacteria)	3.4.24.27	กรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติก และ Ile, Leu, Val
Serine protease	Chymotrypsin (pH 8 - 9)	3.4.21.1	กรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติก และ Leu
	Subtilisin (from <i>Bacillus</i> bacteria)	3.4.21.14	ส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่ ชอบน้ำ
	Trypsin (pH 8 - 9)	3.4.21.4	Arg, Lys
Exopeptidases			
Amino peptidases	Amino peptidase <sup>a</sup>	3.4.11.1	กรดอะมิโนที่ปลาย N-terminus ของโปรตีนหรือเปปไทด์
	Amino peptidase Y <sup>b</sup>	3.4.11.15	Lys ที่ปลาย N-terminus ของ โปรตีนหรือเปปไทด์
Carboxypeptidase	Carboxypeptidase <sup>c</sup>	3.4.16.1	กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด กลางและเบส
	Glycine carboxypeptidase <sup>d</sup>	3.4.17.4	Gly ที่ปลาย C-terminus ของ โปรตีนหรือเปปไทด์
	Alanine carboxypeptidase <sup>e</sup>	3.4.17.8	D-Ala ที่ปลาย C-terminus ของ โปรตีนหรือเปปไทด์
	Carboxypeptidase S <sup>f</sup>	3.4.17.9	Gly ที่ปลาย C-terminus ของ โปรตีนหรือเปปไทด์
Dipeptidase	Dipeptidase I <sup>f</sup>	3.4.13.11	ช่วงกว้างของไดเปปไทด์
	Proline dipeptidase (prolidase) <sup>a</sup>	3.4.13.9	Pro-กรดอะมิโน หรือ กรดอะมิ โน-hydroxyproline ที่ปลาย C- terminus (ไม่ใช่ Pro-Pro)

## ตารางที่ 2-4 (ต่อ)

ประเภทของเอนไซม์	ชื่อเอนไซม์	EC number	ความจำเพาะในการย่อย
	Prolyl dipeptidase <sup>a</sup>	3.3.13.8	Pro-กรดอะมิโน หรือ Hydroxyproline-กรดอะมิโน
Endo- and exo-peptidases			
Pronase	A mixture of proteases <sup>a</sup> (จาก <i>Streptomyces griseus</i> )	3.4.24	กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด กลางและเบส
Other peptidases	Dipeptidyl-peptide III <sup>f</sup>	3.4.14.4	ปล่อยที่ปลาย N-terminal ของ ไดเปปต์จากเปปต์ที่ ประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระ 4 ตัวหรือมากกว่า
	Dipeptidyl-peptidase IV <sup>g</sup>	3.4.14.5	ปล่อยที่ปลาย N-terminal ของ ไดเปปต์จากเปปต์ที่ ประกอบด้วย proline <sup>h</sup>

<sup>a</sup>Metallopeptidase (ต้องใช้  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  or  $Zn^{2+}$  ในการกระตุ้น), <sup>b</sup>Metallopeptidase (ต้องใช้  $Co^{2+}$  ในการกระตุ้น, ยับยั้งโดย  $Zn^{2+}$  และ  $Mn^{2+}$ ), <sup>c</sup>Serine carboxypeptidase, <sup>d</sup>Strongly ยับยั้งโดย  $Ag^+$  and  $Cu^{2+}$ , <sup>e</sup>Metallopeptidase (ต้องใช้  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  or  $Co^{2+}$  ในการกระตุ้น), <sup>f</sup>Metallopeptidase (ต้องใช้  $Zn^{2+}$  ในการกระตุ้น), <sup>g</sup>Serie protease, <sup>h</sup>AA<sub>1</sub>-Pro-AA<sub>2</sub>, โดย AA<sub>2</sub> ไม่ใช่ทั้ง proline หรือ hydroxyproline และ AA (กรดอะมิโน)

## 3) ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อค่าระดับการย่อยซึ่งมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ Yarnpakdee, Benjakul, Kristinsson and Kishimura (2015) รายงานว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นถึง 40% โดยเอนไซม์แต่ละชนิดจะให้ความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นเพื่อเพิ่มระดับการย่อยจาก 10 - 40% ซึ่งอัลคาเลส (Alcalase) ให้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.08 - 5.54% ฟลาโวไซม์ (Flavourzyme) 0.07 - 11.69% โปรตามอกซ์ (Protamex) 0.58 - 8.67% และปาเปน (Papain) 0.83 - 4.69%

#### 4) สภาพะที่ใ้ใช้ในการย่อย

- pH: ค่า pH ของสารละลายโปรตีนมีผลต่อประจุที่เกิดขึ้นบน โมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีผลกระทบต่อการทำงานของเอนไซม์ (เสาวภา จันทรเทศ, 2557) เอนไซม์โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันที่ระดับ pH ต่างกัน แต่จะมีช่วงหนึ่งที่เอนไซม์มีการทำงานสูงสุด เรียกว่า Optimum pH ซึ่งมีค่าต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ (ปราณี อานเป็ร็อง, 2558)
- อุณหภูมิ: อุณหภูมิมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์เนื่องจากเอนไซม์เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและการทำงานในการเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งด้วยเอนไซม์จะแปรผันตามอุณหภูมิ และอุณหภูมิยังมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิสูงจะทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ และมีผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์สูญเสียไป (ปราณี อานเป็ร็อง, 2558; เสาวภา จันทรเทศ, 2557)
- ระยะเวลาในการย่อย: ระยะเวลาที่ใ้ใช้ในการย่อยโปรตีนมีผลต่อระดับการย่อย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับกิจกรรมทางชีวภาพ Verma, Chatli, Kumar and Mehta (2017) รายงานว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยทริปซินเป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่ามีระดับการย่อย เท่ากับ 1.24, 20.02, 26.20 และ 26.82% และมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 24.38, 49.70, 55.26 และ 57.49% ตามลำดับ

ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้ที่กล่าวมาข้างต้น ได้แก่ ซับสเตรต เอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และสภาพที่ใ้ใช้ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตมีผลกระทบต่อระดับการย่อย

#### ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยเป็นค่าที่ใ้ใช้ในการอธิบายการแยกเปปไทด์ของซับสเตรตและการคำนวณเป็นอัตราส่วนเปอร์เซ็นต์ระหว่างจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดไปและจำนวนพันธะเปปไทด์ในสารตั้งต้นที่อยู่ภายใต้การศึกษาโดยใช้โปรโตคอล เช่น trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), pH stat และ *O*-phthalaldehyde (OPA) (Lasekan et al., 2013) ซึ่งระดับการย่อยเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการควบคุมการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสต เนื่องจากสมบัติต่าง ๆ ของเจลาตินไฮโดรไลเสตมีความสัมพันธ์กับระดับการย่อย เช่น กิจกรรมทางชีวภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ (Lasekan et al., 2013; สินีนาถ สุขไ้กาว, 2555) ระดับการย่อยที่วิเคราะห์จาก Free  $\alpha$  - amino group เช่น TNBS โดย TNBS เป็นสารที่มีความจำเพาะต่อ Primary amino groups วิเคราะห์โดยการผสม TNBS กับเจลาตินไฮโดรไลเสตแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร วิธีนี้มีข้อเสีย คือ ใ้ระยะเวลาในการวิเคราะห์

นานสารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย Picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ โพรตีนและไฮดรอกซีโพรตีน และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับหมู่อะมิโนของไลซีนได้

โดยระดับการย่อยสามารถคำนวณได้จากสมการ (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย และบรรณัตร์ ศรีทองแท้, 2557)

$$\%DH = ((L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)) \times 100$$

เมื่อ %DH หมายถึง ร้อยละของระดับการย่อย

$L_0$  หมายถึง ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น

$L_t$  หมายถึง ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ระยะเวลาการย่อยใด ๆ

$L_{max}$  หมายถึง ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง หรือที่เรียกว่า การทำ “acid hydrolysis”

สภาวะการย่อยโปรตีนของผลพลอยได้จากสัตว์ที่มีการศึกษาปัจจัยการย่อยที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2-5 ทั้งชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน รวมถึงสภาวะของการย่อยบางประการ เช่น ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ซึ่งส่งผลกระทบต่อระดับการย่อย (%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยมีวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนและเปปไทด์ที่อาจมีผลจากการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างเปอร์ออกซิเดชัน (Peroxidation) การต้านอนุมูลอิสระขององค์ประกอบที่มีออกซิเจนหรือความสามารถในการจับโลหะ (Centenaro et al., 2011)

ตารางที่ 2-5 สภาวะการย่อยโปรตีนของผลพลอยได้จากสัตว์ที่มีการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอนไซม์		สภาวะของการย่อยด้วยเอนไซม์		DH (%)	วิเคราะห์คุณภาพ	แหล่งอ้างอิง
		ชนิด	ความเข้มข้น (%)	pH	อุณหภูมิ (°C)			
Peptide	Duck by-products (feet, bones, heads and viscera)	Flavourzyme	2% (w/w)	7.0	50	480	Antioxidant	Lee al et.
		Neutrase		7.0	50	(8 h)	- Hydroxyl radical scavenging activity	(2010)
		Protamex		7.0	50			
		Alcalase		7.0	50			
		Papain		6.0	37			
		Pepsin		2.0	37			
Collagen hydrolysate	Chicken feet	$\alpha$ -Chymotrypsin		7.0	37			
		protease of the <i>Bacillus</i> family	1, 3, 5% (w/w)	6.0	60, 75 or 90	120, 60 or 480 (2, 6, 8 h)	1. Conversion degree (%) 2. Ash in the hydrolysates (%)	Mokrejs et al. (2017)



## ตารางที่ 2-5 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอ็นไซม์	สถานะของการย่อยด้วยเอ็นไซม์			DH (%)	วิเคราะห์คุณภาพ	แหล่งอ้างอิง	
			ความเข้มข้น (%)	pH	อุณหภูมิ (°C)				เวลา (นาที)
Gelatin hydrolysates	Duck skin	Collaganase (EC 3.4.24.7)	0.02% (w/w)	7.0	37	480 (8 h)	48.70	1. ACE inhibitory activity 2. Antioxidant	Lee et al. (2012)
		Papain (EC 3.4.22.2)		7.0	37		25.31		
		Pepsin (EC 3.4.23.1)		2.0	37		33.14	-DPPH radical	
		Trypsin (EC 3.4.21.4)		7.0	37		29.98	scavenging activity	
		$\alpha$ -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)		7.0	37		36.09	- Hydroxyl radical scavenging activity	
		Flavourzyme (EC 3.4.11.1)		7.0	50		30.01	- Alkyl radical scavenging activity	
		Neutrase (EC 3.4.24.4)		6.0	50		29.27		
		Protamex(EC3.4.21.14)		6.0	40		22.79		
		Alcalase (EC 3.4.21.62)		8.0	50		28.31		

ตารางที่ 2-5 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอ็นไซม์	ความเข้มข้น (%)	สถานะของการย่อยด้วยเอ็นไซม์		DH (%)	วิเคราะห์คุณภาพ	แหล่งอ้างอิง
				pH	อุณหภูมิ เวลา (นาที)			
Chicken breast protein hydrolysate	chicken breast meat	Papain (800 U/mg)	0.15%	51.2	369	-	1. Antioxidant	Sun et al.
			(w/w)	6.5	(6.15 h)		-DPPH radical scavenging activity -Reducing power	(2012)
Protein Hydrolysates	Fish (F) and Chicken (C) Bones	Flavourzyme 1000L <sup>®</sup> (EC 3.4.11.1)	1% (w/w)	7.0	480	9.7 (F)	1. Antioxidant	Centenaro et al. (2011)
		Trypsin (EC 3.4.21.4)		8.0	37	13.1 (C)	-DPPH radical scavenging activity	
		$\alpha$ -Chymotrypsin (EC 3.4.21.1)		8.0	37	6.5 (F)	-ABTS radical scavenging activity	
						5.6 (C)	-Hydroxyl radical scavenging activity	
						8.5 (F)	-Reducing power	
						13.0 (C)		



ตารางที่ 2-5 (ต่อ)

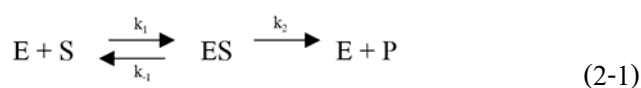
ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอ็นไซม์	สถานะของการย่อยด้วย			DH (%)	วิเคราะห์คุณภาพ	แหล่งอ้างอิง
			เอ็นไซม์	เอ็นไซม์	เอ็นไซม์			
		ชนิด	ความเข้มข้น (%)	pH	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)		
Protein	Scalloped	Neutrase	2.5%	7.0	60	240	20.87	1. Antioxidant Li, Chi, Li
Hydrolysate	Hammerhead	Alcalase		8.0	50	(4 h)	21.37	-DPPH radical and Wang
	( <i>Sphyrna lewini</i> )	Trypsin		8.0	40		23.72	scavenging activity (2017)
		Pepsin		2.0	37		21.58	-ABTS radical
	Cartilage	Papain		6.0	50		18.33	scavenging activity - Hydroxyl radical scavenging activity - Superoxide anion
								radical (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) Scavenging Activity
								2. Lipid peroxidation inhibition assay

จากตารางที่ 2-5 แสดงให้เห็นว่าได้มีรายงานในการศึกษาปัจจัยการย่อยผลพลอยได้จาก สัตว์ชนิดต่าง ๆ อีกทั้งชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ ซึ่งความแตกต่างของชนิดเอนไซม์เป็นผลให้เปปไทด์มีความ ยาวและลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกันเนื่องจากกระบวนการย่อยของเอนไซม์แต่ละชนิดมี ความจำเพาะและสัมพันธ์กับซับสเตรตโปรตีน (Ghassem et al., 2014) นำไปสู่การศึกษาระดับความ เข้มข้นของผลิตภัณฑ์ ซับสเตรต และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์หรือจลนพลศาสตร์ของ เอนไซม์

### จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ (Enzyme kinetics)

จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์เป็นการศึกษาระดับความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ ซับสเตรต และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์เกี่ยวกับความเร็วของปฏิกิริยา (Reaction rate) รวมทั้งกลไก การทำงานของเอนไซม์ ปัจจัยต่าง ๆ ที่เป็นตัวกำหนดความเร็วของปฏิกิริยาที่ถูกเร่งโดยเอนไซม์ นำไปสู่การวิเคราะห์ค่าความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาเริ่มต้น ในปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง ส่วนมากพบว่า เมื่อเอนไซม์ทำปฏิกิริยาอยู่ในชั่วระยะเวลาหนึ่งเอนไซม์มักจะเกิดการสูญเสียสภาพ ทางธรรมชาติ (Denature) ที่ทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาลดลงส่งผลต่อการวัดอัตราเร็ว ของปฏิกิริยาที่ไม่ถูกต้อง ซึ่งสามารถแก้ไขปัญหานี้ได้โดยการวัดความเร็วเริ่มต้นโดยพิจารณาเฉพาะ ช่วงเวลาสั้น ๆ หลังเริ่มปฏิกิริยาเพราะเอนไซม์ยังไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ยังมีความเข้มข้นอยู่ในระดับที่น้อยจนถือว่าไม่มีผลต่อการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา (Product inhibition) ข้อมูลจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์มีประโยชน์ในการระบุความจำเพาะเจาะจงของ เอนไซม์ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน (นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559; ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรตสูงมากสามารถบ่งบอกได้ถึงโครงสร้างของ ซับสเตรตที่เหมาะสมสอดคล้องพอดีกับเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ เหมือนลักษณะคีย์ลูกกุญแจ (ซับสเตรต) กับแม่กุญแจ (เอนไซม์และโคแฟกเตอร์) หรือชักนำให้เกิดการรวมกันขึ้นได้ (“Lock and key” fit or induced fit) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ไม่เปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ทั้งนี้เอนไซม์ (E) และโคแฟกเตอร์จะต้องจับกับซับสเตรต (S) ก่อนจึงจะเกิดการเร่งได้เป็น ผลิตภัณฑ์ (P) พร้อมทั้งเกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรต (Enzyme-substrate complex; ES) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558) ดังสมการ 2-1



การเร่งปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์จนเกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรตในช่วงต้น ( $k_1$ ,  $k_{-1}$ ) จะเกิดขึ้นเร็วมาก ดังนั้นความเร็วของปฏิกิริยาจึงขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาในของการเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ ( $k_2$ ) ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดความเร็วของสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรตทั้งหมดหรือขึ้นอยู่กับสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรต ดังเช่นสมการ 2-2

$$V = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \quad (2-2)$$

พบว่าที่เวลาใด ๆ จะได้

$$\text{ปฏิกิริยาการเกิด} \quad ES = \frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] \quad (2-3)$$

$$\text{ปฏิกิริยาของการสลาย} \quad ES = \frac{-d[ES]}{dt} = k_{-1}[E][S] + k_2[ES] \quad (2-4)$$

$$\text{ในสภาวะที่คงตัว} \quad k_1[E][S] = k_{-1}[ES] + k_2[ES] \quad (2-5)$$

$$\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = K_m = \text{Michaelis-Menten constant} \quad (2-6)$$

เมื่อกำหนดให้ [...] คือ ความเข้มข้น

$k_{-1}$  คือ ค่าคงที่การแตกตัว (Dissociation constant)

$k_1$  คือ Affinity constant

$k_2$  คือ ค่าคงที่การเร่งปฏิกิริยา ( $K_{cat}$ )

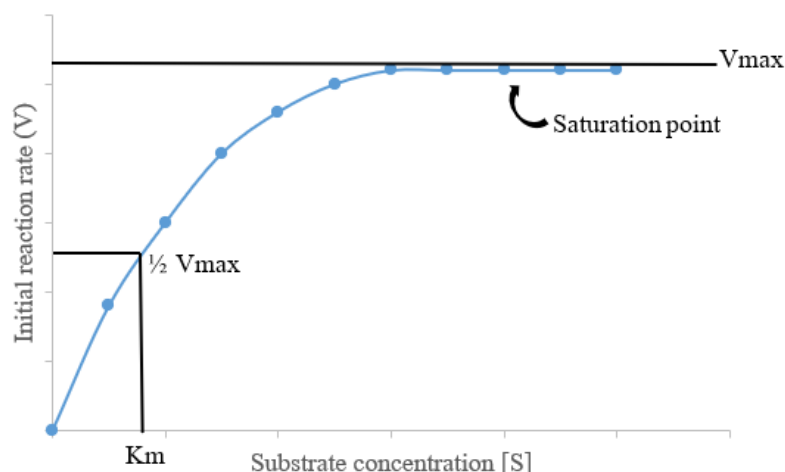
$V$  คือ ความเร็วเริ่มต้น (Initial velocity)

$V_{max}$  คือ ความเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา (Maximum velocity) ซึ่งจะเกิดขึ้นเมื่อเอนไซม์อิ่มตัวด้วยซับสเตรต

$K_m$  คือ ค่าคงที่ไมคาลิส (Michaelis-Menten constant) กล่าวคือความเข้มข้นของซับสเตรตที่ทำให้  $V$  มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของ  $V_{max}$

$$(V = 0.5 V_{max})$$

เฮนรี (Henri) และบราวน์ (Brown) ค้นพบความสัมพันธ์ของความเร็วในการเกิดปฏิกิริยา และความเข้มข้นของซับสเตรตในลักษณะเส้นโค้งของซับสเตรตอิ่มตัวและความเร็ว (Velocity and substrate saturation curve) ดังภาพที่ 2-6



ภาพที่ 2-6 ความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นของซับสเตรตต่าง ๆ คัดแปลงจาก ปรานี อานเป็รื่อง (2558)

กราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นของซับสเตรตต่าง ๆ (ภาพที่ 2-6) พบว่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของซับสเตรต [S] กับความเร็วเริ่มต้น (V) จะเริ่มอิ่มตัวเมื่อกราฟมีลักษณะเป็นเส้นโค้ง โดยความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่สามารถเพิ่มไปมากกว่าจุดที่ซับสเตรตอิ่มตัว (Saturation point) เนื่องจากจะต้องเกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรต ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังสมการของไมคิเลียสและเมนเทน (Michaelis and Menten) (สมการ 2-7) (ปรานี อานเป็รื่อง, 2558) ซึ่งค่อนข้างยุ่งยากในการประเมินค่า Vmax และ Km เพื่อที่จะให้การหาค่าทั้งสองนี้ไม่มีความซับซ้อนจึงนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ Lineweaver-Burk plot (ภาพที่ 2-7) ที่แปลงเป็นส่วนกลับและแยกเทอมของความเข้มข้นของซับสเตรต (1/[S]) กับความเร็วเริ่มต้น (1/V) ได้ดังสมการ 2-9

$$V = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad (2-7)$$

กลับเศษส่วน ดังสมการ 2-8

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m + [S]}{V_{\max} [S]} \quad (2-8)$$

แยกเทอม  $V, [S]$  ดังสมการ 2-9

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (2-9)$$

การสร้างกราฟความสัมพันธ์ Lineweaver-Burk plot (ภาพที่ 2-7) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์ระหว่าง  $1/V$  และ  $1/[S]$  สามารถพิจารณาค่า  $V_{\max}$  ได้จากส่วนกลับของจุดตัดแกน y (y-Intercept) ดังสมการ 4-5

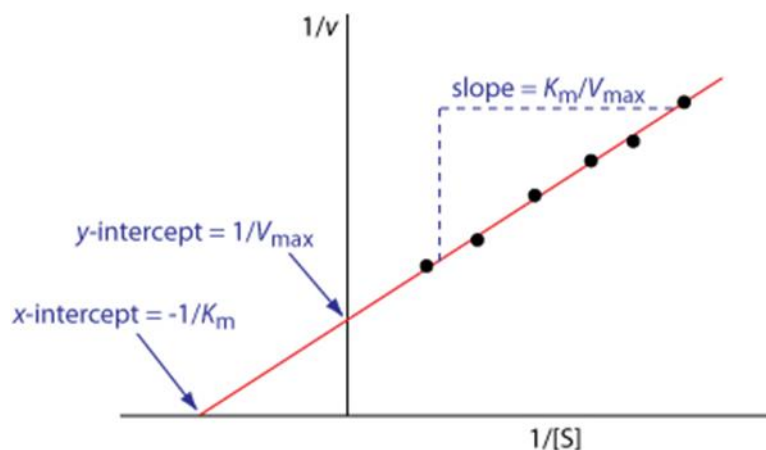
$$\text{y-intercept} = \frac{1}{V_{\max}} \quad (2-10)$$

ณ  $V_{\max}$  โมเลกุลของเอนไซม์ทั้งหมดจะถูกทำให้เกิดสารเชิงซ้อนของเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของซับสเตรตจะไม่ส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาหรือเอนไซม์กับซับสเตรตเกิดการอิ่มตัว

ส่วนค่า  $K_m$  สามารถพิจารณาได้จากความสัมพันธ์ของจุดตัดแกน x (x-Intercept) กับการประมาณการถดถอยเชิงเส้นดังสมการ 4-6 อีกทั้งค่า  $K_m$  ยังสามารถพิจารณาได้จากความชันของค่าความชัน (Slope) ดังสมการ 4-7 (Ekpenyong, Asitok, Odey, & Antai, 2016)

$$\text{x-intercept} = - \frac{1}{K_m} \quad (2-11)$$

$$\text{Slope} = \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (2-12)$$



ภาพที่ 2-7 Lineweaver-Burk plot ของปฏิกิริยาของเอนไซม์

(<https://community.asdlib.org/imageandvideoexchangeforum/2013/08/05/lineweaver-burk-plots/>)

ดังนั้นการวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์สามารถทราบถึงความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (Maximum velocity,  $V_{max}$ )  $K_m$  (Michaelis–Menten constant)  $K_{cat}$  (Catalytic constant) และ  $K_{cat}/K_m$  โดยแต่ละตัวชี้วัด คือ

ค่า  $V_{max}$  คือ ความเร็วปฏิกิริยาสูงสุดที่แสดงถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์

ค่า  $K_m$  คือ ค่าคงที่สัมพรรคภาพหรือค่าความเข้มข้นของซับสเตรตที่ทำให้  $V$  มีค่าเป็นครึ่งหนึ่งของ  $V_{max}$

ค่า  $K_{cat}$  คือ ค่าคงที่ของความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสำหรับเปลี่ยนจำนวน โมเลกุลของซับสเตรตที่สามารถเข้าไปในบริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ให้เป็นผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 1 วินาที ต่อเอนไซม์ 1 โมล ในสภาวะเอนไซม์อิ่มตัว

ค่า  $K_{cat}/K_m$  คือ ค่าประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาหรือค่าคงที่ความจำเพาะเจาะจง (Specificity constant) ของเอนไซม์

เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบุรฉัตร ศรีทองแท้ (2557) กล่าวว่า การย่อยพันธะเปปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลสเสตที่ได้สามประการ คือ

1. การเพิ่มขึ้นของหมู่อะมิโน และคาร์บอกซิลที่สามารถแตกตัวได้ จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความชอบน้ำ และปริมาณประจุของโปรตีน
2. การลดความยาวของสายพอลิเปปไทด์ มีผลในการลดความเป็นแอนติเจนของโปรตีน

3. โครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลง ทำให้เกิดการเผยหน้าที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนให้ออกมาอยู่บริเวณผิวหน้าของโปรตีนที่ผ่านการตัดแปรด้วยเอนไซม์ ซึ่งจะมีผลต่อสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน

### 2.3.3 ประโยชน์ของเจลาตินไฮโดรไลเสต

การย่อยโปรตีนมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของโปรตีน (จิรนาถทิพย์รักษา, 2549) โปรตีนหรือคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ถูกผลิตขึ้นมีส่วนผสมของเปปไทด์ที่มีความยาวและกรดอะมิโนอิสระแตกต่างกัน โดยเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพถูกผลิตขึ้นในระหว่างการย่อยโปรตีนที่มีการควบคุม ซึ่งการย่อยในสภาวะที่ต่างกันทำให้ได้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกัน (Lasekan et al., 2013)

#### ข้อดีหรือประโยชน์ของเจลาตินไฮโดรไลเสต

- เมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถย่อยได้ง่าย ดูดซึมง่ายและสามารถกระจายอยู่ในร่างกายได้ (เสาวภา จันทร์เทศ, 2557)
- ได้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ และความดันโลหิตสูง (สารยับยั้งเอนไซม์ ACE) (Lasekan et al., 2013) เป็นต้น
- การย่อยบางส่วนสามารถปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการละลาย การดูดซึมไขมัน เสถียรภาพการเกิดฟอง และคุณสมบัติในการทำให้เป็นอิมัลชัน (Lasekan et al., 2013)

#### ข้อเสียของเจลาตินไฮโดรไลเสต

- ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับ รสขมที่ได้เกิดจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไอโซลูซีน ลูซีน ฟีนิลอะลานีน ทรีปโตเฟน และวาเลอีน เป็นต้น กรดอะมิโนหลาย ๆ ตัวเรียงต่อกันเป็นเปปไทด์จะให้รสขมมากกว่ากรดอะมิโนที่อยู่แบบอิสระ (เสาวภา จันทร์เทศ, 2557)

## 2.4 เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant peptides)

เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระมีความโดดเด่นเป็นพิเศษสำหรับการมีส่วนร่วมในการปรับปรุงสุขภาพของมนุษย์ โดยป้องกันและรักษาโรคเรื้อรังที่ไม่ติดต่อ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคข้ออักเสบ หรือโรคเบาหวาน (Zou, He, Li, Tang, & Xia, 2016) ซึ่งการเกิดโรคต่าง ๆ อาจมีสาเหตุมาจากการดำเนินชีวิตในปัจจุบันที่มีความเสี่ยงต่ออนุมูลอิสระจากภายนอกมากมาย เช่น การรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของไขมันสูง การใช้น้ำมันในการ

ทอดที่อุณหภูมิสูงมาใช้ซ้ำ หรือจากสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ เช่น ควันจากบุหรี่และท่อไอเสียรถยนต์  
มลพิษต่าง ๆ จากโรงงานอุตสาหกรรม

#### 2.4.1 อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ คือ สารหรือโมเลกุลใด ๆ ที่มีอิเล็กตรอน โคเดเดี่ยว (Unpaired electron) ที่  
ชั้นนอกสุดทำให้มีความไวในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ (Jarukamjorn, Sinthorn, & Pimson,  
2014) อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ในทางชีววิทยาที่สามารถเป็นตัวตั้งต้นที่ทำให้เกิดเป็น  
อนุมูลอิสระ สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ  
(Reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive nitrogen  
species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (Reactive chlorine species, RCS)  
อนุมูลอิสระที่สำคัญที่สุดที่เกิดในเซลล์ที่ใช้ออกซิเจน ได้แก่ อนุพันธ์ของอนุมูลออกซิเจน (Oxygen  
radical) (เช่น ซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (Superoxide anion) และอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl  
radical), ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide), โลหะทรานซิชัน (Transition metals),  
อนุมูลคาร์บอเนต (Carbonate radical,  $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ), อนุมูลไนเตรต (Nitrate radical,  $\text{NO}_3^{\cdot}$ ), อนุมูลเมทิล  
(Methyl radical,  $\text{CH}_3^{\cdot}$ ), อนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide radical,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), อนุมูลเพอร์ออกซิล  
(Peroxyl radical,  $\text{ROO}^{\cdot}$ ), ROS เป็นต้น อนุมูลเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาทางเคมี  
กับสารอื่นสูงมาก การเกิดอนุมูลอิสระมีได้หลายกลไกที่แตกต่างกัน (ปวีณา พันทอง, 2559)

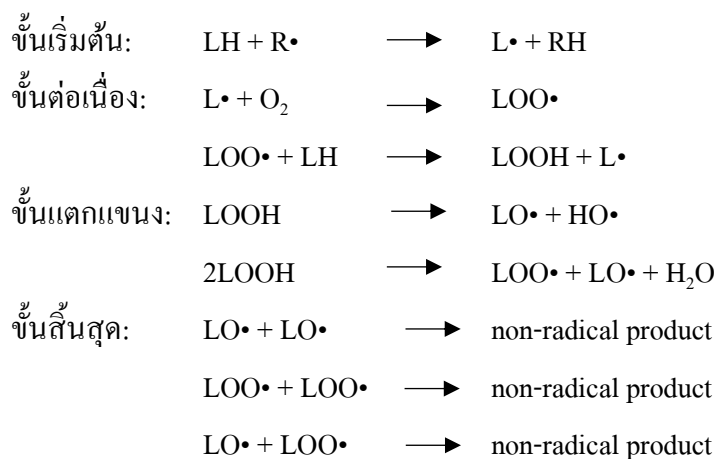
#### 2.4.2 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ

การเกิดอนุมูลอิสระโดยทั่วไปจะเกี่ยวข้องกับอะตอมของออกซิเจน กรดไขมันที่ไม่  
อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid) ฟอสโฟไลปิด (Phospholipids) โคเลสเตอรอล (Cholesterol)  
ดีเอ็นเอ (DNA) รวมทั้งฮีม (Heme) และตัวเร่งปฏิกิริยาโลหะ (Metal catalysts) ชักนำให้เกิดการ  
ออกซิเดชัน (Falowo, Fayemi, & Muchenje, 2014; เบลญามาต ไชยลาภ และชเนศวร นวลโย, 2559)

กระบวนการออกซิเดชันของไขมันมีส่วนสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของอาหาร  
ซึ่งจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ระหว่างการเก็บรักษาของขั้นเริ่มต้น (Initiation) และปฏิกิริยาเกิดอย่าง  
รวดเร็วในขั้นต่อเนื่องเกิดเป็นผลิตภัณฑ์ปฐมภูมิ (Primary oxidation production) ซึ่งเป็น  
สารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, LOOH) ไม่เสถียร โดยสามารถเปลี่ยนเป็น  
สารประกอบทุติยภูมิ (Secondary oxidation production) อื่น ๆ ได้ เช่น การแตกตัวเป็นแอลกอฮอล์  
แอลดีไฮด์ กรดไฮดรคาร์บอน การสูญเสียน้ำเป็นคีโตน และการเกิดเป็นอนุมูลอิสระ เช่น โมโน  
เมอร์ ไดเมอร์ โดยกระบวนการออกซิเดชันของไขมันโดยทั่วไปเป็นปฏิกิริยา Non-enzymatic free  
radical-mediated chain reaction ที่เกิดอนุมูลอิสระที่เป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ก่อให้เกิด  
การทำลายอย่างต่อเนื่อง โดยเริ่มจากขั้นเริ่มต้น (Initiation) ที่เกิดจากสิ่งกระตุ้นจากภายนอกร่างกาย



เช่น ความร้อน แสง สารเคมีหรือโปรตีนที่มีโลหะ ต่อด้วยขั้นต่อเนื่อง (Propagation) ขั้นแตกแขนง (Branching) และขั้นสิ้นสุด (Termination) (เบญจมาศ ไชยลาภ และชเนศวร นวลใย, 2559; ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)



ภาพที่ 2-8 กลไกการเกิดอนุมูลอิสระ (เบญจมาศ ไชยลาภ และชเนศวร นวลใย, 2559)

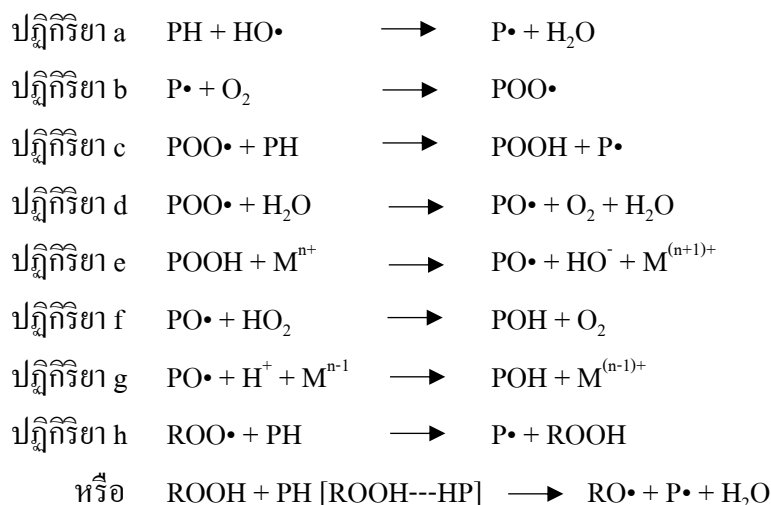
หมายเหตุ : LH คือ โมเลกุลตั้งต้น เช่น ไขมัน

$R\cdot$  คือ อนุมูลอิสระที่กระตุ้นให้เกิดการออกซิเดชัน (Initiating oxidizing radical)

การออกซิเดชันของไขมันจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาสูง (Highly reactive allylradical,  $L\cdot$ ) อนุมูลอิสระจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจนอย่างรวดเร็วเพื่อเกิดเป็นอนุมูลอิสระไขมันของเปอร์ออกซิล (Peroxy,  $LOO\cdot$ ) ซึ่ง  $LOO\cdot$  เป็นพาหะให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่จะออกซิไดซ์ไขมันต่อไปหรือทำให้เกิดไขมันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxides,  $LOOH$ ) ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นสารประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ ไฮโดรคาร์บอน และอนุมูลอิสระอื่น ๆ รวมถึงอนุมูลของ alkoxy ( $LO\cdot$ ) ในกระบวนการสิ้นสุดจะเกี่ยวข้องกับการรวมตัวกันของอนุมูลอิสระเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (Non-radical product)

นอกจากนี้ Falowo et al. (2014) รายงานถึงการออกซิเดชันของโปรตีนของการออกซิเดชันในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยการออกซิเดชันของโปรตีนเป็นการดัดแปลงพันธะโควาเลนต์ของโปรตีนที่เหนียวมา ROS หรือการทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับผลพลอยได้ขั้นทุติยภูมิ ปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนเกิดผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับการเกิดออกซิเดชันของไขมันในกล้ามเนื้อสัตว์ ในขั้นเริ่มต้นอะตอมไฮโดรเจนจะถูกแยกออกจากโปรตีน (PH) ด้วย ROS ( $HO\cdot$ ) เกิดเป็นอนุมูลอิสระของโปรตีน ( $P\cdot$ ) (ปฏิกิริยา a) มีผลให้เปลี่ยนเป็นอนุมูล

Analkylperoxyl (POO•) (ปฏิกิริยา b) เมื่อมีออกซิเจน และเปลี่ยนเป็น Analkylperoxide (POOH) (ปฏิกิริยา c) จากการจับกับไฮโดรเจนอะตอมของโมเลกุลที่อ่อนแอกว่า ต่อมา ROS (เช่น HO<sub>2</sub> หรือ การเปลี่ยนรูปให้ลดลงจากการถ่ายโอนโลหะ (Mn<sup>+</sup>)) เกิดปฏิกิริยากับ เช่น Fe<sup>2+</sup> หรือ Cu<sup>+</sup> นำไปสู่ การผลิตอนุมูล Analkyl (PO•) (ปฏิกิริยา e และ f) และ Peroxyl derivative (POH) (ปฏิกิริยา g) การ ออกซิเดชันของโปรตีนยังเกิดขึ้นเนื่องจากการทำปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่ของ อนุมูลอิสระเหมือนไขมัน โดยไนโตรเจน (N) หรือซัลเฟอร์ (S) ของกรดอะมิโนอิสระของโปรตีน ทำปฏิกิริยากับไขมันไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (Hydroperoxide, ROOH หรือ LOOH) หรือผลิตภัณฑ์ ขั้นทุติยภูมิจากการออกซิเดชันของไขมัน เช่น อัลดีไฮด์ (ปฏิกิริยา h) โดยอนุมูลเพอร์ออกซิล (Peroxyl radical, ROO• หรือ LOO•) เกิดระหว่างการออกซิเดชันของไขมันซึ่งจะจับกับไฮโดรเจน อะตอมจากโมเลกุลของโปรตีนผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่



ภาพที่ 2-9 กลไกการออกซิเดชันของโปรตีน (Falowo et al., 2014)

### 2.4.3 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรงเพื่อกำจัด อนุมูลหรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อไปในการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งสารต้านอนุมูล อิศระมีทั้งชนิดที่เป็นสารสังเคราะห์ เช่น โทร็อกซ์ (Trolox) อีดีทีเอ (EDTA) บีเอชเอ (BHA) บีเอชที (BHT) เป็นต้น และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ เช่น วิตามินอี วิตามินซี และสารออกฤทธิ์ ทางชีวภาพอื่น ๆ เป็นต้น (ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557; โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจง, จันทรา บุญ ะรัตน์, และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง, 2550)

### 2.4.3.1 แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระ

แหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระแบ่งออกเป็น 2 แหล่ง ได้แก่ สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (Synthetic antioxidants) เช่น โทรล็อก (Trolox) เป็นอนุพันธ์ของวิตามินอีสามารถละลายน้ำได้ดีจึงทำให้สามารถออกฤทธิ์ได้เร็วกว่าวิตามินอี โดยงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมใช้โทรล็อกเป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (Natural antioxidants) เช่น วิตามินซี วิตามินอี ซิลิเนียม ทองแดง และสังกะสี ฟลาโวนอยด์ และเนื้อสัตว์ (ปวีณา พันทอง, 2559)

#### ตัวอย่างสารต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อสัตว์ (ปวีณา พันทอง, 2559)

เปปไทด์ กรดอะมิโน และแคโรทีนอยด์ถูกระบุว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เปปไทด์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น คาร์โนซีน (Carnosine) แอนเซอร์อิน (Anserine) และ Ophidine เป็นไคเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนฮิสติดีน (Histidine) เป็นองค์ประกอบโดยมีความสามารถในการจับโลหะและอนุมูลอิสระ อีกทั้งเปปไทด์ที่มีลำดับของปลาย N - terminal สามารถที่จะยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันที่มีโลหะเป็นตัวกระตุ้น (Metal catalyzed oxidation) ที่ดี ซึ่งแอล-ฮิสติดีนอิสระหรือในโมเลกุลเล็ก ๆ ของเปปไทด์หรือโปรตีนสามารถจับอนุมูลอิสระ ไฮดรอกซีและซิงเกิลออกซิเจนโดยมีความสามารถในการจับมากกว่าทริปโตเฟน 3 เท่า อีกทั้งยังมีรายงานว่าทั้งคาร์โนซีนและแอนเซอร์อินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH และเป็นตัวรีดิวซ์หรือรับอิเล็กตรอน (Bernardini et al., 2011; ศิริธร ศิริอมรพรรณ, 2557)

โปรตีนจากผลพลอยได้ที่ถูกนำมาขยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่างกัน ดังตารางที่ 2-6 โดยในวัตถุุดิบชนิดเดียวกันที่ขยด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกัน พบว่าเปปซิน ทริปซินและอัลคาเลสมีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ

ตารางที่ 2-6 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จากผลพลอยได้ของสัตว์

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอนไซม์	DH (%)	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ* (เอนไซม์ที่ฤทธิ์มากที่สุด)	แหล่งอ้างอิง
Protein Hydrolysates	Chicken breast meat	Papain	-	DPPH 1.28 mg/ml (EC <sub>50</sub> ) Reducing power 2.37 mg/ml	Sun et al. (2012)
Gelatin hydrolysates	Duck skin	Collaganase, Papain, Pepsin, Trypsin, α-Chymotrypsin, Flavourzyme, Neutrase, Protamex & Alcalase	48.70, 25.31, 33.14, 29.28, 36.09, 30.01, 29.27, 22.79 & 28.31	DPPH of pepsin 1.230% (EC <sub>50</sub> ) OH of pepsin 0.554% (EC <sub>50</sub> )	Lee et al. (2012)
Peptide	Duck by-products (feet, bones, heads and viscera)	Flavourzyme, Neutrase, Neutrase, Protamex, Alcalase, Papain, Pepsin, Trypsin & α-Chymotrypsin	-	OH of pepsin 54.29%	Lee et al. (2010)
Protein hydrolysate	Porcine liver	Alcalase, trypsin & papain	23.56, 26.82 & 19.12	DPPH of trypsin 57.49% ABTS of trypsin 86.79%	Verma et al. (2017)

ตารางที่ 2-6 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	วัตถุดิบ	เอนไซม์	DH (%)	กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ* (เอนไซม์ที่ฤทธิ์มากที่สุด)	แหล่งอ้างอิง
Protein	Scalloped	Neutrase, Alcalase,	20.87, 21.37, 23.72,	OH of trypsin 62.38%	Li et al. (2017)
Hydrolysate	Hammerhead ( <i>Sphyrna lewini</i> ) Cartilage	Trypsin, Pepsin & Papain	21.58 & 18.33		
Gelatin hydrolysates	Hoki ( <i>Johnius belengerii</i> ) skin	Trypsin, α-Chymotrypsin & Pepsin	-	DPPH of trypsin 30.2% Superoxide of trypsin 48.6% Carbon-centered of trypsin 43.6%	Mendis, Rajapakse and Kim (2005)
Protein hydrolysate	Chicken skins	Pepsin and Pancreatin (PP), Alcalase		DPPH of alcalase 35.37% OH of alcalase 19.59%	Onuh et al. (2014)

\*วิธี DPPH scavenging activity assay, Hydroxyl (OH) radical scavenging activity, Reducing power, ABTS radical scavenging activity assay

Carbon-Centered Radical-Scavenging Activity และ Superoxide Radical-Scavenging Activity

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเสตได้รับการพิสูจน์จากงานวิจัยต่าง ๆ ซึ่งจากการรายงานของ Sun et al. (2012) ศึกษาสมบัติต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจากเนื้อหน้าอกไก่ที่ย่อยด้วยปาเปน โดยวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH scavenging activity assay และ Reducing power พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสเสตจะทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเนื่องจากโปรตีนไฮโดรเจนมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่ดี แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลสเสตของโปรตีนจากเนื้อหน้าอกไก่สามารถยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เป็นอนุมูลอิสระได้ โดยการเปลี่ยนอนุมูลอิสระเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเสถียรภาพมากขึ้น และการรายงานของ Lee et al. (2012) ศึกษาเจลาตินไฮโดรไลสเสตจากหนังเป็ดที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์เพื่อผลิตเป็นไฮโดรไลสเสตที่สามารถละลายน้ำได้ จากการผ่านการเตรียมขึ้นต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดอะซิติกก่อนนำมาสกัดเจลาตินด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเจลาตินที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้เป็นเจลาตินไฮโดรไลสเสต และนำไปวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radicals scavenging activity, Hydroxyl radicals scavenging activity และ Alkyl radicals scavenging activity พบว่า Pepsin hydrolysate ที่ผ่านการเตรียมขึ้นต้นด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เนื่องจาก DPPH ลดลงจากการจับคู่อิเล็กตรอนที่ผิดปกติของอนุมูลอิสระของ DPPH แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลสเสตมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นที่น่าสนใจ

#### 2.4.3.2 ประเภทของสารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามกลไกการเกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน โดยการขัดขวางและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ได้แก่ Primary (radical chain-breaking) antioxidants และ Secondary (preventive) antioxidants แต่โดยทั่วไปสามารถแบ่งเป็น 5 ประเภทใหญ่ ๆ (บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ, 2549; อรวรรณ กริ่งเกษมศรี, 2555) ดังนี้

- Primary antioxidants: สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการยุติปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน โดยเป็นตัวให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้น เช่น การหยุดปฏิกิริยาการสร้างอนุมูลอิสระ (Chain-breaking)
- Oxygen scavenger: สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการช่วยเสริมฤทธิ์ (Synergism) ให้กับสารต้าน

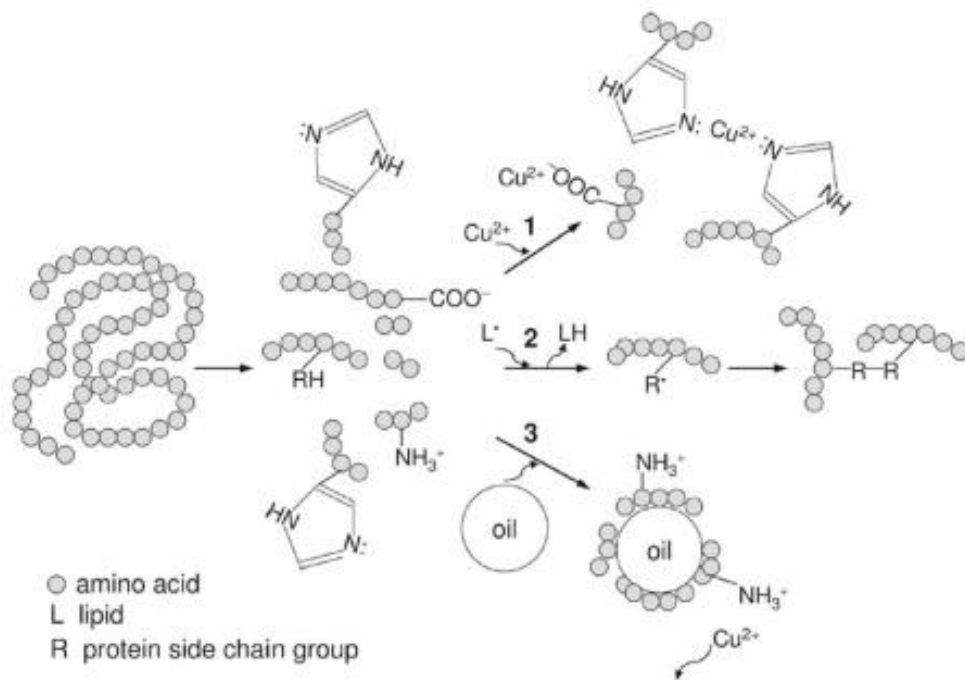
อนุมูลอิสระตัวอื่น ซึ่งมีกลไกในการทำปฏิกิริยาที่หลากหลายด้วยการให้ไฮโดรเจนแก่อนุมูลฟีนอกซี (Phenoxy radical) ทำให้ Primary antioxidants มีฤทธิ์กลับคืนสู่สภาพเดิม หรือเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงช่วยกำจัดออกซิเจนในระบบปิดได้

- Secondary (preventive) antioxidants: สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่ในการสลายโมเลกุลหรือยับยั้งปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมัน โดยขัดขวางหรือทำให้ปฏิกิริยามีอัตราเร็วช้าลงมากกว่าจะไปทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระจึงมีกลไกที่หลากหลาย เช่น การจับไอออนของโลหะ (Binding metal ions) การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Metal chelation) การดักจับอนุมูลอิสระ (Radical scavenging) และการยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (Singlet oxygen quenching)

- Enzymic antioxidant: สารในกลุ่มนี้ทำหน้าที่กำจัดออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระของออกซิเจน โดยเฉพาะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ได้แก่ เอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งแบ่งเป็น Primary antioxidant enzyme และ Auxiliary antioxidant enzyme

- Chelating agent หรือ Sequestant: สารกลุ่มนี้ทำหน้าที่คล้ายกับ Oxygen scavenger ได้แก่ อีดีทีเอและฟอสเฟต ซึ่งสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อยมากหรือแทบจะยับยั้งไม่ได้เลยเมื่อใช้เพียงลำพังแต่มีประสิทธิภาพสูงในการช่วยเสริมฤทธิ์ให้กับ Primary antioxidants และ Oxygen scavengers ยกเว้นกรดอะมิโน ซึ่งเป็นได้ทั้งสารต้านอนุมูลอิสระและ Pro-oxidants และยังทำหน้าที่ในการจับไอออนของโลหะทำให้ทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เสถียร

โดยส่วนใหญ่เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะมีลักษณะโครงสร้างร่วมกันบางอย่าง รวมถึงความยาวของเปปไทด์อิสระสายสั้น ๆ (เช่น กรดอะมิโน 3 - 16 ตัว) และน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 200 - 1800 Da ซึ่งมักแสดงกรดอะมิโนอิสระที่ไม่ชอบน้ำในลำดับของกรดอะมิโน เปปไทด์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมัน ออกซิเจนที่มีในองค์ประกอบและการจับกับโลหะ ซึ่งเปปไทด์ที่อยู่ระหว่างผิวของน้ำมันหรือไขมันสามารถป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะเข้ามาทำปฏิกิริยาได้โดยตรง (Nikoo & Benjakul, 2015) ดังภาพที่ 2-9



ภาพที่ 2-10 ลักษณะของกลไกทางเคมีและทางกายภาพของเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งกระบวนการออกซิเดชัน (1) จับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (2) ดักจับอนุมูลอิสระ (3) ชัดขวางทางกายภาพ (การป้องกัน; การกำจัด) (Nikoo & Benjakul, 2015)

ลักษณะโครงสร้างร่วมกันบางอย่างของเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้รับการพิสูจน์จากงานวิจัยต่าง ๆ เช่น งานวิจัยของ Verma et al. (2017) ศึกษาการประเมินประสิทธิภาพของการต้านอนุมูลอิสระและจุลินทรีย์ของดักสุกรไฮโดรไลสด้วยเอนไซม์ (อัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน) เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าทริปซินที่ระยะเวลาการบ่ม 6 ชั่วโมง มีระดับการย่อยและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าอัลคาเลสและปาเปน เนื่องจากเปปไทด์อาจแตกต่างกันไปในแง่ของการจัดเรียงกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโน ฯลฯ ซึ่งการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์เกิดจากโครงสร้างของเปปไทด์ที่อาจสัมพันธ์กับน้ำหนัโมเลกุล และลำดับกรดอะมิโนต่อกิจกรรมที่ทำให้เกิดการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัโมเลกุล ขนาด จำนวน องค์ประกอบ และลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์เป็นผลมาจากความจำเพาะของเอนไซม์ ซับสเตรต และการย่อยที่มีความจำเพาะ



#### 2.4.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์หรือคอลลาเจน

##### ไฮโดรไลเซต

ลักษณะ โครงสร้างทางเคมีของเปปไทด์อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ การมีเปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำและลักษณะแอมฟิฟิลิก (Amphiphilic) จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง โดยธรรมชาติของเปปไทด์ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการเพิ่มความสามารถในการละลายของเปปไทด์ ในขณะเดียวกันก็ช่วยสนับสนุนการมีปฏิสัมพันธ์และการแลกเปลี่ยน โปรตอนกับชนิดของอนุมูล (Zou et al., 2016)

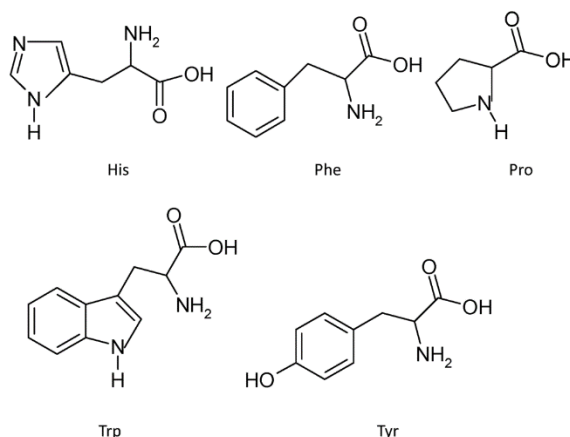
##### 2.4.4.1 น้ำหนักโมเลกุล

Cai et al. (2015) รายงานว่าเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้จากหนังปลาฉลาม (*Ctenopharyngodon idella*) ไฮโดรไลเซตโดยย่อยด้วยอัลคาเลส พบว่าเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซตมาทำบริสุทธิ์ โดยใช้ Gel chromatography sephadex G-15 และนำเปปไทด์ที่แยกได้มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ส่วนแรกของเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ที่สุดและส่วนสุดท้ายน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่สุดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ อาจเป็นผลมาจากการปรากฏกรดอะมิโนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่มีอยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนออกมาอยู่ที่บริเวณผิวหน้ามากกว่าทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลขนาดใหญ่ (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย และบูรฉัตร ศรีทองแท้, 2557)

##### 2.4.4.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

ความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์กรดอะมิโนสามารถบ่งชี้การกระจายตัวของกรดอะมิโนแต่ละตัวในเปปไทด์ที่ไม่เท่ากัน Zou et al. (2016) รายงานว่าการที่เปปไทด์มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำในปริมาณสูงจะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเมื่อเทียบกับกรดอะมิโนอื่น ๆ ที่เป็นกรดอะมิโนที่ชอบน้ำซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ในการทดสอบกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำมักประกอบไปด้วย His, Trp, Phe, Pro, Gly, Lys, Ile และ Val กรดอะมิโนอิสระนี้ถือว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงในปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเฉพาะปฏิกิริยาที่เกิดจากเอนไซม์เนื่องจากมีวงแหวนอิมิดาโซล (Imidazole) ซึ่งจะเป็นผู้ให้โปรตอนที่สำคัญ แต่ถ้าหากมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำมากเกินไปจะมีความสามารถในการละลายน้ำได้ต่ำทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ต่ำและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl radical scavenging สูง ส่วนกรดอะมิโนที่เป็นกรดซึ่งมีประจุลบ เช่น

Glu และ Asp แสดงกิจกรรมยับยั้งอนุมูลอิสระ (Free-radical quenching) เนื่องมาจากการมีของอิเล็กตรอนมากเกินไป



ภาพที่ 2-11 โครงสร้างทางเคมีของกรดอะมิโนต้านอนุมูลอิสระ 5 ชนิดที่มีวงแหวน  
(Zou et al., 2016)

Cai et al. (2015) รายงานว่า เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่แยกได้หนึ่งจากหนังปลาฉลาม (*Ctenopharyngodon idella*) ที่ย่อยด้วยอัลคาเลสมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Pro-Tyr-Ser-Phe-Lys (PYSFK, GPH-E21) Gly-Phe-Gly-Pro-Glu-Leu (GFGPEL, GPH-E4) และ Val-Gly-Gly-Arg-Pro (VGGRP, GPH-E5) โดย GPH-E21 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่สูงที่สุดเนื่องจาก Trp, Tyr และ Phe มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระจากอินโดลและวงแหวนเบนซีนของกรดอะมิโนที่สามารถให้โปรตอนกับอนุมูลอิสระที่ขาดอิเล็กตรอนทำให้ออกซิเจนมีความเสถียรระหว่างกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ จึงคาดว่า Tyr และ Phe ในลำดับของ GPH-E21 และ Phe ในลำดับของ GPH-E4 อาจเป็นตัวช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงส่วนที่เหลือของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำในลำดับเปปไทด์ช่วยเพิ่มการปรากฏตัวของเปปไทด์ในส่วนผิวหน้าที่อยู่ระหว่างน้ำกับไขมันและช่วยในการเข้าถึงอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเฟสของไขมัน (Ranathunga et al., 2006) ดังนั้นจึงคาดการณ์ว่า Pro, Tyr และ Lys ในลำดับของ GPH-E21, Pro และ Leu ในลำดับของ GPH-E4, Val และ Pro ในลำดับของ GPH-E5 อาจช่วยให้สามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลของไขมันได้ง่าย และต้านอนุมูลอิสระผ่านการให้โปรตอน เช่นเดียวกับการรายงานของ Lee et al. (2010) ศึกษาการแยกเปปไทด์จากผลพลอยได้ (เท้า กระดุก หัว และอวัยวะภายใน) จากกระบวนการผลิตเบ็ดที่ถูกนำมาบดเป็นผงก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ (ฟลาโวไซม์ นิวเตรส โปรตามิกซ์

อัลคาเลส ปาเปน เปปซิน ทริปซิน และแอลฟา-ไคโมทริปซิน) ในสภาวะที่เหมาะสมเป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง พบว่า เปปซินมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี Hydroxyl (OH) radical scavenging activity มากกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ โดยมีลำดับกรดอะมิโน คือ Asp-Val-Cys-Gly-Arg-Asp-Val-Asn-Gly-Tyr (1096 Da) ซึ่งไคเปปไทด์และไตรเปปไทด์ที่เป็นกรดอะมิโนอิสระในวงอะโรมาติก (Trp หรือ Tyr) รวมทั้งเปปไทด์ที่มี Pro หรือ His มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี การต้านอนุมูลอิสระของ Tyr อาจอธิบายได้จากความสามารถพิเศษของกลุ่มฟีนอลเพื่อทำหน้าที่เป็นผู้ให้ไฮโดรเจนโดยเป็นกลไกหนึ่งในการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ

#### 2.4.4.3 ลำดับของกรดอะมิโน

Zou et al. (2016) กล่าวว่า Trp ในลำดับมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้เคียง Trp ได้รับการพิจารณาว่ามีอิทธิพลต่อการต้านอนุมูลอิสระสูง และแสดงให้เห็นกิจกรรมต่าง ๆ ในลำดับที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากเป็นความสามารถพิเศษของวงแหวนอินโดลของ Trp ที่ให้ไฮโดรเจนทำปฏิกิริยากับอนุมูลของอินโดล และความเสถียรของกรดอะมิโนที่อยู่ใกล้เคียงกับสมบัติทางเคมีกายภาพที่แตกต่างกันมีอิทธิพลต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ทั้งหมด ในส่วนของกลุ่มซัลฟไฮดริล (SH) Cys ให้ไฮโดรเจนที่มาจากกลุ่ม SH หรือการสูญเสียอิเล็กตรอนจากอะตอมของซัลเฟอร์ และ Trp อีสารที่มีโครงสร้างวงอะโรมาติกจะให้โปรตอนให้แก่อนุมูลอิสระที่ขาดอิเล็กตรอน ดังนั้น Cys และ Trp จะมีบทบาทสำคัญในกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์บางชนิดเมื่อมีอยู่ในสายเปปไทด์เดียวกัน

ลำดับกรดอะมิโนอิสระที่ไม่ชอบน้ำ เช่น Val หรือ Leu ที่ N-terminus ประกอบด้วย Pro, His หรือ Tyr เป็นลักษณะของเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ ในลำดับของกรดอะมิโน Pro มีแนวโน้มที่จะขัดขวางและเปลี่ยนโครงสร้างทุติยภูมิของโมเลกุลเปปไทด์ซึ่งอาจช่วยเพิ่มความสามารถของกรดอะมิโนอิสระในลำดับเปปไทด์เพื่อทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการมี Leu และ Ser-Leu / Thr-Leu / Pro-Leu ในลำดับโดยเฉพาะที่ปลายทาง N-terminus และ C-terminus ดูเหมือนจะมีส่วนช่วยให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี กรดอะมิโนของไตรเปปไทด์มีความสัมพันธ์กับโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของอิเล็กตรอน ส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และสมบัติการยึดจับไฮโดรเจนต่อความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ สมบัติของอิเล็กตรอนของกรดอะมิโนอิสระมีความสำคัญมากและส่วนที่ไม่ชอบน้ำขนาดใหญ่ที่ C-terminal มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระอย่างใกล้ชิด ซึ่งให้เห็นว่าสมบัติการยึดจับไฮโดรเจนและตำแหน่งของกรดอะมิโนร่วมกับสมบัติของ Steric ของกรดอะมิโนอิสระที่ C-Terminal และ N-Terminal อาจเป็นส่วนสำคัญของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ทั้งหมด (Zou et al., 2016)

#### 2.4.4.4 โครงสร้างทุติยภูมิ

$\alpha$ -helices และ  $\beta$ -sheet ของโครงสร้างทุติยภูมิมีอยู่ในโครงสร้างของเปปไทด์ด้านอนุโมลติสระ แต่ผลการตรวจสอบบทบาทของโครงสร้างทุติยภูมิในกิจกรรมก่อนข้างหายากเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุโมลติสระอย่างมีนัยสำคัญมักเป็นสายสั้นที่มีกรดอะมิโนอิสระ 4-6 ดังนั้น โครงสร้างทุติยภูมิอาจเป็นปัจจัยรองลงมาสำหรับเปปไทด์ด้านอนุโมลติสระเนื่องจากน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Zou et al., 2016)

## 2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสต

### 2.5.1 ความสามารถในการละลาย

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีนเนื่องจากความสามารถในการละลายจะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่น ๆ เช่น การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ การเกิดโฟม เป็นต้น (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรฉัตร ศรีทองแท้, 2557) ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์อาจส่งผลต่อขนาดโมเลกุลและความชอบน้ำ ความมีขั้วและหมู่ที่แตกตัวได้ (Ionizable group) ของกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเสต รวมทั้งความสมดุลความชอบและไม่ชอบน้ำของเปปไทด์ ซึ่งมีผลต่อความสามารถในการละลาย (Intarasirisawat, Benjakul, Visessanguan, & Wu, 2012)

### 2.5.2 สมบัติของโฟม

เมื่อโปรตีนที่ละลายอยู่ในของเหลวเคลื่อนที่มาบริเวณที่ผิวรอยต่อระหว่างอากาศและน้ำ (หรือของเหลวที่มีขั้ว) โปรตีนคลายตัวเกิดเป็นฟิล์มบางจัดเรียงตัวในลักษณะเป็นสายยาว (Chain) ห่วง (Loop) และหาง (Tail) โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วสู่อากาศ และหันส่วนที่มีขั้วสู่น้ำ ส่งผลให้โปรตีนสามารถกักเก็บฟองอากาศไว้ภายในโครงสร้าง และฟองอากาศกระจายตัวอยู่ภายในส่วนของเหลวได้ ปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม ได้แก่ ค่า pH ปริมาณไขมัน ความเข้มข้นของโปรตีน ประจุและโครงสร้างของโปรตีน ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนขึ้นอยู่กับสมบัติระหว่างพื้นผิวของโปรตีนภายหลังการย่อย (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรฉัตร ศรีทองแท้, 2557)

### 2.5.3 สมบัติของอิมัลชัน

ทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ของระบบ โดยมีการจัดเรียงส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคของน้ำมัน และหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคน้ำทำให้เกิดเป็นสภาพอิมัลชันขึ้น สมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะสัมพันธ์กับสมบัติระหว่างพื้นผิว (Interfacial properties) หรือความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างส่วนที่ชอบน้ำ และไม่ชอบน้ำในระบบอาหาร การย่อย

โปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำทำให้สมบัติด้านต่าง ๆ ของโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ความมีขี้้ว และความชอบน้ำมากขึ้น น้ำหนักโมเลกุลน้อยลง และโครงสร้างของโมเลกุลเกิดการเปลี่ยนแปลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนที่ระดับการย่อยต่ำ (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบุรฉัตร ศรีทองแท้, 2557)

#### 2.5.4 ความสามารถในการจับน้ำและดูดซับน้ำมัน (*Water holding capacity และ*

##### *Oil absorption capacity*)

ความสามารถของโปรตีนในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ และยึดเหนี่ยวโมเลกุลน้ำไว้ในโครงสร้าง การย่อยโปรตีนจะทำให้จำนวนหมู่ที่มีขี้้วในระบบ เช่น หมู่คาร์บอกซิล และหมู่อะมิโนมีปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้โปรตีนที่ผ่านการย่อยระดับการย่อยต่ำจะมีความสามารถในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำได้ดีขึ้นจึงมีสมบัติด้านการอุ้มน้ำสูงขึ้น (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบุรฉัตร ศรีทองแท้, 2557)

ตารางที่ 2-7 การประยุกต์ใช้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากผลพลอยได้ชนิดต่าง ๆ

ผลิตภัณฑ์	ผลพลอยได้	สมบัติเชิงหน้าที่	การประยุกต์ใช้	แหล่งอ้างอิง
โปรตีนไฮโดรไลเสต	เนื้อปลาอ่อน ( <i>Channa striata</i> )	-สมบัติของอิมัลชัน	ไส้กรอกอิมัลชัน	Zakaria and Sarbon (2018)
โปรตีนไฮโดรไลเสต	ไขปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ	-สมบัติของอิมัลชัน	ไส้กรอกอิมัลชัน	Intarasirisawat et al. (2014)
โปรตีนไฮโดรไลเสต	กระดูกหมู	-สมบัติของอิมัลชัน	-	Liu, Li, Diao, Kong and Liu (2018)
เจลาตินไฮโดรไลเสต	หนังหมึกกระดอง	-ความสามารถในการละลาย -สมบัติของโฟม -สมบัติของอิมัลชัน -ความสามารถในการจับน้ำและดูดซับน้ำมัน	-	Jridi et al. (2014)
เจลาตินไฮโดรไลเสต	หนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา	-ความสามารถในการละลาย -สมบัติของโฟม -สมบัติของอิมัลชัน	เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ	สินีนาด สุขไกว (2555)
คอลลาเจนไฮโดรไลเสต	หนังหมู	-ความสามารถในการละลายหรือการตกตะกอน	เครื่องดื่มเกี๊ยงฮวย	Zhang et al. (2018)

## 2.6 การประยุกต์ใช้เจลาตินไฮโดรไลเสต

โปรตีนที่ถูกนำมาขายและมีระดับการย่อยสูงจะประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระปริมาณมาก ซึ่งนอกจากจะมีผลให้มีสมบัติด้านการละลายสูงขึ้นยังมีความสามารถในการปรับปรุงรสชาติและการต้านอนุมูลอิสระทำให้ถูกนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งโดยทั่วไปจะนิยมใช้ในกระบวนการผลิตซอสปรุงรส เช่น ซอสถั่วเหลือง การผลิตซีอิ๊ว การผลิตน้ำปลา และช่วยลดความขมของผลิตภัณฑ์ปรุงแต่งรสบางชนิด ซึ่งมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากโปรตีนที่ถูกนำมาขายเป็นอาหารเพื่อสุขภาพเนื่องจากเปปไทด์หลายชนิดที่มีสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีผลกับการควบคุมการทำงานของระบบต่าง ๆ ภายในร่างกายมนุษย์ให้เป็นปกติ (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรณัตร์ ศรีทองแท้, 2557)

โปรตีนที่ถูกนำมาขายและมีระดับการย่อยต่ำจากธัญพืช นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์และอาหารเพื่อสุขภาพต่าง ๆ ซึ่งสามารถช่วยปรับปรุงลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส รวมถึงความฉ่ำน้ำของผลิตภัณฑ์อาหารประเภทเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีสมบัติเป็นองค์ประกอบที่ช่วยด้านการคงตัว (Stabilizing ingredient) ในผลิตภัณฑ์ประเภทไส้กรอกอิมัลชัน และใช้ทดแทนไข่ขาวในการขึ้นรูปโฟมของผลิตภัณฑ์เบเกอรี่และขนมอบจากผลพลอยได้ของน้ำนมหรือเวย์โปรตีนเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ นิยมใช้เป็นส่วนประกอบสำคัญในอาหารประเภทไขมันต่ำซึ่งช่วยส่งเสริมลักษณะความเป็นครีม (Creaminess) ลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดี และความสามารถในการอุ้มน้ำของผลิตภัณฑ์อาหารหลายประเภท เช่น ซุป ซอส น้ำสลัด และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เป็นต้น ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมปลาถูกนำมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารด้านต่าง ๆ เช่น การเพิ่มคุณค่าทางอาหารแทนน้ำนม (Milk replacers) การเพิ่มคุณค่าทางอาหารในการเป็นสารเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม และช่วยเสริมกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ขนมขบเคี้ยว (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรณัตร์ ศรีทองแท้, 2557) โดยจากการรายงานของ Mokrejs et al. (2017) ศึกษาการวิธีการแปรรูปทำไก่เป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเสตด้วยโปรทามกซ์ (1, 3 และ 5%) ร่วมกับอุณหภูมิ (60, 75 และ 90 องศาเซลเซียส) และระยะเวลาในการสกัด (2, 6 และ 8 ชั่วโมง) พบว่าการเปลี่ยนโปรตีนไฮโดรไลเสตไปเป็นคอลลาเจนไฮโดรไลเสตมีสถานะที่เหมาะสม คือ การใช้โปรทามกซ์ 3%(w/w) ในอัตราส่วน 1:8 (โปรตีนไฮโดรไลเสต: น้ำ) เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (pH 6.0) จากนั้นจึงนำมาสกัดต่อที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง จะได้คอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่มีระดับการเปลี่ยนแปลง (%Conversion

degree) ประมาณ 60% ซึ่งจะละลายน้ำได้ดีและย่อยง่ายจึงมีศักยภาพเป็นอาหารเสริม สารเติมแต่งในอุตสาหกรรมอาหาร อีกทั้งการรายงานของ Intarasirisawat et al. (2012) ศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบ (Roe protein hydrolysate, RPH) ด้วยอัลคาเลส พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยมีผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH ลดลง ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากอาจถูกควบคุมโดยความแตกต่างของความยาวสาย องค์กรประกอบและสายของกรดอะมิโน และความไม่ชอบน้ำ ซึ่งการที่เอนไซม์มีความสามารถในการตัดพันธะสูงชันจะส่งผลให้เกิดเปปไทด์สายสั้นที่มีความชอบน้ำมากขึ้นซึ่งเปปไทด์เหล่านี้มีประสิทธิภาพต่ำในการกำจัดอนุมูลอิสระ ในส่วนของสมบัติเชิงหน้าที่พบว่า เมื่อเพิ่มระดับการย่อยความสามารถในการละลายและการเกิดโฟมมีแนวโน้มสูงขึ้น เนื่องจากเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีสัดส่วนของหัวอิสระมากจึงสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำและสามารถละลายได้มากขึ้น และยังสามารถเคลื่อนที่ไปอยู่ระหว่างอากาศและน้ำได้เร็วขึ้น ส่วนความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ระดับการย่อย 5% มีค่ามากที่สุดจากการที่มีส่วนที่ชอบและไม่ชอบน้ำซึ่งจะช่วยให้เปปไทด์เคลื่อนที่ไปอยู่ระหว่างน้ำและน้ำมัน

ดังนั้นจากสมบัติทางชีวภาพในด้านการต้านอนุมูลอิสระและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ถูกนำมาย่อยที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จึงมีความน่าสนใจที่จะนำเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากสัตว์ปีกที่เป็นแหล่งทดแทนการผลิตคอลลาเจนและเจลาตินที่มีคุณภาพสูง (Du & Betti, 2016) มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อสัตว์ เช่น ไส้กรอกไก่ เพื่อศึกษากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระร่วมกับสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ไส้กรอกไก่ เป็นต้น

### 2.6.1 ไส้กรอก (Sausage)

ไส้กรอกเป็นผลิตภัณฑ์ที่เนื้อสัตว์ผสมกับสารปรุงแต่งบรรจุในปลอกหุ้มที่เหมาะสมและผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อน ในระหว่างการสับผสมกลุ่มเส้นใยกล้ามเนื้อเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (Myofibrillar protein) จำพวกไมโอซิน (Myosin) และ แอกทิน (Actin) ขาดออกจากกันรวมทั้งขนาดของเนื้อเยื่อไขมันจะลดลง เมื่อเติมเกลือจะทำให้โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ละลายน้ำและเคลื่อนย้ายไปอยู่ในพื้นผิวที่มีเม็ดไขมัน และอยู่ในรูปของเมทริกซ์โปรตีนระหว่างไขมันกับน้ำทำให้เกิดเป็นอิมัลชันขึ้น โดยระหว่างการสับผสมต้องมีการควบคุมอุณหภูมิเพื่อป้องกันความร้อนสูงจากทางกลที่อาจทำให้คุณสมบัติของอิมัลชันของโปรตีนจากเนื้อสัตว์ลดลง และไขมันที่ไม่เป็นอิมัลชันจะเคลื่อนที่ไปยังผิวของผลิตภัณฑ์ทำให้มีผลต่อเนื้อสัมผัส ความรู้สึกลูกปากและความชอบโดยรวม ซึ่งทำให้การใช้เจลาตินไฮโดรไลสเป็นอิมัลซิฟิเคอร์เป็นสิ่งสำคัญที่สามารถปรับปรุงเสถียรภาพของผลิตภัณฑ์อิมัลชันได้ (Intarasirisawat



183963776



et al., 2014; Zakaria & Sarbon, 2018) สมบัติทางเคมีกายภาพของไส้กรอกเป็นลักษณะสำคัญในการกำหนดคุณภาพของไส้กรอก เนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของไส้กรอกชนิดอิมัลชันเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค ในแง่ของบรรจุภัณฑ์ สารเติมแต่ง สี และสมบัติทางประสาทสัมผัส เวลาในการเก็บรักษาและปริมาณการเติมจำพวกแป้ง (Farinaceous) ซึ่งมักจะทำให้นิ่มลงเมื่อเวลาผ่านไปเนื่องจากการย่อยสลายทางชีวเคมีทำให้สมบัติทางเนื้อสัมผัสเปลี่ยนไป นอกจากนี้คุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านของเนื้อสัมผัส ความนุ่มและสีเกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่แย่ลงซึ่งเกิดจากการออกซิเดชันของโปรตีน (Zakaria & Sarbon, 2018)

จากการศึกษาการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากผลพลอยได้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ โดยงานวิจัยของ Zakaria and Sarbon (2018) ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาช่อน (Snakehead (*Channa striata*) protein hydrolysate, CSPH) ในระดับต่าง ๆ (0-3%) ที่มีต่อสมบัติทางเคมีกายภาพและความคงตัวของออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชัน พบว่าโครงสร้างจุลภาคขนาดของเม็ดไขมันในไส้กรอกลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนของ CSPH โดยแนวโน้มในเกิดก้อนไขมันที่มีขนาดเล็กลงและมีการกระจายสม่ำเสมอมากขึ้น อาจเป็นผลมาจาก CSPH มีสมบัติในการเกิดเป็นอิมัลชันซึ่งเป็นฟิล์มบาง ๆ ที่อยู่รอบ ๆ ไขมัน ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตและโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ย้ายไปอยู่ระหว่างน้ำกับไขมันได้รวดเร็วทำให้เกิดอิมัลชันที่มีเสถียรภาพ และพบว่า การเก็บรักษาวันที่ 12 มีค่าเปอร์ออกไซด์ (PV) และ 2-thiobarbituric acid (TBARS) ของ CSPH 3% น้อยกว่าไส้กรอกควบคุม เนื่องจากการสลายตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันขั้นทุติยภูมิ CSPH จึงอาจทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในไส้กรอกอิมัลชัน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับงานวิจัยของ Intarasirisawat et al. (2014) ที่ศึกษาผลกระทบของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ทองแถบในปริมาณ 0.5, 1 และ 3 กรัมต่อ 100 กรัม ต่อสมบัติและความคงตัวของออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชันเสริมด้วยไขมันของปลาทูน่าระหว่างการเก็บรักษาด้วยความเย็นเป็นระยะเวลา 12 วัน

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### วัตถุดิบและสารเคมี

1. เท้าไก่ จากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี แช่แข็งในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ ก่อนนำมาใช้เท้าไก่จะถูกละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง
2. เปปซิน (EC 3.4.23.1) บริษัท Sigma aldrich ประเทศเยอรมนี
3. ทริปซิน (EC 3.4.21.4) บริษัท Sigma aldrich ประเทศเยอรมนี
4. ปาเปน บริษัทอนุทิเทค จำกัด ประเทศไทย
5. อัลคาเลส บริษัทอนุทิเทค จำกัด ประเทศไทย
6. ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline) บริษัท Sigma aldrich ประเทศเยอรมนี
7. ไทโรซีน (L-Tyrosine) บริษัท เอเพกซ์ เคมิคัล จำกัด ประเทศไทย
8. ลิวซีน (L-Leucine) บริษัท Himedia laboratories ประเทศอินเดีย
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
10. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
11. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
12. โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulphite) บริษัท Kemaus ประเทศออสเตรเลีย
13. โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate) บริษัท Qrec ประเทศนิวซีแลนด์
14. โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
15. เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (Tetrasodium pyrophosphate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
16. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
17. โมโน โซเดียมฟอสเฟต (Mono sodium phosphate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
18. กรดอะซิติก (Acetic acid) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
19. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
20. กรดบอริก (Boric acid) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์



183963776

BUU-IThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

21. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) บริษัท Loba chemie ประเทศอินเดีย
22. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, TCA) บริษัท Loba chemie ประเทศอินเดีย
23. กรดซิตริก โมโนไฮเดรต (Citric acid monohydrate) บริษัท Fluka guarantee ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
24. กรดไทโอบาร์บิวริก (2-Thiobarbituric acid) บริษัท Fluka guarantee ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
25. เอทานอล (Ethanol) บริษัท Quality reagent chemical ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
26. คอปเปอร์ ซัลเฟต (Copper (II) sulfate) บริษัท Fluka finechem ประเทศนิวซีแลนด์
27. คอปเปอร์ อะซิเตต (Cupric acetate) บริษัท Fluka guarantee ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
28. โพแทสเซียม ซัลเฟต (Potassium sulfate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
29. โพแทสเซียม เปอร์ซัลเฟต (Potassium persulfate) บริษัท Ajax finechem ประเทศนิวซีแลนด์
30. มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde, MDA) บริษัท Merck KGaA ประเทศเยอรมนี
31. เมทานอล (Methanol) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
32. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) บริษัท RCI Labscan ประเทศไทย
33. 1-โพรพานอล (1-Propanol) บริษัท Winnex ประเทศไทย
34. สารโฟลีน - ซีโอเคาเทล (Folin - Ciocalteu's phenol reagent) บริษัท Loba chemie ประเทศอินเดีย
35. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) บริษัท เอ็นพี เคมีคอล ซัพพลาย จำกัด ประเทศไทย
36. เคซีนจากนมวัว (Casein) บริษัท Sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
37. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) บริษัท Sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
38. เลซิทีน (Lecithin) บริษัท ทีทีเค จำกัด ประเทศไทย
39. โทรล็อก (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid, Trolox) บริษัท Sigma aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา
40. ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) บริษัท Sigma aldrich ประเทศเยอรมนี
41. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) บริษัท Sigma aldrich ประเทศเยอรมนี
42. TPTZ (2,4,6-tripyridyl- triazine) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

43. Chloramine-T บริษัท Sigma Aldrich ประเทศเยอรมนี
44. เฟอริกคลอไรด์ (Ferric chloride (hexahydrate)) บริษัท Loba chemie ประเทศอินเดีย
45. 4-(Dimethylamino)-benzaldehyde บริษัท Ajax finechem ประเทศออสเตรเลีย

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดค่าสี Hunter lab colorimeter รุ่น Miniscan XP Plus ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดลักษณะเนื้อสัมผัส Stable micro system รุ่น TA-XT2 ประเทศอังกฤษ
3. เครื่องบดเนื้อสัตว์ Meat mincer รุ่น TC22 ประเทศจีน
4. เครื่องสับผสมอาหาร CombiMax รุ่น K 600 ประเทศเยอรมันนี
5. เตาเผา (Muffle furnace) Ney รุ่น 6-160A ประเทศอังกฤษ
6. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet apparatus) Gerhardth รุ่น S306AK ประเทศ

### สวีตเซอร์แลนด์

7. เครื่องวิเคราะห์โปรตีนรุ่น Buchi 323 ประเทศสวีตเซอร์แลนด์
8. เครื่องกำจัดไอรก (Scrubber unit) Buchi, รุ่น B-414 ประเทศสวีตเซอร์แลนด์
9. เครื่องวัด pH (pH meter) Schott รุ่น TA-XT5 ประเทศอังกฤษ
10. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) Heidolph รุ่น REAX 2000 ประเทศเยอรมันนี
11. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (Centrifuge) Hermle รุ่น Z323K ประเทศเยอรมนี
12. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น AC 211S ประเทศเยอรมนี
13. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น BA 4100S ประเทศเยอรมนี
14. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS) รุ่น Genesys 10S ประเทศ

### สหรัฐอเมริกา

15. เครื่องอบแห้งแบบถาด (Tray dryer) บริษัท อีเคฟู้ดเทค จำกัด ประเทศไทย
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath) รุ่น CB22-20-SB-D ประเทศ

### เดนมาร์ก

17. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (Tray dryer) ประเทศไทย
18. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) Shel lab รุ่น 1350 FX ประเทศสหรัฐอเมริกา
19. ด้วยเครื่องกวนสารละลาย (Overhead stirrer) รุ่น D-79219 ประเทศเยอรมนี
20. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) Memmert รุ่น Model 600 ประเทศเยอรมนี
21. เตาเผาไฟฟ้า (Hot plate) รุ่น EC46 ประเทศอังกฤษ
22. Shaker รุ่น Innova ประเทศสหรัฐอเมริกา

23. Autoclave รุ่น H-99LL ประเทศญี่ปุ่น
24. อุปกรณ์ในการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส เช่น ถ้วยชิม แก้วน้ำ ช้อน
25. อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น กระจกตวง ปีกเกอร์ ขวดปรับปริมาตร
26. อุปกรณ์เครื่องครัว เช่น อ่างสแตนเลส ถาด

## วิธีดำเนินการทดลอง

### ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

นำเท้าไก่มาเตรียมเป็นวัตถุดิบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Abedinia, Ariffin, Huda and Nafchi (2017) โดยนำเท้าไก่มาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบขั้นต้น การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน การทำให้ฟองด้วยสารละลายกรด และการสกัดอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ของคอลลาเจน (เจลาติน)

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบขั้นต้น

นำเท้าไก่มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปาแล้วนำมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบดเนื้อสัตว์ที่มีขนาดของรูหน้าแปลน 5 มิลลิเมตร ก่อนนำของแข็งที่ได้มาแช่น้ำเพื่อกำจัดเลือดในอัตราส่วน 1:6 w/v ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วนำของแข็งมาบิบน้ำออกก่อนนำมาแช่ด้วยสารละลายเอทานอลเพื่อกำจัดไขมันในอัตราส่วน 1:10 w/v ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง โดยตลอดกระบวนการของขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบมีการกวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนสารละลาย

#### 2. ขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายต่าง

นำของแข็งที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบขั้นต้นมาแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:6 w/v ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำของแข็งที่ได้มาล้างน้ำจนสารละลายต่างหมดหรือมี pH เป็นกลางจะได้เป็นคอลลาเจน

#### 3. ขั้นตอนการทำให้ฟองด้วยสารละลายกรด

นำคอลลาเจนที่ได้จากขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนด้วยสารละลายต่างมาแช่สารละลายกรดอะซิติกเพื่อทำให้คอลลาเจนเกิดการพองตัว (Swelling) ที่ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:6 w/v ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วล้างคอลลาเจนด้วยน้ำจนสารละลายกรดหมดหรือมี pH เป็นกลาง

#### 4. ขั้นตอนการสกัดอนุพันธ์ที่ละลายน้ำได้ของคอลลาเจน (เจลาติน)

นำคอลลาเจนที่ได้จากขั้นตอนการทำให้พังด้วยสารละลายกรดมาผลิตเป็นเจลาติน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Mokhtar et al. (2017) ด้วยการนำคอลลาเจนมาแช่น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2 w/v ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ในระบบสุญญากาศ (Abedinia et al., 2017) เก็บสารละลายส่วนใสหรือเจลาตินในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน (Polyethylene, PE) แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาวิเคราะห์คุณภาพ

#### การวิเคราะห์คุณภาพ

1. ปริมาณผลได้ (%Yield) (Liu et al., 2001) แสดงดังภาคผนวก ข-1
2. องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจากเท้าไก่
  - 2.1. ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-1
  - 2.2. ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-2
  - 2.3. ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-3
  - 2.4. ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000) แสดงดังภาคผนวก ก-4
3. ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Garbowska, Radzaminska, & Jakubowska, 2013) แสดงดังภาคผนวก ก-5

### 3.1 ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเต้าไก่

ขั้นตอนการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์จากเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ เปปซิน ทริปซิน ปาเปน และอัลคาเลส แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน ได้แก่ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

#### 3.1.1 วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

วิธีการวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ก-7 โดยนำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ โดยตัดแปลงจาก วันชัย เกียรติพิมล (2545) เริ่มจากการนำเคซีนที่ความเข้มข้น 1% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร ที่ผ่านการเจือจางอย่างเหมาะสมในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และนำมาบ่ม (ซึ่งมี pH และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดดังตารางที่ 3-1) เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นยุติปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยบัฟเฟอร์ (Stop buffer) 2 มิลลิลิตร ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร โดยเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (ภาคผนวก ก-7) ก่อนนำมาคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ดังสมการ 3-1

กิจกรรมของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)

$$= \frac{\text{มิลลิกรัมไทโรซีน} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลไทโรซีน (กรัมต่อโมล)} \times \text{เวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}} \quad (3-1)$$

#### 3.1.2 วิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์

นำเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดมาหาประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสที่เหมาะสมกับเต้าไก่ โดยตัดแปลงจากวิธีของ Ghassem et al., (2014) นำเจลาตินจากเต้าไก่ที่สกัดได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบมาแปรความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน (0-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ (ในปริมาณที่ทำให้กราฟระหว่างข้อสเตรตกับความเร็วมเริ่มต้นของปฏิกิริยาเกิดความอิมตัวจนสามารถหาค่า  $K_m$  และ  $V_{max}$  ได้ โดยเจือจางด้วยบัฟเฟอร์ด้วย pH ที่เหมาะสมกับชนิดของเอนไซม์) ผสมให้เข้ากันและบ่มทันทีด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสมกับชนิดของ

เอนไซม์ (ตารางที่ 3-1) เป็นระยะเวลา 15 นาที ก่อนนำมายุติปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์คุณภาพ

ตารางที่ 3-1 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด

ชนิดของเอนไซม์	pH	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
เปปซิน	2.0	37
ทริปซิน	8.0	37
อัลคาเลส	8.0	50
ปาเปน	6.0	65

### การวิเคราะห์คุณภาพ

#### 1. ค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ของเอนไซม์

นำสมการ Michaelis-Menten มาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์ผลกระทบของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท่าที่ไปด้วยค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด (Maximum velocity,  $V_{max}$ ) และค่าคงที่ของ  $K_m$  (Michaelis-Menten constant) โดยดัดแปลงจาก Ghassem et al. (2014) โดยสุ่มตัวอย่างส่วนใส 125 ไมโครลิตร มาวิเคราะห์ค่า  $\alpha$ -amino ดังภาคผนวก ก-8 เพื่อนำข้อมูลจากการทดลองคำนวณหาค่า  $V_{max}$  และ  $K_m$  โดยนำข้อมูลมาสร้างกราฟ Lineweaver-Burk ระหว่าง  $v$  กับ  $[S]$

2. ปริมาณระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH) (Benjakul & Morrissey, 1997) แสดงดังภาคผนวก ก-8

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพที่วัดได้ โดยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab<sup>®</sup> 18

#### เกณฑ์ในการคัดเลือก

เลือกชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสที่มีค่า  $V_{max}$  มากที่สุด และค่า  $K_m$  น้อยที่สุด



### 3.2 ศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากทำไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

การผลิตเจลาตินไฮโดรไลสเกิดจากการใช้วัตถุดิบ (ทำไก่) เช่นเดียวกับการผลิตเจลาติน โดยนำทำไก่มาเตรียมขั้นต้นด้วยการแช่ในสารละลายต่างเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ใช่คอลลาเจน แล้วนำมาสกัดเป็นคอลลาเจนด้วยสารละลายกรดซึ่งคอลลาเจนที่ได้จะเกิดจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนเพื่อผลิตเป็นเจลาติน เมื่อนำเจลาตินมาย่อยด้วยเอนไซม์จะได้เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เรียกว่า “เจลาตินไฮโดรไลส”

จากรายงานของการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสหรือคอลลาเจนไฮโดรไลสหรือเจลาตินไฮโดรไลสหรือเปปไทด์ที่มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากผลพลอยได้ต่าง ๆ (ตารางที่ 2-6) พบว่าหนึ่งปีดใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณ 0.02% เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง (Lee et al., 2012) ผลพลอยได้จากเป็ด (กระดูก หัว เท้า และอวัยวะภายใน) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณ 2% เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง (Lee et al., 2010) กระดูกปลาและไก่ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณ 1% เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง (Centenaro et al., 2011) ตับหมูใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณ 1% เป็นระยะเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง (Verma et al., 2017) กระดูกอ่อนของปลาฉลามหัวค้อนหยัก (*Sphyrna lewini*) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในปริมาณ 2.5% เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง (Li et al., 2017) แสดงให้เห็นว่าการย่อยโปรตีนดังกล่าวมีช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยที่แตกต่างกันตามชนิดสัตว์ที่ใช้ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาปริมาณเอนไซม์ (เปปซิน 0.02 - 5% w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยคอลลาเจนไฮโดรไลส (2 - 8 ชั่วโมง) ต่อคุณภาพของเจลาตินไฮโดรไลส โดยมีปัจจัยที่ศึกษา คือ

ปัจจัยที่ 1 ( $X_1$ ) ปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount) 0.02-5% (w/w)

ปัจจัยที่ 2 ( $X_2$ ) ระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time) 2 - 8 ชั่วโมง

จัดสิ่งทดลองแบบ Central composite design (CCD) แบบพหุนกำลังสองมาตรฐาน ศึกษา ปัจจัยละ 5 ระดับ (ค่ารหัส -1.414, -1, 0, 1, 1.414) โดยมีการทำซ้ำที่จุดกึ่งกลาง (ค่ารหัส 0) 3 ซ้ำ ให้ สามารถจัดสิ่งทดลองได้ทั้งหมด 11 สิ่งทดลอง แสดงค่ารหัสและค่าจริงดังตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 สิ่งทดลองในการวางแผนการทดลองแบบ CCD หาภาวะที่เหมาะสมของปริมาณ เอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากทำไ้ต่อ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

สิ่งทดลอง	ค่ารหัส		ค่าจริง	
	X <sub>1</sub> : ปริมาณ เอนไซม์ (%w/w)	X <sub>2</sub> : ระยะเวลาใน การย่อย (ชั่วโมง)	X <sub>1</sub> : ปริมาณ เอนไซม์ (%W/W)	X <sub>2</sub> : ระยะเวลาใน การย่อย (ชั่วโมง)
1	-1	-1	0.75	3.30
2	-1	1	0.75	7.00
3	1	-1	0.43	3.30
4	1	1	0.43	7.00
5	-1.414	0	0.02	5.00
6	1.414	0	5.00	5.00
7	0	-1.414	1.76	2.00
8	0	1.414	1.76	8.00
9	0	0	1.76	5.00
10	0	0	1.76	5.00
11	0	0	1.76	5.00

การผลิตเจลาตินไฮโดรไลสตัดแปลงจากวิธีของ Lee et al. (2012) โดยนำเจลาตินที่ได้มาช่วยด้วยเอนไซม์ที่คัดเลือกได้จากข้อที่ 3.1 โดยเริ่มปฏิบัติการย่อยเจลาตินจากการนำเจลาติน (14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาเติมเอนไซม์ในอัตราส่วน 0.02-5% w/w ดังตารางที่ 3-2 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำมาบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิทันทีเป็นระยะเวลา 2 - 8 ชั่วโมง จากนั้นนำมายุติปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ทันที

และทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000g เป็นระยะเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (เจลาตินไฮโดรไลเสต) มาวิเคราะห์คุณภาพ

#### การวิเคราะห์คุณภาพ

1. ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method) (Lowry, Rosebrough, Farr, & Randall, 1951) แสดงดังภาคผนวก ก-6
2. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (Yarnpakdee et al., 2015) โดยวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบ Lecithin liposome แสดงดังภาคผนวก ก-9
3. ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Protein hydrophobicity) (Chelh, Gatellier, & Santé-Lhoutellier, 2006) แสดงดังภาคผนวก ก-11
4. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS คัดแปลงจาก (Vate & Benjakul, 2013) แสดงดังภาคผนวก ก-12
5. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH คัดแปลงจาก (Vate & Benjakul, 2013) แสดงดังภาคผนวก ก-13
6. ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Vate & Benjakul, 2013) แสดงดังภาคผนวก ก-14
7. องค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid profile) โดยเครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC) (AOAC Official method 994.12, 2012) วิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการชีวเคมีและจุลชีววิทยา สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ดังภาคผนวก ก-15 โดยวิเคราะห์เจลาตินไฮโดรไลเสตจากเต้าไก่อที่ได้รับการคัดเลือกสำหรับไปประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่



183963776

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุ (Multiple regression) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามทีวิเคราะห์ (Y) และตัวแปรที่ศึกษา (X) โดยมีความสัมพันธ์ดังนี้

$$Y_{1-6} = f(X_1, X_2)$$

เมื่อ  $Y_{1-6}$  คือ ตัวแปรตามทีวิเคราะห์ ได้แก่

$Y_1$  คือ ปริมาณโปรตีน

$Y_2$  คือ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี

TBARS

$Y_3$  คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ

$Y_4$  คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

$Y_5$  คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH

$Y_6$  คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP

และ  $X_{1-2}$  คือ ตัวแปรต้นทีศึกษา ได้แก่

$X_1$  คือ ปริมาณเอนไซม์

$X_2$  คือ ระยะเวลาในการย่อย

วิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab® 18 ทำให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของค่าคุณภาพหรือค่าตอบสนองต่าง ๆ ( $Y_1$ - $Y_6$ ) ที่แสดงในแต่ละสมการซึ่งแบ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linear effect) ความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (Quadratic effect) และอิทธิพลระหว่างปัจจัย (Interaction effect) ซึ่งมีรูปแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือเทอมกำลังหนึ่ง ( $X_1, X_2$ ) ความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง หรือเทอมกำลังสอง ( $X_1^2, X_2^2$ ) และอิทธิพลระหว่างปัจจัยหรือเทอมที่มีอิทธิพลร่วมกัน ( $X_1X_2$ ) โดยพิจารณาความน่าเชื่อถือของสมการจาก  $R^2$  (Coefficient of Determination) ซึ่งเป็นค่าที่บ่งบอกถึงสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ ถ้ามีค่าเข้าใกล้ 1 แสดงว่า สมการมีความเหมาะสม ค่า Model significance ซึ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Y และค่า X ถ้ามีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงถึงค่า Y และ X มีความสัมพันธ์กันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 (Hema et al., 2017)

การทวนสอบความแม่นยำของสมการที่ทำนายได้ โดยดำเนินการทดลองซ้ำเพื่อให้ได้ค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง และแทนค่าตัวแปรที่ศึกษา ( $X_{1-2}$ ) ในสมการทีวิเคราะห์ได้และมีความน่าเชื่อถือเพื่อให้ได้ค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย จากนั้นนำค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายมาคำนวณค่า %Error เพื่อบ่งบอกถึงความคลาดเคลื่อนของการทำนายจากการใช้สมการ 3-2 (Mohammad, Kumar, & Basha, 2015) ถ้า %Error มีค่าต่ำ

แสดงว่าค่าที่ได้จากการทำนายมีความคลาดเคลื่อนจากค่าจริงน้อย ซึ่งมีรูปแบบสมการที่ดี (Bumrungsart & Duangmal, 2019)

$$\%Error = ((A - B)/A) \times 100 \quad (3-2)$$

กำหนดให้ A คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง

B คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย

นำสมการที่น่าเชื่อถือและผ่านการทวนสอบมาสร้างกราฟพื้นผิวการตอบสนอง (Response surface methodology, RSM) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Minitab<sup>®</sup> 18 เพื่อพิจารณาแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตาม (Y) และตัวแปรที่ศึกษา (X) เป็นการอธิบายผลของปริมาณเอนไซม์ที่ใช้และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเต้าไก่ที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันมากที่สุด โดยการใช้เทคนิคการซ้อนทับกราฟ (Super imposed technique)

ถ้าหากการทวนสอบความแม่นยำของสมการไม่มีความน่าเชื่อถือให้พิจารณาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสจากเต้าไก่ที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมัน โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) วางแผนการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพที่วัดได้ด้วยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab<sup>®</sup> 18

#### เกณฑ์ในการคัดเลือก

เลือกเจลาตินไฮโดรไลสจากเต้าไก่ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่

### 3.3 ศึกษาผลของปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่

นำเจลาตินไฮโดรไลสที่คัดเลือกได้มาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่โดยดัดแปลงจากวิธีของ Jo, Lee and Jung (2018) และ สายใจ จริยาเอกภาส (2553) โดยนำเนื้ออกไก่ไม่มีหนังมาบดด้วยเครื่องบดเนื้อสัตว์ที่มีขนาดของรูหน้าแปลน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปแช่แข็งเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนนำส่วนผสมต่าง ๆ (ตารางที่ 3-3) ได้แก่ เนื้ออกไก่บดมาผสมกับน้ำแข็ง โซเดียมคลอไรด์ และ สารละลายเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ (ในปริมาณ 1%, 3% และ 5%) รวมถึงเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตเป็นตัวอย่างควบคุมเชิงบวกที่ใช้แทนเจลาตินไฮโดรไลสทำให้ได้สิ่งทดลอง 5 สิ่งทดลอง กล่าวคือ

ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส (Sausage fortified gelatin hydrolysate 0%, SGH 0%)

ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 1% (Sausage fortified gelatin hydrolysate 1%, SGH 1%)

ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 3% (Sausage fortified gelatin hydrolysate 3%, SGH 3%)

ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 5% (Sausage fortified gelatin hydrolysate 5%, SGH 5%)

และไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% (Sausage adds tetrasodium pyrophosphate 0.3%, SSP 0.3%)

นำส่วนผสมทั้งหมดในแต่ละสิ่งทดลองดังตารางที่ 3-3 ใส่ลงในเครื่องสับผสมอาหาร จากนั้นสับผสมให้เข้ากันเป็นระยะเวลา 3 นาที โดยส่วนผสมที่เป็นเนื้อเดียวกันทั้ง 5 สิ่งทดลอง ถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้ทั้ง 5 สิ่งทดลอง มาอัดไส้โดยใช้ไส้คอลลาเจนแล้วมัดด้วยด้ายก่อนนำไปอบในตู้อบลมร้อนแบบถาดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะ 35 นาที แล้วนำไส้กรอกที่ได้ไปต้มที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลาระยะ 3 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 5 นาที ก่อนนำไส้กรอกที่แห้งแล้วใส่ถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีนเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณภาพไส้กรอกจะถูกนำไปนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 นาที ยกเว้นการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์

ตารางที่ 3-3 ส่วนผสมสำหรับการผลิตไส้กรอกไก่ในแต่ละสิ่งทดลอง

ส่วนผสม (กรัม)	สิ่งทดลอง				
	SGH 0%	SGH 1%	SGH 3%	SGH 5%	SSP 0.3%
เนื้ออกไก่บด	100	100	100	100	100
โซเดียมคลอไรด์	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
น้ำแข็ง	20	20	20	20	20
สารละลายเจลาตินไฮโดรไลเสต	-	1	3	5	-
เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต	-	-	-	-	0.3

SGH 0% คือ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต SGH 1% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% (0.03 %โปรตีน) SGH 3% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% (0.09 %โปรตีน) SGH 5% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (0.15 %โปรตีน) และ SSP 0.3% คือ ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3%

### การวิเคราะห์คุณภาพ

#### 1. ลักษณะทางกายภาพของไส้กรอกไก่

1.1 ค่าสี โดยใช้เครื่องวัดสี รายงานผลเป็นค่าสี  $L^* a^* b^*$  (Zakaria & Sarbon, 2018)

แสดงดังภาคผนวก ข-2

1.2 การวัดปริมาณน้ำอิสระ ( $a_w$ ) ด้วยเครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระที่ 25 องศาเซลเซียส

(Herranz, Hoz, Hierro, Fernandez, & Ordonez, 2005)

1.3 ลักษณะเนื้อสัมผัส ได้แก่ ค่าความแข็ง (Hardness) ค่าการเกาะติดของอาหาร

(Adhesiveness) ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) ค่าการยึดเกาะกันของอาหาร (Cohesiveness) ค่า

พลังงานในการกัด (Gumminess) และค่าพลังงานในการเคี้ยว (Chewiness) ด้วยเครื่อง Texture

Analyzer (TA-XT2) ตัวอย่างไส้กรอกจะถูกตัดเป็นทรงกระบอก (เส้นผ่าศูนย์กลางสูง 1 เซนติเมตร

x สูง 1.5 เซนติเมตร) ใช้หัววัด P/50 คัดแปลงจากวิธีของ Jo et al. (2018) แสดงดังภาคผนวก ข-3

2. การออกซิเดชันของไขมัน (Lipid peroxidation) ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substances

(TBARS) (Jayasingh & Cornforth, 2004) ตรวจวัดเป็นระยะเวลา 0-14 วัน แสดงดังภาคผนวก ก-

10

3. การต้านจุลินทรีย์ ตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count) (Intarasirisawat et al.,

2014) แสดงดังภาคผนวก ง-1

#### 4. การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ความชอบทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale โดย 1 คะแนน คือ ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 คะแนน คือ ชอบมากที่สุด ใช้ผู้ทดสอบเป็นผู้บริโภคทั่วไป จำนวน 30 คน ประเมินความชอบด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม (สายใจ จิรียาเอก ภาส, 2553) แบบประเมินแสดงดังภาคผนวก ก-1

#### การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (ANOVA) โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD สำหรับผลวิเคราะห์คุณภาพทุกด้าน ยกเว้นการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส วางแผนการทดลองแบบ RCBD และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของคุณภาพที่วัดได้ โดยวิธี Tukey's Multiple Comparison test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab®

18



183963776



## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

จากผลการวิเคราะห์ห้องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่และอนุพันธ์ของคอลลาเจนที่ละลายน้ำได้ (เจลาติน) จากเท้าไก่ (ในรูปของของเหลว) (ตารางที่ 4-1 และภาพที่ 4-1) พบว่า เมื่อนำเท้าไก่มาผ่านกระบวนการสกัดเป็นเจลาตินมีผลทำให้เจลาตินมีปริมาณความชื้น โปรตีนและไฮดรอกซีโพรลีนมากกว่าเท้าไก่ ในขณะที่มีปริมาณไขมันและเถ้าน้อยกว่าเท้าไก่เช่นเดียวกับรายงานของ Widyasari and Rawdkuen (2014) ที่ศึกษาการสกัดและลักษณะของเจลาตินจากเท้าไก่ พบว่าเมื่อนำเท้าไก่มาสกัดเป็นเจลาตินจะมีปริมาณโปรตีนของเจลาติน (90.06%) เพิ่มมากขึ้นจากเท้าไก่ (18.69%) ในขณะที่มีปริมาณไขมันของเจลาติน (1.67%) ลดลงจากเท้าไก่ (2.19%) ทั้งนี้ปริมาณความชื้นและเถ้าขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ผ่านกระบวนการที่แตกต่างกัน (เช่น การอบแห้ง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และอื่น ๆ) รวมถึงวิธีที่ใช้ในการสกัดเจลาติน (Widyasari & Rawdkuen, 2015) โดยปริมาณเถ้าในผงเจลาตินไม่ควรเกิน 2% ซึ่งปริมาณเถ้าและไขมัน (%) ดำเนินตัวบ่งชี้ถึงกระบวนการสกัดเจลาตินที่มีประสิทธิภาพ (Widyasari & Rawdkuen, 2014) ส่วนปริมาณคอลลาเจนวัดได้จากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน เนื่องจากคอลลาเจนเป็น โปรตีนชนิดเดียวที่อุดมไปด้วยไฮดรอกซีโพรลีนและไม่พบใน โปรตีนชนิดอื่น ดังนั้นไฮดรอกซีโพรลีนจึงมักเป็นตัวบ่งชี้ปริมาณของคอลลาเจน (ปิยะพร เนียมมณี, 2559) จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเท้าไก่ (9.64%) ที่วิเคราะห์ได้น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ Vittayanont (2007) (16.3%) แต่มากกว่ารายงานของ Liu et al. (2001) (9.07%) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสายพันธุ์และอาหารของไก่ อีกทั้งปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินที่สกัดได้ (27.03%) มีปริมาณน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณคอลลาเจนจากรายงานของ Almeida, Silva, Lannes, Farias and Santana (2013) (62.03 กรัมต่อ 100 กรัม) อาจเป็นผลมาจากวัตถุดิบเริ่มต้นที่มีปริมาณคอลลาเจนไม่มากนักรวมถึงกระบวนการสกัด ซึ่งกระบวนการทำให้พองในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดอะซิติกจะทำให้เส้นใยโปรตีนของเท้าไก่เกิดการพองตัว โดยกรดจะไปทำลายพันธะนอน โควาเลนซ์ ทำให้โปรตีนคลายตัวออกซึ่งเป็นการเตรียมวัตถุดิบให้พร้อมต่อการสกัดคอลลาเจนให้เป็นเจลาติน จากนั้นเมื่อนำเจลาตินมาสกัดด้วยความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่จะเกิดจากการทำลายพันธะนอน โควาเลนซ์ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลรวมถึงพันธะเปปไทด์อีกเล็กน้อยทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลงไปเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง (Sarbon et al.,



183963776

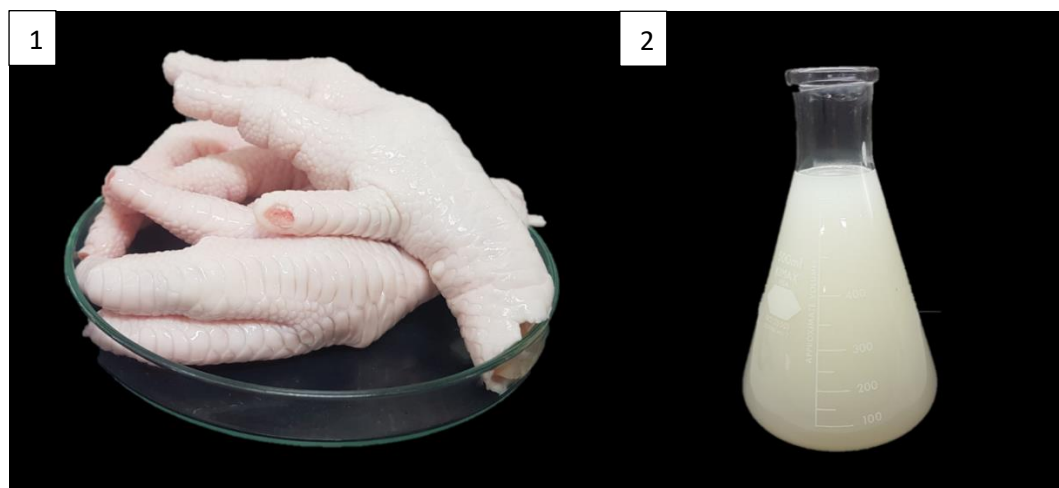
BUU-IThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

2015; สีนินาถ สุขไกว, 2555) สีนินาถ สุขไกว (2555) รายงานว่าการใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดคอลลาเจนจะถูกย่อยเป็นเจลาตินและละลายออกมาในสารสกัดได้มากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ และระยะเวลาที่สั้นกว่า ดังนั้นอุณหภูมิและระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดคอลลาเจนให้เป็นเจลาตินจึงมีผลต่อปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาติน

ตารางที่ 4-1 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่และเจลาตินจากเท้าไก่

องค์ประกอบ	เท้าไก่	เจลาติน
ปริมาณผลได้ (%)	-	136.23 ± 1.95
ความชื้น (%)	60.64 ± 1.75	96.53 ± 0.30
โปรตีน* (% ฐานแห้ง)	38.73 ± 1.95	84.42 ± 4.92
ไขมัน (% ฐานแห้ง)	7.31 ± 2.05	0.72 ± 0.13
เถ้า (% ฐานแห้ง)	5.43 ± 1.47	0.52 ± 0.16
ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (% ฐานแห้ง)	9.64 ± 0.30	27.03 ± 0.50

\* ค่าโปรตีนแฟลคเตอร์เท่ากับ 5.4 (Melanie et al., 2015)



ภาพที่ 4-1 เท้าไก่ (1) และเจลาตินที่ผ่านกระบวนการสกัดจากเท้าไก่ (2)

#### 4.1 ผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสเสตจากเท้าไก่

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ทริปซิน เปปซิน อัลคาเลส และ ปาเปน (ตารางที่ 4-2) จากการเตรียมสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยากับเคซีนที่มีความเข้มข้น 1% ทำให้ทราบถึงกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีนจึงกล่าวได้ว่ากิจกรรมของเอนไซม์ 1 ยูนิต (Units) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยซัสเตรตได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครโมล ในระยะเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พบว่า ทริปซินและปาเปนมีกิจกรรมของเอนไซม์น้อยกว่าเปปซินและอัลคาเลสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ในขณะที่เวกกันอัลคาเลสและเปปซินมีกิจกรรมของเอนไซม์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) แต่ทริปซินและปาเปนแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางที่ 4-2 กิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด

ชนิดของเอนไซม์	กิจกรรมของเอนไซม์* (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)
ทริปซิน	1.83±0.03 <sup>c</sup>
เปปซิน	14.03±0.71 <sup>b</sup>
อัลคาเลส	21.07±0.05 <sup>a</sup>
ปาเปน	1.78±0.09 <sup>c</sup>

\*กิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายเอนไซม์เข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวดิ่ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

เมื่อทราบถึงกิจกรรมของเอนไซม์ในสารละลายเอนไซม์ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เตรียมแล้วจึงกำหนดให้กิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดเท่ากันเพื่อเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการย่อยเจลาตินจากเท้าไก่ที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์เป็นหนึ่งในปัจจัยที่นำไปสู่การวิเคราะห์ค่าความเร็วเริ่มต้น (นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559) ของจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ ซึ่งข้อมูลจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์มีประโยชน์ในการระบุความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน (นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559; ปราณี อานเป็รื่อง, 2558)

จากการวิเคราะห์จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ ทริปซิน เปปซิน อัลคาเลสและปาเปน ซึ่งทดสอบด้วยวิธี Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ซึ่งเป็นการวัดการทำปฏิกิริยาของสาร TNBS กับหมู่อะมิโนจากการย่อยยับสเตรต (เจลาติน) ที่ความเข้มข้น 0 - 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.001 ยูนิต โดยใช้ L-Leucine ที่ความเข้มข้น 0 - 15 มิลลิโมลาร์ต่อมิลลิลิตร เป็นสารมาตรฐานในการเทียบความเข้มข้นของกรดอะมิโนที่ผลิตได้ โดยสาร TNBS จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมิโนอิสระที่เป็นทั้งหมู่  $\alpha$ -amino และ  $\epsilon$ -amino ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสายโพลีเปปไทด์ของโปรตีนถูกตัดเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ หรือกรดอะมิโนอิสระมากขึ้น จึงมีปริมาณหมู่เอมิโนที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ TNBS มากขึ้น (ศุภรจิตต์ เอี่ยมนเรพร, 2551) มีผลทำให้ทราบความเร็วเริ่มต้น (V) จากการทำปฏิกิริยาในการย่อยยับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์หรือหมู่เอมิโน จึงพบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีความสามารถในการย่อยยับสเตรตที่แตกต่างกันเห็นได้จากค่า  $V_{max}$ ,  $K_m$ ,  $K_{cat}$  และ  $K_{cat}/K_m$  (ตารางที่ 4-3)

เมื่อนำค่า  $K_m$  หรือค่าคงที่ในการจับตัวกันระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต ซึ่งถ้าค่า  $K_m$  ต่ำ หมายถึงเอนไซม์มีความต้องการความเข้มข้นของซับสเตรตต่ำเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะกับซับสเตรตในการทำปฏิกิริยา จากตารางที่ 4-3 พบว่าทริปซินมีค่า  $K_m$  ต่ำกว่าอัลคาเลสและปาเปนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ทริปซินมีค่า  $K_m$  ต่ำกว่าเปปซินอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่าทริปซินและเปปซินมีความต้องการความเข้มข้นของซับสเตรตในการจับตัวกันน้อยกว่าอัลคาเลสและปาเปน เนื่องจากทริปซินและเปปซินสามารถยึดจับตัวกันได้กับซับสเตรตเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และซับสเตรต (ES) หรือ ES แยกตัวได้น้อย ( $k_1 > k_{-1}$ ) (ดังสมการ 2-6) เนื่องจากความเร็วของปฏิกิริยาทั้งหมดขึ้นกับปริมาณ [ES] จึงอธิบายได้ว่าเอนไซม์ทั้งหมดของทริปซินและเปปซินซึ่งอยู่ในรูปของ ES มีความเร็วของปฏิกิริยาสูง ( $K_m$  จะต่ำ) กว่าเอนไซม์อัลคาเลสและปาเปน (Ghassem et al., 2014; นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559; ปราณี อ่านเปรื่อง, 2558)

จากตารางที่ 4-3 ค่า  $K_{cat}$  เป็นอีกตัวชี้วัดหนึ่งที่สนับสนุนค่า  $K_m$  เนื่องจากค่า  $K_{cat}$  เป็นค่าคงที่ของความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาสำหรับเปลี่ยนจำนวน โมเลกุลของซับสเตรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ในระยะเวลา 1 วินาที ต่อเอนไซม์ 1 โมล (Catalytic constant) พบว่าทริปซินมีค่า  $K_{cat}$  ต่ำกว่าอัลคาเลสและปาเปนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่เปปซินมีค่า  $K_{cat}$  ต่ำกว่าค่าอัลคาเลสอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยค่า  $K_{cat}$  ต่ำบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของทริปซินและปาเปนที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาโมเลกุลของซับสเตรตให้เป็นผลิตภัณฑ์ (ดังสมการ 2-1) ได้ไม่ดีเท่ากับอัลคาเลสและเปปซิน ดังนั้นอัลคาเลสและเปปซินจึงมีความสามารถในการเร่ง

ปฏิกิริยาได้ดีกว่าทริปซินและปาเปน (Eisenthal, Danson, & Hough, 2007; นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559; สามารถ สายอุต, 2561)

ส่วนค่า  $K_{cat}/K_m$  เป็นค่าประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาหรือค่าคงที่ความจำเพาะเจาะจง (Specificity constant) ของเอนไซม์ พบว่าทริปซินมีค่า  $K_{cat}/K_m$  สูงกว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาหรือความเสถียรของการจับตัวกันระหว่างทริปซินกับซับสเตรตที่ดีกว่าเอนไซม์อีก 3 ชนิด (Eisenthal et al., 2007; นพพล เล็กสวัสดิ์, 2559; สามารถ สายอุต, 2561)

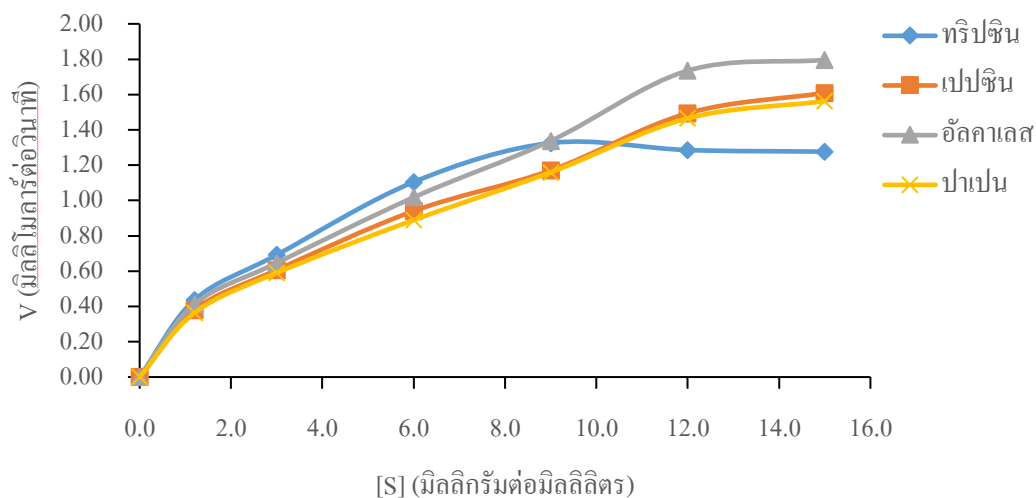
เมื่อพิจารณาถึงราคาของเอนไซม์ที่เป็นต้นทุนการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสต พบว่าเปปซินมีราคาที่ถูกกว่าอัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน และเมื่อนำราคามาพิจารณาร่วมกับค่า  $V_{max}$ ,  $K_m$  และ  $K_{cat}$  ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด เปปซินจึงเป็นเอนไซม์เหมาะสำหรับนำไปศึกษาประสิทธิภาพในด้านความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

ตารางที่ 4-3 จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเจลาตินจากเท้าไก่ตามสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด

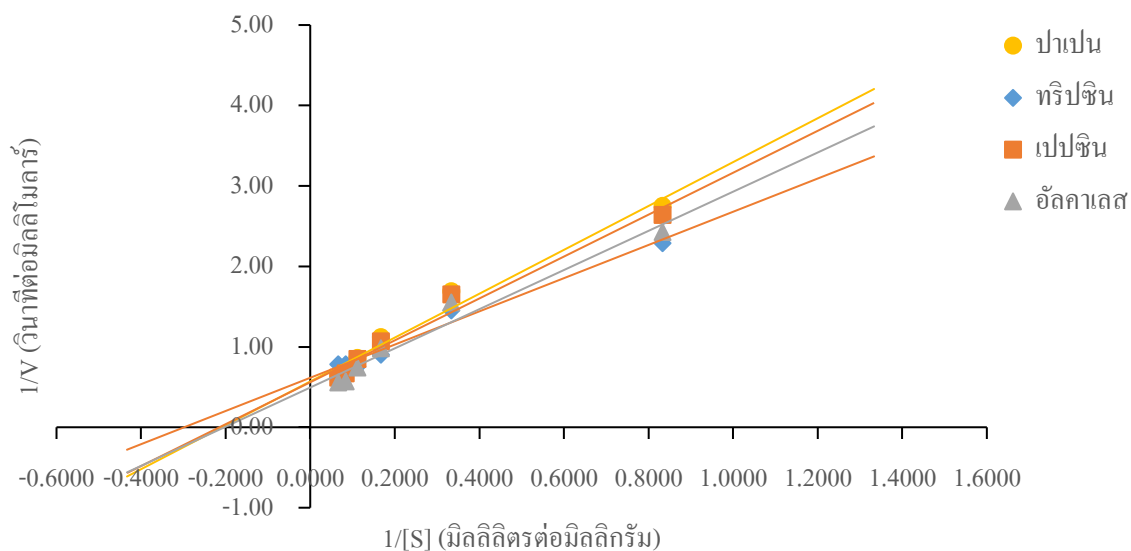
เอนไซม์	$V_{max}$ (มิลลิโมลาร์ ต่อวินาที)	$K_m$ (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร)	$K_{cat}^*$ (วินาที <sup>-1</sup> )	$K_{cat}/K_m$ (มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร·วินาที)	ราคา (บาท/มิลลิกรัม หรือมิลลิลิตร)
ทริปซิน	1.63 <sup>b</sup>	3.38 <sup>b</sup>	$1.63 \times 10^{3b}$	$4.85 \times 10^{2a}$	17.36
เปปซิน	1.79 <sup>ab</sup>	4.67 <sup>ab</sup>	$1.79 \times 10^{3ab}$	$3.87 \times 10^{2b}$	0.12
อัลคาเลส	2.03 <sup>a</sup>	4.96 <sup>a</sup>	$2.03 \times 10^{3a}$	$4.12 \times 10^{2ab}$	10
ปาเปน	1.76 <sup>b</sup>	4.79 <sup>a</sup>	$1.76 \times 10^{3b}$	$3.67 \times 10^{2b}$	10

\*ค่า  $K_{cat} = V_{max}/[E]_{total}$

a,b,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

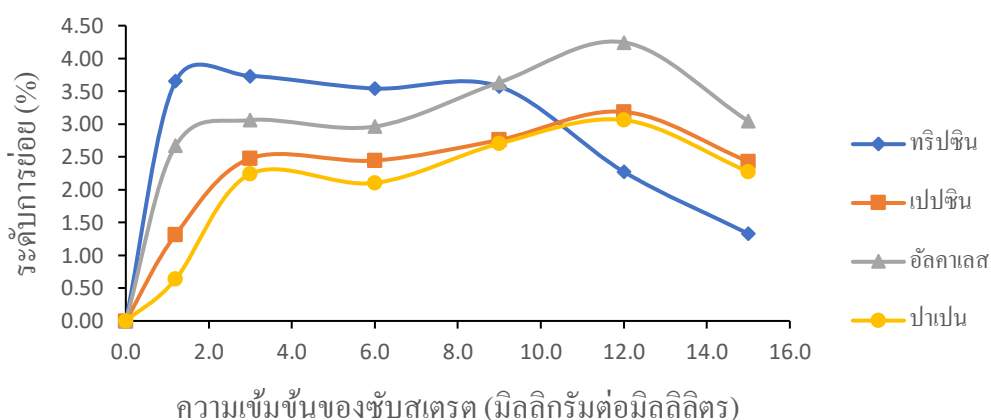


ภาพที่ 4-2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซับสเตรต (เจลาติน) [S] กับความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (V) แต่ละชนิด



ภาพที่ 4-3 กราฟไลน์วีเวอร์-เบอร์ก (Lineweaver-Burk plot) ของปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิดในการย่อยเจลาตินจากเท้าไก่

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซัสเตรต (เจลาตินจากเท้าไก่ที่ความเข้มข้น 0 - 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) กับระดับการย่อยของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด (ภาพที่ 4-4 และภาคผนวก จ-1) พบว่าซัสเตรตในช่วง 1-9 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทริปซินมีระดับการย่อยมากที่สุด (3.57%) ซึ่งสอดคล้องกับภาพที่ 4-2 ที่บ่งชี้ความสามารถของทริปซินในการย่อยซัสเตรตสูงกว่าเอนไซม์อีก 3 ชนิด อีกทั้งค่า Km ยังแสดงให้เห็นถึงความเร็วในการเกิดของปฏิกิริยาที่น้อยกว่าและประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของทริปซินที่มีความจำเพาะต่อซัสเตรตที่มากกว่าเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด แต่เมื่อมีการเพิ่มความเข้มข้นซัสเตรตจนถึงจุดอิ่มตัว (9-15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ที่ทำให้ทริปซินสามารถยึดจับตัวกันได้ดีกับซัสเตรต หรือ ES แยกตัวได้น้อยมีผลให้ระดับการย่อยจะไม่เพิ่มขึ้นอีก ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์อีก 3 ชนิดเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันแต่จะสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนในช่วงความเข้มข้น 12 - 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การเพิ่มขึ้นและลดลงของระดับการย่อยนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกับการงานวิจัยของ Butré, Sforza, Gruppen and Wierenga (2014) และ Deng, Butré and Wierenga (2018) โดยการเพิ่มขึ้นและลดลงของระดับการย่อยอาจเป็นผลกระทบจากความเข้มข้นของซัสเตรตที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการลดลงของระดับการย่อยอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากการเพิ่มความเข้มข้นของซัสเตรตในขณะที่เอนไซม์มีปริมาณเท่าเดิมจึงเป็นผลให้ซัสเตรตเกิดการรวมตัวกันและไม่สามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ ทั้งนี้ความแตกต่างระหว่างระดับการย่อยอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของซัสเตรต เอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ (Noman et al., 2018)



ภาพที่ 4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของซัสเตรต (เจลาตินจากเท้าไก่) กับระดับการย่อย (%) ของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด

## 4.2 ผลของปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจาก เท้าไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ออกแบบการทดลองแบบ Central composite design (CCD)

จากผลการศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ในข้อ 4.1 จึงนำเปปซินมาใช้ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ซึ่งจากการรายงานของการศึกษาโปรตีนที่ย่อยด้วยเปปซินรวมถึงเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ นั้นมีปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กับซับสเตรตที่แตกต่างกัน อีกทั้งสถานะที่ใช้ในการย่อยยังส่งผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ดังนั้นในขั้นตอนนี้จึงเป็นการศึกษาปริมาณเอนไซม์ (เปปซิน 0.02 - 5% w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลส (2 - 8 ชั่วโมง)

จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ ( $X_1$ ) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย ( $X_2$ ) เจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ที่มีผลต่อปริมาณโปรตีน ( $Y_1$ ) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ( $Y_2$ ) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ ( $Y_3$ ) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ( $Y_4$ ) DPPH ( $Y_5$ ) และ FRAP ( $Y_6$ ) ซึ่งเป็นการจัดตั้งทดลองแบบ Central composite design (CCD) แบบพหุกำลังสองมาตรฐาน ทำให้สามารถจัดตั้งทดลองได้ 11 ตั้งทดลอง ดังตารางที่ 4-4 ถึง ตารางที่ 4-7

การวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุ (Multiple regression) ดังตารางที่ 4-4 พบว่าค่าตอบสนองต่าง ๆ ( $Y_1$  -  $Y_6$ ) มีค่า  $R^2$  ของปริมาณโปรตีน (99.55%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (98.33%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (91.31%) ซึ่งมีค่ามากกว่า 90% หรือเข้าใกล้ 1 และมีค่า Model significant ของปริมาณโปรตีน (0.00) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (0.00) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (0.01) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีสมการที่มีความเหมาะสมน่าเชื่อถือตามเกณฑ์ที่กำหนด (Hema et al., 2017) โดยสมการของปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีลักษณะรูปแบบสมการเหมือนกัน คือมีทั้งเทอมของกำลังหนึ่ง เทอมกำลังสอง และเทอมที่มีอิทธิพลร่วมกัน โดยเมื่อพิจารณาที่ค่าสัมประสิทธิ์ของปริมาณโปรตีน พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของ  $X_1$ ,  $X_2$  มีค่าเป็นบวกบ่งชี้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเจลาติน





ไฮโดรไลสจากแท่งไม้มีแนวโน้มทำให้ปริมาณโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้น ค่าสัมประสิทธิ์ของปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของ  $X_1$  มีค่าเป็นลบบ่งชี้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากแท่งไม้มีแนวโน้มทำให้ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่  $X_2$  มีค่าเป็นลบบ่งชี้ว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากแท่งไม้มีแนวโน้มทำให้ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมีค่าลดลง ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของ  $X_1, X_2$  มีค่าเป็นลบบ่งชี้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากแท่งไม้มีแนวโน้มทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีค่าลดลง

การทวนสอบความแม่นยำของสมการที่ทำนายได้โดยพิจารณาจากความคลาดเคลื่อน (%Error) ดังตารางที่ 4-4 พบว่า ค่าความคลาดเคลื่อนของปริมาณโปรตีน (0.01%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (0.69%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (0.02%) มีค่าความคลาดเคลื่อนน้อยมากจากการเปรียบเทียบค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย ซึ่งบ่งบอกได้ว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายมีค่าความคลาดเคลื่อนจากค่าทดลองหรือจากค่าจริงน้อยมาก (Bumrungsart & Duangmal, 2019) ซึ่งค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายได้แสดงดังตารางที่ 4-5 ถึงตารางที่ 4-7 และภาพที่ 4-5

ตารางที่ 4-4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง ( $Y_{1-6}$ ) กับตัวแปรที่ศึกษา ( $X_{1,2}$ ) แสดงในรูปของ สมการถดถอยแบบพหุ ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ ( $R^2$ ) ความสัมพันธ์ระหว่างค่า X และ Y (Model significant) และความคลาดเคลื่อน (%Error)

ค่า ผลตอบสนอง	สมการถดถอย	$R^2$ (%)	Model significant	% Error
$Y_1$	$= 29.871 + 6.404 X_1 + 0.399 X_2 + 1.202 X_1^2 + 0.092 X_2^2 - 0.618 X_1 * X_2$	99.55	0.000	0.01
$Y_2$	$= 0.4409 + 0.00415 X_1 + 0.01124 X_2 + 0.0164 X_1^2 + 0.0181 X_2^2$	47.90	0.345	-
$Y_3$	$= 64.22 + 26.61 X_1 - 0.82 X_2 - 2.95 X_1^2 - 0.38 X_2^2 + 4.57 X_1 * X_2$	98.33	0.000	0.69
$Y_4$	$= 0.042886 - 0.000815 X_1 - 0.000157 X_2 - 0.002210 X_1^2 - 0.000701 X_2^2 + 0.000807 X_1 * X_2$	91.31	0.011	0.02
$Y_5$	$= 0.03476 + 0.00335 X_1 + 0.00126 X_2 - 0.00399 X_1^2 + 0.00028 X_2^2 + 0.00653 X_1 * X_2$	57.45	0.375	-
$Y_6$	$= 0.002474 - 0.000157 X_1 - 0.000047 X_2 + 0.000094 X_1^2 - 0.000364 X_2^2 + 0.000430 X_1 * X_2$	50.73	0.488	-

$X_1$  คือ ปริมาณเอนไซม์ (%w/w)  $X_2$  คือ ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)  $Y_1$  คือ ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)  $Y_2$  คือ ค่า TBARS (mg of MDA/L of liposome)  $Y_3$  คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Bound BPB (Bromophenol blue),  $\mu\text{g}$ )  $Y_4$  คือ ABTS ( $\mu\text{mole TE/ mg protein}$ )  $Y_5$  คือ DPPH ( $\mu\text{mole TE/mg protein}$ ) และ  $Y_6$  คือ FRAP ( $\mu\text{mole TE/mg protein}$ )

จากการพิจารณาความน่าเชื่อถือ ( $R^2$ , Model significant) ของความสัมพันธ์ของสมการพบว่า ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ( $Y_2$ ) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ( $Y_5$ ) และ FRAP ( $Y_6$ ) ไม่ผ่านเกณฑ์การพิจารณา แต่อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าค่าตอบสนองทั้ง 3 ค่าคุณภาพ มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ดังตารางที่ 4-8 ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS (ตารางที่ 4-8) จากการศึกษาใช้ปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท่าที่พบว่าสิ่งทดลองทั้ง 11 สิ่งทดลอง มีค่า TBARS ใกล้เคียงกัน อีกทั้งยังมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่าง

ควบคุมเชิงบวก (โทรลลิ่งความเข้มข้น 1,000 ppm) แต่มีค่า TBARS ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (น้ำกลั่น) จากตารางจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้มีผลทำให้ค่า TBARS ลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นถึงเอนไซม์ไฮโดรไลสที่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันไม่อิ่มตัวในอาหารที่อาจเกิดจากการทำงานร่วมกันของความเข้มข้นของเอนไซม์ไฮโดรไลสกับตัวของ Lecithin liposomes ทำให้สามารถถ่ายโอนอิเล็กตรอนของเปปไทด์ไปสู่อนุมูลอิสระได้ง่าย (Hamzeh, Benjakul, & Senphan, 2016) อีกทั้งอาจเป็นผลมาจากปริมาณหรือสัดส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (ปิยะนันท์ ชื่อเสียง, 2554) จึงมีผลให้เอนไซม์ไฮโดรไลสสามารถยับยั้งกระบวนการเกิดออกซิเดชันได้ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ต่อไปมีผลทำให้ค่า TBARS เพิ่มขึ้น อาจเป็นสาเหตุมาจากการย่อยอาจผลิตเปปไทด์ที่มีและไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือกรดอะมิโนของเปปไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลงนำไปสู่ความสามารถที่ลดลงในการต้านอนุมูลอิสระ (Karami, Peighambardoust, Hesari, & Akbari-Adergani, 2019; Zhuang & Sun, 2011) ในการวิเคราะห์ค่า TBARS ใช้สารประกอบมาลอนไดอิลดีไฮด์เป็นสารมาตรฐาน เนื่องจากมาลอนไดอิลดีไฮด์เป็นสารตั้งต้น (Initiator) ที่ส่งผลต่อความปลอดภัยของอาหาร การเพิ่มขึ้นของค่า TBARS เกิดจากผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิของการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Dey & Dora, 2014) โดยสาร TBARS จะทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นสารสื่อกลาง (Intermediate) จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (ในกรณีนี้ใช้ Lecithin เป็นไขมัน) โดยไขมันจะเกิดกระบวนการออกซิเดชันได้เป็นสารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่ทำให้เริ่มต้นการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ ท้ายที่สุดจะเกิดสารทุติยภูมิหลายชนิด อย่างเช่น สารระดับมาลอนไดอิลดีไฮด์ (พรพิมล ม่วงไทย, 2554) โดยใช้เป็นตัวชี้วัดถึงระดับการถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ (จตุรงค์ จงเจริญ, 2555)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ตารางที่ 4-8) แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ไฮโดรไลสที่สกัดได้จากเห็ดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการใช้ปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยในปริมาณต่าง ๆ เนื่องจากเอนไซม์ไฮโดรไลสหรือเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนบางชนิด เช่น ฮิสทีดีน ไทโรซีน ฟีนอลอะลานีน ซีสเตอีน และทริปโตเฟนจากการย่อยที่มีความสามารถในการให้โปรตอนแก่อนุมูลอิสระ อีกทั้งกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างแบบวงแหวนอะโรมาติกจะสามารถทำปฏิกิริยากับ Unpaired electron ของอนุมูล DPPH• ได้ รวมถึงลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์และขนาดของเปปไทด์ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 1300-1400 Da จึงทำให้อธิบายได้ว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยที่ส่งผลต่อระดับการย่อยของโปรตีนทำให้ได้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนและขนาดของเปปไทด์ที่เหมาะสมในการต้านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มขึ้นของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH จาก

กระบวนการย่อยอาจเกิดจากโปรตีนที่ถูกย่อยจนมีเปปไทด์ที่สามารถทำงานได้มากขึ้นจึงมีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Al-Shamsi, Mudgil, Hassan, & Maqsood, 2018; ปิยะนันท์ ชื่อเสียง, 2554)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (ตารางที่ 4-8) แสดงให้เห็นว่า เจลาตินไฮโดรไลเสตที่สกัดได้จากเท้าไก่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจากการใช้ปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยในปริมาณต่าง ๆ จะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้มีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากเปปไทด์ให้อิเล็กตรอนแก่ Ferric ions ( $Fe^{3+}$ ) หรือลดพลังงานของ  $Fe^{3+}$  ไปอยู่ในรูปของ Ferrous ions ( $Fe^{2+}$ ) ทำให้หยุดปฏิกิริยาถูกโซ่ที่นำไปสู่การผลิตอนุมูลอิสระอย่างต่อเนื่อง (Sonklin, Laohakunjit, & Kerdchoechuen, 2018) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ต่อไปมีผลทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง อาจเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเจลาตินไฮโดรไลเสตขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ (ปิยะนันท์ ชื่อเสียง, 2554)

จากการพิจารณาถึงสาเหตุที่ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP ไม่ผ่านเกณฑ์ความน่าเชื่อถือ ( $R^2$ , Model significant) อาจมีผลมาจากสภาวะที่ศึกษา รวมถึงช่วงเวลาที่อาจส่งผลต่อระดับการย่อยและลักษณะโครงสร้างของเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ถูกผลิตขึ้น โดยจะเห็นได้ว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ( $Y_4$ ,  $Y_5$  และ  $Y_6$ ) มีผลที่ไม่สอดคล้องกัน อาจเป็นผลมาจากความสามารถในการวิเคราะห์ของแต่ละวิธี โดยวิธี ABTS มีความสามารถละลายที่ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการออกซิเดชันของสารได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำหรือไขมัน ในขณะที่วิธี DPPH มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีโปรตีนสูง เนื่องจากต้องเตรียมสารละลายในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอน (Magalhães, Segundo, Reis, & Lima, 2008) จึงไม่สามารถวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในแต่ละสิ่งทดลองตามค่าการต้านที่แท้จริงได้ อีกทั้งการทดสอบด้วยวิธี FRAP มีรายงานจาก Pvl et al. (2015) เปรียบเทียบการวิเคราะห์ FRAP กับ TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity or ABTS) เพื่อประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเลือด รายงานว่าค่าเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของวิธี TEAC สูงกว่าวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากวิธี TEAC พิจารณาโปรตีนเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่มีผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่ FRAP พิจารณาโปรตีนเพียงเล็กน้อยที่จะมีผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านกลุ่มซัลไฟด์ (-SH) เป็นผลให้วิธี

TEAC มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าวิธี FRAP ดังนั้นจะเห็นได้ว่าเนื่องจากข้อจำกัดของวิธี DPPH และ FRAP จึงอาจทำให้ DPPH และ FRAP มีค่า  $R^2$  ต่ำ เช่นเดียวกับความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก TBARS ที่ไม่เพียงทำปฏิกิริยากับมาลอนไดไฮด์ไฮดรอกไซด์แต่ยังทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่น ๆ (เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน ไพรดีน รงควัตถุ และอื่น ๆ) (Mendes, Cardoso, & Pestana, 2009) ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อยจึงอาจทำให้ค่า TBARS ไม่สามารถนำมาทำนายได้ อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBARS ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP สามารถบอกประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท่าที่กล่าว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Corrêa et al. (2014) ที่กล่าวว่ากิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ที่เกิดจากการย่อยของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับกลุ่มที่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้และกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ โดยเปปไทด์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระผ่านกลไกต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นกลไกการกำจัดอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน การจับไอออนของโลหะหรือการรวมกันของกลไกเหล่านี้ ดังนั้นกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระควรประเมินด้วยวิธีการต่าง ๆ รวมกัน

ตารางที่ 4-5 ความสัมพันธ์ของปริมาณโปรตีนกับปริมาณแอมโมเนียรวมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากเห็ดไถ่

สิ่งทดลอง	ตัวแปรที่ศึกษา				ค่าจริง		ค่าตอบสนอง
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	
1	-1	-1	0.75	3.30	24.06 ± 1.65 <sup>bc</sup>		23.74
2	-1	1	0.75	7.00	38.38 ± 1.61 <sup>a</sup>		37.79
3	1	-1	4.27	3.30	26.01 ± 3.41 <sup>bc</sup>		25.78
4	1	1	4.27	7.00	37.86 ± 0.79 <sup>a</sup>		37.35
5	-1.414	0	0.02	5.00	23.00 ± 1.46 <sup>c</sup>		23.22
6	1.414	0	5.00	5.00	40.73 ± 1.83 <sup>a</sup>		41.33
7	0	-1.414	1.76	2.00	29.01 ± 3.08 <sup>bc</sup>		29.49
8	0	1.414	1.76	8.00	30.27 ± 1.91 <sup>b</sup>		30.62
9	0	0	1.76	5.00	29.98 ± 2.41 <sup>b</sup>		29.87
10	0	0	1.76	5.00	29.82 ± 2.81 <sup>b</sup>		29.87
11	0	0	1.76	5.00	29.81 ± 1.79 <sup>b</sup>		29.87

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

X<sub>1</sub> คือ ปริมาณแอมโมเนีย (%w/w) X<sub>2</sub> คือ ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง) Y<sub>1</sub> คือ ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

\*ค่าจากการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-6 ความสัมพันธ์ของปริมาณโบรดินที่ไม่ชอบน้ำกับปริมาณแอนโทรมร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากเต้าไก่

สิ่งทดลอง	ตัวแปรที่ศึกษา						ค่าตอบสนอง	
	ค่ารหัส			ค่าจริง			Y <sub>3</sub>	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	ค่าจากการทดลอง*	ค่าจากการทำนาย	
1	-1	-1	0.75	0.75	3.30	44.30 ± 9.49 <sup>cd</sup>	39.67	
2	-1	1	0.75	0.75	7.00	87.73 ± 10.45 <sup>a</sup>	83.75	
3	1	-1	4.27	4.27	3.30	27.38 ± 7.16 <sup>de</sup>	28.89	
4	1	1	4.27	4.27	7.00	89.10 ± 9.25 <sup>a</sup>	91.25	
5	-1.414	0	0.02	0.02	5.00	19.00 ± 4.53 <sup>e</sup>	20.69	
6	1.414	0	5.00	5.00	5.00	95.17 ± 0.84 <sup>a</sup>	95.95	
7	0	-1.414	1.76	1.76	2.00	59.03 ± 2.14 <sup>bc</sup>	64.62	
8	0	1.414	1.76	1.76	8.00	65.39 ± 5.08 <sup>b</sup>	62.30	
9	0	0	1.76	1.76	5.00	63.86 ± 6.08 <sup>bc</sup>	64.22	
10	0	0	1.76	1.76	5.00	62.18 ± 8.34 <sup>bc</sup>	64.22	
11	0	0	1.76	1.76	5.00	66.60 ± 1.31 <sup>b</sup>	64.22	

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

X<sub>1</sub> คือ ปริมาณแอนโทรมที่ใช้ (%w/w) X<sub>2</sub> คือ ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง) Y<sub>3</sub> คือ ปริมาณโบรดินที่ไม่ชอบน้ำ (Bound BPB (Bromophenol blue), µg)

\*ค่าจากการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4-7 ความสัมพันธ์ของความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS กับปริมาณแอนโทไซยานินในช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากเห็ดไถ่

สิ่งทดลอง	ตัวแปรที่ศึกษา				ค่าจริง		ค่าตอบสนอง	
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	ค่าจากการทดลอง*	ค่าจากการทำนาย
1	-1	-1	0.75	3.30	0.0419 ± 0.00 <sup>abc</sup>	0.0418		
2	-1	1	0.75	7.00	0.0383 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.0385		
3	1	-1	4.27	3.30	0.0391 ± 0.00 <sup>abc</sup>	0.0398		
4	1	1	4.27	7.00	0.0388 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.0398		
5	-1.414	0	0.02	5.00	0.0398 ± 0.00 <sup>abc</sup>	0.0396		
6	1.414	0	5.00	5.00	0.0380 ± 0.00 <sup>c</sup>	0.0373		
7	0	-1.414	1.76	2.00	0.0416 ± 0.00 <sup>abc</sup>	0.0417		
8	0	1.414	1.76	8.00	0.0423 ± 0.00 <sup>abc</sup>	0.0413		
9	0	0	1.76	5.00	0.0431 ± 0.00 <sup>a</sup>	0.0429		
10	0	0	1.76	5.00	0.0428 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.0429		
11	0	0	1.76	5.00	0.0427 ± 0.00 <sup>ab</sup>	0.0429		

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกัน ในแนวตั้งเดียวกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

X<sub>1</sub> คือ ปริมาณแอนโทไซยานิน (%w/w) X<sub>2</sub> คือ ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง) Y<sub>4</sub> คือ ABTS (μmole TE/ mg protein)



ตารางที่ 4-8 ความสัมพันธ์ของ TBARS, DPPH และ FRAP กับปริมาณแอนโทไซยานินในช่วงระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเต้าไก่

สิ่งทดลอง	ตัวแปรที่ศึกษา				ตัวแปรตามที่ต้องการวิเคราะห์หรือค่าตอบสนอง					
	ค่ารหัส	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>5</sub> *	Y <sub>6</sub> *	Y <sub>6</sub> *	
1	-1	-1	1	0.75	3.30	0.42 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.0448 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.0034 ± 0.0002 <sup>a</sup>	0.0034 ± 0.0002 <sup>a</sup>	
2	-1	1	1	0.75	7.00	0.46 ± 0.02 <sup>abcd</sup>	0.0286 ± 0.01 <sup>cd</sup>	0.0016 ± 0.0001 <sup>de</sup>	0.0016 ± 0.0001 <sup>de</sup>	
3	1	-1	1	4.27	3.30	0.48 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.0263 ± 0.01 <sup>d</sup>	0.0027 ± 0.0004 <sup>b</sup>	0.0027 ± 0.0004 <sup>b</sup>	
4	1	1	1	4.27	7.00	0.50 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.0363 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.0026 ± 0.0000 <sup>bc</sup>	0.0026 ± 0.0000 <sup>bc</sup>	
5	-1.414	0	0	0.02	5.00	0.49 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.0122 ± 0.01 <sup>c</sup>	0.0021 ± 0.0001 <sup>cd</sup>	0.0021 ± 0.0001 <sup>cd</sup>	
6	1.414	0	0	5.00	5.00	0.47 ± 0.04 <sup>abcd</sup>	0.0355 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.0025 ± 0.0001 <sup>bc</sup>	0.0025 ± 0.0001 <sup>bc</sup>	
7	0	-1.414	0	1.76	2.00	0.49 ± 0.01 <sup>ab</sup>	0.0321 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.0016 ± 0.0002 <sup>de</sup>	0.0016 ± 0.0002 <sup>de</sup>	
8	0	1.414	0	1.76	8.00	0.48 ± 0.03 <sup>abc</sup>	0.0326 ± 0.00 <sup>bc</sup>	0.0011 ± 0.0000 <sup>e</sup>	0.0011 ± 0.0000 <sup>e</sup>	
9	0	0	0	1.76	5.00	0.46 ± 0.01 <sup>abcd</sup>	0.0349 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.0025 ± 0.0002 <sup>bc</sup>	0.0025 ± 0.0002 <sup>bc</sup>	
10	0	0	0	1.76	5.00	0.44 ± 0.02 <sup>bcd</sup>	0.0344 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.0025 ± 0.0002 <sup>bc</sup>	0.0025 ± 0.0002 <sup>bc</sup>	
11	0	0	0	1.76	5.00	0.42 ± 0.02 <sup>cd</sup>	0.0350 ± 0.00 <sup>b</sup>	0.0025 ± 0.0001 <sup>bc</sup>	0.0025 ± 0.0001 <sup>bc</sup>	

ตารางที่ 4-8 (ต่อ)

สิ่งทดลอง	ตัวแปรที่ศึกษา			ตัวแปรตามที่ต้องการวิเคราะห์หรือค่าตอบสนอง		
	ค่ารหัส	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	ค่าจริง
ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (วิเคราะห์ของ TBARS)**	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>5</sub> *	Y <sub>6</sub> *
				0.41 ± 0.01	-	-
ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (วิเคราะห์ของ TBARS)**	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>2</sub> *	Y <sub>5</sub> *	Y <sub>6</sub> *
				0.70 ± 0.02	-	-

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p≤0.05)

X<sub>1</sub> คือ ปริมาณแอสคอร์บิก (mg of MDA/l of liposome) Y<sub>2</sub> คือ ค่า TBARS (mg of MDA/l of liposome) Y<sub>5</sub> คือ DPPH (μmole TE/mg protein) และ Y<sub>6</sub> คือ FRAP (μmole TE/mg protein)

\*ค่าจากการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

\*\* ค่า TBARS ของโพรงและตัวอย่างควบคุมไม่ได้นำไปวิเคราะห์ทางสถิติร่วมกับ 11 สิ่งทดลอง เพียงเป็นค่าที่แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของสิ่งทดลองบางสิ่งทดลองที่มีความสามารถใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (โพรง) และตัวอย่างควบคุมเชิงลบ (น้ำกลั่น)

เมื่อนำค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายของ ปริมาณ โปรีติน ปริมาณ โปรีตินที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มาเปรียบเทียบกับด้วยกราฟการแจกแจงความน่าจะเป็นแบบปกติ (Normal probability plot) ดังภาคผนวก จ-3 พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายทั้ง 3 ค่าคุณภาพมีการกระจายตัวในแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นถึงความปกติของ ผลการทดลอง (คาริกา อวะภาค, นพรัตน์ มะเห, และดลฤดี พิษย์รัตน์, 2556) ที่มีความสอดคล้องกัน ระหว่างค่าตอบสนองทั้งสอง อีกทั้งจากภาพทั้ง 3 ภาพ ( $Y_1$ ,  $Y_3$  และ  $Y_4$ ) มีค่าสัมประสิทธิ์ของ ปริมาณ โปรีติน ( $R^2$  เท่ากับ 1) ปริมาณ โปรีตินที่ไม่ชอบน้ำ ( $R^2$  เท่ากับ 0.98) และความสามารถใน การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ( $R^2$  เท่ากับ 0.91) ในการสกัดเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ ซึ่ง ค่า  $R^2$  แสดงให้เห็นถึงความพึงพอใจของกระบวนการย่อย (Ovissipour, Abedian, Motamedzadegan, & Nazari, 2010) จะเห็นได้ว่าการศึกษาปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ ในการย่อยมีค่า  $R^2$  เป็นที่น่าพึงพอใจต่อปริมาณ โปรีติน ปริมาณ โปรีตินที่ไม่ชอบน้ำ และ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS

เมื่อนำสมการถดถอยแบบพหุ (ตารางที่ 4-4) ที่ได้มาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองเพื่อ อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของ เจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่กับปริมาณ โปรีติน ปริมาณ โปรีตินที่ไม่ชอบน้ำและความสามารถ ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยจากภาพที่ 4-5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ เอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยกับปริมาณ โปรีติน พบว่าปริมาณ โปรีตินมีแนวโน้ม เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ โดยปริมาณ โปรีตินมีอิทธิพลต่อปริมาณเอนไซม์มากกว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยจึงมีผลต่อปริมาณ โปรีตินที่เพิ่มมากขึ้นมากกว่า จากผลดังกล่าวปริมาณ เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย (0.02-5 %w/w) กลายเป็นปัจจัยกำหนดกระบวนการย่อยเจลาติน ไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่และมีอิทธิพลต่อการทำงานของเอนไซม์เพื่อทำปฏิกิริยากับซัสเตรต ซึ่งมี ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้มากจนทำให้สามารถย่อยซัสเตรตจนเป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก (ผลิตภัณฑ์) มาก ขึ้น จากการมีตำแหน่งที่เชื่อมต่อกับซัสเตรตที่เรียกว่าแอคทีฟไซต์ (Active site) ของเอนไซม์ที่จะ ทำการยึดส่วนต่าง ๆ ของซัสเตรตมากขึ้น (Silva, Park, & Hubinger, 2010) เป็นผลให้ได้โปรตีนที่มี ขนาดเล็กลงและมีสมบัติการละลายได้มากขึ้นจึงทำให้ปริมาณ โปรีตินเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปริมาณ โปรีตินที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยมักจะเพิ่มขึ้นจนถึงจุดสูงสุดจะเกี่ยวข้องกับ ความจำเพาะของเอนไซม์และซัสเตรต (Corrêa et al., 2014) อัตราการย่อยด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้น ในช่วงแรกและเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป จึงเป็นผลให้ระยะเวลาในการย่อยไม่มีอิทธิพลต่อ ปริมาณ โปรีตินเมื่อใช้ระยะเวลาที่นานขึ้นอีกต่อไป

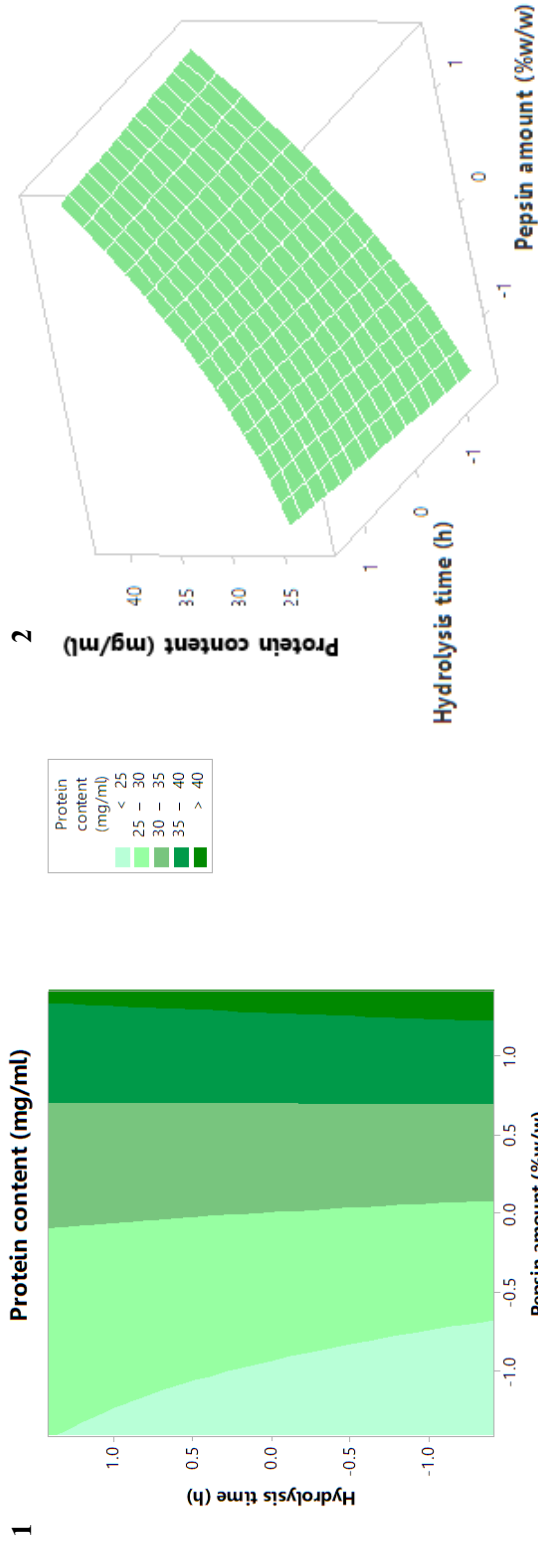
จากภาพที่ 4-6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยกับปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ พบว่าปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์คล้ายคลึงกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โดยทั่วไปอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทรงกลมของโปรตีน (รวมถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อน) เนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโปรตีนจะถูกปลดปล่อยออกมาซึ่งสภาพแวดล้อมที่มีขี้ (ในน้ำ) มากขึ้น เนื่องจากเปปซินมีความจำเพาะเจาะจงในการตัดเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิลของวงอะโรมาติกและ/หรือกรดอะมิโนลิซีน และฟีนอลอะลานีน (Ahn, Cao, Yu, & Engen, 2013; Amissah, 2012) จึงทำให้มีปริมาณของโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมากขึ้น และการมีโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดการรวมตัวของอนุภาคเนื่องจากการมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้นทำให้เปปไทด์รวมตัวกันด้วยอันตรกิริยาระหว่างหมู่ที่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic interaction) ของกรดอะมิโนในเจลาติน ไฮโดรไลสและเกิดการตกตะกอน ก่อนจะถูกกำจัดออกในขั้นตอนของการปั่นเหวี่ยงจึงทำให้มีปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำลดลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มมากขึ้น (Al-Shamsi et al., 2018; Corrêa et al., 2014) เช่นเดียวกับรายงานของ Cui, Zhao, Yuan, Zhang and Ren (2013) ศึกษาการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเปปซินพบว่า โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ถูกย่อย

จากภาพที่ 4-7 แสดงความสัมพันธ์ของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS กับปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย พบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย เนื่องจากซับสเตรดถูกย่อยจนเป็นเปปไทด์สายสั้นจึงทำให้มีกรดอะมิโนที่ปลายสายเพิ่มมากขึ้นที่จะสามารถให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนในปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ และเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยจนถึงจุดหนึ่งๆ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยต่อไป ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Sonklin et al. (2018) กล่าวคือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดหนึ่งแล้วลดลง อาจมีสาเหตุมาจากความอิ่มตัวของเอนไซม์โปรตีเอส ซึ่งความอิ่มตัวของเอนไซม์โปรตีเอสเกิดขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูงและใช้ระยะเวลาในย่อยนานจึงไม่สามารถที่จะย่อยได้อีกทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ลดลง (Sonklin et al., 2018) นอกจากนี้ขนาดเปปไทด์ที่สั้นเกินไปและการมีลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Karami, Peighambardoust, Hesari and Akbari-Adergani (2019) รายงานว่าการย่อยสลายที่

เหมาะสมสามารถปลดปล่อยเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและการย่อยสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งการย่อยอาจผลิตเปปไทด์ที่มีและไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือกรดอะมิโนของเปปไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลง นำไปสู่ความสามารถที่ลดลงในการต้านอนุมูลอิสระ (Karami et al., 2019; Zhuang & Sun, 2011) องค์ประกอบของกรดอะมิโนและลำดับของเปปไทด์นั้นมีความสำคัญต่อคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งการย่อยโปรตีนจะทำให้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเปปไทด์และลำดับของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากแหล่งของโปรตีนและเงื่อนไขในการย่อยสลาย (Zheng et al., 2014) รูปแบบของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระบ่งชี้ว่าการย่อยเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปลดปล่อยลำดับของเปปไทด์อิสระในการต้านอนุมูลอิสระ (Corrêa et al., 2014) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของการย่อยไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยเพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากปัจจัยอื่น ๆ เช่น เปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำที่ปลดปล่อยออกมาจากโปรตีนหรือปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ (Rudzińska, Flaczyk, Amarowicz, Wąsowicz, & Korczak, 2007) ซึ่งรวมถึงขนาดของเปปไทด์ที่เหมาะสม (ประมาณ 1300 - 1400 Da) จึงทำให้อธิบายได้ว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ปิยะนันท์ ชื่อเสียง, 2554)

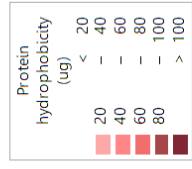
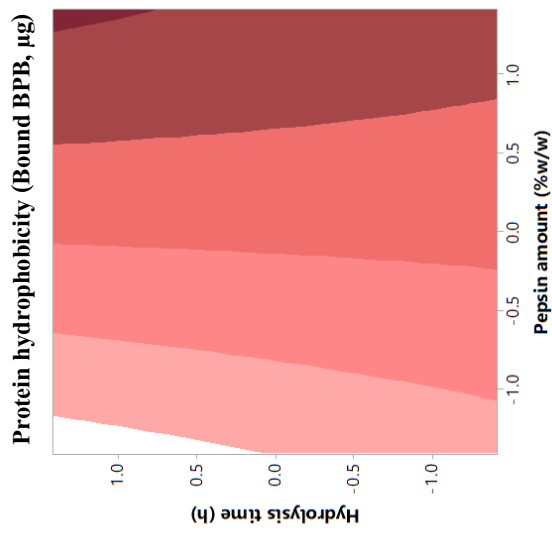


183963776

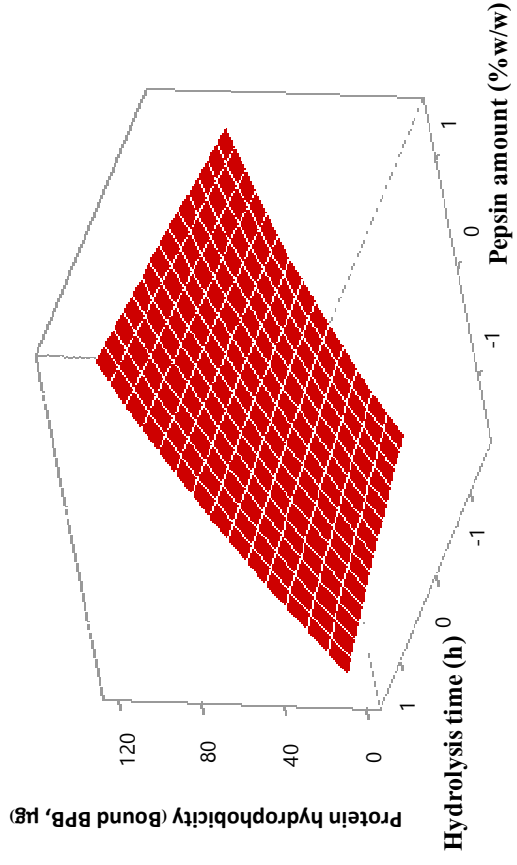


ภาพที่ 4-5 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot) (1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot) (2) ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (Protein content,  $Y_1$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount,  $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time,  $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)

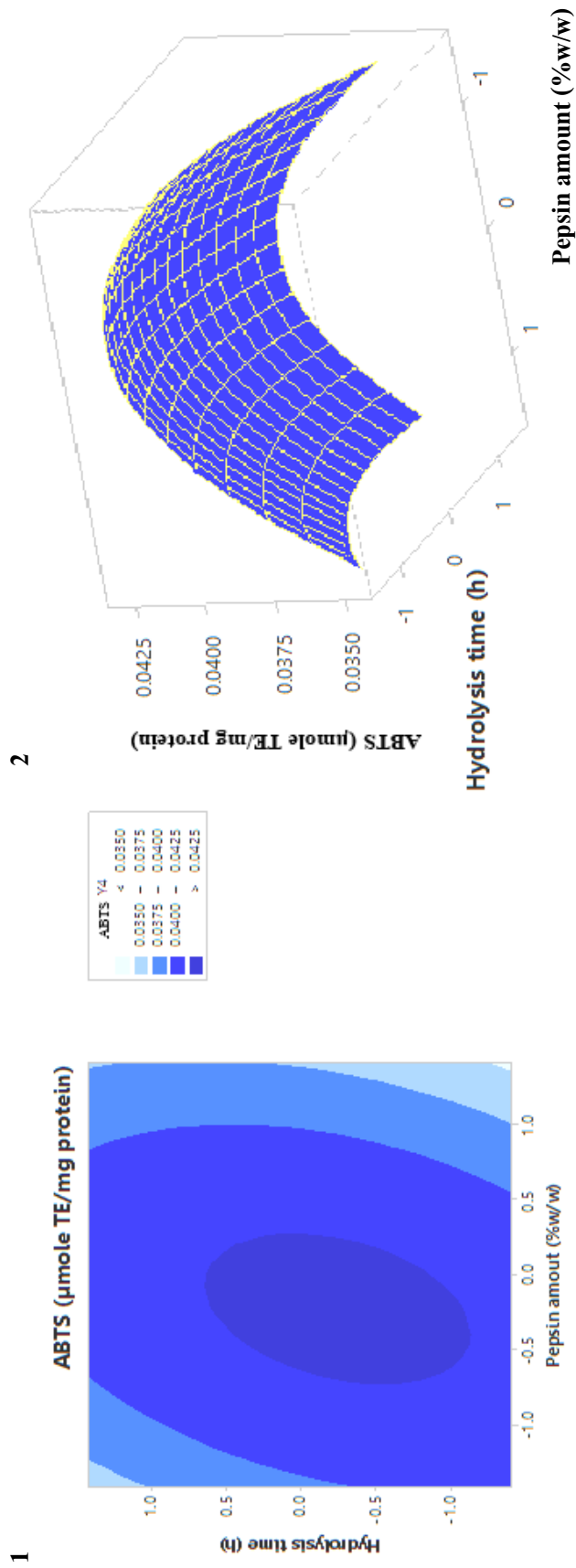
1



2



ภาพที่ 4-6 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot)(1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot)(2) ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Protein hydrophobicity,  $Y_3$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount,  $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time,  $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)



ภาพที่ 4-7 พื้นผิวตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ (Contour plot) (1) และลักษณะ 3 มิติ (Surface plot) (2) ของความสัมพันธ์ระหว่างค่า ABTS ( $Y_4$ ) กับปริมาณเอนไซม์ (Pepsin amount,  $X_1$ ) และระยะเวลาในการย่อย (Hydrolysis time,  $X_2$ ) เมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)



ผลการทวนสอบความแม่นยำของสมการจากการหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเทคนิคการซ้อนทับกราฟแล้วกำหนดสภาวะที่ต้องการ (ตารางที่ 4-9) จากการศึกษาปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ (ภาพที่ 4-5 ถึง 4-7) โดยเมื่อพิจารณาพื้นผิวตอบสนองของปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS พบว่าพื้นผิวตอบสนองทั้ง 3 ตัวแปร มีแนวโน้มของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ซึ่งมีปริมาณสูงที่สุดไม่เกินไปในทิศทางเดียวกันกับปริมาณโปรตีนและปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ จึงทำให้ทางผู้วิจัยเลือกจุดที่แต่ละค่าตอบสนองมีปริมาณมากที่สุด และจุดกึ่งกลางของทั้ง 3 ตัวแปรที่มีปริมาณมากที่สุดได้เป็น 4 จุด ที่มีปริมาณเอนไซม์กับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยที่แตกต่างกัน ได้แก่ จุดที่ 1 คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมากที่สุด (5.00 %w/w, 2 ชั่วโมง) จุดที่ 2 คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมากที่สุด (5.00 %w/w, 8 ชั่วโมง) จุดที่ 3 คือ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด (2.08 %w/w, 4.48 ชั่วโมง) และจุดที่ 4 คือ จุดกึ่งกลางของทั้ง 3 ตัวแปรที่มีปริมาณมากที่สุด (3.69 %w/w, 5.76 ชั่วโมง) และเมื่อทวนสอบความแม่นยำของสมการของทั้ง 4 จุด พบว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนายจึงทำให้มีค่าความคลาดเคลื่อนต่ำ (Bumrungsart & Duangmal, 2019)

ตารางที่ 4-9 ผลการทวนสอบความแม่นยำของสมการจากการหาสถานะที่เหมาะสมโดยซ้ำกับกราฟแล้วกำหนดสถานะที่ต้องการและแสดงผลของ %Error ของความสัมพันธ์ระหว่าง  $X_{1-2}$  และ  $Y_{1,3,4}$  ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลต์จากเท้าไก่

ค่า	ตัวแปร		ค่าจริง		$Y_1$		$Y_3$		$Y_4$				
	$X_1$	$X_2$	$X_1$	$X_2$	Observed values	Predicted values	%Error	Observed values	Predicted values	%Error			
$Y_1$ max	1.414	-1.414	5.00	2.00	42.50	42.18	0.74	86.68	87.21	0.62	0.0351	0.0345	1.64
$Y_3$ max	1.414	1.414	5.00	8.00	41.39	40.84	1.31	104.11	103.17	0.90	0.0363	0.0373	2.78
$Y_4$ max	-0.2428	-0.2428	2.08	4.48	29.44	28.26	4.00	59.03	58.03	1.68	0.0438	0.0430	1.77
Optimal	0.6713	0.3571	3.69	5.76	35.38	34.72	1.86	83.14	81.51	1.97	0.0416	0.0414	0.39

$X_1$  คือ ปริมาณเอนไซม์ (%w/w)  $X_2$  คือ ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)

$Y_1$  คือ ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)  $Y_3$  คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Bound BPB,  $\mu\text{g}$ )  $Y_4$  คือ ABTS ( $\mu\text{mole TE}/\text{mg protein}$ )  $Y_1$  max คือ ปริมาณโปรตีนมากที่สุด

$Y_3$  max คือ ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมากที่สุด  $Y_4$  max คือ ABTS มากที่สุด Optimal คือ จุดกึ่งกลางของทั้ง 3 ตัวแปรที่มีปริมาณมากที่สุด

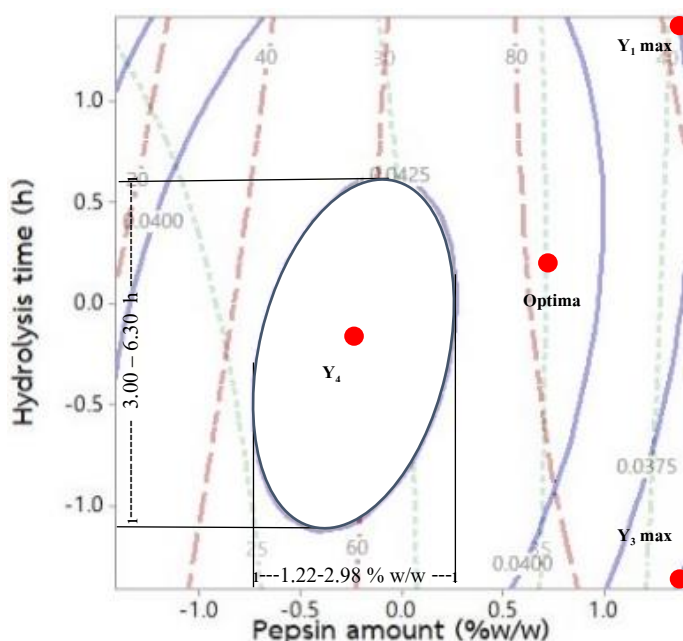
Observed values คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการสังเกตหรือทดลอง Predicted values คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย

เมื่อพิจารณาจุดที่ 3 ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด (ภาพที่ 4-8) พบว่ามีการใช้ปริมาณเปปซินอยู่ในช่วง 1.22 - 2.98% w/w ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย 3.00 - 6.30 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 26.80 - 31.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในช่วง 45.10 - 71.13 Bound BPB,  $\mu\text{g}$  และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 0.0425 - 0.0431  $\mu\text{mole TE/mg protein}$  และเมื่อพิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่ให้ค่าจากการทำนายมากที่สุด (0.0430  $\mu\text{mole TE/mg protein}$ ) พบว่ามีการใช้ปริมาณของเปปซิน 2.08% (w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย 4.48 ชั่วโมง ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 28.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร และปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ 58.03 ไมโครกรัม และเมื่อนำมาทวนสอบความแม่นยำของสมการมีค่าความคลาดเคลื่อนของปริมาณโปรตีน (4.00%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (1.68%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (1.77%) ต่ำ เนื่องจากค่าตอบสนองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยรายงานของ Mazloomi-Kiyapey, Sadeghi-Mahoonak, Ranjbar-Nedamani and Nourmohammadi (2019) มีการใช้ปริมาณของเปปซิน 1% ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยโปรตีนจากเมล็ดพืชทอง 2 ชั่วโมง ทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (82.07%) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมมีความแตกต่างกันในแต่ละชั้นสเตรต เนื่องจากความแตกต่างกันของชั้นสเตรต โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณและความสามารถในการทำปฏิกิริยาของโปรติเอส (Endogeneous proteases) (Ovissipour et al., 2010)

เมื่อนำจุดที่ 3 ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุดมาศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโน เนื่องจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนของโปรตีนและเปปไทด์มีอิทธิพลอย่างมากต่อสมบัติเชิงหน้าที่ (Onuh et al., 2014) พบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากแท่งไม้มีปริมาณใกล้เคียงกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนของแท่งไม้และคอลลาเจนจากแท่งไม้จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการสกัดและลักษณะเฉพาะของคอลลาเจนจากแท่งไม้ของ Liu et al. (2001) ซึ่งองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากแท่งไม้ (ตารางที่ 4-10) มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Pro, Trp และ Tyr โดยสมบัติความไม่ชอบน้ำของเจลาตินไฮโดรไลสช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ เนื่องจากมีส่วนช่วยเพิ่มปฏิสัมพันธ์กับไขมันและช่วยในการทำปฏิกิริยากับเป้าหมาย (Onuh et al., 2014) อีกทั้งเจลาตินไฮโดรไลสได้จากแท่งไม้ยังมี Asp, Glu, Pro, Lys, Ala และ Arg ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงของปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งหมดดังการรายงานของ Onuh, Girgih, Malomo, Aluko and Aliani (2015) กล่าวว่าการย่อยผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกและการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเยื่อเลือกผ่านจะมี Asp, Glu, Pro, Lys, Ala และ Arg ในปริมาณสูง โดย Onuh et al. (2014) กล่าวว่า Asp และ

Glu เป็นกรดอะมิโนที่มีประจุลบที่มีสมบัติการต้านอนุมูลอิสระสูง เนื่องจากมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนส่วนเกินระหว่างการทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ รวมถึงการมี Tyr, Met, His และ Lys เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากกรดอะมิโนดังกล่าวจะทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนซึ่ง His มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากการยับยั้ง ดักจับและการสลายตัวของไขมันด้วยวงแหวนอิมิดาโซล เป็นผลให้เจลาตินไฮโดรไลสแตกจากเท้าไก่ที่ข่อยด้วยเปปซิน (2.08 %w/w, 4.48 ชั่วโมง) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด

ปัจจุบันเจลาตินไฮโดรไลสหรือเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้รับความสนใจในด้านความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์รวมถึงการมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีทำให้สามารถช่วยเพิ่มเสถียรภาพในการเก็บรักษาอาหาร และเนื่องจากทางผู้วิจัยมีความต้องการเจลาตินไฮโดรไลสแตกไปประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ในขั้นตอนต่อไป ดังนั้นคำตอบสนองของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด (2.08 %w/w, 4.48 ชั่วโมง) เป็นจุดที่มีความน่าสนใจ อีกทั้งจุดนี้ยังมีปริมาณโปรตีนน้อยที่สุดที่ชี้ให้เห็นว่าการใช้ปริมาณโปรตีนในปริมาณน้อยก็เพียงพอในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพที่ดี



ภาพที่ 4-8 พื้นที่ผิวตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (---) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (- - -) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (—) กับปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการข่อยเมื่อกำหนดค่า  $X_1$  และ  $X_2$  เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)

ตารางที่ 4-10 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ที่มีความสามารถ  
ในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด

องค์ประกอบของกรดอะมิโน	กรัมต่อ 100 กรัม โปรตีน
กรดแอสพาร์ติก (Asp)	8.74 ± 0.58
ทรีโอนีน (Thr)*	3.25 ± 0.25
เซอรีน (Ser)	4.34 ± 0.71
กรดกลูตามิก (Glu)	14.76 ± 0.89
โพรลีน (Pro)	15.36 ± 1.41
ไกลซีน (Gly)	29.92 ± 5.82
อะลานีน (Ala)	11.96 ± 1.07
ซิสเตอีน (Cys)	0.49 ± 0.17
วาลีน (Val)*	2.75 ± 1.16
เมไทโอนีน (Met)*	1.31 ± 0.67
ไอโซลิวซีน (Ile)*	1.96 ± 0.90
ลูซีน (Leu)*	4.09 ± 0.39
ไทโรซีน (Tyr)	1.60 ± 0.57
ฟีนิลอะลานีน (Phe)*	2.91 ± 0.29
ฮิสติดีน (His)*	1.17 ± 0.36
ไลซีน (Lys)*	5.38 ± 0.83
อาร์จินีน (Arg)	10.11 ± 1.76
ทริปโตเฟน (Trp)*	0.16 ± 0.16
กรดอะมิโนทั้งหมด	120.80 ± 12.43

\* กรดอะมิโนจำเป็น (Najafian & Babji, 2014)

กรดอะมิโนที่เป็นวงอะโรมาติก ได้แก่ Phe, His, Trp และ Tyr (Fennema, 1996; Najafian & Babji, 2014)

กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ได้แก่ Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Pro, Trp และ Tyr (Fennema, 1996; Najafian & Babji, 2014)

### 4.3 ผลของปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่ต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่

ไส้กรอกเป็นผลิตภัณฑ์สำเร็จรูปที่สะดวกต่อการบริโภค จึงได้รับความนิยมอย่างกว้างขวาง (ชนวิวัฒน์ มาปายะ และคณะ, 2557) โดยสมบัติทางเคมีกายภาพของไส้กรอกเป็นลักษณะสำคัญในการกำหนดคุณภาพของไส้กรอก ไม่ว่าจะเป็นลักษณะเนื้อสัมผัสและกลิ่นรสของไส้กรอก ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญที่ต้องคำนึงถึงเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภค (Zakaria & Sarbon, 2018) โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์มักมีการเติมไขมันเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของลักษณะเนื้อสัมผัส อย่างไรก็ตามผู้บริโภคมีความต้องการผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพจากเนื้อสัตว์เพิ่มมากขึ้น ดังนั้นเนื้ออกไก่จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากกล้ามเนื้ออกไก่ส่วนใหญ่ประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อลายแบบเอพฟิ (FG fiber) หรือการหดตัวเพียงชนิดเดียว (Fast glycolytic fiber) ดังนั้นเนื้อจึงแน่นและแห้งเนื่องจากมีเส้นใยกล้ามเนื้อจำนวนมากและความเข้มข้นของไขมันต่ำ อีกทั้งเนื้ออกไก่อังมีสมบัติทางโภชนาการของไขมันต่ำและเปอร์เซ็นต์ของโปรตีนสูง (Jo et al., 2018) จึงเหมาะสำหรับการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไส้กรอกไก่เพื่อสุขภาพ และจากการรายงานของ Bhattacharyya (2011) ไส้กรอกไก่อาจเสื่อมคุณภาพลงในระหว่างการเก็บรักษา เนื่องจากการเติบโตของจุลินทรีย์และการออกซิเดชันของไขมันทำให้คุณภาพอาหารลดลงและส่งผลกระทบต่อกลิ่นรสทำให้ผู้บริโภคมีการยอมรับที่ลดลง ดังนั้นการเสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจเนื่องจากเจลาตินไฮโดรไลสเป็นเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เช่น สารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติต้านจุลินทรีย์ รวมถึงการย่อยบางส่วนสามารถปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น ความสามารถในการละลาย การดูดซึมไขมัน และคุณสมบัติในการทำให้เป็นอิมัลชัน (Lasekan et al., 2013)

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้เจลาตินไฮโดรไลสได้ในไส้กรอกพบว่า มีงานวิจัยต่าง ๆ นำโปรตีนไฮโดรไลสได้จากแหล่งต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้ในไส้กรอก เช่น โปรตีนไฮโดรไลสได้จากไข่ปลาทูน่าทองแถบ 0.5 - 3% (Intarasirisawat et al., 2014) และจากปลาช่อน 1 - 3% (Zakaria & Sarbon, 2018) ในขณะที่ยังไม่พบการนำเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่มาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ ดังนั้นจึงแปรปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่อยู่ในช่วง 1 - 5% เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ อีกทั้งยังใช้เตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตเป็นตัวช่วยควบคุมเชิงบวก เนื่องจากมีรายงานว่าสารประกอบฟอสเฟตเมื่อนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะมีหน้าที่สำคัญคือ ช่วยให้ไส้กรอกมีความเหนียวและสามารถอุ้มน้ำได้ดีทำให้ไส้กรอกมีความชื้นและไขมัน มีความคงตัวดี ขณะที่ต้มหรือรมควันจึงทำให้มีลักษณะเนื้อแน่น อีกทั้งฟอสเฟตยังมีสมบัติในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันแต่ไม่ควรใช้เกิน 0.3% เนื่องจากจะทำให้มีรสชาติคล้ายสบู่ (Jo et al., 2018; อรรถกร มุนิกานนท์ และมาลัยวรรณ อารยะสกุล, 2547) อีกทั้งสารประกอบฟอสเฟตเป็นวัตถุเจือ

ปนอาหารโดยปริมาณสูงสุดที่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เรื่อง ไข่กรอกไก่ (มพช. 331/2547) อนุญาตให้ใช้ไม่เกิน 3000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือ 0.3% ดังนั้น ไข่กรอกไก่จึงสามารถถูกผลิตเป็น 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไข่กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (SGH 0%) (ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ) ไข่กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% (SGH 1%) ไข่กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% (SGH 3%) ไข่กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (SGH 5%) และ ไข่กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (SSP 0.3%) (ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก)

ผลการวัดค่าสีของไข่กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต ดังตารางที่ 4-11 พบว่า ไข่กรอกไก่มีค่า  $L^*$  (ค่าความสว่าง) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยค่า  $L^*$  ของไข่กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมากกว่าไข่กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (SGH 1%, 3% และ 5%) และเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต จะเห็นได้ว่าการเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมากขึ้นมีผลทำให้ค่า  $L^*$  ลดลง อาจเป็นผลมาจากสารละลายเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่มีลักษณะเป็นสีเหลืองใสจึงทำให้มีค่า  $L^*$  ต่ำกว่าไข่กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต ในลักษณะเดียวกับปุ๊อัดที่มีการใช้ Mechanically Deboned Chicken Hydrolysates (MDCH) เป็นส่วนประกอบจะมีสีขาวน้อยกว่าและมีสีเหลืองมากกว่า ดังนั้นการเติม MDCH ไฮโดรไลเสตอาจส่งผลเสียต่อค่าสีของปุ๊อัด (Jin et al., 2014) และจะเห็นได้ว่าการเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตในไข่กรอกไก่มีค่า  $L^*$  น้อยกว่าไข่กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต ( $p \leq 0.05$ ) อาจเป็นผลมาจากสารประกอบฟอสเฟตช่วยให้โปรตีนแอกโตไมโอซินแยกตัวออกจากกันเป็นแอกตินกับไมโอซินจึงเพิ่มความสามารถในจับกับโมเลกุลของน้ำสานเป็นตาข่าย (อรรถกร มุณีกันนท์ และมาลัยวรรณ อารยะสกุล, 2547) ที่อาจกันไม่ให้เลือดและของเหลวไหลออกมาจึงอาจทำให้มีค่า  $L^*$  น้อย แต่แตกต่างกับไข่กรอกไก่เสริม เจลาตินไฮโดรไลเสต 3% อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ค่า  $a^*$  (ค่าความเป็นสีแดง) ของไข่กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) พบว่า ไข่กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต มีค่า  $a^*$  มากกว่าไข่กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต เป็นผลมาจากเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีฤทธิ์เป็นด่างที่ช่วยทำให้ pH ของโปรตีนในเนื้อสูงขึ้น (Jo et al., 2018) จากการเพิ่มจำนวนประจุให้กับโมเลกุลของโปรตีนทำให้โปรตีนมีความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้นสานเป็นตาข่ายที่กันไม่ให้เลือดและของเหลวไหลออกมาจึงอาจทำให้มีค่า  $a^*$  สูงกว่าสิ่งทดลองอื่น ในขณะที่ไข่กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมากขึ้นจึงมีผลให้ค่า  $a^*$  ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) ซึ่งจากการรายงานของ Zakaria and Sarbon (2018) ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และความเสถียรในการออกซิเดชันของไข่กรอกปลาอิมัลชันที่ได้รับอิทธิพลจากโปรตีนไฮโดรไลเสตของปลาช่อน (*Channa striata*) ในระดับต่าง ๆ (0 - 3 กรัมต่อ 100 กรัม) กล่าวว่า การ

ลดลงของค่า  $a^*$  ของไส้กรอกมีความสัมพันธ์กับการเกิดออกซิเดชันของไมโอโกลบิน (Myoglobin) ไปอยู่ในรูปเมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) เกิดเป็นสีน้ำตาลจากความร้อนที่ใช้ในระหว่างการแปรรูปทำให้ค่าสีแดงลดลง (Cavalheiro et al., 2014) เป็นผลให้ไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% และ 5% มีค่า  $a^*$  ต่ำกว่า 1% และไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

ค่า  $b^*$  (ค่าความเป็นสีเหลือง) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% มีค่า  $b^*$  มากกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตซึ่งอาจเป็นผลมาจากสารละลายเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่มีลักษณะเป็นสีเหลือง ในขณะที่ไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% และ 5% มีค่า  $b^*$  ลดลง จากการรายงานของ Hajfathalian, Jorjani and Ghelichi (2019) กล่าวว่าผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไขปลาเหลืองไม่พบแนวโน้มที่ชัดเจนต่อค่า  $b^*$  ของไส้กรอกปลา ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงส่งผลต่อค่า  $L^*$  แต่ไม่ส่งผลอย่างชัดเจนต่อค่า  $a^*$  และค่า  $b^*$  ของไส้กรอกปลา ในลักษณะใกล้เคียงกันนี้เกิดกับไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต และเป็นไปได้ว่าการลดลงของค่า  $b^*$  ในไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% และ 5% อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มปริมาณของเจลาตินไฮโดรไลเสตมากขึ้นจึงทำให้ไส้กรอกไก่มีสีที่เข้มมากขึ้นจึงทำให้มีค่า  $b^*$  ลดลง

ตารางที่ 4-11 ค่าสีของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่

สิ่งทดลอง	ค่าสี		
	$L^*$	$a^*$	$b^*$
SGH 0%	$74.63 \pm 0.13^a$	$3.23 \pm 0.01^c$	$17.86 \pm 0.05^b$
SGH 1%	$72.26 \pm 0.04^b$	$3.43 \pm 0.01^b$	$18.53 \pm 0.01^a$
SGH 3%	$71.88 \pm 0.05^c$	$2.19 \pm 0.02^c$	$16.22 \pm 0.11^c$
SGH 5%	$69.98 \pm 0.13^d$	$2.69 \pm 0.05^d$	$16.17 \pm 0.30^c$
SSP 0.3%	$71.71 \pm 0.07^c$	$3.93 \pm 0.00^a$	$18.63 \pm 0.02^a$

SGH 0% คือ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต SGH 1% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% SGH 3% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% SGH 5% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% และ SSP 0.3% คือ ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3%

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ค่า  $a_w$  หรือปริมาณน้ำอิสระเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมและป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการกำหนดอายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของอาหาร เนื่องจากเป็นปัจจัยที่ชี้วัดระดับของปริมาณน้ำต่ำสุดในอาหารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตและใช้ในการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ (ชิดชนก สุขศรีไพศาล, 2559) โดยค่า  $a_w$  ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (ตารางที่ 4-12) พบว่าไส้กรอกไก่มีค่า  $a_w$  แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) แต่จะเห็นว่าไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีค่า  $a_w$  สูงที่สุด เนื่องจากเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ (Jo et al., 2018) จากการช่วยเพิ่มประจุให้กับโมเลกุลของโปรตีนทำให้เพิ่มความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้นจึงทำให้มี  $a_w$  สูง ในขณะที่ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมีค่า  $a_w$  ต่ำที่สุด และจะเห็นได้ว่าการเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตในไส้กรอกไก่มีผลทำให้ค่า  $a_w$  สูงกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตอาจเป็นผลมาจากเจลาตินไฮโดรไลเสตซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดกลุ่มที่มีขั้วเพิ่มมากขึ้น เช่น  $-COOH$  และ  $-NH_2$  (Balti, Bougategf, Ali, Zekri, & Barkia, 2010) ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำได้ทำให้มีความสามารถในการอุ้มน้ำได้มากขึ้นจึงมีผลให้มีค่า  $a_w$  เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามค่า  $a_w$  ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ในลักษณะเดียวกันกับการรายงานของ Herranz et al. (2005) กล่าวว่าการเติมกรดอะมิโนอิสระไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า  $a_w$  ในไส้กรอกหมักแห้ง

ตารางที่ 4-12 ค่า  $a_w$  ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่

สิ่งทดลอง	$a_w^{ns}$
SGH 0%	0.990 ± 0.02
SGH 1%	0.993 ± 0.02
SGH 3%	0.992 ± 0.03
SGH 5%	0.995 ± 0.03
SPP 0.3%	1.003 ± 0.02

SGH 0% คือ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต SGH 1% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% SGH 3% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% SGH 5% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% และ SSP 0.3% คือ ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3%  
ns หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ผลของการวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน

ไฮโดรไลสเสด (ดังตารางที่ 4-13) พบว่าไส้กรอกไก่ทั้ง 5 สิ่งทดลอง มีค่าความแข็ง (Hardness) ค่าพลังงานในการกัด (Gumminess) และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยว (Chewiness) แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) จะเห็นได้ว่าไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเสดในปริมาณ 1% 3% และ 5% มีค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อเพิ่มปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสเสด อาจเป็นผลมาจากสมบัติด้านอนุโมลอิสระของเจลาตินไฮโดรไลสเสดที่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ดังตารางที่ 4-10 ได้แก่ Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Pro, Cys, Trp และ Tyr รวมถึงการมี Asp และ Glu ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีประจุลบที่มีสมบัติการต้านอนุโมลอิสระสูงที่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มกล้ามเนื้อ (Muscle membrane) จากการออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งอาจลดการสูญเสียความชื้นจากการรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Muscle fibres) ทำให้มีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอก (Zakaria & Sarbon, 2018) ที่ทำให้ค่าความแข็งเพิ่มขึ้น รวมถึงค่าพลังงานในการกัดและค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับ Intarasirisawat et al. (2014) ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลสเสดจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบในระดับต่าง ๆ (0–3 กรัมต่อ 100 กรัม) ต่อสมบัติและความเสถียรในการเกิดออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชันจากปลาตุ๊กอูย (*Clarias macrocephalus*) ที่เสริมด้วยไขมันจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบพบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลสเสดมากขึ้น ค่าความแข็ง ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) ค่าการยึดเกาะกันของอาหาร (Cohesiveness) และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวเพิ่มมากขึ้น แต่จะเห็นได้ว่าไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเสดมีค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวน้อยกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเสดอาจอาจเป็นไปได้ว่าเจลาตินไฮโดรไลสเสดซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์จะทำให้เกิดกลุ่มที่มีขั้วเพิ่มมากขึ้น เช่น  $-COOH$  และ  $-NH_2$  (Balti et al., 2010) ที่สามารถจับกับโมเลกุลของน้ำไว้ในโครงสร้างของไส้กรอกไก่ได้มากขึ้นจึงมีผลให้ค่าดังกล่าวลดลง อีกทั้งไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเสด (ตัวอย่างควบคุมเชิงลบ) มีค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวมากกว่าไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (ตัวอย่างควบคุมเชิงบวก) อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) รวมถึงลักษณะเนื้อสัมผัสด้านอื่น ๆ ได้แก่ ค่าการเกาะติดของอาหาร (Adhesiveness) ค่าความยืดหยุ่น และค่าการยึดเกาะกันของอาหาร ถึงแม้ว่าสมบัติของสารประกอบฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้นจากการที่ฟอสเฟตช่วยทำให้โปรตีนแอกโตไมโอซินสามารถแยกตัวออกจากกันเป็นแอกตินและไมโอซินเข้าไปจับหุ้มหัดไขมันไว้และสานกันเป็นตาข่าย (อรรถกร มุนิกานนท์ และ มาลัยวรรณ อารยะสกุล, 2547) ซึ่งช่วยลดการไหลซึมของเจลและไขมันที่ละลาย (Jelly and melted



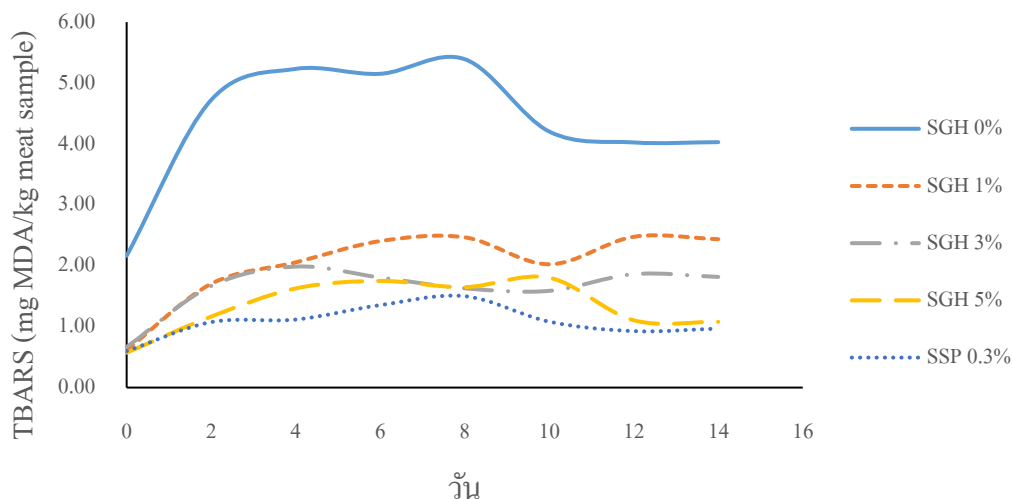
183963776

fat) ออกจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีผลต่อการเพิ่มค่าความแข็ง แต่อย่างไรก็ตามการเติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตในไส้กรอกไก่นั้นไม่สามารถช่วยปรับปรุงความสามารถในการอุ้มน้ำ เนื่องจากความเข้มข้นของเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตที่เติมลงในไส้กรอกไก่อาจเป็นปริมาณที่ไม่เพียงพอสำหรับปรับปรุงโครงสร้างในไส้กรอกให้แข็งแรงมากพอ อีกทั้งอาจเป็นมาจากเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตมีช่วยเพิ่มประจุให้กับโมเลกุลของโปรตีนทำให้เพิ่มความสามารถในการจับกับโมเลกุลของน้ำได้มากขึ้น จึงเป็นผลให้ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตมีค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกััด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวน้อยกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสแต่อย่างใดไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jo et al. (2018) ที่ศึกษาการผลิตไส้กรอกไก่เกลือต่ำเสริมด้วยผงเห็ดหมัณฑ์ในระดับต่าง ๆ (0 - 0.5 กรัมต่อ 100 กรัม) และมีตัวอย่างควบคุมเชิงบวกคือไส้กรอกไก่เกลือต่ำเติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟต 0.3% พบว่าไส้กรอกไก่เกลือต่ำไม่เสริมผงเห็ดหมัณฑ์มีค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกััด ค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยว ค่าความยืดหยุ่น และค่าการยึดเกาะกันของอาหารมากกว่าไส้กรอกไก่เกลือต่ำเติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟต รวมทั้งฟอสเฟตมีความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันผ่านการจับกับไอออนของโลหะ (Jo et al., 2018) อาจทำให้สามารถป้องกันเชื้อหุ้มกล้ามเนื้อจากการออกซิเดชันทำให้รักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มของเส้นใยกล้ามเนื้อจึงทำให้ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตมีค่าลักษณะเนื้อสัมผัสสูง



ค่า TBARS หรือความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์เป็นการวัดผลิตภัณฑ์ขั้นทุติยภูมิของการเกิดการออกซิเดชันของไขมันที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาของไส้กรอก ซึ่งเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้การเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ การออกซิเดชันเกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการแปรรูป โดยการออกซิเดชันของไขมันเกิดจากอนุมูลอิสระจะออกซิไดซ์กรดไขมัน โดยเฉพาะกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนผ่านปฏิกิริยาลูกโซ่ (Jo et al., 2018) รวมถึงการออกซิเดชันของโปรตีนด้วยอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบจะตัดแปลงพันธะโควาเลนต์ของโปรตีน (Fallowo et al., 2014) นำไปสู่การเกิดกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์และกลิ่นหืนทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและก่อให้เกิดองค์ประกอบที่เป็นสารพิษ (Jo et al., 2018) การตรวจวัดค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตเป็นเวลา 14 วัน ดังภาพที่ 4-9 โดยไส้กรอกไก่ทั้ง 5 สิ่งทดลอง พบว่าค่า TBARS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 0 – 8 ในวันที่ 0 พบค่า TBARS 0.60 – 2.16 mg MDA/kg meat sample ซึ่งบ่งชี้ว่าการเกิดออกซิเดชันของไขมันเกิดขึ้นระหว่างการแปรรูปและการปรุงสุกของไส้กรอก (Intarasirisawat et al., 2014) เนื่องจากไมโอโกลบินซึ่งเป็นโปรตีนฮีมในเนื้อสัตว์จะสูญเสียสภาพในระหว่างกระบวนการให้ความร้อน จากนั้นเหล็กไม่ได้อยู่ในรูปของฮีม (Nonheme iron) จะถูกปล่อยออกจากฮีมของไมโอโกลบินและสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลซึ่งเป็นหนึ่งในอนุมูลอิสระผ่านปฏิกิริยาเฟนต์ันหรือปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วของสารประกอบอินทรีย์ซึ่งส่งเสริมการเกิดออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Jo et al., 2018) จึงทำให้ค่า TBARS เพิ่มขึ้น หลังจากวันที่ 8 ค่า TBARS มีแนวโน้มค่อย ๆ ลดลงจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการเก็บรักษาอาจเกิดจากการสูญเสียผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันขั้นทุติยภูมิที่ระเหยได้ และผลิตภัณฑ์เหล่านี้อาจทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน โปรตีนและเปปไทด์ด้วยการสร้าง Schiff bases) ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีพันธะคู่ (Hajfathalian et al., 2019; Intarasirisawat et al., 2014) จะเห็นได้ว่าตั้งแต่วันที่ 0 - 14 ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมีค่า TBARS สูงกว่าไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตในปริมาณ 1% 3% และ 5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เนื่องจากเจลาตินไฮโดรไลเสตอาจทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Zakaria & Sarbon, 2018) โดยส่วนใหญ่เปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระอาจจะมีลักษณะ โครงสร้างร่วมกันบางอย่าง รวมถึงความยาวของเปปไทด์อิสระสายสั้น ๆ (เช่น กรดอะมิโน 3 - 16 ตัว) และน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 200 - 1800 Da ซึ่งมักพบกรดอะมิโนอิสระที่ไม่ชอบน้ำในลำดับของกรดอะมิโน เปปไทด์จึงมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในระหว่างปฏิกิริยาการออกซิเดชันของไขมัน ออกซิเจนที่มีในองค์ประกอบและการจับกับโลหะ ซึ่งเปปไทด์ที่อยู่ระหว่างผิวของน้ำมันหรือไขมันจะสามารถป้องกันไม่ให้ไอออนของโลหะเข้ามาทำปฏิกิริยาได้โดยตรง (Nikoo & Benjakul, 2015) ดังภาพที่

2-9 ทั้งนี้แม้ว่าจะยังไม่มีความเห็นเป็นเอกฉันท์เกี่ยวกับกลไกการทำงานที่แน่นอนของโปรตีนไฮโดรไลสเตเพื่อแสดงสมบัติในการป้องกันการเกิดออกซิเดชัน แต่ก็มี การยอมรับอย่างกว้างขวางว่าขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ ลำดับและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลสเตเป็นตัวกำหนดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Hajfathalian et al., 2019) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Intarasirisawat et al. (2014) ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลสเตจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบในระดับต่าง ๆ (0 – 3 กรัมต่อ 100 กรัม) ต่อสมบัติและความเสถียรในการเกิดออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชันจากปลาชุกอูย (*Clarias macrocephalus*) ที่เสริมด้วยไขมันจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบพบว่า ไส้กรอกที่ไม่เสริมโปรตีนไฮโดรไลสเตมีค่า TBARS สูงกว่าไส้กรอกที่เสริมโปรตีนไฮโดรไลสเต และเมื่อเสริมโปรตีนไฮโดรไลสเตมากขึ้นจะยังมีค่า TBARS ลดลง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเจลาตินไฮโดรไลสเตสามารถชะลอการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในไส้กรอกอิมัลชันได้ในระดับหนึ่ง อีกทั้งไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีค่า TBARS ต่ำกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Jo et al. (2018) ศึกษาผลิตไส้กรอกไก่เกลือต่ำเสริมด้วยผงเห็ดเหิมันต์ในระดับต่าง ๆ (0 - 0.5 กรัมต่อ 100 กรัม) และมีตัวอย่างควบคุมเชิงบวกคือไส้กรอกไก่เกลือต่ำเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% รายงานว่าฟอสเฟตสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันผ่านการจับกับไอออนของโลหะ (Jo et al., 2018) จึงอาจทำให้มีค่า TBARS ต่ำกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเต



ภาพที่ 4-9 ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตเป็นระยะเวลา 14 วัน ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% (SGH 3%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (SGH 5%) และไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%)

การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์บ่งบอกถึงการเน่าเสียและการไม่เป็นที่ยอมรับผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ (Ketnawa, Benjakul, Martínez-Alvarez, & Rawdkuen, 2016) ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ปรึกษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากผ่านกระบวนการผลิตไส้กรอกเป็นระยะเวลา 1 วัน (ตั้งตารางที่ 4-14) พบว่าไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% และ 5% มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% และเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดอาจเป็นผลมาจากเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีคุณสมบัติช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำจึงทำให้มีค่า  $a_w$  มากกว่าสิ่งทดลองอื่น (ตารางที่ 4-11) ซึ่ง  $a_w$  มีบทบาทสำคัญที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเจริญเติบโตในวัตถุดิบอาหาร (Jin, Choi, Lee, Lee, & Hur, 2016) ในขณะที่การเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตในปริมาณมากขึ้นมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มากขึ้น เนื่องจากเปปไทด์บางชนิดมีความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ โดยปัจจัยที่อาจจะเกี่ยวข้องกับความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ของโปรตีน



ไฮโดรไลเซตหรือเปปไทด์ ได้แก่ องค์ประกอบ ลำดับ น้ำหนักโมเลกุลของกรดอะมิโนและชนิดของแบคทีเรีย (Ketnawa et al., 2016) ซึ่งคุณสมบัติของเปปไทด์ที่เป็นแอมฟิพาติก (Amphipathic) ประกอบด้วยประจุบวกและความเป็น Hydrophobic จะทำลายจุลินทรีย์โดยการทำปฏิกิริยา (Electrostatic interaction) กับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยไขมันชนิดที่เป็นประจุลบแบบไม่จำเพาะทำให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด อีกทั้งโปรตีนไฮโดรไลเซตยังมีกลไกอีกหลายรูปแบบในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เช่น สามารถทำให้เกิดรูรั่วที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Barrel stave หรือ Toroidal pore models) หรือสะสมบนเยื่อหุ้มเซลล์แล้วทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์บางลงจนเกิด Membrane dissolution (Carpet model) (Ketnawa et al., 2016; สกาวรัตน์ กันทะวงศ์, 2558) ซึ่งการเพิ่มปริมาณเจลาตินไฮโดรไลเซตในไส้กรอกไก่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Intarasirisawat et al. (2014) ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบในระดับต่าง ๆ (0 - 3 กรัมต่อ 100 กรัม) ต่อสมบัติและความเสถียรในการเกิดออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชันจากปลาชุกอูย (*Clarias macrocephalus*) ที่เสริมด้วยไขมันจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ จะเห็นได้ว่าในวันที่ 0 ไส้กรอกอิมัลชันที่มีโปรตีนไฮโดรไลเซต 3 กรัมต่อ 100 กรัมมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มากกว่าสิ่งทดลองอื่น อีกทั้งเจลาตินไฮโดรไลเซตจากเห้าไก่มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ดังตารางที่ 4-10 ได้แก่ Ala, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Pro, Cys, Trp และ Tyr จากองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งหมดมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำที่อาจเป็นส่วนที่มากพอที่จะส่งผลกระทบต่อกรยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และด้วยเหตุนี้ไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเซต 3% และ 5% จึงที่จะยืดอายุการเก็บรักษาได้นานที่สุด



ตารางที่ 4-14 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส

สิ่งทดลอง	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)
SGH 0%	3.98 ± 0.07 <sup>a</sup>
SGH 1%	3.86 ± 0.07 <sup>a</sup>
SGH 3%	2.96 ± 0.09 <sup>b</sup>
SGH 5%	3.29 ± 0.41 <sup>b</sup>
SSP 0.3%	3.99 ± 0.07 <sup>a</sup>

SGH 0% คือ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส SGH 1% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 1% SGH 3% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 3% SGH 5% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส 5% และ SSP 0.3% คือ ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3%

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ผลการทดลองคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลส (ดังตารางที่ 4-15) โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนความชอบมากที่สุดเท่ากับ 9 คะแนน และไม่ชอบมากที่สุดเท่ากับ 1 คะแนน พบว่าคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ได้แก่ ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมทั้ง 5 สิ่งทดลองแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) โดยกลิ่นและเนื้อสัมผัสมีคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 5 - 6 คะแนน หมายถึงชอบเฉย ๆ ถึงชอบเล็กน้อย ในขณะที่ลักษณะปรากฏ สี รสชาติ และความชอบโดยรวมมีคะแนนความชอบอยู่ในช่วง 6 - 7 คะแนน หมายถึง ชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานวิจัยของ Jo et al. (2018) ผลดีไส้กรอกไก่เกลือต่ำเสริมด้วยผงเห็ดเหมาตันในระดับต่าง ๆ (0 - 0.5 กรัมต่อ 100 กรัม) และมีตัวอย่างควบคุมเชิงบวกคือไส้กรอกไก่เกลือต่ำเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% รายงานว่าไส้กรอกไก่เกลือต่ำเสริมด้วยผงเห็ดเหมาตันในระดับต่าง ๆ และการเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีคะแนนความชอบของสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม (อยู่ในช่วง 5 - 6 คะแนน) แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ ) สำหรับการเติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตในไส้กรอกไก่ไม่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส ซึ่งจากการที่เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตมีสมบัติช่วยปรับปรุงความสามารถในการอุ้มน้ำอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตที่เติมลงในไส้กรอกไก่อาจเป็นปริมาณที่ไม่เพียงพอสำหรับปรับปรุงความสามารถในการอุ้มน้ำที่จะทำให้ผู้บริโภครับรู้ถึงความฉ่ำน้ำจึงทำให้ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตไม่มีผลต่อ

คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส อีกทั้งงานวิจัยของ Intarasirisawat et al. (2014) ศึกษาผลของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบในระดับต่าง ๆ (0 - 3 กรัมต่อ 100 กรัม) ต่อสมบัติและความเสถียรในการเกิดออกซิเดชันของไส้กรอกอิมัลชันจากปลาชุกอูย (*Clarias macrocephalus*) ที่เสริมด้วยไขมันจากไข่ปลาทูน่าพันธุ์ท้องแถบ รายงานว่าในวันที่ 0 ลักษณะปรากฏ สี กลิ่น และความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้สารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ จากธรรมชาติ เช่น โปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ปลาใน (3 กรัมต่อ 100 กรัม) (Hajfathalian et al., 2019) เครื่องเทศไทม์ (Thyme) และ โรสแมรี่ (Rosemary) (0 - 0.2 กรัมต่อ 100 กรัม) (Jin et al., 2016) ไม่มีผลต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกจากภาพที่ 4-10 ไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตทั้ง 5 สิ่งทดลอง แสดงให้เห็นว่าไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตมีลักษณะปรากฏที่แตกต่างจากสิ่งทดลองอื่นอย่างเห็นได้ชัดโดยมีลักษณะปรากฏไม่เป็นเนื้อเดียวกัน ในขณะที่ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตในปริมาณที่มากขึ้นปรากฏแนวโน้มน้ำที่มีลักษณะเรียบเนียนเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้นเนื่องจากเจลาตินไฮโดรไลเสตมีสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ เช่น ความสามารถในการละลายซึ่งเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญในการส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ด้านอื่น ๆ เช่น สมบัติของอิมัลชัน (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรฉัตร ศรีทองแท้, 2557) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นสารลดแรงตึงผิว (Surface-active materials) และสนับสนุนสมบัติของอิมัลชันชนิดน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water emulsion) เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตมีกลุ่มที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ และมีประจุ (Jridi et al., 2014) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตมีการจัดเรียงส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคของน้ำมันและหันส่วนที่ชอบน้ำเข้าหาวัฏภาคน้ำทำให้เกิดเป็นสภาพอิมัลชันขึ้น สมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะสัมพันธ์กับสมบัติระหว่างพื้นผิว (Interfacial properties) หรือความสามารถในการลดแรงตึงผิวระหว่างส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำในระบบอาหาร (เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ และบูรฉัตร ศรีทองแท้, 2557) จึงทำให้ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสตในปริมาณที่มากขึ้นปรากฏแนวโน้มน้ำที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น ในลักษณะเดียวกับกับงานวิจัยของ Zakaria and Sarbon (2018) ศึกษาสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และความเสถียรในการออกซิเดชันของไส้กรอกปลาอิมัลชันที่ได้รับอิทธิพลจากโปรตีนไฮโดรไลเสตของปลาช่อน (*Channa striata*) ในระดับต่าง ๆ (0 - 3 กรัมต่อ 100 กรัม) รายงานโครงสร้างจุลภาคของไส้กรอกอิมัลชันปลา พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตส่งผลให้ก้อนไขมันมีขนาดเล็กลงและการกระจายตัวที่สม่ำเสมอมากขึ้นอาจเนื่องมาจากสมบัติของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งจะก่อตัวเป็นฟิล์มบาง ๆ ที่เชื่อมต่อกันรอบ ๆ ก้อนไขมัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตสามารถเคลื่อนย้ายไปรวมตัวอยู่ระหว่างพื้นผิวของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จึงทำให้เกิดอิมัลชันที่มีเสถียรภาพ (Intarasirisawat et al., 2014) แต่



183963776

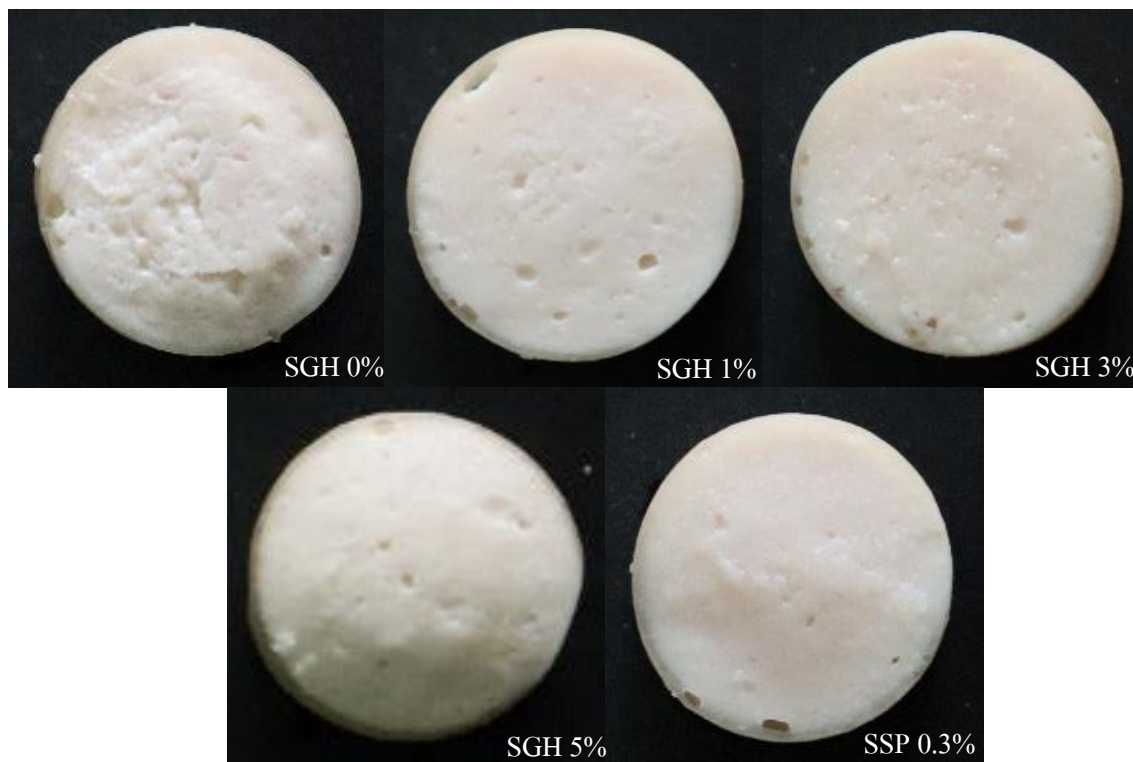
BUU-1Thesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

อย่างไรก็ตามไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟต 0.3% มีลักษณะปรากฏเรียบเนียนเป็นเนื้อเดียวกันมากที่สุด เนื่องจากเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟตมีส่วนช่วยเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำ (Jo et al., 2018) โดยสารประกอบฟอสเฟตจะช่วยในการสกัดโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ซึ่งประกอบไปด้วยแอกตินและไมโอซินรวมตัวกัน เรียกว่าแอกโตไมโอซินออกมาได้มากขึ้น โดยฟอสเฟตจะช่วยทำให้โปรตีนแอกโตไมโอซินสามารถแยกตัวออกจากกันเป็นแอกตินและไมโอซินเข้าไปจับหุ้มหยดไขมันไว้และเกิดเป็นโครงสร้างร่างแห ในช่องว่างของร่างแหนอกจากไขมันยังมีน้ำแทรกอยู่ในโครงสร้างซึ่งจะไม่ไหลออกมาทำให้เกิดเป็นระบบอิมัลชันที่มีความคงตัว (อรรถกร มุณีกานนท์ และมาลัยวรรณ อารยะสกุล, 2547) จึงทำให้ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟต 0.3% มีลักษณะปรากฏเรียบเนียนอีกทั้งยังสังเกตได้ถึงความฉ่ำน้ำของไส้กรอกมากกว่าสิ่งทดลองอื่น



183983776





ภาพที่ 4-10 ไส้กรอกไก่ 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% (SGH 3%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (SGH 5%) และไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%)

**หมายเหตุ** ภาพแสดงลักษณะทางกายภาพของไส้กรอกไก่ถ่ายด้วยกล้องดิจิทัล Canon EOS M50 Lens Kit 15-45 mm.

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### สรุปผลการวิจัย

ผลของขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบพบว่า เท้าไก่เมื่อนำมาผ่านกระบวนการสกัดเป็นเจลาตินมีผลทำให้เจลาตินมีปริมาณ โปรตีน (84.42%) และคอลลาเจน (27.03%) เพิ่มมากขึ้น แต่มีปริมาณไขมัน (0.72%) และเถ้า (0.52%) ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับเท้าไก่

ผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ โดยศึกษาชนิดของเอนไซม์ ได้แก่ ทริปซิน เปปซิน อัลคาเลส และปาเปน พบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีค่ากิจกรรมแตกต่างกัน และเมื่อกำหนดให้เอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีค่ากิจกรรมเท่ากันทำให้ผลการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์จากการศึกษาจนพบศาสตร์พบว่า เปปซินมีค่า  $V_{max}$  สูง (1.79 มิลลิโมลาร์ต่อวินาที) และ  $K_m$  ต่ำ (4.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) รวมถึงราคา (0.12 บาทต่อมิลลิกรัม) ของเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่

ผลของปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response surface methodology) ออกแบบการทดลองแบบ Central composite design โดยศึกษาปริมาณเปปซิน (0.02 - 5% w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลส (2 - 8 ชั่วโมง) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยมีความสัมพันธ์กับปริมาณ โปรตีน ปริมาณ โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS โดยสภาวะที่มีปริมาณ เปปซิน 2.08 %w/w ร่วมกับระยะเวลา 4.48 ชั่วโมง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (0.0430  $\mu\text{mole TE/mg protein}$ ) ปริมาณ โปรตีนต่ำ (28.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และปริมาณ โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำต่ำ (58.03 Bound BPB,  $\mu\text{g}$ )

ผลของปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่ โดยศึกษา 5 ปัจจัย ได้แก่ ปริมาณเจลาตินไฮโดรไลส 4 ระดับ (0%, 1%, 3% และ 5%) และตัวอย่างควบคุมเชิงบวก (เตตระโซเดียมไฟโรฟอสเฟต 0.3%) พบว่าไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสในปริมาณที่มากขึ้น ส่งผลให้มีค่า TBARS และลักษณะเนื้อสัมผัสด้านค่าความแข็ง ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีผลให้มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและค่าสี ( $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$ ) ลดลง ในขณะที่การเสริมเจลาตินไฮโดรไลสไม่ผลมีต่อค่า  $a_w$  ลักษณะเนื้อสัมผัสด้านค่าการเกาะติดของอาหาร ค่าความยืดหยุ่น และค่าการยึดเกาะกัน และคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหาระดับการย่อยของเจลาตินไฮโดรไลเสตเพื่อลดระยะเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ รวมถึงราคาของเอนไซม์
2. ควรศึกษาขนาดโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลเสตเพื่ออธิบายถึงความสามารถในด้านการต้านอนุมูลอิสระ ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น
3. ควรศึกษาหาสมบัติเชิงหน้าที่ของไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต เช่น สมบัติอิมัลชัน ความสามารถในการอุ้มน้ำ เป็นต้น
4. นำเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำสลัด ซุปไก่สกัด โจ๊กรสไก่ เป็นต้น



183963776

## บรรณานุกรม

- เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย และบุรฉัตร ศรีทองแท้. (2557). การดัดแปรสมบัติของโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสและการประยุกต์ใช้. วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 42(2), 274-288.
- จตุรงค์ จงเจริญ. (2555). การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์และไฮดรอกซีเมทิลเฟอร์พีวาลดีไฮด์พร้อมกันในตัวอย่างน้ำมันพร้อมดื่มด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง. ปรินญาวิทยาสาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเคมี, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- จิตติมา เจริญพานิช. (2553). เอนไซม์วิทยา. กรุงเทพฯ: โอ.เอส.พรีนติ้ง เฮ้าส์.
- จิรนาถ ทิพย์รักษา. (2549). การศึกษาสภาวะการย่อยโปรตีนในการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบปรุงแต่งอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสยาม.
- ชิดชนก สุขศรีไพศาล. (2559). การผลิตและเก็บรักษาถั่วเหลืองหมักไขมันพร้อมบริโภครวมโดยใช้เทคโนโลยีเฮอร์เซลล์. วิทยาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.
- ดาริกา อวะภาค, นพรัตน์ มะเห และคลฤดี พิชัยรัตน์. (2556). การหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากสาหร่ายพมนางโดยใช้วิธีปั่นผิวตอบสนอง. วารสารวิทยาศาสตร์ มข., 41(2), 414-430.
- ชนวัฒน์ มาปายะ, พีรภรณ์ เครือปลา, นภาพร ดีสนาม และสุขพัฒน์ ใต้เวชศาสตร์. (2557). การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไก่เสริมเส้นใยสับปะรด. นเรศวรวิจัย, ครั้งที่ 12, 279-289.
- นพพล เล็กสวัสดิ์. (2559). เอนไซม์และจลนพลศาสตร์เอนไซม์. เชียงใหม่: นพบุรีการพิมพ์.
- บังอร วงศ์รักษ์ และศศิลักษณ์ ปิยะสุวรรณ. (2549). ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของผักพื้นบ้าน. เกษศา สตรบัณฑิต, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหิดล.
- เบญจมาศ ไชยลาภ และชเนศวร นวลใย. (2559). ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของสารกลุ่มแซนโทนโดยวิธีทางเคมีไฟฟ้า. สาขาเคมีอินทรีย์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์.
- ประสิทธิ์ สุจิรวรกุล และบุษกร สิริวัฒนเกตุ. (2558). ขึ้นแท่นผู้นำธุรกิจไก่และธุรกิจสุกรแบบครบวงจรรายใหญ่ในประเทศไทย. Retrieved from ไทย ฟู้ดส์ กรุ๊ป:  
<http://tfg.listedcompany.com/misc/analyst-research/20150729-tfg-bls-th.pdf>



- ปราณี อ่านเปรื่อง. (2558). เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปวีณา พันทอง. (2559). การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC โดยใช้ อุปกรณ์ตรวจวัดแบบกระดาษ. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเคมีศึกษา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ปิยะนันท์ ชื่อเสียง. (2554). โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลและปลากระพง: สมบัติการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอชอี. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปิยะพร เนียมมณี. (2559). การตรวจสอบคอลลาเจนในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพด้วยเทคนิคสเปกโทรสโกปีอินฟราเรดย่านใกล้. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร, คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- พนัญฐ กิตติพัฒน์บวร. (2559). ผลของระยะเวลาในการทำให้หนังฟองตัวต่อคุณลักษณะและสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาทราย. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร, คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน, มหาวิทยาลัยทักษิณ.
- พรพิมล ม่วงไทย. (2554). การศึกษาการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรออกซิเดชันในเนื้อไก่และผลิตภัณฑ์แปรรูปจากไก่. คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- มนต์สรวง ยางทอง. (2557). การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในปลา. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 32(2), 66-75.
- วันชัย เกียรติพิมล. (2545). การผลิตและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดจากปลาจากวัสดุเศษเหลือโรงงานแปรรูปอาหารทะเลเป็นสารตั้งต้นการกินอาหารของปลากดเหลือง (*Mystus nemurus* Cuv. & Val.). วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศิริธร ศิริอมรพรรณ. (2557). สารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร. กรุงเทพฯ: พิมพ์โอเดียนส์ไตร์.
- ศุภรจิตต์ เอี่ยมมณเฑียร. (2551). การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไบบาสุบ. ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สกาวรัตน์ กันทะวงศ์. (2558). Antimicrobial Peptides: ทางเลือกใหม่ในการรักษาโรคมะเร็ง? ศรีนครินทร์เวชสาร, 30(2), 191-199.
- สามารถ ยานวงษ์. (2557). ผลของน้ำมันหอมระเหยและสารเชื่อมขวางต่อสมบัติของฟิล์มเจลาตินกินได้จากหนังปลา. วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาการและวิศวกรรมพอลิเมอร์, คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.

- สามารถ สายอุต. (2561). การประยุกต์เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารกลุ่มโปรตีน. วิทยาศาสตร์บูรพา, ปีที่ 23(ฉบับที่ 3), 1234-1252.
- สายใจ จริยาเอกภาส. (2553). การใช้เส้นใยสับประรดเสริมในไส้กรอกไก่. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก.
- สินีนาด สุขไกว. (2555). การผลิตเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสำหรับการพัฒนาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- เสาวภา จันทร์เทศ. (2557). โปรตีนไฮโดรไลสชนิดผงแห้งจากเนื้ออกไก่ด้วยปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะด้วยเอนไซม์โปรติเอสเพื่อเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มต้นแบบ. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- หทัยรัตน์ ปิ่นแก้ว, สุธิ วังเต็อย, กุรอซียะห์ ยามิรุเต็ง และมณชัย เดชสังกรานนท์. (2549). การผลิตเจลาตินจากเกล็ดปลาที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปซูริมิ และการนำไปใช้ประโยชน์. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนดุสิต.
- อรรธกร มุณีกันนท์ และมาลัยวรรณ อารยะสกุล. (2547). บทบาทของฟอสเฟตและสตาร์ชตัดแปรในการผลิตไส้กรอกที่ทำจากเนื้อหมูผ่านการแช่แข็ง. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42 (หน้า 354-361). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อรวรรณ กริ่งเกษมศรี. (2555). ปริมาณสารโพลีฟีนอล และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเปลือกและเมล็ดของผลไม้ไทย. วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- โอภา วัชรคุปต์, ปรีชา บุญจุง, จันทรา บุญยะรัตน์ และมาลีรักษ์ อัดต์สินทอง. (2550). สารต้านอนุมูลอิสระ *Radical Scavenging Agent*. กรุงเทพฯ: นิเวศมิตรการพิมพ์.
- Abedinia, A., Ariffin, F., Huda, N. & Nafchi, A. M. (2017). Extraction and characterization of gelatin from the feet of Pekin duck (*Anas platyrhynchos domestica*) as affected by acid, alkaline, and enzyme pretreatment. *Biological Macromolecules*, 98, 586-594.
- Ahn, J., Cao, M.-J., Yu, Y. Q. & Engen, J. R. (2013). Accessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834(6), 1222-1229.
- Al-Shamsi, K. A., Mudgil, P., Hassan, H. M. & Maqsood, S. (2018). Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential

- in in vitro and in food model systems. *Dairy Science*, 101(1), 47-60.
- Almeida, P., Silva, J. R., Lannes, S., Farias, T. M. B. & Santana, J. (2013). Quality assurance and economical feasibility of an innovative product obtained from a byproduct of the meat industry in Brazil. *African Journal of Business Management*, 7, 2745-2756.
- Amissah, J. (2012). *Bioactive properties of salmon skin protein hydrolysates*. Master's thesis, Bioresource Engineering, Faculty of Science, McGill University.
- AOAC. (2000). *Association of official analytical chemists, official methods of analysis* (17<sup>th</sup> ed.). Gaithersburg, Md.: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC Official method 994.12. (2012). Official methods of analysis of the AOAC international no. 994.12. *Official journal of the European Communities, Chapter 4*, 18-19.
- Balti, R., Bougatef, A., Ali, N., Zekri, D. & Barkia, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the science of food and agriculture*, 90, 2006-2014.
- Benjakul, S. & Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9), 3423-3430.
- Bernardini, D. R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M. & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307.
- Bhattacharjee, A. & Bansal, M. (2005). Collagen structure: the Madras triple helix and the current scenario. *IUBMB life*, 57(3), 161-172.
- Bhattacharyya, D. (2011). A comparative study on the antioxidant and antimicrobial properties of garlic and coriander on chicken sausage. *International Journal of Meat Science*, 1(2), 108-116.
- Bumrungsart, N. & Duangmal, K. (2019). Optimization of enzymatic hydrolysis condition for producing black gram bean (*Vigna mungo*) hydrolysate with high antioxidant activity. *Food and Applied Bioscience Journal*, 7(3), 105-117.
- Butré, C. I., Sforza, S., Gruppen, H. & Wierenga, P. A. (2014). Introducing enzyme selectivity: a quantitative parameter to describe enzymatic protein hydrolysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(24), 5827-5841.

- Cai, L., Wu, X., Zhang, Y., Li, X., Ma, S. & Li, J. (2015). Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Functional Foods*, *16*, 234-242.
- Canty-Laird, E. & Kadler, K. (2005). Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *Cell Science*, *118*, 1341-1353.
- Cavalheiro, C., Lüdtke, F., Stefanello, F., Kubota, E., Terra, N. & Fries, L. (2014). Replacement of mechanically deboned chicken meat with its protein hydrolysate in mortadella-type sausages. *Food Science and Technology (Campinas)*, *34*, 478-484.
- Centenaro, G. S., Centenaro, M. S. & Hernandez, C. P. (2011). Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Food Science and Technology*, *3*(4), 280-288.
- Chakka, A. K., Muhammed, A., Sakhare, P. Z. & Bhaskar, N. (2017). Poultry processing waste as an alternative source for mammalian gelatin: extraction and characterization of gelatin from chicken feet using food grade acids. *Waste and Biomass Valorization*, *8*(8), 2583-2593.
- Chelh, I., Gatellier, P. & Santé-Lhoutellier, V. (2006). Technical note: A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Science*, *74*(4), 681-683.
- Chen, L., Ma, L., Zhou, M., Liu, Y. & Zhang, Y. (2014). Effects of pressure on gelatinization of collagen and properties of extracted gelatins. *Food Hydrocolloids*, *36*, 316-322.
- Chen, T., Hou, H., Lu, J., Zhang, K. & Li, B. (2016). Protective effect of gelatin and gelatin hydrolysate from salmon skin on UV irradiation-induced photoaging of mice skin. *Journal of Ocean University of China*, *15*(4), 711-718. doi:10.1007/s11802-016-2953-5
- Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J. & Brandelli, A. (2014). Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. *Peptides*, *61*, 48-55.
- Cui, C., Zhao, M., Yuan, B., Zhang, Y. & Ren, J. (2013). Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates. *Food Science*, *78*(12), C1871-C1877.
- Deng, Y., Butré, C. I. & Wierenga, P. A. (2018). Influence of substrate concentration on the extent of protein enzymatic hydrolysis. *International Dairy Journal*, *86*, 39-48.
- Dey, S. S. & Dora, K. C. (2014). Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Food Science and*

- Technology*, 51(3), 449-457.
- Du, L. & Betti, M. (2016). Chicken collagen hydrolysate cryoprotection of natural actomyosin: Mechanism studies during freeze-thaw cycles and simulated digestion. *Food Chemistry*, 211, 791-802.
- Dybka-Stępień, K. & Walczak, P. (2009). Collagen hydrolysates as a new diet supplement. *Food Chemistry and Biotechnology*, 73, 83-92.
- Eisenthal, R., Danson, M. J. & Hough, D. W. (2007). Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends in Biotechnology*, 25(6), 247-249.
- Ekpenyong, M., Asitok, A., Odey, A. & Antai, S. (2016). Production and activity kinetics of gelatinase by *Serratia* sp.SLO3. *Nigerian Journal of Biopesticides*, 1, 70-82.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O. & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.
- Fennema, O. R. (1996). *Food chemistry* (3<sup>rd</sup> ed.). New York: Marcel Dekker.
- Garbowska, B., Radzimska, M. & Jakubowska, D. (2013). Influence of the origin on selected determinants of the quality of pork meat products. *Czech J. Food Sci.*, 31(6), 547-552.
- Ghassem, M., Fern, S. S., Said, M., Ali, Z. M., Ibrahim, S. & Babji, A. S. (2014). Kinetic characterization of *Channa striatus* muscle sarcoplasmic and myofibrillar protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 51(3), 467-475.
- Grommuang, F. (2007). *Extraction and properties of gelatin from chicken feet*. Master's thesis, Food Technology, Faculty of Science, Soongkla University.
- Hajfathalian, M., Jorjani, S. & Ghelichi, S. (2019). Characterization of fish sausage manufactured with combination of sunflower oil and fish oil stabilized with fish roe protein hydrolysates. *Food Science and Technology*, 57.
- Hamzeh, A., Benjakul, S. & Senphan, T. (2016). Comparative study on antioxidant activity of hydrolysates from splendid squid (*Ioligo formosana*) gelatin and protein isolate prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Science and Technology*, 53(9), 3615-3623.
- Hashim, P., Ridzwan, M. S. M. & Baker, J. (2014). Isolation and characterization of collagen from chicken feet. *Bioengineering and Life Sciences*, 8(3).

- Helkar, P., Sahoo, A. & Patil, N. (2016). Review: Food industry by-products used as a functional food ingredients. *International Journal of Waste Resources*, 6(3), 1-6.
- Hema, G. S., Joshy, C. G., Shyni, K., Chatterjee, N. S., Ninan, G. & Mathew, S. (2017). Optimization of process parameters for the production of collagen peptides from fish skin (*Epinephelus malabaricus*) using response surface methodology and its characterization. *Food Science and Technology*, 54(2), 488-496.
- Herranz, B., de la Hoz, L., Hierro, E., Fernandez, M. & Ordonez, J. A. (2005). Improvement of the sensory properties of dry-fermented sausages by the addition of free amino acids. *Food Chemistry*, 91(4), 673-682.
- Hou, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, G. & Wu, G. (2017). Protein hydrolysates in animal nutrition: Industrial production, bioactive peptides, and functional significance. *Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 24.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135(4), 3039-3048.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Wu, J. (2014). Effects of skipjack roe protein hydrolysate on properties and oxidative stability of fish emulsion sausage. *Food Science and Technology*, 58(1), 280-286.
- Iwai, K., Hasegawa, T., Taguchi, Y., Morimatsu, F., Sato, K., Nakamura, Y., Higashi, A., Kido, Y., Nakabo, Y. & Ohtsuki, K. (2005). Identification of food-derived collagen peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(16), 6531-6536. doi:10.1021/jf050206p
- Jahanbani, R., Ghaffari, M., Vahdati, K., Salami, M., Khalesi, M., Sheibani, N. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2018). Kinetics study of protein hydrolysis and inhibition of angiotensin converting enzyme by peptides hydrolysate extracted from walnut. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 24(1), 77-85.
- Jarukamjorn, K., Sinthorn, W. & Pimson, C. (2014). The relation of oxidative stress and hypercholesterolemia. *Thai Journal of Toxicology*, 29(1-2).
- Jayasingh, P. & Cornforth, D. P. (2004). Comparison of antioxidant effects of milk mineral, butylated hydroxytoluene and sodium tripolyphosphate in raw and cooked ground pork.

*Meat Science*, 66(1), 83-89.

- Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K. & Bawa, A. S. (2012). Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Food Science and Technology*, 49(3), 278-293.
- Jin, S.-K., Hwang, J.-W., Moon, S., Choi, Y.-J., Kim, G.-D., Jung, E. & Yang, H.-S. (2014). The effects of mechanically deboned chicken hydrolysates on the characteristics of imitation crab stick. *Korean journal for food science of animal resources*, 34.
- Jin, S. K., Choi, J. S., Lee, S. J., Lee, S. Y. & Hur, S. J. (2016). Effect of thyme and rosemary on the quality characteristics, shelf-life, and residual nitrite content of sausages during cold storage. *Korean journal for food science of animal resources*, 36(5), 656.
- Jo, K., Lee, J. & Jung, S. (2018). Quality characteristics of low-salt chicken sausage supplemented with a winter mushroom powder. *Korean journal for food science of animal resources*, 38(4), 768.
- Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M. & Souissi, N. (2014). Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed research international*, 2014.
- Karami, Z., Peighambaroust, S. H., Hesari, J. & Akbari-Adergani, B. (2019). Response surface methodology to optimize hydrolysis parameters in production of antioxidant peptides from wheat germ protein by alcalase digestion and identification of antioxidant peptides by LC-MS/MS. *Agricultural Science and Technology*, 21(4), 829-844.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O. & Rawdkuen, S. (2016). Physical, chemical, and microbiological properties of fish tofu containing shrimp hydrolysate. *Fisheries Science*, 82(2), 379-389.
- Kouguchi, T., Zhang, Y., Sato, M., Takahata, Y. & Morimatsu, F. (2012). Vasoprotective effect of foods as treatments: Chicken collagen hydrolysate. In *Atherogenesis: InTech*.
- Lasekan, A., Bakar, A. F. & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources. *Waste Management*, 33(3), 552-565.
- Lee, S.-J., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Oh, H.-J., Cheong, S.-H., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Lee, S. M. & Park, P.-J. (2010). Purification and characterisation of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysates of duck processing by-products. *Food Chemistry*, 123(2), 216-220.

- Lee, S.-J., Kim, K. H., Kim, Y.-S., Kim, E.-K., Hwang, J.-W., Lim, B. O., Moon, S.-H., Jeon, B.-T., Jeon, Y.-J., Ahn, C.-B. & Park, P.-J. (2012). Biological activity from the gelatin hydrolysates of duck skin by-products. *Process Biochemistry*, 47(7), 1150-1154.
- Leon, M., Garcia, A. N., Marcilla, A., Martinez-Castellanos, I., Navarro, R. & Catala, L. (2017). Thermochemical conversion of animal by-products and rendering products. *Waste Management*.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102(4), 1135-1143.
- Li, X.-R., Chi, C.-F., Li, L. & Wang, B. (2017). Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) Cartilage. *Marine Drugs*, 15(3), 61.
- Liu, D. C., Lin, Y. K. & Chen, M. T. (2001). Optimum condition of extracting collagen from chicken feet and its characteristics. *Asian-Australas J Anim Sci*, 14(11), 1638-1644.
- Liu, H., Li, Y., Diao, X., Kong, B. & Liu, Q. (2018). Effect of porcine bone protein hydrolysates on the emulsifying and oxidative stability of oil-in-water emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 538, 757-764.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S. & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atheroscler*, 15(5), 218-227.
- Melanie, H., Susilowati, A., Iskandar, J. M. & Laelatunur, M. (2015). Fat reduction in improving the quality of chicken feet gelatine for functional food application. *Jurnal Kimia VALENSI*, 1(1), 12-19.
- Mendes, R., Cardoso, C. & Pestana, C. (2009). Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectrophotometric test. *Food*



*Chemistry*, 112, 1038-1045.

- Mendis, E., Rajapakse, N. & Kim, S.-K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 581-587.
- Mohammad, A. W., Kumar, A. G. & Basha, R. K. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of tilapia (*Oreochromis Spp.*) scale gelatine. *International Aquatic Research*, 7(1), 27-39.
- Mohammad, A. W., Suhimi, M. S., Aziz, A. G. K. A. & Jahim, J. M. (2014). Process for production of hydrolysed collagen from agriculture resources: Potential for further development. *Applied Sciences*, 14 (12), 1319-1323.
- Mokhtar, N. D., Wahab, W. A., Hamdan, N. A., Hadi, H. A., Hassan, M. S. A. & Bunnori, N. M. (2017). Extraction optimization and characterization of collagen from chicken (*gallus gallus domesticus*) feet. *Biological and Environmental Sciences*.
- Mokrejs, P., Gál, R., Janacova, D., Plskova, M. & Zacharová, M. (2017). Chicken paws by-products as an alternative source of proteins. *Oriental Journal of Chemistry*, 33(5), 2209-2216.
- Najafian, L. & Babji, A. S. (2014). Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydrolysate. *Functional Foods*, 9, 280-289.
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougateg, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Nasri, M. & Karra-Châabouni, M. (2013). ACE inhibitory and antioxidative activities of goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1), 552-561.
- Nikoo, M. & Benjakul, S. (2015). Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant–cryoprotectant: A review. *Functional Foods*, 19, 753-764.
- Noman, A., Xu, Y., Al-Bukhaiti, W. Q., Abed, S. M., Ali, A. H., Ramadhan, A. H. & Xia, W. (2018). Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Process Biochemistry*, 67, 19-28.
- Ockerman, H. W., Basu, L. & Toldrá, F. (2017). Chapter 22 - edible by-products a2 - toldra', fidel. In *Lawrie's Meat Science (eight edition)* (pp. 679-696): Woodhead Publishing.
- Offengenden, M., Chakrabarti, S. & Wu, J. (2018). Chicken collagen hydrolysates differentially

- mediate anti-inflammatory activity and type I collagen synthesis on human dermal fibroblasts. *Food Science and Human Wellness*, xxx, xxx-xxx.
- Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E. & Aliani, M. (2014). In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chemistry*, 150, 366-373.
- Onuh, J. O., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Aluko, R. E. & Aliani, M. (2015). Kinetics of in vitro renin and angiotensin converting enzyme inhibition by chicken skin protein hydrolysates and their blood pressure lowering effects in spontaneously hypertensive rats. *Functional Foods*, 14, 133-143.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A. & Nazari, R. (2010). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*thunnus albacares*). *Food and Bioprocess Technology*, 5, 696-705.
- Pal, G. K. & Suresh, P. V. (2016). Sustainable valorisation of seafood by-products: Recovery of collagen and development of collagen-based novel functional food ingredients. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 201-215.
- Pótorak, A., Marcinkowska-Lesiak, M., Lenzion, K., Moczowska, M., Onopiuk, A., Wojtasik-Kalinowska, I. & Wierzbicka, A. (2018). Evaluation of the antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial effects of catuaba, galangal, roseroot, maca root, guarana and polyfloral honey in sausages during storage. *Food Science and Technology*, 96, 364-370.
- Pvln, S., Kiranmayi, V. S., Swathi, P., Jeyseelan, L., Suchitra, M. & Bitla, A. (2015). Comparison of two analytical methods used for the measurement of total antioxidant status. *Journal of Antioxidant Activity*, 1, 22-28.
- Rudzińska, M., Flaczyk, E., Amarowicz, R., Wąsowicz, E. & Korczak, J. (2007). Antioxidative effect of crackling hydrolysates during frozen storage of cooked pork meatballs. *European Food Research and Technology*, 224, 293-299.
- Sarboń, N. M., Badii, F. & Howell, N. K. (2015). The effect of chicken skin gelatin and whey protein interactions on rheological and thermal properties. *Food Hydrocolloids*, 45, 83-92.
- Sarboń, N. M., Badii, F. & Howell, N. K. (2018). Purification and characterization of antioxidative peptides derived from chicken skin gelatin hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 85, 311-320.
- Schmidt, M. M., Dornelles, R. C. P., Mello, R. O., Kubota, E. H., Mazutti, M. A., Kempka, A. P. &

- Demiate, I. M. (2016). Collagen extraction process. *International Food Research Journal*, 23(3), 913-922.
- Sibilla, S., Godfrey, M., Brewer, S., Budh-Raja, A. & Genovese, L. (2015). An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen as a nutraceutical on skin properties: Scientific background and clinical studies. *The Open Nutraceuticals Journal*, 8(1).
- Silva, V., Park, K. & Hubinger, M. (2010). Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat. *Food Science*, 75, C36-42.
- Sonklin, C., Laohakunjit, N. & Kerdchoechuen, O. (2018). Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates. *PeerJ*, 6, e5337.
- Sukkawai, S., Kijroongrojana, K. & Benjakul, S. (2011). Extraction of gelatin from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) skin for gelatin hydrolysate production. *International Food Research Journal*, 18.
- Sun, Y., Pan, D., Guo, Y. & Li, J. (2012). Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3397-3404.
- Vallejos, N., González, G., Troncoso, E. & Zúñiga, R. N. (2014). Acid and enzyme-aided collagen extraction from the byssus of chilean mussels (*mytilus chilensis*): Effect of process parameters on extraction performance. *Food Biophysics*, 9(4), 322-331.
- Vate, N. K. & Benjakul, S. (2013). Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (*Loligo formosana*). *International Aquatic Research*, 5(1), 9.
- Verma, A., Chatli, M. K., Kumar, P. & Mehta, N. (2017). Antioxidant and antimicrobial activity of protein hydrolysate extracted from porcine liver. *Animal Sciences*, 87(6), 711-717.
- Vittayanont, M. (2007). *Extraction and characterization of collagen from chicken feet*. Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Songkla University.
- Widyasari, R. & Rawdkuen, S. (2014). Extraction and characterization of gelatin from chicken feet by acid and ultrasound assisted extraction. *Food and Applied Bioscience Journal*, 2, 83-95.
- Widyasari, R. & Rawdkuen, S. (2015). Gelatin from chicken feet: papain-assisted extraction, characterization and its application. *Food Science and Agricultural Technology (JFAT)*, 1, 136-143.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H. G. & Kishimura, H. (2015). Antioxidant and sensory

- properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Food Science and Technology*, 52(6), 3336-3349.
- Yasin, H., Babji, A. S. & Norrakiah, A. S. (2017). Modification of chicken feet gelatin with aqueous sweet basil and lemongrass extract. *Food Science and Technology*, 77, 72-79.
- Zakaria, N. A. & Sarbon, N. M. (2018). Physicochemical properties and oxidative stability of fish emulsion sausage as influenced by snakehead (*Channa striata*) protein hydrolysate. *Food Science and Technology*, 94, 13-19.
- Zhang, Q.-X., Fu, R.-J., Yao, K., Jia, D.-Y., He, Q. & Chi, Y.-L. (2018). Clarification effect of collagen hydrolysate clarifier on chrysanthemum beverage. *Food Science and Technology*, 91, 70-76.
- Zheng, Z., Huang, Y., Wu, R., Zhao, L., Wang, C. & Zhang, R. (2014). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of duck blood corpuscle using commercial proteases. *Poultry science*, 93(10), 2641-2650.
- Zhuang, Y. & Sun, L. (2011). Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology. *Food Science*, 76(3), C483-C489.
- Zou, T.-B., He, T.-P., Li, H.-B., Tang, H.-W. & Xia, E.-Q. (2016). The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*, 21(1), 72.

## ภาคผนวก



183963776

BUU iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

ภาคผนวก ก  
การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี



183963776

BUU\_Thesis\_60910022\_thesis / rev: 29102563 10:55:56 / seq: 142

## ก-1 ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (Moisture can)
2. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)
3. โถดูดความชื้น (Desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

### การวิเคราะห์

1. อบอุ่นสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 - 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 ชั่งจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1 - 2 กรัม ใส่ในภาชนะที่ผ่านการหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว
4. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 - 6 ชั่วโมง
5. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง
6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)} = (W_1 - W_2 / W_1) \times 100\%$$

เมื่อ  $W_1$  คือน้ำหนักก่อนอบ (กรัม)

$W_2$  คือน้ำหนักหลังอบ (กรัม)

## ก-2 ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์การย่อยโปรตีน ประกอบด้วยเตาเผาและเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณ์กลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 และ 250 มิลลิลิตร
4. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
5. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
6. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
7. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

### สารเคมี

1. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper(II) sulfate,  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ )
2. โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate,  $\text{K}_2\text{SO}_4$ )
3. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (Sulfuric acid,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ )
5. กรดบอริก (Boric acid,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ )
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid,  $\text{HCl}$ )
7. Sher indicator ของ Buchi

### การเตรียมสาร

1. สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1:10
2. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 32% เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 32 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร
3. กรดบอริก ความเข้มข้น 2% เตรียมโดยชั่งกรดบอริก 2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร
4. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.2 N เตรียมโดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1.65 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นในขวดปรับปริมาตร

### การวิเคราะห์

#### ขั้นตอนการย่อย (Digestion)

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-3 กรัม ใส่ลงในหลอดย่อยโปรตีน
2. ใส่สารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 10 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกปริมาณ 20 มิลลิลิตร



4. วางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ และเครื่องดักจับไอกรด ให้เรียบร้อย

5. เปิดสวิตช์เครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิไปที่ No. 2 เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิไปที่ No. 9 ย่อยต่ออีก 50 นาที จนได้สารละลายใส ขั้นตอนการกลั่น

1. จัดเตรียมอุปกรณ์กลั่น แล้วเปิดสวิตช์ให้ความร้อนและเปิดน้ำหล่อเย็นเครื่องควบแน่น

2. นำขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (ความเข้มข้น 2%) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติม Sher indicator แล้วนำไปรองรับของเหลวที่กลั่นได้ โดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรด

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอสังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น

4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร

การไทเตรท (Titration)

1. นำของเหลวที่กลั่นได้ในขวดรูปชมพู่มาไทเตรทด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.2 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นใสไม่มีสี

2. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} (\text{ฐานเปียก}) = [(A - B) \times N \times 1.4007 \times F] / W_1$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} (\text{ฐานแห้ง}) = [(A - B) \times N \times 1.4007 \times F] / W_2$$

เมื่อ A คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไทเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไทเตรทกับแบลนด์ (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรด (0.2 N)

F คือ แฟกเตอร์ (5.4) (Melanie et al., 2015)

$W_1$  คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

$W_2$  คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น – น้ำหนักน้ำในตัวอย่าง (กรัม)

### ก-3 ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

#### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet)
2. ทิมเบิล (Thimble)
3. ตู้อบไฟฟ้า
4. กระจกทรง
5. ซ้อนดักสาร
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

#### สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

#### การวิเคราะห์

1. ชั่งตัวอย่าง 1 - 3 กรัม ใส่บนกระจกทรงและห่อให้มิดชิด แล้วนำไปใส่ลงในทิมเบิล
2. นำทิมเบิลใส่ใน Extraction cup ที่ผ่านการอบแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
3. เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ลงใน Extraction cup ประมาณ 150 มิลลิลิตร จากนั้นประกอบเข้า

#### เครื่อง Soxhlet

4. ทำการสกัดไขมันจากตัวอย่างนานประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นจาก Condenser มีอัตราหยด 150 หยดต่อนาที
5. ระเหยปีโตรเลียมอีเทอร์ออกจากไขมัน โดยนำ Extraction cup ไปวางไว้ใน Hood จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2$  องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
6. อบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่ไม่เกิน 1 - 3 มิลลิกรัม
7. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = ((X_1 - X_2) / X_3) \times 100$$

เมื่อ  $X_1$  คือ น้ำหนัก Extraction cup หลังสกัด (กรัม)

$X_2$  คือ น้ำหนัก Extraction cup ก่อนสกัด (กรัม)

$X_3$  คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

#### ก-4 ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

##### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ตู้อบไฟฟ้า
2. โถดูดความชื้น (Desiccator)
3. ครุชชีเบิล (Crucible)
4. เตาเผา
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง

##### การวิเคราะห์

1. อบครุชชีเบิลที่อุณหภูมิ  $105 \pm 2$  องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ ทำให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 3 กรัม ใส่ลงครุชชีเบิลที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปเผาในตู้ดูดควันจนไม่มีควัน แล้วจึงนำไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ  $550 \pm 2$  องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาว
3. นำออกมาทำให้เย็นใน โถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
4. คำนวณหาปริมาณเถ้าตามสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = (\text{น้ำหนักเถ้า (g)} / \text{น้ำหนักตัวอย่าง (g)}) \times 100$$

## ก-5 ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Garbowska et al., 2013)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 9 มิลลิลิตร
2. ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร
3. กระจกกรองเบอร์ 4
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิด 4 ตำแหน่ง
5. ตู้อบลมร้อน
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl)
2. กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid หรือ Sulphuric acid, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)
3. Chloramine-T (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNO<sub>2</sub>S·Na)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH)
5. โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate, CH<sub>3</sub>COONa·3H<sub>2</sub>O)
6. กรดซิตริก โมโนไฮเดรต (Citric acid monohydrate, C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)
7. 1-โพรพานอล (1-Propanol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)
8. ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline)
9. 4-(Dimethylamino)-benzaldehyde (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO)

### การเตรียมสารเคมี

1. Oxidant solution: chloramine-T ความเข้มข้น 1.41% เตรียมก่อนใช้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบไปด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 15 กรัม โซเดียมอะซิเตท ไตรไฮเดรต 90 กรัม กรดซิตริก โมโนไฮเดรต 30 กรัม และ 1-โพรพานอล 290 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สีที่ทำปฏิกิริยา: dimethylamine benzaldehyde 10 กรัม ผสมกับกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้น 60% (60 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) 35 มิลลิลิตร และ 1-โพรพานอล 65 มิลลิลิตร
3. สารละลายไฮดรอกซีโพรลีน ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เตรียมจาก 0.05 กรัม ในน้ำกลั่นด้วยขวดปริมาตรด้วย 25 มิลลิลิตร

### การเตรียมตัวอย่าง

1. ตัวอย่าง 4 กรัม ผสมกับกรดซัลฟิวริก 30 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมง
2. นำตัวอย่างที่ได้มากรอง

### การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่กรองได้มาเจือจางด้วย 1-โพรพานอล (5 - 200 เท่า)
2. ก่อนนำมา 2 มิลลิลิตร ผสมกับ oxidant solution 1 มิลลิลิตร ผสมเข้ากันทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิเป็นระยะเวลา 20 นาที
3. เติมสีที่ทำปฏิกิริยา 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 15 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร
5. ใช้ไฮดรอกซีโพรลีนเป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อคำนวณเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

## ก-6 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีลาวรี (Lowry method) (Lowry et al., 1951)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาด 9 มิลลิลิตร
2. ไมโครปิเปตขนาด 1000 ไมโครลิตร และ 1 มิลลิลิตร
3. เครื่องผสมสารละลาย (Vertex mixer)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulfate pentahydrate,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )
2. โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
3. โซเดียม ซิเตรท (Sodium Citrate,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )
4. สารฟอลิน - ซีโอเคาทูล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent)
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide,  $\text{NaOH}$ )
6. โบวีนซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin, BSA)

### การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายโซเดียม ซิเตรทที่ความเข้มข้น 1% โดยชั่งโซเดียม ซิเตรท 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. สารละลายเอ เตรียมโดยโซเดียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 2% ชั่ง 2 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายบี เตรียมโดยคอปเปอร์ซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.5% ชั่ง 0.5 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียม ซิเตรทที่ความเข้มข้น 1% 100 มิลลิลิตร
4. สารละลายซี เตรียมโดยสาร ฟอลิน - ซีโอเคาทูลที่ความเข้มข้น 2 นอร์มอล โดยปิเปตฟอลิน - ซีโอเคาทูล 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
5. สารละลายดี เตรียมโดยนำสารละลายเอ 2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบี 0.04 มิลลิลิตร
6. สารละลายมาตรฐาน BSA ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

### การวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร และสารละลายมาตรฐาน BSA ความเข้มข้นละ 200 ไมโครลิตร ดังตารางภาคผนวก ก-1 เติมสารละลายดี 2.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที ก่อนนำผสมกับสารละลายซี 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ตัวอย่างควบคุมใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก ก-1 ปริมาตรของสารละลายต่อความเข้มข้นของ BSA

ความเข้มข้น BSA (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	สารละลาย BSA (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
0	0	200	-
0.1	20	180	-
0.3	60	140	-
0.5	100	100	-
0.7	140	60	-
1.0	200	0	-
***	-	0	200

\*\*\* ไม่ทราบความเข้มข้นของตัวอย่าง

## ก-7 กิจกรรมของเอนไซม์ (วันชัย เกียรติพิมล, 2545)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปีกเกอร์
2. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. ซ้อนตักสาร
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. กระบอกตวง

### สารเคมี

1. กรดไตรคลอโรอะเซติก (Trichloroacetic acid, TCA)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)
3. กรดอะซิติก (Acetic acid, CH<sub>3</sub>COOH)
4. ไทโรซีน (Tyrosine, C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>)

### การเตรียมสารเคมี

1. กรดไตรคลอโรอะเซติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมจาก 1.6339 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. โซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 0.22 โมลาร์ เตรียมจากโซเดียมคลอไรด์ 12.87 กรัม กรดอะซิติก 1.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร
3. กรดอะซิติกความเข้มข้น 0.33 โมลาร์ เตรียมจาก 1.89 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร
4. ไทโรซีนความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก 0.01 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เล็กน้อยจนละลายแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 10 มิลลิลิตร

**บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (Stop buffer)** เตรียมจากกรดไตรคลอโรอะเซติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมกับโซเดียมอะซิเตดความเข้มข้น 0.22 โมลาร์ และกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.33 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1:1



## ตารางผนวก ก-2 ปริมาตรของสารละลายต่อความเข้มข้นของไทโรซีน

ความเข้มข้นไทโรซีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)	ไทโรซีน (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	ตัวอย่าง (ไมโครลิตร)
0	0	1000	-
100	100	900	-
200	200	800	-
300	300	700	-
400	400	600	-
500	500	500	-
***	-	0	1000

\*\*\* ไม่ทราบความเข้มข้นของตัวอย่าง

## ก-8 วิเคราะห์ค่า $\alpha$ -Amino และระดับการย่อย (Benjakul & Morrissey, 1997)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 มิลลิลิตร
3. หลอดทดลอง
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS,  $C_6H_3N_3O_9S$ )
2. สารมาตรฐานลิวซีน (l-leucine,  $C_6H_{13}NO_2$ )
3. โซเดียมซัลไฟต์ (Sodium sulphite หรือ Sodium sulfite,  $Na_2SO_3$ )
4. ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate,  $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ )
5. โมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Monobasic sodium phosphate,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ )
6. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl)

### การเตรียมสารเคมี

1. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 8.2 เตรียมจาก โมโนเบสิก โซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (53.63 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นสารละลาย A และ ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต 0.2 โมลาร์ (31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) เป็นสารละลาย B ผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ
2. สารละลายมาตรฐานลิวซีน ความเข้มข้น 30 มิลลิโมล เตรียมจาก 0.039 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
3. โซเดียมซัลไฟต์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ เตรียมจาก 12.604 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
4. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) ความเข้มข้น 0.1 % เตรียมจาก 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
5. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 6 มอร์นาล เตรียมจาก 49.67 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

### การวิเคราะห์

1. ตัวอย่าง 125 ไมโครลิตร เติมลงในหลอดทดลอง ก่อนนำโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และสารละลาย TNBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลอง
2. นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที
3. ยุติปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 15 นาที
4. พร้อมกับวัดสารมาตรฐานลิซีนที่เจือจางเป็นความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน
5. นำสารละลายตัวอย่างและสารมาตรฐานมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร

5.1 สร้างกราฟจลนพลศาสตร์ ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) จากการนำค่าการดูดกลืนแสงหรือจำนวนหมู่  $\alpha$ -Amino ทั้งหมดในตัวอย่างหรือความเร็วของปฏิกิริยา (แนวแกน y) ที่เทียบกับกราฟมาตรฐานแล้วมาพล็อตกับความเข้มข้นของซับสเตรต (แนวแกน x)

5.2 นำค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณเป็นค่าระดับการย่อย

**การคำนวณ**      ระดับการย่อย (%DH) =  $[(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] / 100$

เมื่อ  $L_t$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -Amino ทั้งหมดในตัวอย่างที่ย่อยเป็นเวลา t

$L_0$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -Amino ทั้งหมดในตัวอย่างที่ย่อยเป็นเวลาเริ่มต้น

$L_{max}$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -Amino ทั้งหมดในตัวอย่างที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์จาก

สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 มอร์นาล ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

## ก-9 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) สำหรับการวิเคราะห์ ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบ lecithin liposome

(Yarnpakdee et al., 2015)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร
4. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
5. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ
6. เครื่อง Sonicating bath
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer)
2. เลซิทีน (Lecithin)
3. คอปเปอร์อะซิเตต (Cupric acetate หรือ Copper(II) acetate,  $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ )
4. โทร็อก (Trolox)
5. 2-กรดไทโอบาร์บิวทริก (2-Thiobarbituric acid (TBA),  $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ )
6. กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid (TCA),  $\text{CCl}_3\text{COOH}$ )
7. มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde (MDA),  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_2$ )
8. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl)

### การเตรียมสารเคมี

1. ตัวอย่างคอแลเจนไฮโดรไลเสต ความเข้มข้น 1,000 ppm เตรียมจากความเข้มข้นตั้งต้นของคอแลเจนไฮโดรไลเสตด้วยน้ำกลั่น
2. โทร็อก ความเข้มข้น 1000 ppm เตรียมจาก 0.001 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
3. คอปเปอร์อะซิเตต ความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ เตรียมจาก 0.03 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร
4. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.25 นอร์มอล เตรียมจาก 8.75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 400 มิลลิลิตร
5. สารละลายผสม : TCA 60 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 400 มิลลิลิตร ด้วยการกวนแล้วค่อยๆ ละลาย TBA จนหมดในปริมาณ 1.5 กรัม

### การวิเคราะห์ระบบ lecithin liposome

1. เลซิทีน ความเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก 0.96 กรัม กวนให้ละลายในน้ำกลั่น 120 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Sonicating bath ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที
2. นำเลซิทีนที่ได้ 15 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ผสมกับเจลาตินไฮโดรไลเสต 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเขย่าด้วยเครื่อง Sonicating bath ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 2 นาที
3. นำมาเริ่มปฏิกิริยาด้วยการเติมคอปเปอร์อะซิเตต 20 ไมโครโมล ลงในขวดรูปชมพู่แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที
4. นำสารละลายจากขวดรูปชมพู่มาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันด้วยวิธี TBARS
  - 4.1 นำสารละลายจากขวดรูปชมพู่ 250 ไมโครลิตร มาผสมกับสารละลายผสม 1,250 ไมโครลิตร
  - 4.2 นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นระยะเวลา 10 นาที (สารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีชมพู)
  - 4.3 ทิ้งให้เย็น
  - 4.4 บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000g เป็นระยะเวลา 15 นาที
  - 4.5 นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร
  - 4.6 ใช้ MDA เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณเปรียบเทียบกับตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลเสต
    - 4.7 Blank เป็นการทำให้ปฏิกิริยาที่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
    - 4.8 ตัวอย่างควบคุมใช้โทรลือกแทนเจลาตินไฮโดรไลเสต
    - 4.8 รายงานค่า TBA เป็น mg MDA /L of liposome

## ก-10 Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) สำหรับการวิเคราะห์ในได้

กรอกไก่ (Jayasingh & Cornforth, 2004)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปีเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. 2-กรดไทโอบาร์บิวทริก (2-Thiobarbituric acid (TBA),  $C_4H_4N_2O_2S$ )
2. กรดไทรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid (TCA),  $CCl_3COOH$ )
3. มาลอนไดอัลดีไฮด์ (Malondialdehyde (MDA),  $C_3H_4O_2$ )
4. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid, HCl)

### การเตรียมสารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.25 นอร์มัล เตรียมจาก 8.75 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 400 มิลลิลิตร
2. สารละลายผสม : TCA 60 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 400 มิลลิลิตร ด้วยการกวนแล้วค่อยๆ ละลาย TBA จนหมดในปริมาณ 1.5 กรัม

### การวิเคราะห์

1. ตัวอย่างไส้กรอกไก่ 2 กรัม ถูกนำมาผสมกับสารละลายผสม 10 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองที่มีฝาปิด
2. นำหลอดทดลองไปบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู
3. ทำให้เย็นก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง 5500 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 25 นาที
4. นำส่วนใสมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร
5. ใช้ MDA เป็นสารมาตรฐานในการคำนวณเปรียบเทียบกับตัวอย่างไส้กรอก
6. Blank เป็นการปฏิบัติที่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
7. รายงานค่า mg MDA/kg meat sample



## ก-11 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Protein hydrophobicity)

(Chelh et al., 2006)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. Bromophenol blue sodium salt สำหรับ Electrophoresis
2. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
3. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

### การเตรียมสารเคมี

1. Bromophenol blue (BPB) sodium salt ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เตรียมจาก 0.01 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์
3. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมล pH 6

### การวิเคราะห์

1. สารละลายตัวอย่าง: นำสารละลายเจลาตินไฮโดรไลเสต 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย BPB ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ปรับ pH ของสารละลายให้เป็น 5.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก
2. สารละลายตัวอย่างควบคุม: สารละลาย BPB ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมกับโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร
3. สารละลายทั้ง 2 ถูกกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิเป็นระยะเวลา 10 นาที
4. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2000g เป็นระยะเวลา 15 นาที
5. นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยเจือจาง 1/10 ด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
6. Blank เป็นโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
7. นำค่าที่ได้เป็นคำนวณตามสูตร

$$\text{BPB bound } (\mu\text{g}) = 200 \mu\text{g} \times ((A \text{ control} - A \text{ sample})/A \text{ control})$$

## ก-12 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจาก Vate & Benjakul (2013)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer UV/VIS)

### สารเคมี

1. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
2. ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))
3. โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต (Potassiumpersulphate,  $K_2S_2O_8$ )
4. โทร็อก (Trolox)
5. เมทานอล (Methanol) ความเข้มข้น 95%

### การเตรียมสารเคมี

1. ABTS ความเข้มข้น 14.8 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก 0.0812 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. โพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตความเข้มข้น 5.2 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก 0.0141 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
3. สารละลาย ABTS เตรียมได้จากนำสารละลาย ABTS ในข้อที่ 1 ผสมกับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตในข้อที่ 2 ในอัตราส่วน 1:1 ก่อนนำมาบ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้จากการบ่มมา 1 มิลลิลิตร ผสมกับเมทานอล 50 มิลลิลิตร แล้วสารละลายวัดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยต้องมีค่าอยู่ในช่วง  $1.10 \pm 0.02$

### การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. นำสารละลายตัวอย่าง 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย ABTS 2,850 ไมโครลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที
4. ก่อนนำมาวัดที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน (โทร็อก)
5. รายงานในหน่วย  $\mu\text{mole TE}/\text{mg protein}$



**ก-13 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (Vate & Benjakul, 2013)**

**เครื่องมือและอุปกรณ์**

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1601 SHIMADZU)

**สารเคมี**

1. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
2. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
3. โทร็อก (Trolox)
4. เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้น 95%

**การเตรียมสารเคมี**

1. DPPH ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก 0.0030 กรัม ละลายในเอทานอล 50 มิลลิลิตร

**การวิเคราะห์**

1. นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. นำสารละลายตัวอย่าง 1.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย DPPH 1.5 มิลลิลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที
4. ก่อนนำมาวัดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน (โทร็อก)
5. รายงานในหน่วย  $\mu\text{mole TE}/\text{mg protein}$

#### ก-14 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP (Vate & Benjakul, 2013)

##### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร
2. หลอดทดลอง
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ยูวี-วิสิเบิล สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-1601 SHIMADZU)

##### สารเคมี

1. โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์
2. โซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate,  $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )
3. TPTZ (2,4,6-tripyridyl- triazine)
4. เฟอร์ริกคลอไรด์ (Ferric chloride (hexahydrate),  $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
5. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl)
6. กรดแอสติก (Acetic acid,  $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ )
7. โทร็อกซ์ (Trolox)

##### การเตรียมสารเคมี

1. แอซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ pH 3.6 เตรียมจาก 4.08 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 3.6 ด้วยกรดแอสติกก่อนปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร
2. TPTZ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก 0.0156 กรัม ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร
3. เฟอร์ริกคลอไรด์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ เตรียมจาก 0.0270 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาณ 5 มิลลิลิตร
4. สารละลาย FRAP เตรียมจากแอซิเตตบัฟเฟอร์ สารละลาย TPTZ และเฟอร์ริกคลอไรด์ ผสมกันในอัตราส่วน 50:5:5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 นาที

##### การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างที่เจือจางด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ให้ความเข้มข้นที่เหมาะสม
2. นำสารละลายตัวอย่าง 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย FRAP 2,850 ไมโครลิตร
3. บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที
4. ก่อนนำมาวัดที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน (โทร็อกซ์)
5. รายงานในหน่วย  $\mu\text{mole TE}/\text{mg protein}$

**ก-15 องค์ประกอบของกรดอะมิโน (Amino acid profile)** (AOAC Official method 994.12, 2012)

**เครื่องมือ**

1. เครื่อง HPLC (High performance liquid chromatograph) สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนโดยเฉพาะ

**สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์**

HPLC	: Model LC-20A Series ; Shimadzu; Japan
Column	: Shim-pack ISC-07/S 1504 Na (packed with cation exchanger consist of sulphonate styrene divinyl benzene copolymer)
Mobile phase	: A = 0.2 N Sodium citrate (containing 7% EtOH), pH 10 B = 0.6 N Sodium citrate + 0.2 N Boric acid, pH 10 C = 0.2 N Sodium hydroxide
Flow rate	: 0.3 ml/min
Detector	: Fluorescence detector (RF-535, Ex 348 nm, Em 450 nm)
Reaction temp.	: 55 °C
Injection volume	: 10 µl
Post column	: Reaction solution A และ B flow rate 0.3 ml/min

**การวิเคราะห์**

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5 – 1.0 กรัม (ของเหลว) ใส่ใน Vacuum reaction tube
2. เติม 6 N HCl 3 – 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer
3. Vacuum reaction tube ด้วยเครื่อง Aspirator
4. Digest ที่อุณหภูมิ 110 °C นาน 22 – 24 ชั่วโมง
5. วางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วย 0.1 N HCl
7. กรองสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 40
8. เจือจางสารละลายตัวอย่างที่ได้ด้วย Diluent sample (Dilution factor ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง)
9. Inject สารละลายตัวอย่าง 10 µl เข้าเครื่อง HPLC

10. สารละลายตัวอย่างที่ผ่าน Column จะทำปฏิกิริยากับ Reaction solution A และ B (OPA solution) และถูกตรวจวัดด้วย Fluorescence detector

#### การคำนวณ

คำนวณจาก Calibration curve โดยพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดอะมิโน (แกน x) กับพื้นที่ใต้พีคหรือความสูงของพีค (แกน y) ที่อ่านได้ โดยที่ Regression coefficient ( $R^2$ ) อยู่ในเกณฑ์ยอมรับ  $\geq 0.99$

จากสมการ  $y = mX + c$

เมื่อ  $y = \text{Response}$  ของตัวอย่าง

$m = \text{Slope}$  ของกราฟมาตรฐาน

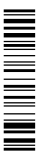
$c = \text{Intercept}$  ของกราฟมาตรฐาน

$X =$  คือ ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ได้จากการคำนวณจากกราฟมาตรฐาน ( $\mu\text{g/ml}$ )

$$\text{จะได้ปริมาณกรดอะมิโน (mg/100g)} = \frac{X \times \text{DF} \times \text{Total volume } (\mu\text{l}) \times 100}{\text{wt. of sample (g)} \times 10^6}$$

เมื่อ DF = Dilution factor

ภาคผนวก ข  
การวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ



183963776

BUU.ITthesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

## ข-1 ปริมาณร้อยละผลได้ (Yield)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง
3. ตู้อบลมร้อน

### การวิเคราะห์

1. นำเจลาตินมาทำแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง
2. คำนวณหาปริมาณร้อยละผลได้ของเจลาตินตามสูตร (Mokrejs et al., 2017)

$$\text{ปริมาณร้อยละผลได้ของเจลาติน} = (m_1/m_0) \times 100$$

เมื่อ  $m_0$  คือ น้ำหนักของเท้าไก่บด (กรัม)

$m_1$  คือ น้ำหนักของเจลาตินแห้ง (กรัม)

## ข-2 ค่าสี (Zakaria & Sarbon, 2018)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องวัดสี (Colorimeter) Hunter LAB รุ่น MiniScan XE Plus

### การวิเคราะห์

1. ก่อนทำการวัดสีของตัวอย่างทุกครั้ง ต้องทำการ Calibration โดยการวางหัววัดทาบบนแผ่นสำหรับ Calibrate สีขาวและดำแล้วกดปุ่ม Measure ซึ่งเครื่องวัดสีจะบันทึกข้อมูลค่าสีขาวและดำของแผ่นสำหรับ Calibrate ไว้

2. นำตัวอย่างมาวัดค่าสี โดยหันตัวอย่างให้กรอกให้เท่ากันและวางให้เต็มตลับวัดสีไม่ให้มีช่องที่แสงสามารถที่จะลอดผ่านได้ ในขณะที่วัดค่าสีนั้นต้องปิดตลับตัวอย่างด้วยฝาครอบสีดำ

3. วัดค่าสีของตัวอย่างด้วยระบบ CIE ซึ่งเป็นการวัดค่า  $L^*$   $a^*$  และ  $b^*$

โดย  $L^*$  คือ ความสว่าง โดยสีดำมีค่าเท่ากับ 0 และสีขาวมีค่าเท่ากับ 100

$a^*$  คือ ค่าความเป็นสีแดงและสีเขียว โดยค่าบวกแสดงความเป็นสีแดง และค่าลบแสดงความเป็นสีเขียว

$b^*$  คือ ค่าความเป็นสีเหลืองและสีน้ำเงิน โดยค่าบวกแสดงความเป็นสีเหลือง และค่าลบแสดงความเป็นสีน้ำเงิน

4. สามารถคำนวณหาค่าความขาว (Whiteness) ตามสูตร

$$\text{Whiteness} = 100 - [(100-L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$$

### ข -3 การตรวจสอบลักษณะเนื้อสัมผัส (Jo et al., 2018)

#### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer รุ่น TA-XT2)
2. อุปกรณ์ในการวิเคราะห์ เช่น มีด เขียง

#### การวิเคราะห์

ลักษณะเนื้อสัมผัส ได้แก่ ค่าความแข็ง ค่าการเกาะติดของอาหาร ค่าความยืดหยุ่น ค่าการยืดเกาะกัน ค่าพลังงานในการกัด และค่าพลังงานที่ใช้ในการเคี้ยวด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA-XT2) ตัวอย่างไส้กรอกจะถูกตัดเป็นทรงกระบอก (เส้นผ่าศูนย์กลางสูง 1 เซนติเมตร x สูง 1.5 เซนติเมตร) โดยใช้หัววัดสำหรับการทดสอบการบีบอัด (P/50) ที่มีน้ำหนัก 5 กิโลกรัม เพื่อเปรียบเทียบโพลลเซลล์ 30 กิโลกรัม

#### วิธีการใช้เครื่องลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture Analyzer รุ่น TA-XT2)

##### 1. เริ่มทำงาน

1.1 เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์และเครื่อง Texture Analyzer

1.2 คลิกที่ Start → Program → Texture Export → Texport U.S.English จะปรากฏหน้าต่าง User Section → คลิก OK

1.3 จากนั้นไปที่ File → New Project จะปรากฏหน้าต่างของ Project (ถ้าใช้เป็นครั้งแรก) หรือถ้าไม่ต้องการจะตั้ง Project → Restart จะปรากฏหน้าต่างของกราฟ

1.4 กรณีมีข้อมูลแล้วให้คลิกที่ Open Icon จะปรากฏหน้าต่างของ Open ให้เลือกชื่อไฟล์ตามต้องการโดยเปลี่ยนชนิดของไฟล์ได้ที่ List First of Type โดย \*.ARC คือไฟล์ที่เป็นกราฟ

\*.RSE คือไฟล์ที่เป็นตารางข้อมูล \*.PRJ คือไฟล์ที่เป็น Project Document .MAC คือไฟล์ที่เป็น Macro และ \*.LIS คือไฟล์ที่เป็นข้อมูลดิบ

##### 2. การปรับเทียบ (Calibration)

2.1 จะต้องทำการ Calibrate Force ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ

โดยไปที่ T.A บน Menu Bar → Calibrate Force จะปรากฏหน้าต่างของ Force Calibration ตรวจสอบให้แน่ใจว่าไม่มีหัววัด (Probe) ติดอยู่ที่ Calibrate Platform จากนั้นให้คลิก OK

2.2 จากนั้นจะปรากฏหน้าต่างใหม่ของ Force Calibration ต่อไปให้วางตุ้มน้ำหนัก 5 กิโลกรัม บน Calibration Platform แล้วคลิก OK

2.3 เมื่อปรากฏข้อความว่า “Calibration Successful” ให้ยกตุ้มน้ำหนักลงแล้วคลิก OK

### 3. การทำ T.A.Setting

3.1 ไปที่ T.A → T.A.Setting จะปรากฏหน้าต่างของ Texture Analyzer Setting ตั้งค่าพารามิเตอร์ดังนี้

Mode	Measure Force in Compression
Option	Return to Start
Pre-Test Speed	1.0 nm/s
Test Speed	5.0 nm/s
Post-Test Speed	5.0 nm/s
Distance	70 %
Trigger Type	Auto-5g
Data Acquisition Rate	200 pps

3.2 ถ้าต้องการบันทึกข้อมูลไว้ให้คลิก Save กรณีจะเรียกใช้ข้อมูลเดิมให้คลิก Load

3.3 เมื่อจะทำขั้นต่อไปให้คลิก Update

### 4. การทำ Run a Test

4.1 เมื่อวางตัวอย่างบนแท่นทดสอบหรือ Probe ชุดล่างเรียบร้อยแล้ว ให้เลือก T.A. บน Menu Bar → Run a Test จะปรากฏหน้าต่างของ Run a Test

4.2 เมื่อตั้งค่าต่าง ๆ เรียบร้อยแล้ว ให้คลิก OK เครื่องจะเริ่มทำการทดสอบพร้อมกับปรากฏเส้นกราฟบนหน้าต่างกราฟ ส่วนการทดสอบขั้นต่อไปให้เลือก T.A. บน Menu Bar → Quick Test Run

4.3 บันทึกข้อมูล



ภาคผนวก ก  
การทดสอบทางประสาทสัมผัส



183963776

BUU\_Thesis\_60910022\_thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

### ค-1 แบบสอบถามเกี่ยวกับการแพ้อาหาร

แบบสอบถามนี้เป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยเรื่อง การสกัดและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่และการประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ โดยการทดสอบผลิตภัณฑ์ไส้กรอกที่มีส่วนผสมของเนื้อไก่ เกลือ และเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่บรรจุในไส้คอตลาเจน ของสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบว่า ผู้เข้าร่วมวิจัยเคยมีประวัติการแพ้อาหารหรือไม่ เพื่อเป็นการคัดเลือกผู้ทดสอบชิมเบื้องต้น ทั้งนี้ขอให้ผู้เข้าร่วมวิจัยตอบแบบสอบถามนี้ตามความเป็นจริง โดยข้อมูลของท่านจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยนี้ และเป็นความลับโดยไม่มีผลกระทบใด ๆ ต่อผู้ร่วมวิจัยทั้งสิ้น ขอขอบคุณทุกท่านที่ให้ความร่วมมือ ไว้ ณ โอกาสนี้

คำชี้แจง โปรดทำเครื่องหมาย  ลงใน  หรือเติมข้อความลงในช่องว่างตรงตามความเป็นจริง ข้อมูลทั่วไป

1. เพศ  
 ชาย       หญิง
2. อายุ (โปรดระบุ).....ปี
3. ผู้เข้าร่วมวิจัยเคยมีอาการภูมิแพ้ และประวัติแพ้ยามาก่อนหรือไม่  
 ไม่มี  
 มี (โปรดระบุ).....  
 ไม่แน่ใจ (โปรดระบุ).....

#### ข้อมูลการแพ้อาหาร

4. ผู้เข้าร่วมวิจัยเคยมีประวัติการแพ้อาหารหรือไม่  
 ไม่มี  
 มี (โปรดระบุ).....  
 ไม่แน่ใจ (โปรดระบุ).....
5. ผู้เข้าร่วมวิจัยเคยมีอาการแพ้อาหารที่มีส่วนประกอบ เช่น เนื้อไก่ เกลือ หรือผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (เช่น ไส้กรอก แสม ชูริมิ) โดยแสดงอาการแพ้ เช่น เป็นผื่น ลมพิษ บวมและคันบริเวณผิวหนังหรือส่วนอื่น ๆ ของร่างกาย หายใจลำบาก ปวดท้อง ท้องร่วง คลื่นไส้ อาเจียน เป็นต้น หรือไม่  
 ไม่มี  
 มี (โปรดระบุ).....

ขอบพระคุณในความร่วมมือของท่าน

## ค-2 เอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

**ชื่อโครงการวิจัย :** การสกัดและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่และการประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่

เรียน ผู้ร่วมโครงการวิจัย สำหรับการทดสอบคุณลักษณะของไส้กรอกไก่

ข้าพเจ้า นางสาวมัชฌาณี โลมจะบก นิสิตภาควิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ขอเรียนเชิญท่านเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ก่อนที่ท่านจะตกลงเข้าร่วมการวิจัย ขอเรียนให้ท่านทราบรายละเอียดของโครงการวิจัยดังนี้

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่และนำไปประยุกต์ใช้ในไส้กรอกไก่ ซึ่งมีการศึกษาในขั้นตอนต่าง ๆ คือ ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ และศึกษาผลของปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน ก่อนนำมาศึกษาผลของปริมาณเจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ต่อคุณภาพของไส้กรอกไก่

ในครั้งนีผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยจะต้องไม่เป็นผู้แพ้อาหาร โดยลักษณะการแพ้อาหารมีอาการดังนี้ คัดจมูก คันตา คันจมูก หายใจลำบาก จาม ผิวหนังมีผื่นลมพิษ บวมและคัน บวมบริเวณริมฝีปาก หน้า ลิ้น และคอ คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วงเมื่อท่านตกลงที่จะเข้าร่วมการทดสอบผลิตภัณฑ์ ท่านจะได้รับผลิตภัณฑ์พร้อมแบบประเมินทางประสาทสัมผัส จากนั้นท่านจะทำการทดสอบด้วยการชิมแล้วพิจารณาให้คะแนนความชอบคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ลงในแบบประเมิน ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10 นาที ทั้งนี้หากมีอาการแพ้ในระหว่างการฝึกฝนหรือการทดสอบจะมีการจัดเตรียมการปฐมพยาบาลเบื้องต้น โดยผู้มีความรู้ทางการแพทย์ และนำส่งโรงพยาบาลทันที หากมีอาการแพ้รุนแรง

ผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้มีอายุ 18 ปีขึ้นไปและเข้าร่วมโดยสมัครใจ ท่านอาจจะปฏิเสธที่จะเข้าร่วมหรือถอนตัวจากโครงการวิจัยนี้ได้ทุกเมื่อ โดยไม่มีผลกระทบใด ๆ ต่อท่านที่เข้าร่วมวิจัย

การเข้าร่วมโครงการวิจัยในครั้งนี้ของท่านจะเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงสำหรับการประยุกต์ใช้เจลาตินไฮโดรไลสจากเท้าไก่ต่อไป ข้อมูลต่าง ๆ ของท่านจะถูกเก็บไว้เป็นความลับ อีกทั้งจะไม่มีการเปิดเผยชื่อของผู้ให้ข้อมูล ซึ่งข้อมูลจะถูกนำเสนอในภาพรวมและข้อมูลถูกเก็บไว้เป็นเวลา 3 ปี หลังการเผยแพร่ผลการวิจัยจะนำไปทำลาย

หากท่านมีคำถามหรือข้อสงสัยประการใด ท่านสามารถสอบถามได้โดยตรงจากผู้วิจัยในวันที่ทำการเก็บข้อมูล หรือสามารถติดต่อสอบถามข้าพเจ้านางสาวมัธยาณี โลมจะบกได้ตลอดเวลาที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เบอร์โทรศัพท์ติดต่อ 083-3648480 หรือติดต่อทาง E-mail: Mat\_Mattayanee@hotmail.com และถ้าผู้วิจัยไม่ปฏิบัติตามที่ได้ชี้แจงไว้ในเอกสารชี้แจงผู้เข้าร่วม โครงการวิจัย สามารถแจ้งมายังคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยบูรพา กองบริหารการวิจัยและนวัตกรรม หมายเลขโทรศัพท์ 038-102561-62

เมื่อท่านพิจารณาแล้วเห็นสมควรเข้าร่วมในการวิจัยนี้ ขอความกรุณาลงนามในใบยินยอมร่วม โครงการที่แนบมาด้วยนี้ และขอขอบพระคุณในความร่วมมือของท่าน

ลงชื่อ.....

(นางสาวมัธยาณี โลมจะบก)

### ค-3 เอกสารแสดงความยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง : การสกัดและสมบัติของเจลลาตินไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่และการประยุกต์ใช้ใน  
ไส้กรอกไก่

ให้คำยินยอม วันที่..... เดือน..... พ.ศ .....

ก่อนที่จะลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมของผู้เข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ ข้าพเจ้าได้รับการอธิบายถึงวัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย วิธีการวิจัย และรายละเอียดต่าง ๆ ตามที่ระบุในเอกสารข้อมูลสำหรับผู้เข้าร่วมโครงการวิจัย ซึ่งผู้วิจัยได้ให้ไว้แก่ข้าพเจ้า และข้าพเจ้าเข้าใจคำอธิบายดังกล่าวครบถ้วนเป็นอย่างดีแล้ว และผู้วิจัยรับรองว่าจะตอบคำถามต่าง ๆ ที่ข้าพเจ้าสงสัยเกี่ยวกับการวิจัยนี้ด้วยความเต็มใจ และไม่ปิดบังซ่อนเร้นจนข้าพเจ้าพอใจ

ข้าพเจ้าเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้ด้วยความสมัครใจ และมีสิทธิที่จะบอกเลิกการเข้าร่วมโครงการวิจัยนี้เมื่อใดก็ได้ การบอกเลิกการเข้าร่วมการวิจัยนั้นไม่มีผลกระทบใด ๆ ที่ข้าพเจ้าจะพึงได้รับต่อไป

ผู้วิจัยรับรองว่าจะเก็บข้อมูลเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าเป็นความลับ จะเปิดเผยได้เฉพาะในส่วนที่เป็นสรุปผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต้องได้รับอนุญาตจากข้าพเจ้า ผู้วิจัยรับรองว่าข้อมูลเฉพาะเกี่ยวกับตัวข้าพเจ้าจะเป็นความลับและเปิดเผยในรูปแบบของผลการวิจัย การเปิดเผยข้อมูลของข้าพเจ้าต่อหน่วยงานต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต้องได้รับอนุญาตจากข้าพเจ้า

ข้าพเจ้าได้อ่านข้อความข้างต้นแล้วมีความเข้าใจดีทุกประการ และได้ลงนามในเอกสารแสดงความยินยอมนี้ด้วยความเต็มใจ

ลงนาม .....ผู้ยินยอม  
(.....)

ลงนาม .....พยาน  
(.....)

**ค-4 แบบประเมินทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี 9-point hedonic scale (สายใจ จริยาเอกภาศ, 2553)**

ลำดับที่ของผู้ทดสอบ..... วันที่ทดสอบ.....

ผลิตภัณฑ์...ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต.....

คำชี้แจง กรุณาทดสอบตัวอย่างจากซ้ายไปขวาและให้คะแนนในด้านลักษณะปรากฏ สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ของตัวอย่างในแต่ละรหัสที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกของท่านมากที่สุด ตามเกณฑ์ให้คะแนนดังนี้

กำหนดให้ 9	หมายถึง	ชอบมากที่สุด	4	หมายถึง	ไม่ชอบเล็กน้อย
8	หมายถึง	ชอบมาก	3	หมายถึง	ไม่ชอบปานกลาง
7	หมายถึง	ชอบปานกลาง	2	หมายถึง	ไม่ชอบมาก
6	หมายถึง	ชอบเล็กน้อย	1	หมายถึง	ไม่ชอบมากที่สุด
5	หมายถึง	เฉยๆ			

รหัส ตัวอย่าง	ลักษณะ ปรากฏ	สี	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	ความชอบ โดยรวม
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

คำเสนอแนะ

.....  
 .....

ขอขอบพระคุณในความร่วมมือของท่าน

ภาคผนวก ง  
การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุนทรีย์



183963776

BUU\_iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

## ง-1 ตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total viable count, TVC) (Intarasirisawat et al., 2014)

### เครื่องมือและอุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ เช่น ปิเปต ตะเกียงแอลกอฮอล์
2. เครื่องตีผสม (Stomacher, Stomacher 400, Seward Meduca Limited, England)
3. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, INE 300 39L, Memmert, England )
4. เครื่องผสมสารละลาย
5. Autoclave
6. อาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Compact dry total count (Compact Dry TC, Nissui

Pharmaceutical, Japan)

### สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl)

### การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายน้ำเกลือ ความเข้มข้น 8.5 กรัม/ลิตร (0.85%) เตรียมจากโซเดียมคลอไรด์ 4.25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

### การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างใส่กรอกไก่ 25 กรัม ผสมกับสารละลายน้ำเกลือ 10 เท่า หรือ 225 มิลลิลิตร ในถุงที่ใช้สำหรับการนำไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง stomacher เป็นระยะเวลา 1 นาที ซึ่งจะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:10 หรือเป็นการเจือจาง  $10^{-1}$
2. นำการเจือจาง  $10^{-1}$  1 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายน้ำเกลือ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายจะได้สารละลายตัวอย่างที่เจือจาง 1:100 หรือ  $10^{-2}$  ทำการเจือจางเหมือนกันใน  $10^{-3}$
3. ปิเปตแต่ละระดับการเจือจาง 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป Compact dry total count
4. สำหรับการตรวจวัดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดจะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน
5. เลือกนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารในช่วงระหว่าง 25-250 โคโลนี
6. รายงานจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็น  $\log_{10}$  CFU/g (Póřtorak et al., 2018)



จำนวนจุลินทรีย์ (จำนวนที่นับได้/กรัม) =  $[(x_1 + x_2 + x_3)/3]/(1 \times 10^n)$

เมื่อ  $x_{1,2,3}$  คือ ซ้ำของจำนวนที่นับได้ของตัวอย่าง

$10^n$  คือ ระดับการเจือจางที่สามารถนับจำนวนจุลินทรีย์ได้ในช่วง 25-250 โคโลนี

1 คือ ปริมาณที่ใช้ในการวิเคราะห์ (1 มิลลิลิตร)

หมายเหตุ: ในกรณีที่ไม่มีตัวอย่างระดับเจือจางใดที่พบจำนวนโคโลนีในช่วงระยะ 25-250 โคโลนี รายงานค่า CFU/g ดังต่อไปนี้

1. ทุกงานมีระดับการเจือจางน้อยกว่า 25 โคโลนี หากค่าเฉลี่ยจากระดับการเจือจางต่ำสุด รายงานเป็น CFU/g เป็นค่าประมาณ
2. ทุกงานไม่พบจำนวนโคโลนี รายงานเป็น CFU/g เป็นค่าประมาณ คือ น้อยกว่า  $1 \times$  ความเจือจางระดับต่ำสุด
3. มีเพียงงานเดียวของซ้ำที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 หากค่าเฉลี่ยก่อนนำไปคำนวณ CFU/g
4. ทุกงานมีจำนวนโคโลนีเกิน 300 โคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ให้รายงานว่า “TNTC” (Too Numerous To Count)



183963776

**ภาคผนวก จ**  
**ผลการทดลอง**



183963776

BUU\_Thesis\_60910022\_thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

ภาคผนวก จ-1 ระดับการย่อยของเอนไซม์แต่ละชนิดตามสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินจาก  
 ฟ้าไก่อ

ความเข้มข้นของซัสเตรต (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ระดับการย่อย (%)			
	เอนไซม์			
	ทริปซิน	เปปซิน	อัลคาเลส	ปาเปน
0.0 <sup>ns</sup>	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
1.2	3.65±0.57 <sup>a</sup>	1.32±1.25 <sup>ab</sup>	2.67±1.01 <sup>ab</sup>	0.64±0.73 <sup>b</sup>
3.0 <sup>ns</sup>	3.73±1.13	2.48±0.35	3.06±0.57	2.24±0.35
6.0	3.54±0.23 <sup>a</sup>	2.44±0.51 <sup>bc</sup>	2.96±0.11 <sup>ab</sup>	2.10±0.26 <sup>c</sup>
9.0	3.57±0.45 <sup>a</sup>	2.76±0.05 <sup>b</sup>	3.64±0.03 <sup>a</sup>	2.70±0.14 <sup>b</sup>
12.0	2.27±0.61 <sup>c</sup>	3.19±0.12 <sup>b</sup>	4.25±0.01 <sup>a</sup>	3.06±0.28 <sup>bc</sup>
15.0	1.33±0.12 <sup>c</sup>	2.43±0.04 <sup>b</sup>	3.05±0.09 <sup>a</sup>	2.27±0.18 <sup>b</sup>

a,b,... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

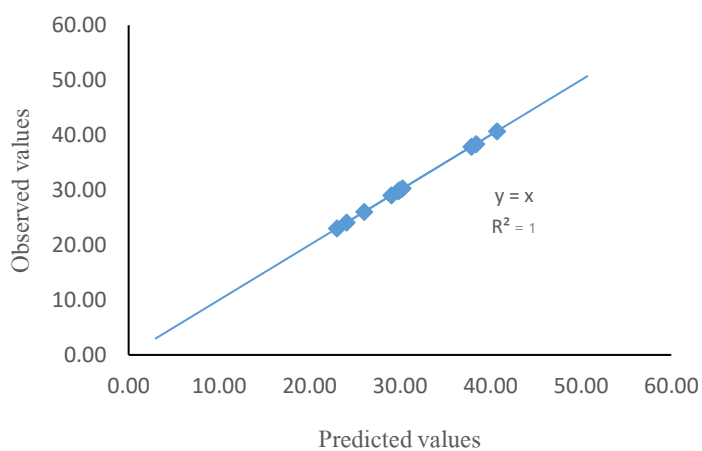
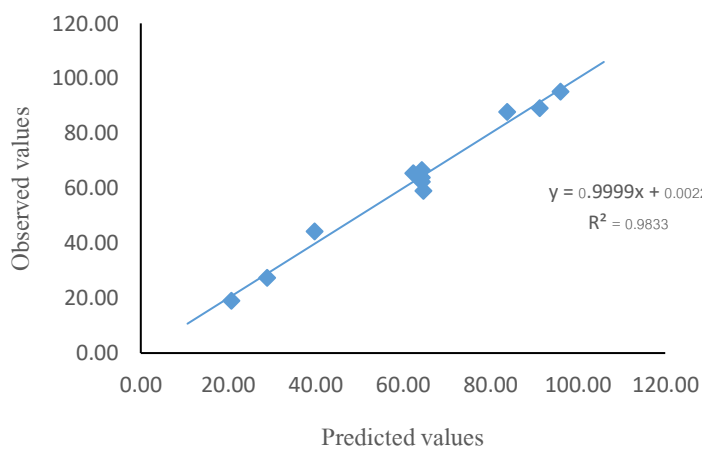
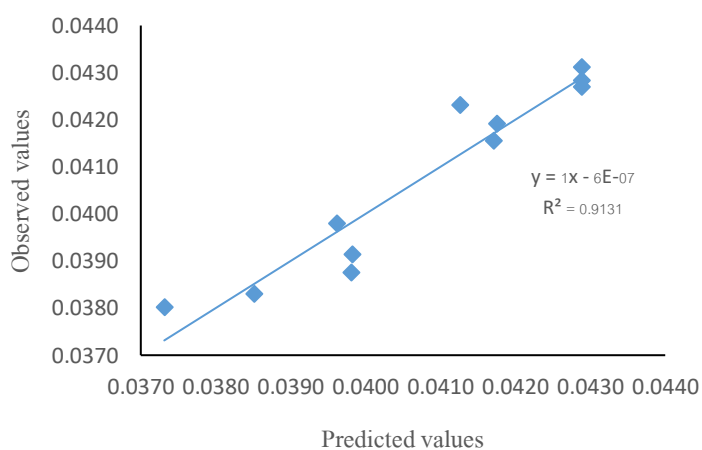
ภาคผนวก จ-2 ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

วัน	TBARS (mg MDA/kg meat sample)				
	SGH 0%	SGH 1%	SGH 3%	SGH 5%	SSP 0.3%
0	2.16 ± 0.04 <sup>aD</sup>	0.62 ± 0.06 <sup>bB</sup>	0.67 ± 0.13 <sup>bB</sup>	0.57 ± 0.08 <sup>bD</sup>	0.60 ± 0.01 <sup>bC</sup>
2	4.72 ± 0.17 <sup>aB</sup>	1.70 ± 0.28 <sup>bA</sup>	1.67 ± 0.31 <sup>bA</sup>	1.17 ± 0.24 <sup>bBC</sup>	1.08 ± 0.19 <sup>cAB</sup>
4	5.23 ± 0.06 <sup>aA</sup>	2.06 ± 0.16 <sup>bA</sup>	1.99 ± 0.16 <sup>bA</sup>	1.63 ± 0.19 <sup>bcAB</sup>	1.12 ± 0.30 <sup>cAB</sup>
6	5.15 ± 0.06 <sup>aA</sup>	2.41 ± 0.29 <sup>bA</sup>	1.81 ± 0.05 <sup>cA</sup>	1.75 ± 0.14 <sup>cdA</sup>	1.35 ± 0.17 <sup>dAB</sup>
8	5.39 ± 0.07 <sup>aA</sup>	2.47 ± 0.17 <sup>bA</sup>	1.63 ± 0.17 <sup>cA</sup>	1.65 ± 0.16 <sup>cA</sup>	1.50 ± 0.15 <sup>cA</sup>
10	4.20 ± 0.11 <sup>aC</sup>	2.02 ± 0.11 <sup>bA</sup>	1.59 ± 0.09 <sup>cA</sup>	1.80 ± 0.19 <sup>bcA</sup>	1.08 ± 0.02 <sup>dAB</sup>
12	4.02 ± 0.07 <sup>aC</sup>	2.48 ± 0.41 <sup>bA</sup>	1.86 ± 0.05 <sup>cA</sup>	1.10 ± 0.06 <sup>dC</sup>	0.93 ± 0.11 <sup>dBC</sup>
14	4.03 ± 0.04 <sup>aC</sup>	2.44 ± 0.55 <sup>bA</sup>	1.82 ± 0.16 <sup>bA</sup>	1.08 ± 0.19 <sup>cC</sup>	0.97 ± 0.10 <sup>cBC</sup>

SCH 0% คือ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต SCH 1% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% SCH 3% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% SCH 5% คือ ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% และ SSP 0.3% คือ ไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3%

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

A, B, C, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

Y<sub>1</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub>

ภาคผนวก จ-3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าจากการทำนาย (Predicted values) กับค่าจากการทดลอง (Observed values) ของปริมาณโปรตีน (Y<sub>1</sub>, มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Y<sub>3</sub>, Bound BPB,  $\mu\text{g}$ ) และ ABTS (Y<sub>4</sub>,  $\mu\text{mole TE/ mg protein}$ )



183963776

BUU iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

ภาคผนวก ฉ  
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ



183963776

BUU\_iThesis 60910022 thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142

ตารางภาคผนวก ฉ-1 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzyme	3	825.597	275.199	2120.24	0.000 <sup>sig</sup>
Error	8	1.038	0.130		
Total	11	826.635			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Vmax กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	0.24501	0.08167	8.04	0.008 <sup>sig</sup>
Error	8	0.08126	0.01016		
Total	11	0.32627			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Km กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	4.697	1.5656	5.43	0.025 <sup>sig</sup>
Error	8	2.305	0.2881		
Total	11	7.002			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-4 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kcat กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	248561	82854	8.05	0.008 <sup>sig</sup>
Error	8	82313	10289		
Total	11	330875			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า Kcat/Km กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	24036	8012.0	9.74	0.005 <sup>sig</sup>
Error	8	6579	822.3		
Total	11	30615			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 1.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	16.470	5.4900	6.42	0.016 <sup>sig</sup>
Error	8	6.844	0.8555		
Total	11	23.314			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางภาคผนวก จ-7 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 3  
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	4.007	1.3355	2.89	0.102 <sup>ns</sup>
Error	8	3.693	0.4616		
Total	11	7.699			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-8 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 6  
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	3.5512	1.18372	11.92	0.003 <sup>sig</sup>
Error	8	0.7942	0.09927		
Total	11	4.3454			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-9 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 9  
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	2.2965	0.76552	13.61	0.002 <sup>sig</sup>
Error	8	0.4499	0.05624		
Total	11	2.7465			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-10 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	5.9153	1.9718	16.66	0.001 <sup>sig</sup>
Error	8	0.9468	0.1183		
Total	11	6.8620			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-11 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับเอนไซม์แต่ละชนิด

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Enzymes	3	4.5381	1.51269	103.35	0.000 <sup>sig</sup>
Error	8	0.1171	0.01464		
Total	11	4.6552			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-12 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ โปรตีนกับเจลาติน ไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน (11 สิ่งทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	1023.1	102.310	21.22	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	106.1	4.821		
Total	32	1129.2			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-13 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่า TBARS กับเจลาตินไฮโดรไล-  
 เซตที่มีปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน (11 สิ่ง  
 ทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	0.023513	0.002351	5.86	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	0.008826	0.000401		
Total	32	0.032339			

<sup>sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-14 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำกับ  
 เจลาตินไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณเอนไซม์ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย  
 แตกต่างกัน (11 สิ่งทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	17704.0	1770.40	39.26	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	991.9	45.09		
Total	32	18695.9			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-15 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการ  
 ออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS กับเจลาตินไฮโดรไลเซตที่มีปริมาณเอนไซม์  
 ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน (11 สิ่งทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	0.006303	0.000630	72.33	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	0.000192	0.000009		
Total	32	0.006494			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-16 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการ  
ออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH กับเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณเอนไซม์  
ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน (11 สิ่งทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	0.001961	0.000196	50.72	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	0.000085	0.000004		
Total	32	0.002046			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-17 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งการ  
ออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP กับเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณเอนไซม์  
ร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยแตกต่างกัน (11 สิ่งทดลอง)

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	10	0.000012	0.000001	34.03	0.000 <sup>sig</sup>
Error	22	0.000001	0.000000		
Total	32	0.000012			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-18 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ  
โปรตีน ( $Y_1$ ) กับปริมาณเอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	339.499	67.900	219.94	0.000 <sup>sig</sup>
Linear	2	329.391	164.695	533.48	0.000
$X_1$	1	328.114	328.114	1062.83	0.000
$X_2$	1	1.276	1.276	4.13	0.098
Square	2	8.582	4.291	13.90	0.009
$X_1^2$	1	8.160	8.160	26.43	0.004
$X_2^2$	1	0.048	0.048	0.16	0.709
2-Way Interaction	1	1.526	1.526	4.94	0.077
$X_1 * X_2$	1	1.526	1.526	4.94	0.077
Error	5	1.544	0.309		
Lack-of-Fit	3	1.526	0.509	57.03	0.017
Pure Error	2	0.018	0.009		
Total	10	341.042			

<sup>sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-19 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่างค่า TBARS ( $Y_2$ ) กับปริมาณเอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	4	0.003754	0.000939	1.38	0.345 <sup>ns</sup>
Linear	2	0.001148	0.000574	0.84	0.476
$X_1$	1	0.000138	0.000138	0.20	0.669
$X_2$	1	0.001010	0.001010	1.48	0.269
Square	2	0.002606	0.001303	1.91	0.227
$X_1^2$	1	0.001522	0.001522	2.24	0.185
$X_2^2$	1	0.001844	0.001844	2.71	0.151
Error	6	0.004083	0.000681		
Lack-of-Fit	4	0.003357	0.000839	2.31	0.324
Pure Error	2	0.000726	0.000363		
Total	10	0.007838			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มียังมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-20 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ  
โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ ( $Y_3$ ) กับปริมาณเอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ใน  
การย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	5802.99	1160.60	59.03	0.000 <sup>sig</sup>
Linear	2	5668.96	2834.48	144.17	0.000
$X_1$	1	5663.58	5663.58	288.07	0.000
$X_2$	1	5.38	5.38	0.27	0.623
Square	2	50.43	25.21	1.28	0.355
$X_1^2$	1	48.98	48.98	2.49	0.175
$X_2^2$	1	0.83	0.83	0.04	0.845
2-Way Interaction	1	83.60	83.60	4.25	0.094
$X_1 * X_2$	1	83.60	83.60	4.25	0.094
Error	5	98.30	19.66		
Lack-of-Fit	3	88.33	29.44	5.91	0.148
Pure Error	2	9.97	4.99		
Total	10	5901.29			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-21 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่าง  
ความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS ( $Y_4$ ) กับปริมาณ  
เอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	0.000036	0.000007	10.51	0.011 <sup>sig</sup>
Linear	2	0.000006	0.000003	4.05	0.090
$X_1$	1	0.000005	0.000005	7.82	0.038
$X_2$	1	0.000000	0.000000	0.29	0.614
Square	2	0.000028	0.000014	20.30	0.004
$X_1^2$	1	0.000028	0.000028	40.58	0.001
$X_2^2$	1	0.000003	0.000003	4.08	0.099
2-Way Interaction	1	0.000003	0.000003	3.83	0.108
$X_1 * X_2$	1	0.000003	0.000003	3.83	0.108
Error	5	0.000003	0.000001		
Lack-of-Fit	3	0.000003	0.000001	25.52	0.038
Pure Error	2	0.000000	0.000000		
Total	10	0.000039			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางภาคผนวก จ-22 ผลการวิเคราะห์สัมพรรคถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่าง  
ความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ( $Y_5$ ) กับปริมาณ  
เอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	4	0.000018	0.000004	2.32	0.171 <sup>ns</sup>
Linear	2	0.000002	0.000001	0.47	0.648
$X_1$	1	0.000002	0.000002	0.92	0.374
$X_2$	1	0.000000	0.000000	0.01	0.924
Square	2	0.000016	0.000008	4.17	0.073
$X_1^2$	1	0.000015	0.000015	7.82	0.031
$X_2^2$	1	0.000004	0.000004	2.27	0.182
Error	6	0.000011	0.000002		
Lack-of-Fit	4	0.000011	0.000003	102.88	0.010
Pure Error	2	0.000000	0.000000		
Total	10	0.000029			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มียังมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-23 ผลการวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุของความสัมพันธ์ระหว่าง  
ความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ( $Y_5$ ) กับปริมาณ  
เอนไซม์ ( $X_1$ ) และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ( $X_2$ )

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Model	5	0.000002	0.000000	1.03	0.488 <sup>ns</sup>
Linear	2	0.000000	0.000000	0.28	0.764
$X_1$	1	0.000000	0.000000	0.52	0.503
$X_2$	1	0.000000	0.000000	0.05	0.838
Square	2	0.000001	0.000000	1.32	0.347
$X_1^2$	1	0.000000	0.000000	0.13	0.731
$X_2^2$	1	0.000001	0.000001	1.97	0.219
2-Way Interaction	1	0.000001	0.000001	1.95	0.222
$X_1 * X_2$	1	0.000001	0.000001	1.95	0.222
Error	5	0.000002	0.000000		
Lack-of-Fit	3	0.000002	0.000001	2463.24	0.000
Pure Error	2	0.000000	0.000000		
Total	10	0.000004			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-24 ผลการวิเคราะห์ค่าสี L\* ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลเสตจากเต้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
treatment	4	22.2356	5.55889	643.84	0.000 <sup>sig</sup>
Error	5	0.0432	0.00863		
Total	9	22.2787			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-25 ผลการวิเคราะห์ค่าสี a\* ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลเสตจากเต้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
treatment	4	3.61887	0.904719	1238.66	0.000 <sup>sig</sup>
Error	5	0.00365	0.000730		
Total	9	3.62253			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-26 ผลการวิเคราะห์ค่าสี b\* ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลเสตจากเต้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
treatment	4	11.7733	2.94334	141.33	0.000 <sup>sig</sup>
Error	5	0.1041	0.02083		
Total	9	11.8775			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-27 ผลการวิเคราะห์ค่า  $a_w$  ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
treatment	4	0.000187	0.000047	0.09	0.982 <sup>ns</sup>
Error	5	0.002640	0.000528		
Total	9	0.002827			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-28 ผลการวิเคราะห์ค่าความแข็งของลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริม  
และไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	3.3342	0.83355	22.17	0.002 <sup>sig</sup>
Error	5	0.1880	0.03761		
Total	9	3.5222			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-29 ผลการวิเคราะห์ค่าการเกาะติดของอาหารของลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้  
กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.1303	0.2826	2.60	0.161 <sup>ns</sup>
Error	5	0.5424	0.1085		
Total	9	1.6727			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-30 ผลการวิเคราะห์ค่าความยืดหยุ่นของลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่  
เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากทำไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.009401	0.002350	3.37	0.108 <sup>ns</sup>
Error	5	0.003488	0.000698		
Total	9	0.012889			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-31 ผลการวิเคราะห์ค่าการยึดเกาะกันของอาหารของลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้  
กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากทำไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.001377	0.000344	0.32	0.856 <sup>ns</sup>
Error	5	0.005426	0.001085		
Total	9	0.006803			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-32 ผลการวิเคราะห์ค่าพลังงานในการกัคของอาหารของลักษณะเนื้อสัมผัสของ  
ไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากทำไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.9741	0.24353	6.82	0.029 <sup>sig</sup>
Error	5	0.1785	0.03570		
Total	9	1.1526			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-33 ผลการวิเคราะห์ค่าพลังงานที่ใช้ในการเลี้ยงของอาหารของลักษณะเนื้อ  
สัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสได้จากทำไก่

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.9915	0.24786	11.15	0.010 <sup>sig</sup>
Error	5	0.1111	0.02223		
Total	9	1.1026			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-34 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากทำไก่ในวันที่ 0

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	5.77793	1.44448	244.76	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.05902	0.00590		
Total	14	5.83695			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-35 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากทำไก่ในวันที่ 2

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	27.4030	6.85074	113.66	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.6027	0.06027		
Total	14	28.0057			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-36 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 4

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	31.6606	7.91514	215.06	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.3680	0.03680		
Total	14	32.0286			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-37 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 6

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	28.1771	7.04428	256.80	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.2743	0.02743		
Total	14	28.4515			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-38 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 8

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	32.5198	8.12996	367.03	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.2215	0.02215		
Total	14	32.7414			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-39 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 10

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	17.4263	4.35657	311.52	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.1399	0.01399		
Total	14	17.5661			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-40 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 12

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	18.7948	4.69869	124.24	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.3782	0.03782		
Total	14	19.1730			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-41 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาติน  
ไฮโดรไลสได้จากเท่าไก่ในวันที่ 14

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	18.7003	4.67508	62.76	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.7449	0.07449		
Total	14	19.4453			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )



ตารางภาคผนวก ฉ-42 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไล-  
เสตจากเท้าไก่เป็นระยะเวลา 0 - 14 วัน

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Day	7	22.9514	3.27878	423.64	0.000 <sup>sig</sup>
Error	16	0.1238	0.00774		
Total	23	23.0753			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-43 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต  
1% จากเท้าไก่เป็นระยะเวลา 0 - 14 วัน

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Day	7	8.393	1.19899	13.52	0.000 <sup>sig</sup>
Error	16	1.419	0.08866		
Total	23	9.811			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-44 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต  
3% จากเท้าไก่เป็นระยะเวลา 0 - 14 วัน

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Day	7	3.5344	0.50492	19.48	0.000 <sup>sig</sup>
Error	16	0.4146	0.02591		
Total	23	3.9490			

<sup>Sig</sup> หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-45 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% จากทำไก่เป็นระยะเวลา 0 - 14 วัน

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Day	7	3.9106	0.55866	19.96	0.000 <sup>sig</sup>
Error	16	0.4479	0.02799		
Total	23	4.3585			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-46 ผลการวิเคราะห์ค่า TBARS ของไส้กรอกไก่ที่เติมเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต 0.3% จากทำไก่เป็นระยะเวลา 0 - 14 วัน

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Day	7	1.5602	0.22289	9.29	0.000 <sup>sig</sup>
Error	16	0.3837	0.02398		
Total	23	1.9439			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-47 ผลการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	2.6023	0.65058	16.96	0.000 <sup>sig</sup>
Error	10	0.3837	0.03837		
Total	14	2.9860			

Sig หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-48 ผลการวิเคราะห์ห้ลักษณะปรากฏของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	0.240	0.06000	0.14	0.966 <sup>ns</sup>
Block	29	133.873	4.61632	10.94	0.000
Error	116	48.960	0.42207		
Total	149	183.073			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีย่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-49 ผลการวิเคราะห์ห้สีของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	3.107	0.7767	2.77	0.030 <sup>ns</sup>
Block	29	249.840	8.6152	30.76	0.000
Error	116	32.493	0.2801		
Total	149	285.440			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่มีย่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-50 ผลการวิเคราะห์หักลิ้นของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่  
เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.773	0.4433	0.61	0.656 <sup>ns</sup>
Block	29	282.273	9.7336	13.41	0.000
Error	116	84.227	0.7261		
Total	149	368.273			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก ฉ-51 ผลการวิเคราะห์หรัสชาติของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอกไก่ที่  
เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	4.867	1.217	1.16	0.332 <sup>ns</sup>
Block	29	165.100	5.693	5.43	0.000
Error	116	121.533	1.048		
Total	149	291.500			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-52 ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของไส้กรอก  
ไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	1.533	0.3833	0.30	0.879 <sup>ns</sup>
Block	29	136.133	4.6943	3.64	0.000
Error	116	149.667	1.2902		
Total	149	287.333			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ตารางภาคผนวก จ-53 ผลการวิเคราะห์ความชอบโดยรวมของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของ  
ไส้กรอกไก่ที่เสริมและไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Treatment	4	3.573	0.8933	0.90	0.467 <sup>ns</sup>
Block	29	125.173	4.3163	4.35	0.000
Error	116	115.227	0.9933		
Total	149	243.973			

ns หมายถึง แตกต่างกันไม่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ )

ภาคผนวก  
ภาพประกอบงานวิจัย

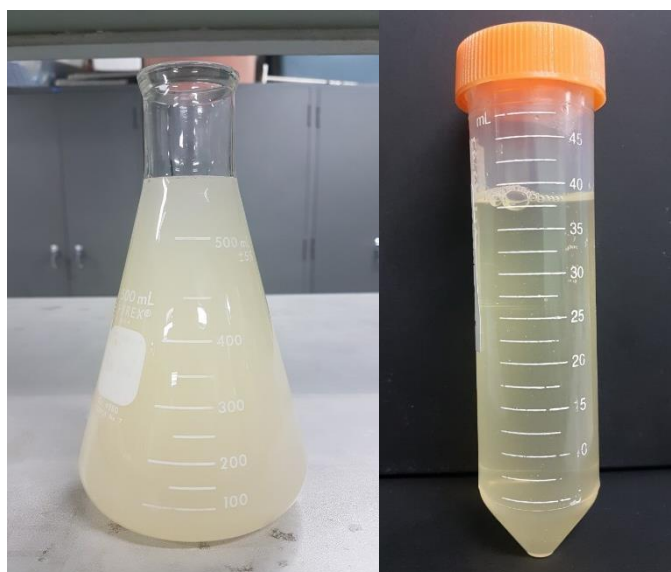


183963776

BUU\_Thesis\_60910022\_thesis / recv: 29102563 10:55:56 / seq: 142



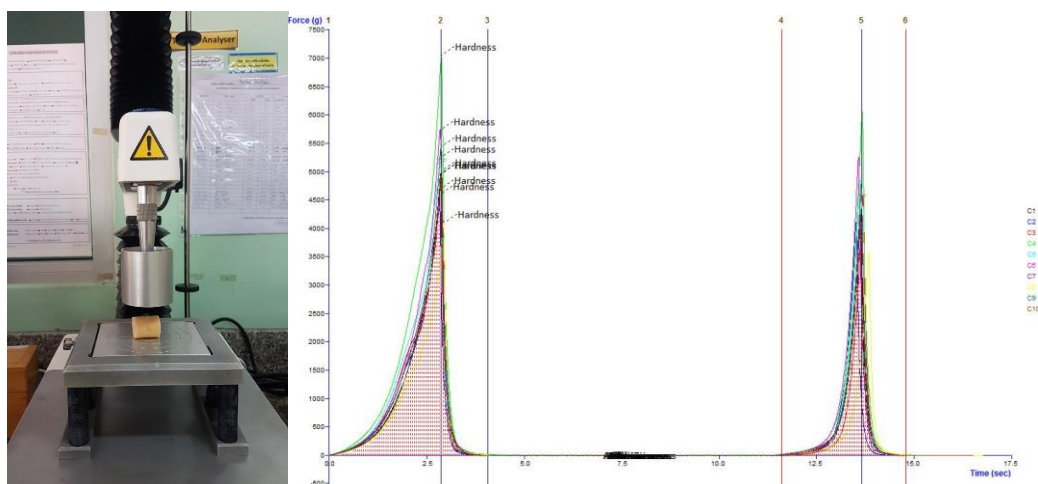
ภาพภาคผนวก ซ-1 เท้าไก่ (ภาพซ้าย) และเนื้ออกไก่ไม่มีหนัง (ภาพขวา) จากตลาดหนองมน  
จังหวัดชลบุรี



ภาพภาคผนวก ซ-2 ลักษณะของเจลาตินจากเท้าไก่ (ภาพซ้าย) และเจลาตินไฮโดรไลเสต  
จากเท้าไก่ (ภาพขวา)



ภาพภาคผนวก ข-3 ไส้กรอกไก่ 5 สิ่งทดลอง ได้แก่ ไส้กรอกไก่ไม่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต (SGH 0%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 1% (SGH 1%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 3% (SGH 3%) ไส้กรอกไก่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสต 5% (SGH 5%) และไส้กรอกไก่ที่เติมเตรโซเดียมฟอสเฟต 0.3% (SSP 0.3%)



ภาพภาคผนวก ข-4 การวิเคราะห์ห้ลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกไก่ด้วยเครื่อง Texture analyzer (ภาพซ้าย) และภาพแสดงผลการวิเคราะห์ (ภาพขวา)