



รายงานการวิจัย

โครงการนวัตกรรมอาหารเพื่อความปลอดภัยและมูลค่าเพิ่มนครชัยบุรินทร์  
(Food Innovation Center of Nakhon Chaiburin)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



## รายงานการวิจัย

# โครงการนวัตกรรมอาหารเพื่อความปลอดภัยและมูลค่าเพิ่มนครชัยบุรินทร์ (Food Innovation Center of Nakhon Chaiburin)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา

รองศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสาร

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรลักษณ์ รอดทอง

รองศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย ทองโสภาก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2566

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและสถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (องค์การมหาชน) ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ ขอขอบคุณ คุณศุภกาจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปของสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับงานควบคุมการเบิกจ่าย การรักษาเสถียรภาพของงบประมาณตลอดระยะเวลาของโครงการวิจัยจนเป็นที่เรียบร้อย อนึ่ง ขอขอบคุณนักศึกษาบัณฑิตและผู้ช่วยนักวิจัยประจำโครงการทุกท่าน ที่อุทิศตน มุ่งมั่นในการทำวิจัย ขอขอบคุณ คุณทิพวรรณ พิมพิจันทร์ คุณกฤษณพงศ์ แก้วบังเกิด และคุณภิรมณียา ชนะจน ที่ช่วยจัดทำรูปเล่มรายงานอย่างวิริยะอุตสาหะ และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือทุกท่าน ที่มีส่วนเกี่ยวข้องให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามท่านได้ทั้งหมด คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

มกราคม 2566

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## บทคัดย่อ

การผลิตข้าวขึ้นรูปด้วยกระบวนการเอ็กซ์ทรูชัน พบว่าการเติมส่วนผสมชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน (โปรตีนถั่วเหลืองสกัด โปรตีนเวย์สกัด) แป้งทนย่อยจากข้าวโพด และไฟเบอร์โซล (Fibersol™) ส่งผลให้ค่าดัชนีน้ำตาล (glycemic index) ลดลง โดยการเติมแป้งทนย่อยในระดับ 20% ส่งผลให้ค่าดัชนีน้ำตาลลดลงมากที่สุดคือ 52.5 ในขณะที่สูตรควบคุมมีค่า 86.2 และในการผลิตเส้นพาสต้าจากแป้งข้าวพบว่าการเติมโปรตีน (โปรตีนถั่วเหลืองสกัด เนื้ออกไก่โคราช โปรตีนเวย์สกัด) ส่งผลให้ค่าแรงดึง (tensile force) ลดลงและค่าดัชนีน้ำตาลเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับสูตรควบคุม การใช้เอ็กซ์ทรูชันเป็นแนวทางหนึ่งในการแปรรูปข้าวให้เกิดผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มและสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพจากข้าวได้

จุดเดือดแดงในไก่ปรุงสุกถูกกำจัดอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนเนื้ออกไก่จนอุณหภูมิแกนกลางได้ 80 องศาเซลเซียส ส่วนผสมที่ใช้ขนาดเนื้อได้แก่ เกลือโซเดียมคลอไรด์ น้ำตาล และพอลิฟอสเฟตมีผลน้อยต่อการเกิดจุดเดือดแดงเนื่องจากถูกจำกัดด้วยการดูดซึมเข้าไปในเนื้ออกไก่ อุณหภูมิที่ทำให้สุกนั้นเป็นปัจจัยสำคัญในการเกิดจุดเดือดแดง เนื่องจากมีผลโดยตรงต่อการสูญเสียสภาพของฮีโมโกลบิน เพื่อลดปัญหาการเกิดจุดเดือดแดงโดยไม่เกิดการสูญเสียปริมาณผลผลิตที่มากเกินไป จึงได้พัฒนากระบวนการให้ความร้อนร่วมกันระหว่างไมโครเวฟตามด้วยการอบไอน้ำ ซึ่งสามารถลดการเกิดจุดเดือดแดงเมื่อตัวอย่างได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 80 องศาเซลเซียส และถูกกำจัดโดยสมบูรณ์ ที่อุณหภูมิแกนกลางเท่ากับ 82 และ 85 องศาเซลเซียส การใช้ไมโครเวฟให้ความร้อนก่อนลดสามารถระยะเวลาการให้ความร้อน 28-48% เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนด้วยไอน้ำอย่างเดียว กระบวนการให้ความร้อนร่วมนี้ ไม่มีผลต่อการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ค่า pH ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity, WHC) และค่าแรงเฉือน (shear force) การให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟเป็นระยะเวลา 7 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส จึงเป็นกระบวนการให้ความร้อนที่มีประสิทธิภาพ ซึ่งสามารถลดการเกิดจุดเดือดแดงและให้ค่าการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกในระดับที่ยอมรับได้

การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยเทคโนโลยีอัลตราซาวด์ความเข้มสูงที่ระดับความเข้ม 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ( $W/cm^2$ ) เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยการสกัดด้วยกรดเป็นเวลา 42 ชั่วโมง (U-AS) ส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นเป็น 1.58% และผลผลิตของคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเป็น 6.28% เมื่อสกัดต่อด้วยเพปซินเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (U-PS) โดยคอลลาเจนที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ 82.84 - 85.70% คอลลาเจนยังคงแสดงโครงสร้างเกลียวสามสาย (Triple helix) ที่ชัดเจนเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเซอร์คูลาร์ไดโครอิมิสมิกโทรสโกปี ผลจากการวิเคราะห์ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared: FT-IR spectroscopy) บ่งชี้ว่าคลื่นเสียงความถี่สูงไม่มีผลต่อโครงสร้างระดับทุติยภูมิ

และอุณหภูมิการเสียสภาพ (Denaturation temperature:  $T_d$ ) ของคอลลาเจนที่ได้อยู่ในช่วง 34.3 - 35.1 องศาเซลเซียส น้ำหนักโมเลกุลของตัวอย่างคอลลาเจนที่สกัดได้สอดคล้องกับลักษณะของคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I) หลอดลมไก่เป็นวัตถุดิบทางเลือกหนึ่งที่ใช้สำหรับผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 และการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยในการสกัดเป็นเทคนิคที่สามารถเพิ่มผลผลิตโดยไม่ทำลายโครงสร้างของคอลลาเจน

แนวทางหนึ่งของการเพิ่มมูลค่าจากปลานิลคือการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันเพื่อพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ จากการศึกษาพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทแสดงสมบัติด้านออกซิเดชันต่ออนุมูลอิสระสังเคราะห์และต่อเซลล์ Hep-G2 ที่สูงกว่าเนื้อปลานิลหลังผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง โดยสภาวะการย่อยที่เหมาะสมคือการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (2.4L) ในระดับ 5% ของปริมาณโปรตีน เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เพปไทด์สำคัญที่แสดงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันคือเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสทีอีน (cysteine, C) และไทโรซีน (tyrosine, Y) โดยเพปไทด์ PGY ซึ่งเกิดจากย่อยด้วยโปรตีเอสในระบบย่อยอาหารด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico* gastrointestinal digestion) แสดงฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันในระดับเซลล์ Hep-G2 สูงสุดและยังมีผลส่งเสริมการแสดงออกของยีนส์เพอร์ออกซิเดส (peroxidase) และแคทาเลส (catalase) ดังนั้นไฮโดรไลเสทจากปลานิลจึงประกอบด้วยเพปไทด์ที่เมื่อย่อยในระบบย่อยอาหารแล้วอาจยังคงฤทธิ์ส่งเสริมสุขภาพ

การใช้เทคโนโลยีอัลตราซาวด์ความเข้มสูงยังสามารถเพิ่มการละลายของแอคโตมัยโอซินจากปลานิลที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.1-0.3 โมลาร์ โดยความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มอัลตราซาวด์เพิ่มขึ้นจนถึง 20.62 W/cm<sup>2</sup> อย่างไรก็ตาม การใช้อัลตราซาวด์ความเข้มสูงส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformational changes) และส่งผลให้เกิดการฉีกขาดของแอคโตมัยโอซิน โดยสภาวะเกลือสูง 0.6 โมลาร์จะเกิดการฉีกขาดมากกว่าในสภาวะเกลือต่ำ 0.2 โมลาร์ และเมื่อประยุกต์อัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อเหนี่ยวนำการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่ระดับความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1 และ 2% พบว่าอัลตราซาวด์สามารถเพิ่มคุณภาพซูริมิเจลที่เติมเกลือ 0.5% แต่ส่งผลลบต่อคุณภาพของเจลที่เติมเกลือ 1 และ 2% เนื่องจากอัลตราซาวด์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนที่มากกว่า ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าอัลตราซาวด์ความเข้มสูงสามารถนำมาใช้ปรับปรุงคุณภาพเจลของซูริมิเจลที่มีเกลือต่ำ (0.5%) ซึ่งเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ซูริมิแปรรูปเกลือต่ำ

นอกจากนี้การปรับปรุงคุณภาพเจลของซูริมิปลาปากคม (lizardfish) และซูริมิปลาทรายแดงสามารถทำได้โดยใช้กรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับ 0.15 และ 0.1% ตามลำดับ ซึ่งทำให้ค่าแรง และระยะทาง ณ จุดแตกหักของปลาทรายแดงมีค่าเพิ่มสูงสุด 150% และ 90% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมสาร การเติมสารทั้งสองเหนี่ยวนำให้ไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) เกิดการจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และยังมีส่งเสริมการเกาะตัวของโปรตีนด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) ส่งผลให้เกิดเจลของซูริมิดีขึ้น

## Abstract

Production of reformed rice by extrusion process revealed that addition of protein (soy protein isolate, whey protein), resistant maize starch and Fibersol™ resulted in a reduction of glycemic index. Samples added 20% resistant maize starch exhibited the lowest glycemic index of 52.5, while that of the control was 86.2. In addition, rice pasta added protein (soy protein isolate, chicken Korat breast meat, whey protein isolate) showed a decrease in tensile force and an increase in glycemic index as compared to the control. Extrusion is a means to increase value of rice and produce functional rice products.

Red blood spot (RBS) in cooked chicken meat product was completely eliminated when core temperature reached 80 °C. Marinating ingredients, including sodium chloride, sugar, and polyphosphate, appeared to have a minimal effect on RBS formation due to their limited absorption into the chicken breast. The cooking temperature is a major factor governing RBSs, as it directly affects the denaturation of hemoglobin. To cope with the RBS problem without the excessive loss in cook yield, the combined thermal process of microwave heating followed by steaming was developed. RBS incidence was reduced when core temperature reached 80 °C and was completely eliminated when core temperature increased to 82 and 85 °C. The use of microwave preheating reduced the process time by 28-48% as compared to steaming alone. The combined heating process had no effect on cooking loss, pH, water holding capacity and shear force of cooked products. The combined process of 7-min microwave heating followed by steaming until the core temperature reached 82 °C is the effective thermal process that can reduce the RBS and yield acceptable cooking loss.

Collagen extraction from chicken trachea using high intensity ultrasound (HIU) at 17.87 W/cm<sup>2</sup> for 20 min followed by acid for 42 h (U-AS) resulted in 1.58% yield. The yield increased to 6.28% when pepsin-assisted extraction was applied for 36 h (U-PS). Purity of extraction collagen ranged 82.84-85.70%. Based on circular dichroism spectroscopy, triple helical structure of the extracted collagen remained. Fourier Transform Infrared (FT-IR) spectroscopy revealed that HIU had no effect on the secondary structure of the extracted collagen. Denaturation temperature of collagen ranged 34.3-35.1 °C. Molecular weight of

the extracted collagen showed the comparable characteristics to that of type I collagen. Chicken trachea is an alternative source for collagen type I extraction and the HIU-assisted extraction is a promising technique that could increase yield without damaging collagen structure.

One means to valorize tilapia is the production of protein hydrolysate with antioxidant activity for functional food products. After *in vitro* gastrointestinal (GI) digestion, protein hydrolysate exhibited higher antioxidant activities towards chemical free radicals and Hep-G2 cell lines than did the tilapia flesh. The optimal condition of hydrolysis was 5% Alcalase 2.4L based on protein content of the substrate for 10 h. Antioxidant peptides found in the hydrolysate contained cysteine and tyrosine. The peptide, PGY, resulted from *in silico* GI digestion exhibited the highest cellular antioxidant towards Hep-G2. In addition, it upregulated expression of genes encoding peroxidase and catalase. Thus, tilapia hydrolysate still contained peptides after GI digestion, which could have health-promoting effect.

HIU technology increased solubility of tilapia actomyosin at 0.1-0.3 M NaCl. Protein solubility increased as intensity increased up to 20.62 W/cm<sup>2</sup>. However, HIU induced conformational changes and disruption of actomyosin, which occurred to a greater extent at higher salt content (0.6 M) than at lower salt content (0.2 M). When HIU was applied to induce gelation of threadfin bream surimi at 0.5, 1 and 2% NaCl, it was found that HIU improved gel-forming ability of surimi gel at 0.5%. But, it negatively affected gelation of 1%- and 2%-NaCl surimi gels because HIU induced greater protein conformational changes at higher salt contents. This study suggested that HIU could improve surimi gel at low NaCl content (0.5%), which could be used to produce low salt surimi seafood products.

Gel improvement of lizardfish and threadfin bream surimi can be achieved through the combined addition of ascorbic and hydrogen peroxide at 0.15 and 0.1%, respectively. This increased breaking force and breaking distance by 150 and 90%, respectively, as compared to the control. Addition of these additives induced formation of disulfide bonds of myosin heavy chain and promote hydrophobic interactions, contributing to enhancement of tropical surimi gelation

## คำอธิบายสัญลักษณ์

|                  |  |
|------------------|--|
| a*               | ค่าสีแดง (Redness)   |
| Ala (A)          | อะลานีน (Alanine)  |
| Arg (R)          | อาร์จินีน (Arginine)   |
| Asn (N)          | แอสพาราจีน (Asparagine)  |
| AsA              | กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid)  |
| Asp (D)          | แอสพาร์ติก (Aspartic acid)   |
| ATP              | สารให้พลังงานสูงแก่เซลล์ (Adenosine triphosphate)                        |
| b*               | ค่าสีเหลือง (Yellowness)   |
| cm <sup>-1</sup> | เลขคลื่น (Wavenumber)  |
| Ca <sup>2+</sup> | แคลเซียม (Calcium)   |
| Cys (C)          | ซิสเทอีน (Cysteine)  |
| CAA              | ฤทธิ์การต่อต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์<br>(cellular antioxidant activity) |
| CAT              | เอนไซม์คาตาเลส (Catalase)  |
| CD               | การบิดระนาบแสงเป็นรูปวงรี (Circular Dichroism)                           |
| DH               | ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis)                                      |
| DI               | น้ำปราศจากไอออน (De-ionized water)                                       |
| FS               | เส้นใยอาหารประเภทละลายน้ำ (Fiber sol-2)                                  |
| GI               | ระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal)                                      |
| Glu (E)          | กลูตามิก (Glutamic acid)   |
| Gln (Q)          | กลูตามีน (Glutamine)   |
| Gly (G)          | ไกลซีน (Glycine)   |
| GPx              | เอนไซม์กลูตาไธโอน เพอร์รอกซิเดส (Glutathione peroxidase)                 |
| HepG2            | เซลล์มะเร็งตับ (Human hepatoma cell line)                                |
| His (H)          | ฮิสทีดีน (Histidine)   |
| HIU              | คลื่นอัลตราซาวด์/ความถี่สูง (High Intensity Ultrasound)                  |
| HM               | แป้งทนย่อย (Hi maize-260)  |



## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| Hyl                           | ไฮดรอกซีไลซีน (Hydroxylysine)                             |
| Hyp                           | ไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline)                           |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)                  |
| Ile (I)                       | ไอโซลิวซีน (Isoleucine)                                   |
| kDa                           | กิโลดาลตัน (kDa)  |
| kHz                           | กิโลเฮิร์ตซ์ (kilohertz)                                  |
| Leu (L)                       | ลิวซีน (Leucine)  |
| LZ                            | ปลาปากคม (Lizard fish)                                    |
| L*                            | ค่าความสว่าง (Lightness)                                  |
| Met (M)                       | เมไทโอนีน (Methionine)                                    |
| mg                            | มิลลิกรัม (Milligram)                                     |
| min                           | นาที (Minute)   |
| mm                            | มิลลิเมตร (Millimeter)                                    |
| mL                            | มิลลิลิตร (Milliliter)                                    |
| mM                            | มิลลิโมลาร์ (Millimolar)                                  |
| m/z                           | การตัดแยกมวลต่อประจุ (Mass per charge ratio)              |
| M                             | หน่วยความเข้มข้นโมลาร์ (Molarity)                         |
| MHC                           | มัยโอซินสายหนัก (Myosin heavy chain)                      |
| Mw                            | มวลโมเลกุล (Molecular weight)                             |
| MW                            | การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (Microwave heating)            |
| MWCO                          | การตัดสรรด้วยน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight cut off)    |
| nm                            | นาโนเมตร (Nanometer)                                      |
| NM                            | ตัวอย่างที่ไม่ได้ถูกนวดกับส่วนผสม (non-marinated samples) |
| N                             | หน่วยความเข้มข้นนอร์มอล (Normality)                       |
| NaCl                          | เกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride)                     |
| Pro (P)                       | โพรลีน (Proline)  |
| PBS                           | โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate buffer)           |

## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

|                     |   |
|---------------------|---|
| PCA                 | การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis)                                       |
| RBCs                | เซลล์เม็ดเลือดแดง (Red blood cells)   |
| RBSs                | จุดเลือดแดง (Red blood spots)   |
| RO                  | น้ำบริสุทธิ์ประเภท 3 (Reverse Osmosis water)  |
| Ser (S)             | เซอรีน (Serine)   |
| SOD                 | เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase)  |
| RF                  | แป้งข้าว (Rice flour)   |
| ROS                 | อนุมูลอิสระชนิดออกซิเจน (Radical oxygen species)  |
| S <sub>0</sub> -ANS | ศักยภาพพื้นผิวเซลล์ที่ไม่ชอบน้ำ (Surface hydrophobicity)  |
| SDS-PAGE            | เทคนิคการแยกโปรตีนด้วยประจุไฟฟ้า<br>(Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) |
| SPI                 | โปรตีนถั่วเหลืองสกัด (Soy protein isolate)  |
| ST-FTIR             | การใช้แสงซินโครตรอนในย่านรังสีอินฟราเรด<br>(Synchrotron radiation FTIR หรือ SR-FTIR)            |
| STPP                | โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (Sodium tripolyphosphate)  |
| TB                  | ปลาทรายแดง (Threadfin beam fish)  |
| Td                  | อุณหภูมิการเสียสภาพ (Denatured temperature)   |
| Thr (T)             | ทรีโอนีน (Threonine)  |
| Trp (W)             | ทริптоแฟน (Tryptophan)  |
| Tyr (Y)             | ไทโรซีน (Tyrosine)  |
| UF                  | การกรองโดยใช้เยื่อบาง (Ultrafiltration)   |
| Val (V)             | วาลีน (Valine)  |
| WHC                 | ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water holding capacity)   |
| WPI                 | เวย์โปรตีนสกัด (Whey protein isolate)   |
| W/cm <sup>-2</sup>  | วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (Watt per centimeter)  |
| %                   | ร้อยละ (Percentage)   |
| %v/v                | ร้อยละปริมาตรต่อปริมาตร (Volume by volume)  |

## คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

|             |   |
|-------------|---|
| %w/v        | ร้อยละน้ำหนักต่อปริมาตร (Weight by volume)  |
| $\times g$  | ความเร่งโน้มถ่วง (Gravitational acceleration)   |
| $\mu$ DSC   | การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางความร้อน<br>(Micro-Differential Scanning Calorimetry) |
| $\mu g$     | ไมโครกรัม (Microgram)   |
| $\mu L$     | ไมโครลิตร (Microliter)  |
| $\mu mol$   | ไมโครโมล (Micromole)  |
| $\mu M$     | ไมโครโมลาร์ (Micromolar)  |
| $\theta$    | องศาการเลี้ยวเบนของแสงแบบวงรี (Ellipticity)   |
| $\alpha$    | แอลฟา (Alfa)  |
| $\beta$     | เบต้า (Beta)  |
| $\gamma$    | แกมมา (Gamma)   |
| $\Delta H$  | พลังงานความร้อน (Enthalpy)  |
| $^{\circ}C$ | องศาเซลเซียส (Degree Celsius)   |

## สารบัญ

|  |    |
|--|----|
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ก  |
| บทคัดย่อ (ภาษาไทย) .....   | ข  |
| บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) .....  | ง  |
| คำอธิบายสัญลักษณ์ .....  | ฉ  |
| บทที่ 1 บทนำ.....  | 1  |
| 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย .....  | 1  |
| 1.2 วัตถุประสงค์.....  | 4  |
| 1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย .....   | 4  |
| 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....  | 4  |
| บทที่ 2 ปริทัศน์และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....  | 5  |
| 2.1 ข้าวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์ .....  | 5  |
| 2.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและ<br>ความสัมพันธ์กับเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก.....  | 6  |
| 2.3 การลดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่นวดสุกโดยความร้อนจากเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับการ<br>ใช้ไอน้ำ.....  | 7  |
| 2.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี .....   | 9  |
| 2.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน<br>แอคโตไมโอซินจากปลานิล ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์<br>ต่ำ..... | 11 |
| 2.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลานิล.....  | 13 |
| 2.7 คุณลักษณะของเพปไทด์จากปลานิลและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วย<br>โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์ .....  | 13 |
| 2.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มี<br>โซเดียมคลอไรด์ต่ำ.....   | 15 |

|   |    |
|---|----|
| 2.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของการสั้นของซูริมิจากปลาเขตร้อน.....                     | 16 |
| บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....   | 18 |
| 3.1 ข้าวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์ .....   | 18 |
| 3.1.1 วัตถุประสงค์และสารเคมี.....   | 18 |
| 3.1.2 การเตรียมตัวอย่างแป้งข้าวผสม ingredients .....  | 18 |
| 3.1.3 การผลิตตัวอย่างข้าวขึ้นรูป.....   | 19 |
| 3.1.4 การผลิตเส้นสปาเก็ตตี้ .....   | 19 |
| 3.1.5 การทดสอบอายุการเก็บ.....  | 20 |
| 3.1.6 การวิเคราะห์ค่าสี .....   | 20 |
| 3.1.7 การวิเคราะห์สมบัติทางการหุงต้ม (Cooking properties).....  | 20 |
| 3.1.8 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของข้าวสุก .....   | 20 |
| 3.1.9 Kinetic digestion .....   | 21 |
| 3.1.10 การทดสอบทางประสาทสัมผัส scoring test.....  | 22 |
| 3.1.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัส hedonic scale test .....   | 23 |
| 3.1.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัส scoring test ประเมินอายุการเก็บ .....  | 23 |
| 3.1.13 คุณสมบัติทางความร้อน.....  | 24 |
| 3.1.14 ความต้านทานต่อแรงดึง .....   | 24 |
| 3.1.15 ศึกษาโครงสร้าง secondary structural ของโปรตีน เอกซ์ทรูเดตและเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก .....                                   | 25 |
| 3.1.16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....  | 25 |
| 3.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและความสัมพันธ์กับการเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก ..... | 25 |
| 3.2.1 ส่วนผสมและสารเคมี .....   | 25 |
| 3.2.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้ออกไก่ขนาด.....  | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมและฟอสฟอรัส .....  | 27 |
| 3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส .....  | 27 |
| 3.2.5 การสกัดฮีโมโกลบินจากเลือดไก่ .....  | 28 |
| 3.2.6 การเสียสภาพจากความร้อนของฮีโมโกลบิน .....   | 28 |
| 3.2.7 ผลของอุณหภูมิการให้ความร้อนต่อการเกิดจุดเลือดแดง .....  | 29 |
| 3.2.8 การส่องภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Microscopy) .....  | 29 |
| 3.2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....  | 30 |
| 3.3 การลดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่ขนาดสุกโดยการให้ความร้อนด้วยเทคนิคไมโครเวฟ<br>รวมกับการใช้ไอน้ำ ..... | 30 |
| 3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้ออกไก่ขนาด .....   | 30 |
| 3.3.2 การให้ความร้อน (cooking) .....  | 31 |
| 3.3.3 พูเรียทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR<br>Spectroscopy) .....     | 31 |
| 3.3.4 คุณภาพของเนื้ออกไก่สุก .....  | 32 |
| 3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....  | 33 |
| 3.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี .....                            | 34 |
| 3.4.1 สารเคมี .....   | 34 |
| 3.4.2 การเก็บและเตรียมวัตถุดิบ .....  | 34 |
| 3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้า และ โปรตีน .....  | 34 |
| 3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณไขมัน .....  | 34 |
| 3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนและคอลลาเจน .....   | 35 |
| 3.4.6 การสกัดคอลลาเจนแบบดั้งเดิม .....  | 35 |
| 3.4.7 การสกัดคอลลาเจนด้วยกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง .....  | 36 |
| 3.4.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด .....   | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 3.4.9 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโน.....   | 37 |
| 3.4.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริ มิเตอร์( $\mu$ DSC) ..  | 38 |
| 3.4.11 การวิเคราะห์ลักษณะสเปกตรัม.....   | 38 |
| 3.4.12 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน.....  | 39 |
| 3.4.13 การระบุชนิดโปรตีน .....   | 39 |
| 3.4.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....  | 40 |
| 3.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน<br>แอคโตไมโอซินจากปลาไนล ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์<br>ต่ำ..... | 41 |
| 3.5.1 วัสดุและสารเคมี.....   | 41 |
| 3.5.2 การสกัดโปรตีนแอคโตไมโอซิน.....   | 41 |
| 3.5.3 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูง.....   | 42 |
| 3.5.4 การทดสอบกิจกรรมของ $Ca^{2+}$ -ATPase .....   | 43 |
| 3.5.5 วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl group) และหมู่ซัลไฮดริล<br>ที่ทำปฏิกิริยา (reactive sulfhydryl group).....   | 43 |
| 3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณ surface hydrophobicity.....   | 44 |
| 3.5.7 วิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size) และ zeta potential.....  | 44 |
| 3.5.8 วิเคราะห์ความขุ่น (turbidity).....   | 44 |
| 3.5.9 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel<br>electrophoresis (SDS-PAGE).....  | 45 |
| 3.5.10 การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy).....   | 45 |
| 3.5.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....  | 45 |
| 3.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลาไนล.....  | 46 |
| 3.6.1 วัสดุและสารเคมี.....   | 46 |
| 3.6.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท .....  | 47 |

|   |    |
|---|----|
| 3.6.3 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง ( <i>In vitro</i> gastrointestinal (GI) digestion) .....  | 47 |
| 3.6.4 วิเคราะห์ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH) และความสามารถในการย่อย (Digestibility).....                                      | 49 |
| 3.6.5 วิเคราะห์การกระจายน้ำหนักโมเลกุลน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight (MW) distribution) โดย Size exclusion chromatography (SEC) ..... | 49 |
| 3.6.6 วิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมี .....   | 50 |
| 3.6.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ .....   | 52 |
| 3.6.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....  | 54 |
| 3.7 คุณสมบัติของเพปไทด์จากปลาไนและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์ .....              | 54 |
| 3.7.1 วัสดุและสารเคมี.....  | 54 |
| 3.7.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography).....  | 55 |
| 3.7.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS.....  | 57 |
| 3.7.4 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลองทางคอมพิวเตอร์ (in silico simulated gastrointestinal (GI) digestion).....                        | 58 |
| 3.7.5 วิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์ .....  | 59 |
| 3.7.6 วิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS•+ .....   | 59 |
| 3.7.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ .....   | 60 |
| 3.7.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene expression).....   | 61 |
| 3.7.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....  | 62 |
| 3.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ.....                              | 63 |
| 3.8.1 วัสดุและสารเคมี.....  | 63 |
| 3.8.2 การเตรียมซูริมิที่สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นต่างๆ .....  | 63 |



|   |    |
|---|----|
| 3.8.3 การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงกับตัวอย่างเนื้อชูริมิ .....   | 63 |
| 3.8.4 การทดสอบความสามารถในการสกัดโปรตีน .....   | 64 |
| 3.8.5 การทดสอบกิจกรรมของ Ca <sup>2+</sup> -ATPase ที่คงเหลือ .....  | 64 |
| 3.8.6 วิเคราะห์ปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl group) และหมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา (reactive sulfhydryl group)..... | 65 |
| 3.8.7 การวิเคราะห์ surface hydrophobicity.....  | 65 |
| 3.8.8 การเตรียมเจลชูริมิ และวิเคราะห์คุณสมบัติของเจล.....   | 65 |
| 3.8.9 วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) ที่ละลายใน trichloroacetic acid (TCA).....   | 66 |
| 3.8.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE).....                                   | 66 |
| 3.8.11 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy .....   | 66 |
| 3.8.12 การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM) .....                                    | 67 |
| 3.8.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....   | 67 |
| 3.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของการสั้นของชูริมิจากปลาเขตร้อน.....                               | 67 |
| 3.9.1 วัตถุประสงค์.....   | 67 |
| 3.9.2 การเตรียมเจลชูริมิ .....  | 68 |
| 3.9.3 คุณสมบัติของเจล.....  | 68 |
| 3.9.4 การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) .....                 | 69 |
| 3.9.5 วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (Total sulfhydryl group content, TSH) .....   | 69 |
| 3.9.6 สเปกโทรสโกปีของการสั้น (Vibrational spectroscopy) .....   | 70 |

|   |     |
|---|-----|
| 3.9.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA).....   | 71  |
| 3.9.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....   | 71  |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล.....   | 72  |
| 4.1 ข้าวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์ .....   | 72  |
| 4.1.1 ผลของการเติมโปรตีนและใยอาหารต่อ .....   | 72  |
| 4.1.2 การศึกษาผลของการเติมโปรตีนในเส้นสปาเก็ตตี้สตาร์ชข้าวเจ้า.....   | 94  |
| 4.1.3 สรุปผลการวิจัย .....  | 104 |
| 4.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและ<br>ความสัมพันธ์กับการเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก ..... | 105 |
| 4.2.1 ความสามารถในการแพร่ผ่านของส่วนผสม.....  | 105 |
| 4.2.2 ผลของส่วนผสมต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบิน .....   | 106 |
| 4.2.3 การเกิดจุดเลือดแดงและการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss)....   | 110 |
| 4.2.4 การวิเคราะห์ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ .....  | 113 |
| 4.2.5 สรุปผลการวิจัย .....  | 114 |
| 4.3 การลดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่นวดสุกโดยการให้ความร้อนด้วยเทคนิคไมโครเวฟ<br>ร่วมกับการใช้ไอน้ำ .....                               | 115 |
| 4.3.1 รูปแบบของเวลา-อุณหภูมิ (Time-temperature profiles) .....  | 115 |
| 4.3.2 คุณภาพของเนื้ออกไก่สุก.....   | 116 |
| 4.3.3 การเกิดจุดเลือดแดง.....   | 120 |
| 4.3.4 พูเรียรัทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR<br>spectroscopy) .....                                 | 120 |
| 4.3.5 สรุปผลการวิจัย .....  | 124 |
| 4.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี ...  | 125 |
| 4.4.1 องค์ประกอบทางเคมี.....  | 125 |
| 4.4.2 ผลิตภัณฑ์คอลลาเจน .....   | 125 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.4.3 กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....  | 128 |
| 4.4.4 ลำดับกรดอะมิโน.....  | 130 |
| 4.4.5 ไมโครดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริ มิเตอร์ (μDSC).....  | 132 |
| 4.4.6 Ultraviolet (UV) spectroscopy.....   | 133 |
| 4.4.7 เซอร์คิวลาร์ไดโครอิสซึมสเปกโทรสโกปี (Circular dichroism: CD spectroscopy)<br>.....   | 134 |
| 4.4.8 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy.....   | 136 |
| 4.4.9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....   | 137 |
| 4.4.10 ผลการวิเคราะห์ LC-MS/MS .....   | 138 |
| 4.4.11 สรุปผลการวิจัย.....   | 139 |
| 4.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีน<br>แอกโตไมโอซินจากปลานิล ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) ในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์<br>ต่ำ..... | 140 |
| 4.5.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการสกัดโปรตีน.....   | 140 |
| 4.5.2 ผลการศึกษากิจกรรมของ $Ca^{2+}$ -ATPase .....   | 142 |
| 4.5.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล .....  | 143 |
| 4.5.4 ผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity .....  | 146 |
| 4.5.5 ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาค.....   | 147 |
| 4.5.6 ผลการวิเคราะห์ Zeta potential .....  | 149 |
| 4.5.7 ผลการวิเคราะห์ความขุ่น.....  | 150 |
| 4.5.8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE.....   | 151 |
| 4.5.9 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค .....  | 152 |
| 4.5.10 สรุปผลการวิจัย.....   | 154 |
| 4.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลานิล.....  | 154 |

|  |     |
|--|-----|
| 4.6.1 ผลต้านออกซิเดชันของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยและการจำลองการย่อยในระบบ<br>กระเพาะอาหาร (gastrointestinal (GI) digestion).....                     | 154 |
| 4.6.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH) และการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MW<br>Distribution).....   | 158 |
| 4.6.3 กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมี .....   | 159 |
| 4.6.4 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ .....  | 162 |
| 4.6.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) และการ<br>วิเคราะห์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation analysis)..... | 164 |
| 4.6.5 สรุปผลการวิจัย .....   | 166 |
| 4.7 คุณลักษณะของเพปไทด์จากปลาไนและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วย<br>โปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์ .....                     | 166 |
| 4.7.1 การทำบริสุทธิ์เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน.....   | 166 |
| 4.7.2. การระบุเพปไทด์และการจำลองการย่อยด้วยคอมพิวเตอร์ ( <i>in silico</i> GI digestion)<br>.....   | 169 |
| 4.7.3. กิจกรรมต้านออกซิเดชันของเพปไทด์.....  | 174 |
| 4.7.4. การควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ .....  | 179 |
| 4.7.5 สรุปผลการวิจัย .....   | 185 |
| 4.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มี<br>โซเดียมคลอไรด์ต่ำ.....                                     | 186 |
| 4.8.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้.....  | 186 |
| 4.8.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรม $Ca^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือ .....   | 187 |
| 4.8.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมดและหมู่ซัลไฟไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา..   | 189 |
| 4.8.4 ผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity .....  | 190 |
| 4.8.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเนื้อสัมผัส.....   | 192 |
| 4.8.6 ผลการวิเคราะห์ค่าสี.....   | 193 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.8.7 การสลายโมเลกุลของโปรตีนจากเอนไซม์ (Proteolysis).....  | 194 |
| 4.8.8 ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลำดับที่สอง (secondary structure) ของโปรตีน                                      | 195 |
| 4.8.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคของเจลซูร์มิ.....   | 197 |
| 4.8.10 สรุปผลการวิจัย.....  | 198 |
| 4.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของ<br>การสั้นของซูร์มิจากปลาเขตร้อน..... | 199 |
| 4.9.1 คุณสมบัติของเจล.....  | 199 |
| 4.9.2 การใช้ SDS-PAGE วิเคราะห์การเกิดพันธะข้ามในโครงสร้างโปรตีน (protein cross-<br>linking).....               | 202 |
| 4.9.3 ปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (TSH group content).....   | 204 |
| 4.9.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน .....                                      | 205 |
| 4.9.4 โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structures) ของโปรตีน.....  | 207 |
| 4.9.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) .....  | 220 |
| 4.9.6 สรุปผลการวิจัย.....   | 222 |
| บรรณานุกรม.....   | 223 |
| ภาคผนวก.....  | 264 |
| ภาคผนวก ก.....  | 264 |
| ภาคผนวก ข.....  | 268 |
| ภาคผนวก ค.....  | 277 |
| ภาคผนวก ง.....  | 288 |
| ประวัติผู้วิจัย.....  | 291 |

## สารบัญตาราง

|   | หน้า |
|---|------|
| ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์สำหรับการทำบริสุทธิ์.....  | 57   |
| ตารางที่ 3.2 โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์สำหรับเครื่อง LC-MS/MS.....  | 58   |
| ตารางที่ 4.1 ค่าสี ( $L^*$ , $a^*$ และ $b^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป.....  | 74   |
| ตารางที่ 4.2 เวลาและปริมาณน้ำที่ใช้หุงของข้าวขึ้นรูป.....   | 74   |
| ตารางที่ 4.3 ค่าความแข็ง (Hardness) ของข้าวขึ้นรูป.....   | 76   |
| ตารางที่ 4.4 ลักษณะปรากฏข้าวขึ้นรูปที่เป็นข้าวสารและข้าวหุงสุก.....   | 77   |
| ตารางที่ 4.5 ค่า eGI ของข้าวขึ้นรูปหุงสุก.....  | 80   |
| ตารางที่ 4.6 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสแบบระดับคะแนน scoring test ในข้าวขึ้นรูป<br>สุก.....  | 81   |
| ตารางที่ 4.7 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ hedonic test* ในข้าวขึ้นรูป<br>สุก.....   | 82   |
| ตารางที่ 4.8 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องสี แบบ scoring test* ในข้าวขึ้นรูป.....   | 83   |
| ตารางที่ 4.9 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่น แบบ scoring test* ในข้าวขึ้นรูป...  | 84   |
| ตารางที่ 4.10 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับโดยรวมของข้าวขึ้นรูปที่<br>สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส.....                   | 85   |
| ตารางที่ 4.11 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่น โดยวิธี scoring test* ในข้าวขึ้น<br>รูปสุก ที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส..... | 86   |
| ตารางที่ 4.12 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับเรื่องสีในข้าวขึ้นรูปสุกที่<br>สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส.....               | 87   |
| ตารางที่ 4.13 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับเรื่องกลิ่นของขึ้นรูปสุกที่<br>สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส.....               | 88   |
| ตารางที่ 4.14 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับโดยรวมของข้าวขึ้นรูปสุกที่<br>สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส.....                | 89   |

|  |     |
|--|-----|
| ตารางที่ 4.15 ภาพถ่ายของข้าวขึ้นรูปและข้าวขึ้นรูปสุกที่การเก็บรักษาที่ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส.....  | 92  |
| ตารางที่ 4.16 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวเจ้า โปรตีนต่าง ๆ และเอกซ์ทรูเดต.....   | 97  |
| ตารางที่ 4.17 ค่า eGI และความต้านทานต่อแรงดึงของเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก.....  | 100 |
| ตารางที่ 4.18 อัตราการย่อยและค่า $C_{\infty}$ .....  | 100 |
| ตารางที่ 4.19 Relative secondary structural ของโปรตีน เอกซ์ทรูเดตและเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก.....  | 104 |
| ตารางที่ 4.20 ผลของส่วนผสมที่ใช้นวดเนื้อต่ออุณหภูมิที่ทำให้เกิดเสถียรภาพทางความร้อน (Td) และเอนทาลปี ( $\Delta H$ ) ของฮีโมโกลบินที่สกัดจากไก่.....                        | 110 |
| ตารางที่ 4.21 การเกิดจุดเลือดแดงที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน.....   | 112 |
| ตารางที่ 4.22 ผลของการให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟ ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยใช้น้ำที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน ต่อคุณภาพของเนื้อสุกและการเกิดจุดเลือดแดงของเนื้ออกไก่ นวด..... | 118 |
| ตารางที่ 4.23 คุณภาพของเนื้ออกไก่ นวดสุกที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้น้ำ.....   | 120 |
| ตารางที่ 4.24 ปริมาณสัมพัทธ์ (%) ของโครงสร้างทุติยภูมิในโปรตีนเนื้ออกไก่ นวดสุกที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้น้ำ ที่สภาวะการให้ความร้อนต่างกัน.....        | 123 |
| ตารางที่ 4.25 องค์ประกอบทางเคมีของหลอดลมไก่เนื้อ.....  | 126 |
| ตารางที่ 4.26 ปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดแบบดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์....   | 132 |
| ตารางที่ 4.27 ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสถียรภาพ (Td) และค่าเอนทาลปี $\Delta H$ ของคอลลาเจน.....  | 134 |
| ตารางที่ 4.28 อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงจากสเปกตรัม FT-IR และอัตราส่วน R <sub>pn</sub> ที่คำนวณจากสเปกตรัม CD ของคอลลาเจนที่สกัดวิธีต่างกัน.....                               | 136 |
| ตารางที่ 4.29 ลำดับกรดอะมิโนสาย $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ ของคอลลาเจนที่สกัดแบบวิธีดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์.....   | 140 |

|   |     |
|---|-----|
| ตารางที่ 4.30 ปริมาณแอลฟา-อะมิโน ( $\alpha$ -amino group) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) <sup>1</sup> .....  | 157 |
| ตารางที่ 4.31 การกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MW distribution) ของไฮโดรไลเซส เพปไทด์จากการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลอง และตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks)...  | 158 |
| ตารางที่ 4.32 ผลผลิตและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรไลเซสโปรตีนปลา นิล และการทำบริสุทธิ์โดย SEC และ RPC <sup>1</sup> .....   | 168 |
| ตารางที่ 4.33 ส่วนของเพปไทด์ (fraction) แหล่งโปรตีนของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเพปไทด์การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยคอมพิวเตอร์ (in silico GI digestion) <sup>1</sup> .....           | 173 |
| ตารางที่ 4.34 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาปากคม ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน.....                          | 210 |
| ตารางที่ 4.35 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาทรายแดงที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน.....                         | 214 |
| ตารางที่ 4.36 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของพันธะไดซัลไฟด์ของซูริมิเพสทและเจลจากปลาปากคมและปลาทรายแดง ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน..... | 219 |



## สารบัญรูปลูกภาพ

|   | หน้า |
|---|------|
| รูปที่ 3.1 แถบสีอ้างอิง.....  | 24   |
| รูปที่ 3.2 ชั้นเนื้อที่ตัดจากเนื้ออกไก่หลังการนวด (A) และบริเวณชั้นเนื้อที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ (B).....  | 27   |
| รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการวางอุปกรณ์อัลตราซาวด์.....  | 37   |
| รูปที่ 4.1 ค่าความสว่าง (L*) ของข้าวชั้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน.....   | 90   |
| รูปที่ 4.2 ค่าสีแดง (a*) ของข้าวชั้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน.....  | 91   |
| รูปที่ 4.3 ค่าสีเหลือง (b*) ของข้าวชั้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน.....  | 91   |
| รูปที่ 4.4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแข็ง (Hardness) ของข้าวชั้นรูปที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน.....   | 94   |
| รูปที่ 4.5 ค่าสีแดง (a*) ของตัวอย่างข้าวชั้นรูปที่การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน.....  | 95   |
| รูปที่ 4.6 digestion curve เส้นสเปกตรัมเกิดที่สูงสุดในตัวอย่าง control (a), 20SPI (b), 20WPI (c) และ 20CK (d).....  | 101  |
| รูปที่ 4.7 digestion curve เส้นสเปกตรัมเกิดที่สูงสุดในตัวอย่าง 40SPI (a), 40WPI (b) และ 40CK (c).....   | 101  |
| รูปที่ 4.8 FTIR spectrum ของสตาร์ชข้าวเจ้า และโปรตีนชนิดต่าง ๆ.....   | 103  |
| รูปที่ 4.9 FTIR spectrum ของเอกซ์ทราคตเส้นสเปกตรัมเกิดที่.....  | 103  |
| รูปที่ 4.10 FTIR spectrum ของเส้นสเปกตรัมเกิดที่ต่ำสุด.....   | 104  |
| รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณของส่วนผสมในบริเวณกึ่งกลางของชั้นเนื้ออกไก่ นวด ภายใต้สภาวะอากาศ เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างกัน (n=9): ปริมาณโซเดียม (A); ฟอสฟอรัส (B); และกลูโคส (C)..... | 107  |

|   |     |
|---|-----|
| รูปที่ 4.12 รูปแบบโปรตีนของฮีโมโกลบิน จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE โดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล 12.5% (M) Marker และ (S) สารมาตรฐานฮีโมโกลบินจากวัว (bovine Hb).....  | 108 |
| รูปที่ 4.13 ผลของอุณหภูมิแกนกลางต่อการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ของเนื้ออกไก่ที่นวด (marinated) และไม่นวด (non-marinated).....  | 113 |
| รูปที่ 4.14 เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลืค้ำอยู่ในเส้นเลือดของเนื้ออกไก่นวดสุกที่ได้รับความร้อนในสภาวะต่างกัน: (A) เนื้อดิบ, (B) เนื้อสุกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ (C) เนื้อสุกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที.....  | 115 |
| รูปที่ 4.15 รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (temperature profiles) ในเนื้ออกไก่เมื่อให้ความร้อนด้วยไอน้ำและใช้วิธีร่วมกันระหว่างไมโครเวฟและให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน S80, S82, S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ W6S80, W6S82, W6S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 6 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ W7S80, W7S82, W7S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 7 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ..... | 117 |
| รูปที่ 4.16 ภาพระดับจุลภาค (micrograph) ของเลือดที่เหลืค้ำอยู่ในเส้นเลือดของเนื้อดิบ (A) และตัวอย่างเนื้อสุกเมื่อได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟรวมกับการใช้ไอน้ำที่ 82 องศาเซลเซียส (B) ได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 36 เท่า เชื่อมต่อกับ SR-FTIR.....   | 122 |
| รูปที่ 4.17 SR-FTIR สเปกตราที่แตกต่างกันของเลือดไก่ที่เหลืค้ำในเส้นเลือดที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส [(ตัวอย่างสุก)-(ตัวอย่างดิบ)] หลังจาก processed ด้วย baseline correction และ vector normalization.....   | 124 |
| รูปที่ 4.18 ผลผลิตคอลลาเจนที่ใช่คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้มต่างกันเป็นเวลา 10 นาที (A), ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มที่ 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรที่เวลาต่างกัน (B), และ  |     |

|   |     |
|---|-----|
| ระยะเวลาสกัดที่แตกต่างกัน ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มที่ 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที (C).....   | 128 |
| รูปที่ 4.19 ผลผลิตคอลลาเจนจากการสกัดแบบดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์.....  | 129 |
| รูปที่ 4.20 ลักษณะโครงสร้างคอลลาเจนที่ละลายด้วยต่างก่อนกระบวนการสกัด (A), ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 10 นาที (B) และ ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 20 นาที (C) ที่กำลังขยาย 500 เท่า..   | 130 |
| รูปที่ 4.21 ลักษณะโครงสร้างคอลลาเจน AS; ละลายด้วยกรด PS; ละลายด้วยเอนไซม์เพปซิน U-AS; ใช้คลื่นอัลตราซาวด์แล้วสกัดด้วยกรด U-PS; ใช้คลื่นอัลตราซาวด์แล้วสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน ที่กำลังขยาย 500 เท่า.....  | 130 |
| รูปที่ 4.22 ยูวีสเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน.....  | 135 |
| รูปที่ 4.23 สเปกตรัม CD ของคอลลาเจนทุกกลุ่ม.....  | 136 |
| รูปที่ 4.24 FT-IR สเปกตรัม (A) และโครงสร้างทุติยภูมิที่ได้จากเอมไซด์ I (B) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน.....   | 138 |
| รูปที่ 4.25 รูปแบบของ SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน.....   | 139 |
| รูปที่ 4.26 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (A), เวลาในการให้คลื่นเมื่อใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 7.04 และ 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับตัวอย่างโปรตีนที่สกัดในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (B) และ 0.6 โมลาร์ (C)..... | 143 |
| รูปที่ 4.27 กิจกรรมของ $Ca^{2+}$ -ATPase ของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.6 โมลาร์ ที่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม (A) และเวลา (B) ต่างๆ.....   | 144 |
| รูปที่ 4.28 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดและหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (A, C) และ 0.6 โมลาร์ (B, D).....   | 146 |
| รูปที่ 4.29 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่า surface hydrophobicity ของ actomyosin ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (A) และ 0.6 โมลาร์ (B).....  | 148 |

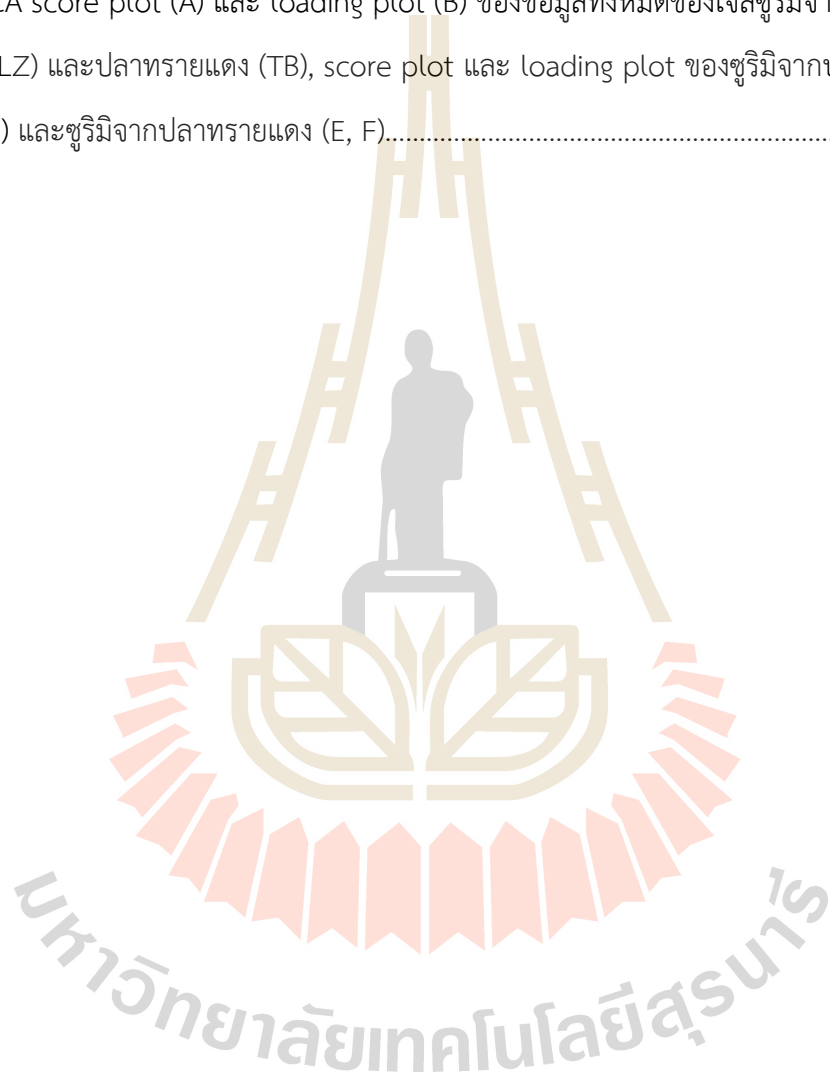
|  |     |
|--|-----|
| รูปที่ 4.30 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์จ่อขนาดอนุภาค (A) และการกระจายตัวของอนุภาคของแอกโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (B) และ 0.6 โมลาร์ (C).....   | 149 |
| รูปที่ 4.31 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่า zeta potential ของแอกโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ โดยให้คลื่นเป็นเวลา 6 นาที.....   | 151 |
| รูปที่ 4.32 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อการเปลี่ยนแปลงความชุ่มชื้นของแอกโตไมโอซินที่ 40 (A) และ 60 (B) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์.....  | 152 |
| รูปที่ 4.33 รูปแบบของ SDS-PAGE ของแอกโตไมโอซินที่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์.....   | 153 |
| รูปที่ 4.34 โครงสร้างจุลภาคของแอกโตไมโอซินที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ (กำลังขยาย 400 เท่า).....  | 154 |
| รูปที่ 4.35 (A) ระดับการย่อย (DH) หรือความสามารถในการย่อย (digestibility) ของโปรตีนไฮโดรไลเสท และ(B) โครมาโตแกรม size exclusion chromatograms (SECs) ของตัวอย่าง.....  | 160 |
| รูปที่ 4.36 กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมีของไฮโดรไลเสทก่อนและหลังย่อยในระบบย่อยอาหาร.....   | 161 |
| รูปที่ 4.37 (A) กิจกรรมการป้องกันเซลล์ (cytoprotection) ที่ 0.1–2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (B) กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่ 0.1–5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของโปรตีนและไฮโดรไลเสทหลังการย่อยใน GI และAAPH คือ 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride.....  | 165 |
| รูปที่ 4.38 PCA biplots (PC1 versus PC2) ของโปรตีนปลาและไฮโดรไลเสทหลังการย่อยใน GI ต่อปริมาณ $\alpha$ -amino group และกิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมีและระดับเซลล์ การป้องกันเซลล์ (cytoprotection) (ที่ 0.1 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และกิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) (ที่ 0.1, 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)..... | 166 |
| รูปที่ 4.39 โครมาโตแกรมของโปรตีนไฮโดรไลเสทของปลาโดย SEC (A1), RPC (B1, และ C1, D1, E1 และ F1) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS จาก SEC (A2) และ RPC (B2 และ C2, D2, E2 และ F2).....  | 169 |

|   |     |
|---|-----|
| รูปที่ 4.40 สเปกตรัม MS/MS จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ด้วยวิธี de novo sequencing.....  | 172 |
| รูปที่ 4.41 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS <sup>•+</sup> ของเพปไทด์สังเคราะห์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน K ที่ 250 ไมโครโมลาร์ (A) EC50 ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox, AsA, GA, GSH), เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน C- และ Y (B)..... | 177 |
| รูปที่ 4.42 ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ (unit CAA) ของกรดแอสคอร์บิกและเพปไทด์สังเคราะห์ อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างในค่าเฉลี่ยของ CAA ของเพปไทด์แต่ละตัวที่ 10, 50, และ 100 ไมโครโมลาร์.....            | 180 |
| รูปที่ 4.43 รูปแบบ 1.5% agarose gel electrophoresis ของ CAT, SOD1 และ GPx1.....   | 183 |
| รูปที่ 4.44 ระดับการแสดงออกของ CAT, SOD1 และ GPx1 สำหรับเซลล์ blank และกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วย AAPH.....   | 184 |
| รูปที่ 4.45 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อความสามารถในการสกัดโปรตีนจากซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ.....   | 188 |
| รูปที่ 4.46 กิจกรรมของ Ca <sup>2+</sup> ATPase ที่คงเหลือของซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ หลังจากได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้มข้นต่างกัน.....  | 189 |
| รูปที่ 4.47 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมดและปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของซูริมิปลาทรายแดงที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 (A), 1 (B), และ 2% (C).....   | 191 |
| รูปที่ 4.48 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่า surface hydrophobicity ของซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน.....  | 192 |
| รูปที่ 4.49 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน.....  | 194 |
| รูปที่ 4.50 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่าความขาว (A) และค่าความสว่าง (B) ของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน.....  | 195 |
| รูปที่ 4.51 ผลการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณของโพลิโกลูเตนที่ละลายใน TCA ของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน.....   | 196 |

|  |     |
|--|-----|
| รูปที่ 4.52 รูปแสดง SDS-PAGE ของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์.....   | 197 |
| รูปที่ 4.53 ผลการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนจากเจลซูริมิปลา<br>ทรายแดงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 (A), 1 (B) และ 2% (C).....   | 198 |
| รูปที่ 4.54 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร นาน<br>30 นาที ต่อโครงสร้างทางจุลภาคของเจลซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอ<br>ไรด์ต่างกัน.....  | 199 |
| รูปที่ 4.55 ค่าแรงที่ใช้ในการเจาะ (breaking force) (A, C) และค่าระยะทางที่เข็มกดก่อน<br>ทะลุ (breaking distance) (B, D) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, B) และปลาทรายแดง (C, D)<br>ที่เติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้ว<br>ให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสเวลา 30 นาที.....  | 201 |
| รูปที่ 4.56 ค่าแรงที่ใช้ในการเจาะ (breaking force) (A, C) และค่าระยะทางที่เข็มกดก่อน<br>ทะลุ (breaking distance) (B, D) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, B) และปลาทรายแดง (C, D)<br>ที่เติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้ว<br>ให้ความร้อนเพื่อเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 ตามด้วยที่อุณหภูมิ 90 องศา<br>เซลเซียส เวลา 30 นาที..... | 202 |
| รูปที่ 4.57 ผลของกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่อค่าความ<br>ขาวของเจลซูริมิจากปลาปากคม (A) และปลาทรายแดง (B) หลังผ่านการให้ความร้อนที่<br>อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที.....   | 203 |
| รูปที่ 4.58 รูปแบบของโปรตีนบน 7.5% polyacrylamide gel ของเจลซูริมิจากปลาปากคม<br>และปลาทรายแดง ผ่านการให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) และสกัดโดยเติม (A) และ<br>ไม่เติม (B) 10% $\beta$ -mercaptoethanol .....  | 205 |
| รูปที่ 4.59 ปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (TSH) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, C) และปลา<br>ทรายแดง (B, D) เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ที่ความ<br>เข้มข้นต่างกัน แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (A, B) และให้<br>ความร้อนเพื่อเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (C, D).....   | 206 |

รูปที่ 4.60 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งประมาณจาก FT-IR สเปกตราของซูริมิจากปลาปากคม (A, C) และปลาทรายแดง (B, D) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (A, B) และให้ความร้อนเพื่อเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาทีตามด้วยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที..... 207

รูปที่ 4.61 PCA score plot (A) และ loading plot (B) ของข้อมูลทั้งหมดของเจลซูริมิจากปลาปากคม (LZ) และปลาทรายแดง (TB), score plot และ loading plot ของซูริมิจากปลาปากคม (C, D) และซูริมิจากปลาทรายแดง (E, F)..... 222



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในกลุ่ม 4 จังหวัดของภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง (นครชัยบุรีรินทร์) เป็นแหล่งปลูกข้าวหอมมะลิและมันสำปะหลังที่ใหญ่ที่สุดของประเทศ อีกทั้งยังเป็นพื้นที่ปศุสัตว์และประมงน้ำจืดที่สำคัญหลายชนิด อาทิ โคเนื้อ โคนม สุกร ไก่เนื้อ ไก่ไข่ ไก่พื้นเมือง ไก่พื้นเมืองลูกผสม ปลานิล ปลาดุก เป็นต้น ผลิตผลทางการเกษตรและปศุสัตว์เหล่านี้จำหน่ายในรูปวัตถุดิบ ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปยังอยู่ในระดับครัวเรือนหรือผู้ประกอบการขนาดเล็ก โดยส่วนใหญ่ยังขาดการนำองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมาใช้ในการสร้างมูลค่าเพิ่ม รวมถึงควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยทางอาหาร ส่งผลให้ผลิตผลทางการเกษตรและผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ ไม่จัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีเลิศ (premium) และขาดการยอมรับจากผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ การสร้างนวัตกรรมในการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และประมง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีคุณภาพ มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีความปลอดภัยในระดับสากล เป็นแนวทางสำคัญที่จะนำไปสู่การสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับผลิตผลต้นน้ำเหล่านี้ เป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันทางการเกษตรและอาหารของประเทศ อีกทั้งเป็นเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการ

ด้วยสาเหตุข้างต้น จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องดำเนินการเพื่อยกระดับคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์ สร้างนวัตกรรมที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์เพื่อลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างประเทศ รวมถึงพัฒนาและยกมาตรฐานผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อสัตว์และประมงในเขตนครชัยบุรีรินทร์ให้เป็นที่ยอมรับในระดับและนานาชาติให้มากขึ้น โครงการนี้มีเป้าประสงค์ที่จะสร้างเทคโนโลยีอาหารขั้นสูงเพื่อสร้างนวัตกรรมทางอาหารให้แก่ผู้ประกอบการขนาดย่อม นอกจากนี้ ยังร่วมพัฒนาเทคโนโลยีกับผู้ประกอบการขนาดใหญ่ เพื่อลดการพึ่งพาเทคโนโลยีจากต่างประเทศ ซึ่งจะพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารของประเทศจากการเป็นเพียงผู้ผลิตสินค้าราคาถูก ไปสู่การสร้างนวัตกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อตอบสนองผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศ

ปัญหาของผู้ประกอบการแปรรูปเนื้อไก่ขนาดใหญ่คือการเกิดเนื้อสีชมพู (pinking) ในไก่ปรุงสุก ซึ่งส่วนใหญ่ (>80%) เป็นผลิตภัณฑ์ส่งออก ปัญหา pinking คือปรากฏการณ์เนื้อสีชมพูในใจกลางของผลิตภัณฑ์เนื้อปรุงสุก ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากไมโอโกลบินมีเสถียรภาพสูง จึงยังไม่เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) แม้จะได้รับความร้อน ส่งผลให้ใจกลางของผลิตภัณฑ์ยังคงเป็นสีชมพู



ปรากฏการณ์นี้ไม่ก่อให้เกิดปัญหาด้านความปลอดภัยทางจุลินทรีย์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์ได้รับความร้อนเพียงพอจนสามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ให้อยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อการบริโภคแล้ว แต่ด้วยสีชมพูที่คงอยู่ ผู้บริโภคมีความรู้สึก (perceive) ว่าผลิตภัณฑ์ไม่ปลอดภัยต่อการบริโภค ปัญหา pinking ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก เกิดปัญหาการคั่นสินค้าระหว่างประเทศ และปัญหานี้เป็นปัญหาที่เกิดขึ้นกับผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุกทั่วโลก โดยเฉพาะผู้ผลิตจากประเทศไทย

การให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟ (microwave heating) จะทำให้ความร้อนเกิดขึ้นภายในชิ้นตัวอย่าง (internal heat generation) เนื่องจากการสั่นของโมเลกุลของน้ำ ลักษณะเดียวกับการให้ความร้อนด้วยคลื่นไมโครเวฟแต่ด้วยความถี่ที่ต่ำกว่า เทคโนโลยีนี้สามารถนำมาใช้ในการผลิตไก่ปรุงสุกร่วมกับกระบวนการให้ความร้อนแบบดั้งเดิม (การอบ การนึ่งไอน้ำ) ความร้อนที่จะเกิดขึ้นภายในชิ้นตัวอย่าง แทนที่จะแพร่ผ่านจากภายนอกเหมือนกับการให้ความร้อนแบบดั้งเดิม ดังนั้นใจกลางตัวอย่างจะได้รับความร้อนเพียงพอที่จะทำให้ไมโอโกลบินสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ เนื่องจากความร้อนเกิดขึ้นภายในตัวอย่าง อัตราการให้ความร้อนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สามารถลดการสูญเสียปริมาณผลผลิต (yield) ซึ่งเป็นประเด็นสำคัญของผู้ประกอบการ การพัฒนาเทคโนโลยีการให้ความร้อนด้วยคลื่นความถี่วิทยุให้สามารถนำไปใช้ในสายการผลิตเนื้อไก่แปรรูป จะสามารถแก้ปัญหา pinking ได้ และอาจเป็นนวัตกรรมที่เป็นที่ต้องการแก่ผู้แปรรูปเนื้อไก่ทั่วโลก

แนวทางหนึ่งของการเพิ่มความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อไก่ คือการหาแนวทางการเปลี่ยนวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการเชือดไก่ให้เป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าสูง หลดดมเป็นหนึ่งในวัสดุเหลือทิ้งที่ได้จากการชำแหละไก่ โดยหลดดม 1 เส้นจากไก่ 1 ตัว มีน้ำหนักประมาณ 2.12 กรัม เมื่อคำนวณปริมาณหลดดมจากอุตสาหกรรมเชือดไก่ของทั้งประเทศ จะมีประมาณ 2,993.37 ตันต่อปี ซึ่งในปัจจุบันหลดดมเหล่านี้จะถูกใช้เป็นวัตถุดิบของอาหารสัตว์เท่านั้น ทั้งที่องค์ประกอบสำคัญของโปรตีนในหลดดมคือคอลลาเจน ซึ่งเป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ และส่วนผสมสำหรับเวชสำอางค์ ซึ่งมีมูลค่าสูงกว่าการนำไปเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ การพัฒนากรรมวิธีการสกัดคอลลาเจนจากหลดดมไก่ที่มีประสิทธิภาพสูง จะเป็นแนวทางสำคัญที่จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากวัสดุเหลือทิ้งนี้

ตามที่ประชากรของประเทศไทยกำลังเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ การพัฒนารูปแบบของอาหารให้เหมาะสมแก่ผู้สูงอายุมีความจำเป็นอย่างยิ่ง อีกทั้งผู้บริโภคให้ความสนใจกับสุขภาพมากขึ้น เนื้อไก่และเนื้อปลาเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญ แต่การพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเฉพาะกลุ่ม เช่น อาหารผู้สูงอายุ อาหารผู้ป่วยระยะพักฟื้น หรือ อาหารสำหรับนักกีฬา จากเนื้อไก่และเนื้อปลามีน้อยมาก เมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์โปรตีนเวย์จากต่างประเทศ ทั้งที่คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อปลาและเนื้อไก่ดีกว่าโปรตีนเวย์ในหลายด้าน ด้วยเทคโนโลยีเอนไซม์ที่ได้รับการค้นคว้าและวิจัยจากหน่วยวิจัยโปรตีนอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุ

นารี สามารถนำองค์ความรู้ที่มีอยู่มาใช้ผลิตอาหารเฉพาะกลุ่มจากเนื้อไก่และปลานิล ให้ได้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกรดอะมิโนครบถ้วน มีเพปไทด์ที่มีสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ บำรุงตับ บำรุงสมอง ควบคุมความดัน และยังมีสมบัติทางประสาทสัมผัส ที่เป็นที่ยอมรับ ไม่มีกลิ่น-รส (flavor) ที่ไม่พึงประสงค์ เทคโนโลยีเอนไซม์ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อมูลค่าของปลานิลได้

ข้าวเป็นอาหารหลักของประชากรโลกและมีการเพาะปลูกอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยในปี พ.ศ. 2560 สหรัฐฯ มีการส่งออกข้าวเป็นมูลค่า 1,718.37 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ และมีมูลค่าการนำเข้า 666.49 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ โดยประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกสินค้าข้าวรายใหญ่ที่สุด ไปยังสหรัฐฯ คิดเป็นร้อยละ 57.73 ของการนำเข้าข้าวทั้งหมดของสหรัฐฯ (ทักษิณา, 2561) นครชัยบุรีนทร์เป็นแหล่งปลูกข้าวคุณภาพสูงของประเทศ โดยในการบริโภคต้องมีการแปรรูปจากข้าวเปลือกให้เป็นข้าวสารโดยผ่านกระบวนการพื้นฐาน 4 ขั้นตอน คือ การทำความสะอาด การกะเทาะให้ส่วนเปลือกหลุดออก การขัดขาว และขัดมันจนเป็นข้าวสาร และการคัดแยกหรือคัดขนาดข้าวสารเพื่อแยก เป็นข้าวเต็มเมล็ด ข้าวหักใหญ่ ข้าวหักเล็ก และปลายข้าว ซึ่งแต่ละส่วนของข้าวมีราคาซื้อขายตามท้องตลาดแตกต่างกันตามคุณภาพ (อรอนงค์, 2547) ซึ่งข้าวเต็มเมล็ดจะจำหน่ายในรูปของข้าวสาร และมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์บางชนิด ส่วนข้าวหักและปลายข้าวเนื่องจากมีราคาต่ำ มักถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่น และนิยมนำไปแปรรูปต่อเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ได้แก่ แป้งข้าว (flour) ผลิตภัณฑ์เส้นและแผ่น ซึ่งสามารถเพิ่มมูลค่าให้แก่ข้าวเหล่านี้ได้นอกจากนี้ พฤติกรรมของผู้บริโภคในปัจจุบันเปลี่ยนไป มีความใส่ใจในสุขภาพมากขึ้น (health conscious) และเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง หัวใจ เบาหวาน ความดันโลหิตสูง เป็นต้น ผลิตภัณฑ์อาหารเฉพาะกลุ่มเป็นที่ต้องการของตลาดมากขึ้น เช่น เส้นพาสต้าจากแป้งข้าวเจ้าที่ปลอดกลูเตน (gluten-free pasta) หรือ ข้าวที่มีค่าดัชนีน้ำตาลต่ำ ซึ่งเป็นข้าวที่ผ่านกรรมวิธีเพื่อลดค่าดัชนีน้ำตาลของข้าวลงได้กว่าร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับข้าวเจ้าทั่วไป (ศุภวิทย์จักรสิทธิ์ไทย, 2561) การแปรรูปข้าวให้เป็นผลิตภัณฑ์เหล่านี้ จะสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับข้าวได้ และยังเป็นการสร้างผลิตภัณฑ์ทางเลือกเพื่อสุขภาพให้กับผู้บริโภคทั้งในและต่างประเทศอีกด้วย

ซูริมิเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อปลาบดล้างน้ำซึ่งประเทศไทยเคยเป็นผู้ผลิตสำคัญของโลก แต่ด้วยข้อจำกัดของวัตถุดิบปลาทะเลที่ลดลง กำลังการผลิตซูริมิของประเทศลดลง ส่งผลให้ซูริมิที่ผลิตภายในประเทศมีราคาแพง จำเป็นต้องนำเข้าจากประเทศเวียดนาม อินเดีย และสาธารณรัฐประชาชนจีน เป็นต้น สมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญของซูริมิคือการเกิดเจล ในปัจจุบัน วิธีการปรับปรุงคุณภาพเจลที่นิยมใช้คือการใช้เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในการเชื่อมข้ามโปรตีนระหว่างกรดอะมิโนไลซีนและกลูตามีน โดยเอนไซม์นี้จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ จึงทำให้มีราคาแพงและเป็นภาระต้นทุนสำหรับผู้ผลิตปูดหรือผลิตภัณฑ์แปรรูปจากซูริมิ การค้นหาแนวทางในการปรับปรุงคุณภาพเจลด้วยต้นทุนที่ต่ำลง ลดการนำเข้าจากต่างประเทศ จะเป็นการเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของอุตสาหกรรมแปรรูปซูริมิ

## 1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1. เพื่อพัฒนานวัตกรรมการผลิตอาหารจากผลิตผลทางการเกษตรหลักในกลุ่มจังหวัดนครชัยบุรีนทร์คือ เนื้อไก่ ปลานิล และข้าวเจ้า
- 1.2.2 เพื่อพัฒนากรรมวิธีการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเชือดไก่
- 1.2.3 เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากผลิตผลทางการเกษตรที่ผลิตในกลุ่มจังหวัดนครชัยบุรีนทร์
- 1.2.4 สร้างนวัตกรรมการปรับปรุงคุณภาพเจลซูริมิ

## 1.3 ขอบเขตของการศึกษาวิจัย

โครงการวิจัยนี้มุ่งพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรหลักในเขตนครชัยบุรีนทร์ได้แก่ ข้าวเจ้า เนื้อไก่ และเนื้อปลานิล ให้เกิดผลิตภัณฑ์อาหารมูลค่าสูง และเพื่อพัฒนาและยกระดับผลิตภัณฑ์อาหารด้วยการใช้เทคโนโลยีเพื่อสร้างนวัตกรรม นอกจากนี้ยังมุ่งพัฒนาคุณภาพเจลซูริมิจากปลาทะเล โดยใช้เทคโนโลยีเอ็กทรูชัน (extrusion) ในการแปรรูปข้าวเป็นพาสต้าที่ปราศจากกลูเตนที่เสริมคุณค่าทางอาหารด้วยโปรตีนชนิดต่าง ๆ และการใช้เทคโนโลยีอัลตราซาวด์ (ultrasound technology) ในการเหนี่ยวนำในการเกิดเจลในปลานิลและซูริมิ ทำให้สามารถผลิตโปรตีนเจลปลานิลและเจลซูริมิที่มีปริมาณโซเดียมลดลงจากสูตรเดิม (2% NaCl) และพัฒนาวิธีการเพิ่มคุณภาพเจลด้วยกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รวมถึงการใช้เทคโนโลยีในการแก้ปัญหาเนื้อไก่สีชมพูในผลิตภัณฑ์ไก่ปรุงสุก ซึ่งสร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาล และสร้างปัญหาความน่าเชื่อถือให้กับอุตสาหกรรมไก่แปรรูปของประเทศ นอกจากนี้ ศึกษาการสกัดคอลลาเจนจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงเชือดไก่คือหลอดลมพร้อมศึกษาคุณสมบัติของคอลลาเจนที่ได้เพื่อมุ่งพัฒนาไปสู่การใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพและเวชสำอางค์ นอกจากนี้ยังได้ใช้เทคโนโลยีทางเอนไซม์ในการแปรรูปเนื้อปลานิลเป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีสมบัติลดอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ เพื่อพัฒนาไปสู่สินค้าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่มีมูลค่าสูง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถสร้างนวัตกรรมทางด้านผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาและเนื้อไก่ให้กับกลุ่มจังหวัดนครชัยบุรีนทร์
- 1.4.2 สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแปรรูปเนื้อไก่ให้มีคุณภาพและมูลค่าสูงเพื่อการส่งออก
- 1.4.3 เพิ่มนวัตกรรมและมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ข้าว

## บทที่ 2

### ปริทัศน์และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ข้าวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์

กระบวนการเอกซ์ทรูชัน เป็นกระบวนการแปรรูปที่ผสมผสานกันระหว่างแรงกลและแรงเฉือน เป็นกระบวนการแปรรูปอาหารที่ได้รับความนิยมในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่าง ๆ ได้แก่ การผลิตอาหารขบเคี้ยวประเภทพองตัวทันที อาหารขบเคี้ยวประเภทที่ต้องผ่านกระบวนการเพื่อทำให้เกิดการพองตัวในภายหลัง โดยผลิตภัณฑ์ที่ออกจากเครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ เรียกว่า เอกซ์ทรูเดท (extrudate) (กมลวรรณ, 2541) ซึ่งในการผลิตข้าวขึ้นรูป จัดอยู่ในกลุ่มของผลิตภัณฑ์กึ่งสำเร็จรูป โดยการขึ้นรูปอาหาร (forming) เหล่านี้ต้องอาศัยหน้าแปลนที่ได้รับการออกแบบมาเพื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ ทำให้อาหารที่ผ่านกระบวนการผลิตมีรูปร่างต่าง ๆ ตรงตามต้องการ ในการผลิตข้าวขึ้นรูปก็เช่นเดียวกันโดยใช้หน้าแปลนที่ออกแบบมาเป็นรูปเมล็ดข้าว ทำให้เมื่อทำการเอกซ์ทรูชันแล้วได้ข้าวขึ้นรูปที่มีลักษณะที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกับข้าวสารปกติ (สุนทรี, 2555)

กระบวนการเอกซ์ทรูชันเป็นกระบวนการที่สามารถรวมส่วนประกอบ (ingredients) ต่าง ๆ เข้าด้วยกัน เพื่อผลิตข้าวขึ้นรูป เช่น สารอาหารเพื่อการปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการของข้าวขึ้นรูป (Zhuang et al., 2010) จากงานวิจัยของ คินจันท์ (2560) ได้ศึกษาผลของโปรตีนจากถั่วเหลือง (SPI) และใยอาหาร (RMD) ต่อความสามารถในการย่อยของข้าวขึ้นรูปหุงสุก พบว่า ข้าวขึ้นรูปหุงสุกที่ถูกแทนที่ด้วย SPI, RMD และ SPI ร่วมกับ RMD มีผลทำให้ค่าดัชนีน้ำตาลอยู่ในกลุ่มปานกลาง ในขณะที่ข้าวขึ้นรูปหุงสุกควบคุมมีค่าดัชนีน้ำตาลอยู่ในกลุ่มสูง มีศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ที่อุดมไปด้วยโปรตีนที่เตรียมจาก soy protein isolate (SPI) 32.2-66.6% ผสมกับแป้งข้าวโพด โดยใช้เครื่องเอกซ์ทรูชันแบบสกรูคู่ กำหนดให้ความชื้นของวัตถุดิบภายในบารเรล (31.6-48.4%), อุณหภูมิของบารเรล (126.4-193.6 C) พบว่าปริมาณ SPI ที่สูงขึ้นและปริมาณความชื้นของวัตถุดิบภายในบารเรลเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า breaking stress และ bulk density เพิ่มขึ้น แต่ลดคุณสมบัติอัตราการขยายตัวดัชนีการละลายน้ำ และอัตราการคืนตัว และปริมาณ SPI ที่สูงขึ้นยังลดค่า  $L^*$  ของสี ในขณะที่ปริมาณความชื้นของวัตถุดิบภายในบารเรลที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มค่า  $L^*$  ส่วนอุณหภูมิที่สูงขึ้นนั้น เพิ่ม breaking stress, อัตราส่วนการขยายตัว, อัตราการดูดน้ำกลับคืน และค่า  $L^*$  แต่ลดความหนาแน่นและดัชนีดัชนีการละลายน้ำ

ซึ่งจากงานวิจัยข้างต้นชี้ให้เห็นว่าการใช้กระบวนการแปรรูปด้วยเครื่องเอกซ์ทรูชัน สามารถผลิต ผลิตภัณฑ์ที่มีรูปร่างเหมือนข้าว และยังสามารถเสริม ingredients ที่มีคุณค่าทางโภชนาการเข้าไปเพื่อปรับปรุงคุณภาพทางโภชนาการ ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของผลิตข้าวขึ้นรูปที่เสริมด้วยโปรตีน

หรือไฟเบอร์ และโปรตีนผสมไฟเบอร์จากกระบวนการเอกซ์ทรูชัน, คุณสมบัติทางกายภาพของข้าวขึ้นรูป และผลของอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงสี และเนื้อสัมผัสของข้าวขึ้นรูป

## 2.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและความสัมพันธ์กับเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก

เนื้ออกไก่สุกเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่สำคัญที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ซึ่งเป็นที่นิยมสำหรับผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญกับสุขภาพเนื่องจากมีปริมาณไขมันต่ำ (USDA Foreign Agricultural Service, 2019) ปัญหาหนึ่งที่ทำให้เกิดการสูญเสียต้นทุนการผลิตอย่างในอุตสาหกรรมเนื้อไก่คือ สีชมพูที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้ออกไก่สุก เนื่องจากผู้บริโภคส่วนใหญ่ไม่นิยมรับประทาน โดยทำให้เข้าใจว่าผลิตภัณฑ์นั้นสุกไม่เพียงพอและไม่ปลอดภัยสำหรับการบริโภค (Suman et al., 2016) สีที่เป็นข้อบกพร่องที่พบทั่วไปในเนื้ออกไก่สุกมี 2 ชนิด คือ เนื้อสีชมพู (pink meat) และจุดเลือดแดง (red blood spot, RBS) เนื้อสีชมพูมักจะพบบริเวณกว้างทั้งผิวและภายในเนื้อสุก ซึ่งพบว่าเกิดจากไมโอโกลบินและไซโตโครม ซี (cytochrome C) (Holownia et al., 2003) การเกิดเนื้อสีชมพูและการป้องกันการเกิดเนื้อสีชมพูนั้น มีงานวิจัยศึกษาเป็นที่เข้าใจกว้างขวางแล้ว (Bae et al., 2018; Cornforth et al., 2001; Holownia et al., 2004; Holownia et al., 2003) ในทางตรงกันข้าม การศึกษาเกี่ยวกับจุดเลือดแดงนั้น พบเพียงภายในเนื้ออกไก่สุกหลังจากการหันในแนวขวาง ข้อบกพร่องนี้สัมพันธ์กับเลือดที่ไหลค้างอยู่ในเส้นเลือดหลังจากการเชือด และมีการศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดจุดเลือดแดง ได้แก่ กระบวนการเชือด (slaughter process) ระยะเวลาที่เลือดไหลออก (bleeding time) และวิธีการทำให้สลบ (stunning methods) (Ahmed, 2003; Ali et al., 2007; Contreras and Beraquet, 2001; Gregory and Wilkins, 1989; Veerkamp, 1988) การใช้กระแสไฟฟ้าทำให้สลบที่ 45 มิลลิแอมป์ (mA) มีรายงานว่าลดการเกิดจุดเลือดแดงได้ (Ahmed, 2003) เนื่องจากเมื่อใช้กระแสไฟฟ้าในระดับต่ำระหว่างการทำให้สลบ กิจกรรมการบีบของหัวใจจะลดลงอย่างช้าๆ ส่งผลให้เลือดไหลออกอย่างต่อเนื่องหลังจากการเชือด (Gregory and Wilkins, 1989) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ไม่สามารถปฏิบัติในทางการค้าได้เนื่องจากข้อบังคับเกี่ยวกับสวัสดิภาพสัตว์ กฎหมายสหภาพยุโรป (EU regulations) กำหนดให้ใช้กระแสไฟฟ้าอย่างต่ำที่ 100 mA ต่อตัว (สัตว์ปีก) และความถี่ <200 เฮิร์ตซ์ (Hz) (The Council of the European Union, 2009) การใช้กระแสไฟฟ้าในระดับสูงระหว่างการทำให้สลบจะทำให้หัวใจหยุดเต้นฉับพลัน ส่งผลให้เลือดเหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดหลังจากสัตว์ตายมากกว่าการใช้กระแสไฟฟ้าในระดับต่ำ (Gregory and Wilkins, 1989) นอกจากนี้ การทำให้สลบนั้นเป็นข้อห้ามในข้อบังคับของฮาลาล (Halal regulations) (The Central Islamic Council, 2016) เมื่อเลือดไม่สามารถไหลออกมาได้หมด เกิดการเหลือค้างอยู่ในเส้นเลือด จึงเป็นสาเหตุของการเกิดจุดเลือดแดงได้ เมื่อให้ความร้อนที่ไม่เพียงพอที่จะเกิดการเสียสภาพของฮีโมโกลบิน

การนวดเนื้อกับส่วนผสม (marination) เป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยทั่วไปมีการเติมส่วนผสม เช่น โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STPP) และกลูโคส ระหว่างการนวดภายใต้สูญญากาศ (Khiari et al., 2013) ส่วนผสมเหล่านี้ทำให้เนื้อนุ่มและเพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ รวมถึงส่งเสริมกลิ่นรส (Dhanda et al., 2003; Kijowski and Mast, 1988) อย่างไรก็ตามส่วนผสมแต่ละชนิดสามารถแพร่ (diffuse) เข้าไปในเนื้อออกไก่ได้แตกต่างกัน ขึ้นกับขนาดโมเลกุล (molecular size) ความสามารถละลายน้ำ (water solubility) ความเข้มข้น (concentration) และปัจจัยอื่น คณะผู้วิจัยของ Li (2000) รายงานว่า ฟอสเฟตที่แตกต่างกัน มีอัตราการแทรกผ่าน (penetration rates) ในเนื้อไก่ที่แตกต่างกัน ไตรโพลีฟอสเฟต (tripolyphosphate) และไพโรฟอสเฟต (pyrophosphate) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่เล็ก สามารถแพร่ผ่านได้เร็ว ทำให้มีความเข้มข้นสูงกว่าเฮกซะเมตาฟอสเฟต (hexametaphosphate) (Xiong and Kupski, 1999) จนกระทั่งปัจจุบันนี้ งานวิจัยที่ศึกษาความสามารถในการแพร่ผ่านของโซเดียมคลอไรด์และกลูโคสในเนื้อออกไก่อังมีไม่มากนัก ส่วนผสมที่ใช้ระหว่างการนวดสามารถส่งผลต่อการเสียดังกล่าวของฮีโมโกลบิน ทั้งยังส่งผลเกี่ยวเนื่องกับสีของเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดหลังจากได้รับความร้อน โครงสร้างธรรมชาติของฮีโมโกลบินนั้นมีสีแดง ในขณะที่ฮีโมโกลบินที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียสภาพด้วยความร้อนจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล ซึ่งบ่งชี้ถึงเนื้อไก่นั้นสุกอย่างทั่วถึง (Suman et al., 2016) ในปี ค.ศ. 2017 Jeong รายงานว่า โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% ลดเสียดังกล่าวของเม็ดสีรงควัตถุฮีโม (heme pigment) ส่งผลให้อุณหภูมิที่ทำให้สูญเสียสภาพมีค่าต่ำลง การศึกษามลของส่วนผสมพื้นฐานในการนวดต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบิน จึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษา เนื่องจากจะทำให้เข้าใจถึงบทบาทของการเสียดังกล่าวของฮีโมโกลบินต่อการเกิดจุดเลือดแดงได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ สืบหาผลของส่วนผสมพื้นฐานที่ใช้ระหว่างการนวดเนื้อไก่ ได้แก่ โซเดียมคลอไรด์ โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต และกลูโคส รวมถึงความเข้มข้นที่ใช้ ต่อการสูญเสียสภาพของฮีโมโกลบินจากไก่และการเกิดจุดเลือดแดง นอกจากนี้ ยังศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำให้สุกเพื่อลดการเกิดจุดเลือดแดง

### 2.3 การลดจุดเลือดแดงในเนื้อออกไคนวดสุกด้วยความร้อนจากเทคนิคไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำ

จุดเลือดแดง (red blood spots, RBSs) เป็นปัญหาที่ยังคงพบในผลิตภัณฑ์เนื้อออกไก่สุก โดยพบเป็นจุดแดงหลังจากตัดตามขวาง เนื่องจากการเสียดังกล่าวของเลือดที่เหลือค้างอยู่เกิดอย่างไม่สมบูรณ์ จุดเลือดแดงในผลิตภัณฑ์ปรุงสุกทางการค้านี้ไม่เป็นที่ยอมรับในหมู่ผู้บริโภค เนื่องจากจุดแดงทำให้เข้าใจว่าเนื้อสุกไม่ทั่วถึง (Bae et al., 2018; Smith and Northcutt, 2003)

กระบวนการให้ความร้อนที่ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อไก่ ได้แก่ การใช้ไอน้ำ (steaming) การคั่ว (roasting) การย่าง (grilling) หรือการทอด (frying) โดยความร้อนจะถ่ายเทผ่านตัวกลาง (heating medium) หรือแหล่งให้ความร้อน (heating source) ไปยังเนื้อออกไก่ โดยอาศัยการพาความร้อน

ร้อน (convection) การแผ่รังสี (radiation) และ/หรือ การนำความร้อน (conduction) (Rinconet al., 2015) การถ่ายเทความร้อนได้จำกัดนั้น เป็นสาเหตุทำให้การเสียดสีของเลือดที่ไหลค้ำในเส้นเลือดเกิดขึ้นอย่างไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะเลือดที่อยู่บริเวณกลางกล้ามเนื้ออก (Sturkie, 2015) อย่างไรก็ตาม การให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง และ/หรือ ระยะเวลาการให้ความร้อนที่นาน ทำให้เกิดการเสียดสีของโปรตีนในเส้นเลือดได้อย่างสมบูรณ์ แต่จะเป็นสาเหตุให้เกิดการสุกมากเกินไป (overcooking) และทำให้ผลผลิต (yield) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Pathare and Roskilly, 2016) ดังนั้น กระบวนการให้ความร้อนที่ทำให้มั่นใจว่าเลือดที่ไหลค้ำอยู่ในกล้ามเนื้ออกเกิดการเสียดสี โดยไม่เกิดการสูญเสีย น้ำหนักของผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญจึงควรมีการศึกษา

การให้ความร้อนโดยไมโครเวฟ (microwave, MW) เกิดจากความร้อนภายในจากการหมุนของสารประกอบที่มีขั้ว (dipole rotation) และการนำความร้อนของไอออน (ionic conduction) เหนี่ยวนำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน (molecular friction) และเกิดความร้อนขึ้นภายในผลิตภัณฑ์เนื้อ ภายใต้อสนามแม่เหล็กไฟฟ้า (alternating electromagnetic field) (Hebbar and Rastogi, 2012) ในอุตสาหกรรม วิทยาศาสตร์ และการแพทย์ (industrial, scientific, and medical (ISM)) ช่วงคลื่นความถี่ของไมโครเวฟที่ประยุกต์ใช้ในการให้ความร้อนคือ 915 และ 2,450 MHz (Piyasena et al., 2003) การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟได้รับความนิยมเพิ่มขึ้นในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการให้ความร้อนที่เร็วและใช้พลังงานต่ำ (Jouquand et al., 2015; McKenna et al., 2006) อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟสามารถทำให้เกิดความร้อนที่ไม่สม่ำเสมอในเนื้อ นวดส่วนผสม (marinated meat) เนื่องจากชิ้นเนื้อมีความไม่เป็นเนื้อเดียวกัน (heterogeneity) มีความหนาและรูปทรง (geometry) แตกต่าง (Vadivambal and Jayas, 2010) ซึ่ง Goksoy และคณะ (1999) รายงานว่า การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟของไก่ทั้งตัว (whole chicken carcass) ที่ความถี่ 2,450 MHz กำลังไฟฟ้า 500 วัตต์ (W) เวลา 5 นาที ส่งผลให้อุณหภูมิได้แตกต่างกันอยู่ในช่วง 15-45 °ซ ระหว่างเนื้อส่วนอกและขา นอกจากนี้ Jeong และคณะ (2007) แสดงให้เห็นว่าเนื้อหมูบด (ground pork patties) ที่เติมเกลือแล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่ 2,450 MHz ให้อุณหภูมิที่แตกต่างกันประมาณ 13 °ซ ระหว่างบริเวณริมและตรงกลางของตัวอย่าง อย่างไรก็ตาม การใช้ไมโครเวฟให้ความร้อนร่วมกับวิธีดั้งเดิม (conventional method) มีรายงานว่าช่วยปรับปรุงให้เกิดการให้ความร้อนที่สม่ำเสมอ เพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตและลดต้นทุน (Datta and Rakesh, 2013; Hebber and Rastogi, 2012; Geedipalli et al., 2008) โดยทั่วไปกระบวนการให้ความร้อนทางการค้าของเนื้ออกไก่ใช้กระบวนการจากไอน้ำ ซึ่งต้องใช้ระยะเวลาค่อนข้างนานถึง 30-50 นาที เพื่อให้ได้อุณหภูมิแกนกลาง (core temperature) ที่ 80-82 °ซ (Pathare and Roskilly, 2016) การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำจึงน่าจะมีการตรวจสอบถึงความเป็นไปได้ในการช่วยลดการเกิดจุดเลือดแดง

กระบวนการให้ความร้อนมีผลอย่างยิ่งต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน โดยส่งผลให้โปรตีนเปิดตัว (unfolding) และรวมตัวกัน (aggregation) (Bertram et al., 2006) ซึ่งสามารถอธิบายได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน ได้แก่  $\alpha$ -helix,  $\beta$ -sheet, และ  $\beta$ -turn พูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy) โดยทั่วไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน พูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (Synchrotron radiation based-FTIR (SR-FTIR)) นั้นใช้แสงซินโครตรอนซึ่งมีความสว่างมากกว่าแหล่งแสงจาก conventional global source ทั่วไป 100-1000 เท่า ทำให้เจาะจงบริเวณที่จะวัดในตัวอย่างได้ด้วยแสงขนาดเล็กถึง 3  $\mu\text{m}$  (Pascolo et al., 2014; Yu, 2006) ซึ่งการวัดองค์ประกอบในตัวอย่างของ FTIR ที่ใช้ทั่วไปมีค่าไม่เกิน 10  $\mu\text{m}$  (Petibois et al., 2010). ในปี ค.ศ. 2010 Ellis และคณะ เปิดเผยว่าสเปกตราของ SR-FTIR มีคุณภาพสูงกว่าฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีแบบดั้งเดิม (conventional FTIR) ที่ช่องเปิด (aperture) ขนาดเล็กเพียง  $3 \times 3 \mu\text{m}^2$  โดย SR-FTIR สามารถตรวจวัดโดยตรงที่โปรตีนในเส้นเลือดที่มีขนาดอย่างน้อย 8  $\mu\text{m}$  (Sturkie, 2015) และให้สเปกตราที่มีคุณภาพสูงกว่า FTIR แบบดั้งเดิม ดังนั้น SR-FTIR น่าจะสามารถนำมาใช้ตรวจวัดตัวอย่างที่มีพื้นที่ขนาดเล็กที่สนใจเช่นในเส้นเลือดได้ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือลดการเกิดจุดเลือดแดงในเนื้อออกไก่เนืวกุดสุก โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำ รวมถึงประเมินคุณภาพของเนื้อออกไก่เนืวกุดสุกที่ได้จากกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังศึกษาการเสถียรภาพของเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดของเนื้อออกไก่เนืวกุดสุกโดยใช้ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR)

#### 2.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาบริโภคเนื้อไก่เพิ่มมากขึ้น โดยมีมูลค่าการตลาดทั่วโลกประมาณ 23.7 พันล้านบาท (<https://www.statista.com>) เนื่องด้วยกระบวนการชำแหละตัวไก่ก่อนเข้าสู่กระบวนการแปรรูปนั้น ได้ผลิตผลพลอยได้ (Byproduct) เป็นจำนวนมาก เช่น เครื่องใน ขน หงอน โครงกระดูก กระดูกอ่อน และอื่น ๆ ซึ่งหลอดลมก็เป็นหนึ่งในผลผลิตพลอยได้จากการชำแหละนี้ด้วย โดยแนวทางปฏิบัติของอุตสาหกรรมจะนำหลอดลมไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ แต่หลอดลมเป็นแหล่งสะสมของคอลลาเจน คอลลาเจนเป็นโปรตีนเส้นใยที่ผสมกันอยู่นอกเซลล์ โดยในกระดูกอ่อนมีปริมาณคอลลาเจน 60% โดยน้ำหนักแห้ง (Eyre, 2001) ดังนั้นการสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมจะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตผลพลอยได้

คอลลาเจนจัดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพ มีองค์ประกอบเป็นสายเพปไทด์ 3 สาย ขดรวมกันเป็นเกลียวสามสาย (triple helix) มีกรดอะมิโน 3 ตัว ต่อเกลียว 1 รอบ มีลำดับกรดอะมิโนเป็นแบบ Gly-X-Y ซึ่งโพรลีนเป็นส่วนที่ทำให้โครงสร้าง triple helix เสถียร (Shoulders & Raines, 2009) ปัจจุบัน



พบคอลลาเจนอย่างน้อย 29 ชนิด แต่ละชนิดมีรหัสยีน โครงสร้างและแหล่งที่พบแตกต่างกัน คอลลาเจนที่สำคัญ ได้แก่ คอลลาเจนชนิด I, II, III, V ซึ่งคอลลาเจนชนิด I ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลากหลายได้แก่ วัสดุเจือปนอาหาร อาหารเสริม บรรจุภัณฑ์อาหาร ไส้กรอก เครื่องสำอาง การปลูกถ่ายทางการแพทย์ และ เวชภัณฑ์ (Martínez-Ortiz et al., 2015) คอลลาเจนมีคุณสมบัติเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพที่เข้ากันได้กับเนื้อเยื่อในร่างกาย (Biocompatible) ทำให้เป็นพิษต่อร่างกายและกระตุ้นให้เกิดการสร้างภูมิคุ้มกันต่อต้านตัว (Ruszczak, 2003; Zou et al., 2020)

แผ่นปิดแผลคอลลาเจน เป็นแผ่นที่ทำมาจากวัสดุพอลิเมอร์ทางชีวภาพ เพื่อใช้สำหรับสมานแผล ประกอบด้วยสารที่ยับยั้งการสร้าง matrix metalloproteinases ช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนคอลลาเจน และช่วยป้องกันเชื้อจากภายนอก (Moura et al., 2014; Wahab et al., 2014) แผ่นปิดแผลทางการแพทย์มีส่วนประกอบที่เป็นคอลลาเจนชนิด I ประมาณ 55-60% ซึ่งผลิตมาจากผิวหนังหรือเอ็นของวัว ม้า หมู และปลานิล (Pallaske et al., 2018; Wiegand et al., 2016) มีการศึกษาการนำผลิตผลพลอยได้มาเป็นแหล่งคอลลาเจนชนิด I ได้แก่ แมงกะพรุน หนังปลาเตอร์เจียน และกระดูกแกะ (Khong et al., 2018; Wang et al., 2013) การสกัดและศึกษาคอลลาเจนจากหลอดลมจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษาเพื่อประยุกต์หลอดลมไก่เนื้อที่เป็นผลิตผลพลอยได้มาเป็นวัตถุดิบทดแทนในการสกัดคอลลาเจนในอุตสาหกรรม

โดยทั่วไปการสกัดคอลลาเจนจะมีวิธีละลายอยู่วิธี คือ กรดอะซิติกและเอนไซม์เพปซิน โดยกรดอะซิติกจะไปเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างสาย  $\alpha$ -helix ทำให้เกิดการพองตัวและสลาย แต่กรดทำลายพันธะโควาเลนต์ระหว่างโมเลกุลได้ยาก การสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน โดยเอนไซม์จะเข้าตัดพันธะในส่วนของไทโรซีนไทด์ ซึ่งจะทำได้ปริมาณผลผลิตที่มากกว่าการสกัดด้วยกรดอะซิติกโดยที่ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน (Hong et al., 2017) การสกัดคอลลาเจนแบบดั้งเดิมด้วยกรดและเอนไซม์เพปซินได้ผลผลิตคอลลาเจนอยู่ที่ 0.1-6.4% และ 0.3-36.2 % ตามลำดับ (Abdollahi et al., 2018; Cheng et al., 2017; Jeevithan et al., 2015; Munasinghe & Schwarz, 2017; Jiacheng Wu et al., 2019) ซึ่งการสกัดคอลลาเจนแบบดั้งเดิมมีข้อเสียคือใช้ระยะเวลา 2-4 วัน และได้ผลิตผลคอลลาเจนน้อย ดังนั้นจำเป็นต้องมีการศึกษาการสกัดที่ใช้ระยะเวลาสั้นและได้ผลิตผลเพิ่มขึ้น

คลื่นอัลตราซาวด์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายด้านเพื่อเพิ่มผลผลิต ลดความเป็นพิษ และกระบวนการผลิตที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (Chemat et al., 2017) คลื่นอัลตราซาวด์เป็นพลังงานจากการสั่นของคลื่นเสียงที่สามารถทำให้แรงดันและอุณหภูมิสูงขึ้น (Ashokkumar, 2015; Chandrapala et al., 2012) มีรายงานว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยเพิ่มปริมาณผลิตผลคอลลาเจนได้ (Ali et al., 2018; Kim et al., 2012; Li et al., 2009; Song et al., 2018)

ความเข้มของคลื่นอัลตราซาวด์และระยะเวลา มีผลต่อปริมาณผลิตผล มีรายงานว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 150 วัตต์ 5 นาที ในการสกัดคอลลาเจนจากปอดไก่ สามารถเพิ่มปริมาณผลิตผล

คอลลาเจนได้ 31.25% (Zou et al., 2020) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 2,990 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 36 นาที สามารถเพิ่มปริมาณผลิตผลคอลลาเจนจากกระดูกสันอกไก่ได้สูงสุด 84.14% (Akram & Zhang, 2020) จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สามารถช่วยเพิ่มปริมาณผลิตผลคอลลาเจนและลดระยะเวลาในการสกัดได้

โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนมีบทบาทสำคัญในการนำมาพัฒนาเป็นวัตถุชีวภาพทางการแพทย์ (Oropallo, 2019; Wiegand et al., 2016) มีรายงานว่า การได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ 100% เป็นเวลา 10 นาที มีผลทำให้คอลลาเจนไขมันมนุษย์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Palumbo et al., 2011) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมีผลไปทำลายโครงสร้าง  $\alpha$ -chain ของคอลลาเจน ผิวหนังปลากะพง (Kosaka, 2012) นอกจากนี้โครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจนกระดูกอ่อนสันอกไก่ถูกทำลายเมื่อได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 36 นาที (Akram & Zhang, 2020) การศึกษาการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของคอลลาเจนจึงจำเป็น ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือศึกษาการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการสกัดคอลลาเจนหลอดลมไก่และศึกษาความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์และระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและลักษณะทางชีวเคมีของคอลลาเจนหลอดลมที่สกัดด้วยวิธีดั้งเดิมและการสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน

## 2.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มข้นสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ เป็นโปรตีนที่ละลายได้ดีในสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 0.3 โมลาร์ อีกทั้งเกลือโซเดียมคลอไรด์ยังมีบทบาทสำคัญในการเกิดเจลของอาหารที่ทำจากโปรตีนกล้ามเนื้อ ปัจจุบันการลดปริมาณโซเดียมในอาหารได้รับความสนใจจากผู้บริโภคเป็นจำนวนมาก เนื่องจากการได้รับโซเดียมในปริมาณที่มากเกินไปสามารถก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพได้ เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น (Kloss et al., 2015) การผลิตอาหารจากเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีเกลือในปริมาณต่ำจึงได้รับการพัฒนาขึ้นบนพื้นฐานของการใช้กลยุทธ์และวิธีการที่หลากหลายเพื่อให้เข้าถึงความต้องการของผู้บริโภค โดยวิธีการทั่วไปที่ใช้นั้น คือการใช้เกลือชนิดอื่นเพื่อทดแทนการใช้โซเดียมในบางส่วน ซึ่งวิธีการนี้จะส่งผลเชิงลบต่อรสชาติและเนื้อสัมผัสของเจล (Tahergorabi & Jaczynski, 2012) ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับการปรับปรุงคุณสมบัติเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์เมื่อใช้เกลือในปริมาณต่ำโดยการเติมสารปรุงแต่งต่าง ๆ เช่น โซเดียมไพโรฟอสเฟต (sodium pyrophosphate (Chang et al., 2001), ทรานกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ (microbial transglutaminase) (Uresti et al., 2004), และกรดอะมิโน (เช่น ไลซีน ซีสเทอีน และฮีสทีดีน) (Cando et al., 2016) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้กระบวนการอื่น ๆ ได้แก่ การใช้ไมโครเวฟ

(Fu et al., 2012) และความดันสูงร่วมด้วย (Cando et al., 2015) ปัจจุบันการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูง (High intensity ultrasound; HIU) ในกระบวนการผลิตอาหารถูกนำมาวิจัยอย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นกระบวนการที่ปลอดภัย ไม่มีพิษ และเป็นเทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเป็นคลื่นชนิดที่มีความถี่ต่ำ (16 – 100 kHz) และมีพลังงานสูง (โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 10 - 1,000 W/cm<sup>2</sup>) (Soria & Villamiel, 2010)

กระบวนการคาวิเทชัน (cavitation) เกิดจากการก่อรูป (formation) ของไอน้ำที่มีขนาดเล็กมากกับอนุภาคลิเธเรที่มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง โดยทั่วไปจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน (sonication) ซึ่งก่อให้เกิดการสะสมของพลังงาน, การเกิดคลื่นเฉือนที่มีพลังงานสูง รวมทั้งปฏิกิริยาทางเคมีที่อาจเป็นไปได้ (Soria & Villamiel, 2010) กระบวนการเหล่านี้จึงอาจส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของอาหาร โดยเฉพาะโปรตีนกลั่นเนื้อ ดังนั้นการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงอาจช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในสภาวะที่ใช้เกลือความเข้มข้นต่ำ ซึ่งอาจส่งผลต่อการปรับปรุงคุณสมบัติของเจลได้ การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงนอกจากจะส่งผลให้โปรตีนเกิดการแยกตัว และสามารถปรับปรุงความสามารถในการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่ค่าความแรงของไอออนสูงแล้ว (Saleem & Ahmad, 2016) แต่ยังมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเปิดตัว การเกาะตัวและการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ฟังก์ชันของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ เช่น หมู่ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic group) และหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) (Liu et al., 2017) นอกจากนี้ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงนั้นสามารถเร่งกระบวนการถ่ายเทมวลสารของโซเดียมคลอไรด์ในเนื้อ (McDonnell et al., 2014) และช่วยในการปรับปรุงคุณสมบัติของเจลที่เกิดจากโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (Zhang et al., 2017) การศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนั้นจะใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูง เช่น 0.6 โมลาร์ และจากข้อมูลบางส่วนที่ศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อการเปิดตัวของโปรตีน ไมโอไฟบริลลาร์ที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือนั้น ยังคงพบข้อจำกัดในด้านความสามารถในการละลายของโปรตีน ดังนั้น การเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมของโปรตีนในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นต่ำภายใต้การใช้คลื่น อัลตราซาวด์ความเข้มสูงจึงจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถนำมาใช้เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เจลจากโปรตีนที่มีเกลือในปริมาณต่ำโดยปราศจากการใช้สารทดแทนโซเดียม และโดยทั่วไปการเกิดเจลของโปรตีนนั้นจะเริ่มจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติเพียงบางส่วน (partial denaturation) ของโปรตีน ตามด้วยการรวมตัวกันของโปรตีนแบบไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible aggregation) (Lanier et al., 2000) ดังนั้น การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงจึงอาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการสูญเสียสภาพ และการรวมตัวของโปรตีนซึ่งอาจมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารร่วมด้วย

## 2.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติด้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลาไหล

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลสเพื่อให้มีเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) เป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของโปรตีนจากปลาไหลเพปไทด์ที่เกิดจากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม สามารถแสดงสมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive) ที่หลากหลาย เช่น ลดความดัน (antihypertensive) ลดการเกิดออกซิเดชัน (antioxidative) ในระดับเซลล์เพิ่มภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) จับแร่ธาตุ (mineral binding) เพื่อเพิ่มการดูดซึมของแร่ธาตุ ลดการเกาะตัวของลิ่มเลือด (antithrombotic) รวมถึงลดคอเลสเตอรอล (hypocholesterolemic effects) (Arihara, 2006) ไฮโดรไลสที่ผลิตขึ้นสามารถนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ที่มีโปรตีนสูง อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลสที่มีแนวโน้มที่จะปรับเปลี่ยนกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระจากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal; GI) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยของเอนไซม์ในกระบวนการผลิตไฮโดรไลสและเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารยังต้องได้รับการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาเพื่อเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์ของปลาไหลเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลสที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะที่เหมาะสม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของการย่อย GI ในหลอดทดลองของโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาไหลด้วยระดับต่าง ๆ ของการย่อยสลาย (degrees of hydrolysis, DH) วิเคราะห์ ด้านออกซิเดชันในระดับเซลล์ รวมถึงวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างสารเคมีและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ได้รับการจัดตั้งขึ้นตามการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) และการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation analysis)

## 2.7 คุณลักษณะของเพปไทด์จากปลาไหลและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์

ความเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางพยาธิสรีรวิทยา (pathophysiology) หลายอย่างเช่นความชรา (aging) การอักเสบ (inflammation) โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) และมะเร็ง (cancers) (Nwachukwu & Aluko, 2019; Sies & Jones, 2020) มีรายงานการวิจัยระบุถึงเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมากที่ผลิตจากแหล่งต่างๆ (Fan, He, Zhuang, & Sun, 2012; Huang, Lin, & Chang, 2015; Kangsanant, Thongraung, Jansakul, Murkovic, & Seechamnaturakit, 2015) อย่างไรก็ตามมีการรายงานกล่าวว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีแนวโน้มที่จะถูกตัดแปลงภายใต้ระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal (GI) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร (Gallego, Mora, & Toldrá, 2018; Ren, Liang, Zhang, Hou, Li, & Ma, 2018; Zhang, Noisa, & Yongsawatdigul, 2020) การระบุเพปไทด์ที่ย่อย

หลังจากผ่าน GI มีความเกี่ยวข้องกับสุขภาพมากขึ้นเนื่องจากมีแนวโน้มที่จะดูดซึมและเข้าถึงอวัยวะเป้าหมายได้ แต่เปปไทด์ที่ผลิตได้หลังจากการย่อย GI ในหลอดทดลองยังมีแพนครีเอติน (pancreatin) จำนวนหนึ่งซึ่งแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างมีนัยสำคัญ (Zhang, Noisa, & Yongsawatdigul, 2020) ดังนั้นการปนเปื้อนของเปปไทด์ที่ผลิตได้จากเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร GI โดยการสลายตัวอัตโนมัติหรือ/และการย่อยสลายของเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหาร GI ทำให้เกิดความเสียหายในการทำให้บริสุทธิ์และระบุเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ผลิตได้จากไฮโดรไลสที่ผ่านการย่อยใน GI เครื่องมือชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics tools) เช่น BIOPEP <http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/en/biopep> และ Peptide cutter [https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/) มักจะนำไปใช้ในการย่อยอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico* GI) เพื่อทำนายตำแหน่งที่อาจเกิดการตัดพันธะของเปปไทด์ในทางเดินอาหาร GI (Agyei, Tsopm, & Udenigwe, 2018; Gallego, Mora, & Toldrà, 2018) ซึ่งช่วยตัดหรือหลีกเลี่ยงการรบกวนของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารจำลองแบบ *in vitro* GI ดังนั้นในการย่อยอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (*in silico* GI) เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยให้ทำนายและทราบผลผลิตของกลุ่มเปปไทด์หลังการย่อยในระบบอาหาร GI ของโปรตีนไฮโดรไลส

นอกจากทดสอบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมีแล้วควรทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ (cellular antioxidant activity, CAA) ซึ่งจะให้ผลการกำจัด/ต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกันกับระบบทางชีวภาพมากขึ้น (López-Alarcón & Denicola, 2013; Wolfe & Liu, 2007) มีรายงานกล่าวถึงเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS<sup>•+</sup> ได้แก่ NTVPAKSCQAQPTTM, FLKKISQRYQKF, ALPQYLKTVYQHOK และ IQPKTKVIPYVRYL โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ในเซลล์ (Tonolo et al., 2020) เปปไทด์ NTVPAKSCQAQPTTM ยังทำให้เกิดการแสดงออกของยีน superoxide dismutase (SOD) ส่วน YLEELHRLNAGY แสดงทั้งความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีนที่ชักนำให้เกิด SOD และ catalase (CAT) (Homayouni-Tabrizi, Asoodeh, & Soltani, 2017) อย่างไรก็ตามเปปไทด์ FNDRLRQGQLL และ DVNNANQLEPR มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROO<sup>•</sup> ทางเคมีต่ำกว่าเปปไทด์ GLVYIL และ YHNAPGLVYIL แต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ในระดับเซลล์ใกล้เคียงกัน (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าเปปไทด์สามารถปรับยีนต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD, glutathione peroxidase (GPx) และ CAT เอนไซม์เหล่านี้มีอิทธิพลถึงความเกี่ยวข้องกับกลไกพื้นฐานของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังไม่ชัดเจน (Homayouni-Tabrizi, Asoodeh, & Soltani, 2017; Tonolo et al., 2020; Wang, Ding, Xue, Ma, Du, Zhang, & Liu, 2018)

## 2.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

กระบวนการเกิดเจล (Gelation) เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญในการกำหนดคุณภาพของซูริมิ เนื่องจากเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อคุณลักษณะของเนื้อสัมผัสและประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ซูริมิ โดน การเกิดเจลของซูรินั้นเกี่ยวข้องกับโดยตรงกับไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน โดยทั่วไปการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จำเป็นต้องใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2-3% (Lanier et al., 2000) การลดปริมาณของโซเดียมคลอไรด์มีผลทำให้ความสามารถในการเกิดเจลของซูริมิต่ำลง เนื่องจากโปรตีนไม่สามารถละลายได้อย่างเพียงพอและเปิดตัวออกได้ไม่ดี (Lanier et al., 2000) ดังนั้น ปัญหานี้จึงทำให้เกิดความท้าทายจากเทคโนโลยีที่เป็นมาตรฐานในการผลิตเจลซูริมิที่ใช้ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูง (High intensity ultrasound; HIU) จัดเป็นเทคโนโลยีเพื่อสิ่งแวดล้อมที่มีคลื่นความถี่ต่ำ ในระหว่างกระบวนการโซนิเคชันนั้นจะเกิดการก่อตัวและการยุบตัวของฟองอากาศซึ่งส่งผลให้เกิดการสะสมของพลังงานและไมโครสตรีมมิง (microstreaming) ที่มีความแข็งแรง (Soria & Villamiel, 2010) ในขณะเดียวกัน อนุภาคลิเธียที่ทำการปฏิกิริยาได้สูงสามารถเกิดได้จากโมเลกุลของน้ำ โดยที่อนุภาคนั้นอาจจะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นหรือกลุ่มอื่น ๆ ที่ทำการปฏิกิริยาได้ เช่น กลุ่มซัลไฟด์-ไฮไดรลของโปรตีน (Soria & Villamiel, 2010) ปัจจุบันมีการนำคลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงมาประยุกต์ใช้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ได้แก่มความสามารถในการละลาย เป็นต้น (Liu et al., 2017; Zhang et al., 2017) การวิจัยก่อนหน้านี้นี้มีรายงานว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยกระตุ้นการคลายตัวของไมโอไฟบริลลาร์โปรตีน, การเพิ่มขึ้นของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำและหมู่ซัลไฟด์ไฮไดรล (Wang et al., 2017; Zou et al., 2018) เพราะฉะนั้น การเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีน ไมโอไฟบริลลาร์และการคลายตัวของโปรตีนจึงอาจมีส่วนช่วยในการเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างสายโปรตีนและโครงข่ายของเจล (gel network) นอกจากนี้ งานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงมีศักยภาพในการสกัดแอกโตไมโอซินที่ภาวะโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ (Tang & Yongsawatdigul, 2020) ดังนั้น จึงสามารถสันนิษฐานได้ว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงอาจส่งผลเชิงบวกต่อเจลซูริมิภายใต้สภาวะที่มีเกลือต่ำ เนื่องจากความสามารถในการละลายของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานหลักในการเกิดเจล

ปัจจุบัน การศึกษาเกี่ยวกับการใช้เทคโนโลยีของคลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงในการเกิดเจลของ ซูริมียังคงมีน้อย ทั้งนี้การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงนั้นถือได้ว่าเป็นเทคโนโลยีที่สามารถใช้ในการปรับปรุงเจลซูริมิโดยปราศจากการใช้สารเคมีและ/หรือ เอนไซม์ งานวิจัยก่อนหน้าของคณะผู้วิจัย แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงสามารถกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีกายภาพของแอกโตไมโอซินจากเนื้อปลาที่สภาวะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน (Tang & Yongsawatdigul, 2020) อย่างไรก็ตาม ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติของ

เจลจากโปรตีนเนื้อปลาที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ ยังคงไม่ได้ถูกนำมาอธิบาย ดังนั้น การศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของเจลเมื่อได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์จึงเป็นหัวข้อที่ควรนำมา ศึกษาวิจัยเพิ่มเติม เนื่องจากความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมของการเกิดเจลซูริมิภายใต้สภาวะที่มีการใช้ คลื่นอัลตราซาวด์นั้น เป็นสิ่งสำคัญที่ใช้เป็นพื้นฐานสำหรับการนำเทคโนโลยีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ความเข้มข้นมาใช้เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์จากซูริมิที่มีเนื้อสัมผัสที่ดี

## 2.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของการสั้น ของซูริมิจากปลาเขตร้อน

ปลาทรายแดง (*Nemipterus spp.*; TB) และ ปลาปากคม (*Saurida spp.*; LZ) เป็นพันธุ์ปลา ที่สำคัญสำหรับใช้ในการผลิตซูริมิเขตร้อนในเขตภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Guenneugues & lanelli, 2014) โดยทั่วไปเจลซูริมิจากปลาเขตร้อนจะมีคุณภาพต่ำกว่าซูริมิจากปลาเขตหนาว เนื่องจาก ความแตกต่างในการจัดการวัตถุดิบปลาหลังการจับ (postharvest handling) และคุณภาพภายในเนื้อ ปลา (intrinsic properties) ดังนั้น การสืบหาวิธีการปรับปรุงคุณภาพเจลของซูริมิจากปลาเขตร้อนจึงมี ความสำคัญ เป็นที่รู้โดยทั่วไปว่าเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase, TGase) ส่งเสริมการ เกิดเจลของซูริมิ โดยทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของพันธะ (non-disulfide cross-linking) ในไมโอซินสาย หนัก (myosin heavy chain, MHC) ระหว่างการเกิดเจล (setting) ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการบ่ม สำหรับการผลิตปฏิกิริยาย้ายหมู่เอซิล (acyl-transfer reaction) ระหว่างกลูตามีนและไลซีน (Folk, 1983) ไม่นานมานี้ มีรายงานว่าผงไข่ขาวสามารถใช้ลดการเกิดการสลายโมเลกุลของโปรตีนจากเอนไซม์ โปรตีเอส (proteolysis) และปรับปรุงคุณภาพของเจลได้ แต่ยังพบข้อจำกัดเนื่องจากมีกลิ่นกำมะถัน (sulfurous odor) และก่อให้เกิดการแพ้ได้ การเพิ่มของพันธะไดซัลไฟด์เป็นหนึ่งในวิธีการที่ช่วย ปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิ กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid, AsA) นั้น เพิ่มความแข็งแรงของเจลได้ เนื่องจากทำให้เกิดการออกซิเดชันของหมู่ซัลไฟด์ไฮดริล (sulfhydryl (SH) groups) (Miyamoto, & Nishimura, 2006) กรดแอสคอร์บิกสามารถเกิดออกซิเดชันขึ้นเอง (auto-oxidized) เกิด monodehydro-L-ascorbic acid และเกิดเป็น dehydro-L-ascorbic acid (DHA) ได้เองตาม ธรรมชาติอย่างไม่เป็นสัดส่วน การเกิดอนุมูลอิสระของซูเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (superoxide anion) นี้ส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันของหมู่ไทออล (SH groups) และเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ ระหว่างโมเลกุลของไมโอซินสายหนัก (MHC) (Nishimura, Goto, & Mano, 1996) นอกจากนี้ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) เป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ที่ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของหมู่ไทออลเกิดพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นได้ (Banlue, Morioka, & Itoh, 2010) US FDA (2004) ระบุว่าสามารถเติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ในผลิตภัณฑ์ได้ที่ 0.04-1.25% การเติม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับกรดแอสคอร์บิกจึงน่าจะเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของหมู่ไทออล

ได้ จนกระทั่งปัจจุบัน การเติมสารรีดิวซ์ (reducing agents) และ/หรือสารออกซิไดซ์ (oxidizing agents) เพื่อส่งเสริมให้เกิดการเชื่อมข้ามของพันธะไดซัลไฟด์ในกระบวนการเกิดเจลซูริมิ ยังไม่มีการศึกษามากนัก

ระหว่างการทำให้ความร้อนเพื่อทำให้เกิดเจล โปรตีนในเนื้อปลาจะเกิดการเสียสภาพและจับตัวกัน (aggregation) ผ่านแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions) แรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interactions) และพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) สเปกโทรสโกปีของการสั่น (vibrational spectroscopy) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ประโยชน์ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน (Wei et al., 2018) ฟลูออโรสโกปีอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FT-IR) สามารถใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิได้ นอกจากนี้ รามานสเปกโทรสโกปี ยังให้ข้อมูลของโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ของโปรตีน รวมถึงโครงสร้างของพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide conformation) พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds) และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions) (Li-Chan, Nakai, & Hirotsuka, 1994) ดังนั้น ฟลูออโรสโกปีอินฟราเรดและรามานสเปกโทรสโกปี จึงเป็นเทคนิคที่ส่งเสริมกัน ซึ่งสามารถประยุกต์เพื่อใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงทั้งในโครงสร้างทุติยภูมิและตติยภูมิของโปรตีนที่ถูกเหนี่ยวนำโดยกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 ข้าวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์

##### 3.1.1 วัตถุดิบและสารเคมี

แป้งข้าว (Rice flour) อะมิโลสสูงจาก บริษัท เยนเนอรัล ฟู้ด โปรดักส์ จำกัด, Soy protein Isolate (Profam 974) , Whey protein Isolate (WPI 9030) จาก บริษัท วิกี้ เอนเตอร์ไพรส์ จำกัด , Hi maize-260 และ Fiber sol-2 จาก Archer Daniels Midland Company

##### 3.1.2 การเตรียมตัวอย่างแป้งข้าวผสม ingredients

สูตรที่ 1: control (100% RF) เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ปรับความชื้นให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น control

สูตรที่ 2 และ 3: 10% Soy protein Isolate และ 20% Soy protein Isolate โดยเตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Soy protein Isolate อัตราส่วน 9:1 และอัตราส่วน 8:2 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25 % เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น 10SPI และ 20SPI ตามลำดับ

สูตรที่ 4 และ 5: 10% Whey protein Isolate และ 20% Whey protein Isolate เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Whey protein Isolate อัตราส่วน 9:1 และอัตราส่วน 8:2 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น 10WPI และ 20WPI ตามลำดับ

สูตรที่ 6 และ 7: 20% Hi maize และ 40% Hi maize เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Hi maize อัตราส่วน 8:2 และอัตราส่วน 6:4 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น 20HM และ 40HM ตามลำดับ

สูตรที่ 8 และ 9: 10% Fiber sol และ 20% Fiber sol เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Fiber sol อัตราส่วน 9:1 และอัตราส่วน 8:2 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น 10FS และ 20FS ตามลำดับ

สูตรที่ 10: 10% Fiber sol + 20% Hi maize เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Fiber sol และ Hi maize อัตราส่วน 7:1:2 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป โดยให้ชื่อตัวอย่างเป็น 10FS20HM

สูตรที่ 11: 20% Whey protein Isolate + 20% Hi maize + 10% Fiber sol เตรียมแป้งข้าว (rice flour) ผสมกับ Whey protein Isolate, Hi maize และ Fiber sol อัตราส่วน 5:2:2:1 จากนั้นปรับความชื้นของแป้งข้าวผสมให้เป็น 25% เก็บตัวอย่างเตรียมขึ้นรูป ให้ชื่อตัวอย่างเป็น 20WPI20HM10FS

### 3.1.3 การผลิตตัวอย่างข้าวขึ้นรูป

ผลิตข้าวขึ้นรูปจากแป้งข้าวจากผสมโปรตีน หรือไฟเบอร์ และโปรตีนผสมไฟเบอร์ โดยใช้เครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ (co-rotating intermeshing twin screw extruder: APV MPF19:25, APV Baker, Inc., Grand Rapid, MI, USA) ชนิดสกรูคู่หมุนตามกัน มีรูปแบบการจัดเรียงสกรูเป็นแบบผลิตภัณฑ์ไม่พองตัว (non-expanded product) ที่ผนังบารेलมีหน่วยให้ความร้อนที่สามารถแบ่งการควบคุมอุณหภูมิได้ 4 ช่วง โดยควบคุมอุณหภูมิของบารेलในช่วง 1, 2, 3 และ 4 ไว้ที่ 70, 90, 90 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และป้อนแป้งข้าวผสมเข้าสู่เครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ผ่านทางถังป้อนที่ได้ถังมีเกลียวสกรูคู่เป็นตัวป้อน โดยป้อนวัตถุดิบของสูตรที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 และ 11 ด้วยอัตราประมาณ 3, 3, 3, 2.5, 2.5, 6, 7, 3, 30, 7 และ 2.7 ตามลำดับ ซึ่งวัตถุดิบที่ป้อนเข้าสู่เครื่องเอกซ์ทรูเดอร์นั้นทำการปรับความชื้นให้มีปริมาณ 25% การตั้งความเร็วรอบสกรู 30 รอบต่อนาที หน้าแปลน (die) ที่ใช้ขึ้นรูปเป็นรูปทรงเมล็ดข้าว เมื่อค่าแรงทอร์คคั้งที่ เก็บข้อมูลจากเครื่องเอกซ์ทรูเดอร์ เช่น อุณหภูมิของเอกซ์ทรูเดอร์ (product temperature) อุณหภูมิในแต่ละช่วงของบารेल ค่าแรงทอร์ค (% torque) และเก็บตัวอย่างเอกซ์ทรูเดอร์ทำแห้งตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง เก็บรักษาเพื่อทำการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

### 3.1.4 การผลิตเส้นสปาเก็ตตี้

ผลิตเส้นสปาเก็ตตี้จากแป้งข้าวโดยผสมโปรตีนถั่วเหลือง (SPI), โปรตีนนม (WPI) และโปรตีนอกไก่ (CK) ในปริมาณ 20 และ 40% โยน้ำหนักรวม จากนั้นปรับความชื้นของของผสมให้ได้ 30% แล้วนำไปผ่านเข้าสู่เครื่องเอกซ์ทรูเดอร์โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับการผลิตข้าวขึ้นรูป โดยใช้หน้าแปลน (die) รูปวงกลมที่มีขนาดรูเปิด 2 มิลลิเมตร เมื่อเส้นสปาเก็ตตี้ผ่านหน้าแปลนออกมาแล้วนำไปตากแห้งที่อุณหภูมิห้องทิ้งไว้ 1 คืน หรือจนกระทั่งมีความชื้นต่ำกว่า 10% จากนั้นตัดเส้นให้มีความยาว 30 เซนติเมตร

### 3.1.5 การทดสอบอายุการเก็บ

เตรียมตัวอย่างสูตรที่ 11: 20WPI20HM10FS แบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, อุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน โดยเก็บตัวอย่างมาเพื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงด้านสี และเนื้อสัมผัส ทุก ๆ 15 วัน

### 3.1.6 การวิเคราะห์ค่าสี

นำข้าวใส่ลงในกระบอกใส่ตัวอย่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เซนติเมตร แล้วนำไปวัดค่า  $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$  ด้วยเครื่องวัดสี HunterLab รุ่น ColorQuestXE โดยอาศัยหลักการวัดการตกกระทบและการสะท้อนของแสงเมื่อส่องผ่านตัวอย่าง โดยใช้  $D65$   $10^\circ$  เป็นแหล่งกำเนิดแสง

### 3.1.7 การวิเคราะห์สมบัติทางการหุงต้ม (Cooking properties)

ดัดแปลงจากวิธีการของ Singh et al. (2005) ชั่งข้าวเต็มเมล็ด 10 กรัม ใส่ในกระป๋องอลูมิเนียม เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จับเวลานำตัวอย่างออกมากดทับด้วยแผ่นกระจก ทุก ๆ 1 นาที เริ่มจากนาทีที่ 10 จนกระทั่งไม่พบส่วนแข็งสีขาว จากนั้นเทใส่ตะแกรง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปอบแห้งหาของแข็ง

-ระยะเวลาหุงข้าว = เวลาที่น้อยที่สุดที่ทำให้ข้าวเกิดเจลมากกว่า 90% ของเมล็ดข้าวหรือไม่พบความชุ่มตรงส่วนกลาง (Bhattacharya, 1978)

$$\text{-ปริมาณน้ำที่ใช้หุง} = \frac{\text{น้ำหนักข้าวสุก} - \text{น้ำหนักข้าวสุกแห้ง}}{\text{น้ำหนักข้าวสารแห้ง}}$$

### 3.1.8 การวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของข้าวสุก

ชั่งข้าว 10 กรัม ใส่กระป๋องอลูมิเนียม เติมน้ำกลั่นเท่ากับปริมาณน้ำที่ใช้หุงเฉลี่ยที่ได้ข้างต้น ปิดฝาให้สนิท นำไปวางในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการหุงต้มเท่ากับเวลาในการหุงต้มที่ได้ข้างต้น จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เก็บไว้ในภาชนะปิด แล้วนำไปวัดสมบัติทางเนื้อสัมผัสด้วยเครื่องวัดเนื้อสัมผัส (The TA.XTplus texture analyzer, Stable Micro Systems, USA) ด้วยการกดข้าวเมล็ดเดียว ใช้หัววัดแบบ cylinder probe (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร) กดด้วยความเร็ว 0.5 มิลลิเมตรต่อวินาที (ทั้งกดและถอนขึ้น) ที่ 90% strain วัดค่าของแรงกระทำ (Force Compression) โดยแรงกดสูงสุดที่ใช้ในการวัด คือค่าความแข็ง (Hardness) และแรงดึงสูงสุดที่ใช้ในการวัด คือค่าความเหนียว (Stickiness)

### 3.1.9 Kinetic digestion

ซึ่งตัวอย่างอาหารที่สับให้ละเอียด 0.25 กรัม ใส่ในหลอดย่อยขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase ลงไป 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลูกแก้วลงในหลอดย่อย 4 อัน และผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixture นาน 20 วินาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ pepsin ลงไป 2.5 มิลลิลิตร บ่มใน shaking water bath เพื่อเขย่าที่ความเร็วรอบ 170 rpm ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ลงไป 2.5 มิลลิลิตร เพื่อปรับ pH ให้เป็นกลาง เติมสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เพื่อปรับ pH เป็น 6 เติมสารละลายเอนไซม์ผสมของ pancretin และ amyloglucosidase ลงไป 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นสุ่มตัวอย่างปริมาณ 100 ไมโครลิตร มาตรวจหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง glucose meter ตามระยะเวลา ดังต่อไปนี้ 0, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240 นาที โดยเวลาที่ 0 นาที คือการสุ่มตัวอย่างมาก่อนเติมสารละลายเอนไซม์ผสม

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่มีความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และตรวจวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง glucose meter ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อนำมาหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกลูโคสกับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้จากเครื่อง glucose meter นำค่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากเครื่อง glucose meter ตามระยะเวลาต่าง ๆ มาคำนวณหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสด้วยสมการที่ได้จากสารละลายมาตรฐานกลูโคส

นำค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในแต่ละระยะเวลาที่ได้มาคำนวณหา digested starch (%) ในแต่ละเวลา โดยเทียบกับปริมาณ total starch ที่ได้ ดังนี้

$$\text{ปริมาณ starch (mg)} = \text{น้ำหนักตัวอย่าง (mg db)} \times \text{total starch (\%)} / 100$$

$$\text{Digested starch (\%)} = \text{ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส} \times 20.5 \text{ mL} / \text{ปริมาณ starch (mg)} \times 100$$

นำค่า digested starch (%) มา plot กราฟ digestion curve เทียบกับเวลา คำนวณหาอัตราการถูกย่อย ( $k$ ) และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เวลา  $\infty$  ( $C_{\infty}$ ) จากสมการต่อไปนี้

$$\ln(dc_t/dt) = \ln(C_{\infty}k) - kt$$

เมื่อ  $C_t$  = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เวลา  $t$   
 $C_\infty$  = ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เวลา  $\infty$   
 $k$  = อัตราการถูกย่อย ( $g/100 g$  dry starch per min)

โดย plot กราฟระหว่าง  $\ln\left(\frac{C_{i+1}-C_i}{t_{i+1}-t_i}\right)$  และ  $(t_{i+1}+t_i)/2$  ดังนั้นค่า  $k$  มีค่าเท่ากับ ความชันของกราฟนี้ และค่า  $C_\infty$  คำนวณได้จากจุดตัดแกน  $y$  ( $\ln(C_\infty k)$ )

### 3.1.9.1 ค่าดัชนีน้ำตาล (Glycemic index: GI)

นำค่า  $k$  และค่า  $C_\infty$  ที่ได้มาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) จากสมการต่อไปนี้

$$D_t = D_0 + D_{\infty-0} (1 - \exp(-kt))$$

$$D_\infty = D_0 + D_{\infty-0}$$

$$AUC = \left[ D_\infty t + \frac{D_{\infty-0}}{k} \exp(-kt) \right]_{t_1}^{t_2}$$

นำค่า AUC มาคำนวณหาค่า Hydrolysis index (HI) โดยนำค่า AUC ของตัวอย่างเทียบกับค่า AUC ของ reference food ที่ใช้เป็นขนมปังขาว ตามสมการต่อไปนี้

$$HI = \frac{AUC_{\text{sample}}}{AUC_{\text{white bread}}} \times 100$$

นำค่า HI ที่ได้มาคำนวณหาค่า Glycemic index (GI) ตามสมการต่อไปนี้

$$GI = 39.51 + 0.570HI$$

### 3.1.10 การทดสอบทางประสาทสัมผัส scoring test

ประเมินระดับคะแนนของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุกด้วยวิธี 9-point scoring test โดยผู้ทดสอบจำนวน 30 คนซึ่งไม่ผ่านการฝึกฝน ประเมินระดับคะแนนด้านสี, ลักษณะปรากฏ, กลิ่นรส, เนื้อสัมผัส และกลิ่นและรสชาติที่คงค้างหลังจากการกลืน โดยให้ผู้ทดสอบชิมตัวอย่างและให้ระดับคะแนน กำหนดค่าคะแนน 1-9 โดยกำหนดให้

สี หมายถึง สีขาว-สีเหลือง

ลักษณะปรากฏ หมายถึง รูปร่างไม่เหมือนข้าวสุก-รูปร่างเหมือนข้าวสุก

กลิ่นรส หมายถึง กลิ่นรสไม่เหมือนข้าวสุก-กลิ่นรสเหมือนข้าวสุก

เนื้อสัมผัส หมายถึง อ่อนนุ่ม-แข็งมาก

aftertaste หมายถึง ไม่มีกลิ่นและรสชาติแปร่ง-มีกลิ่นและรสชาติแปร่ง

### 3.1.11 การทดสอบทางประสาทสัมผัส hedonic scale test

ประเมินความชอบของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุกด้วยวิธี 9-point hedonic scale โดยผู้ทดสอบจำนวน 30 คนซึ่งไม่ผ่านการฝึกฝน ประเมินความชอบด้านสี ลักษณะปรากฏ กลิ่นรส เนื้อสัมผัส กลิ่นและรสชาติที่คงค้างหลังจากการกลั่น และความชอบโดยรวม ประเมินโดยให้ผู้ทดสอบชิมตัวอย่างและให้คะแนนตามความชอบ โดย 1 คะแนน คือ ไม่ชอบมากที่สุด และ 9 คะแนน คือ ชอบมากที่สุด

### 3.1.12 การทดสอบทางประสาทสัมผัส scoring test ประเมินอายุการเก็บ

ประเมินระดับคะแนนของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปข้าวสาร และข้าวสุก โดยผู้ทดสอบจำนวน 12 คนซึ่งผ่านการคัดเลือก ประเมินระดับคะแนนด้านสี, กลิ่นหืน/อับ ด้วยวิธี 5-point scoring test และการยอมรับ ในข้าวสาร และประเมินระดับคะแนนด้านกลิ่นหืน/อับ ด้วยวิธี 5-point scoring test, การยอมรับเรื่องสี, การยอมรับเรื่องกลิ่น และการยอมรับโดยรวม โดยให้ผู้ทดสอบมองและดมตัวอย่างและให้ระดับคะแนน กำหนดค่าคะแนน 1-5 โดยกำหนดให้

สี หมายถึง Beige-Sepia

กลิ่น หมายถึง กลิ่นปกติ-กลิ่นหืน/อับมากที่สุด

การยอมรับสี/กลิ่น/โดยรวม หมายถึง สามารถยอมรับได้-ไม่สามารถยอมรับได้

|              |            |             |            |
|--------------|------------|-------------|------------|
| tan          | beige      | macaroon    | hazel wood |
| granola      | oat        | egg nog     | fawn       |
| sugar cookie | sand       | sepia       | latte      |
| oyster       | biscotti   | parmesan    | hazelnut   |
| sandcastle   | buttermilk | sand dollar | shortbread |

รูปที่ 3.1 แล็บสีอ้างอิง (ที่มา: <https://digitalsynopsis.com/design/color-thesaurus-correct-names-of-shades/>)

### 3.1.13 คุณสมบัติทางความร้อน

วิเคราะห์การเกิดเจลลาติโนเซชันของของสตาร์ชข้าวเจ้า โปรตีนต่าง ๆ เอกซ์ทรูเกตด้วยเครื่อง Differential Scanning Calorimeter (DSC) (DSC1, Mettler Toledo, Switzerland) โดยชั่งตัวอย่าง 7 มิลลิกรัม ลงใน stainless steel DSC pan ที่มีปริมาตร 60 ไมโครลิตร และเติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:3 (w/w) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยเครื่อง DSC1 instrument (Mettler Toledo, Switzerland) โดยตั้งโปรแกรมในการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 25-140 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที ใช้ stainless steel pan เปลาเป็นตัวอย่างอ้างอิง (reference) และใช้ Indium เป็นสารมาตรฐาน (standard) ในการสอบเทียบอุณหภูมิ ค่าสมบัติการเกิดเจลลาติโนเซชันที่ทำการศึกษามีดังนี้ อุณหภูมิเริ่มต้นในการเกิดเจลลาติโนเซชัน (onset gelatinization temperature,  $T_o$ ) อุณหภูมิที่จุดสูงสุดในการเกิดเจลลาติโนเซชัน (peak gelatinization temperature,  $T_p$ ) และ ค่าพลังงานเอนทาลปีของการเกิดเจลลาติโนเซชัน ( $\Delta H$ ) โดยใช้โปรแกรม STARe software version 10.0 (Mettler Toledo, Switzerland)

### 3.1.14 ความต้านทานต่อแรงดึง

ทดสอบคุณสมบัติทางลักษณะเนื้อสัมผัสด้วยเครื่อง Texture analyzer โดยทดสอบคุณสมบัติความต้านทานต่อแรงดึง โดยนำตัวอย่างเส้นที่มีความยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตรพันรอบหัววัดประมาณ 2-3 รอบ โดยกำหนดการทำงานของเครื่องดังต่อไปนี้

|                        |                               |
|------------------------|-------------------------------|
| Mode:                  | Measure Force in Tension      |
| Option:                | Return to Start               |
| Pre-Test Speed:        | 3.0 มิลลิเมตร/วินาที          |
| Test Speed:            | 3.0 มิลลิเมตร/วินาที          |
| Post-Test Speed:       | 5.0 มิลลิเมตร/วินาที          |
| Distance:              | 100 มิลลิเมตร                 |
| Trigger Type:          | Auto 5 g                      |
| Data Acquisition Rate: | 200 pps                       |
| Accessory:             | Spaghetti Tensile Rig (A/SPR) |

ความต้านทานต่อแรงดึงได้จากค่าสูงสุดของกราฟซึ่งหมายถึงแรงสูงสุดที่ใช้ดึงตัวอย่างให้ขาดออกจากกันหารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวอย่าง

### 3.1.15 ศึกษาโครงสร้าง secondary structural ของโปรตีน เอกซ์ทราเซลล์และเส้นสเปกตีตีตัมสุก

ศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของ secondary structural ของโปรตีน เอกซ์ทราเซลล์และเส้นสเปกตีตีตัมสุก ซึ่งตัวอย่างเอกซ์ทราเซลล์จะต้องนำไปบดให้เป็นผงก่อน ส่วนเส้นสเปกตีตีตัมสุกนำไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งก่อน จากนั้นนำตัวอย่างที่เป็นผงมาวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง FTIR Spectrometer (Tensor 27, Bruker, UK) และเซลล์วัดตัวอย่างชนิด attenuated total reflectance (ATR) ที่ความยาวคลื่น 400 ถึง 4000  $\text{cm}^{-1}$  โดยมีค่า resolution เท่ากับ 4  $\text{cm}^{-1}$  และ 64 scans ในการวัดแต่ละครั้ง และใช้ค่า resolution enhancement factor เท่ากับ 1.5 วิเคราะห์สเปกตรัมด้วยโปรแกรม OPUS

### 3.1.16 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS version 14 และทดสอบความแตกต่างด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

## 3.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและความสัมพันธ์กับการเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก

### 3.2.1 ส่วนผสมและสารเคมี

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ซื้อจากบริษัท เกลือพิมาย จำกัด (นครราชสีมา, ประเทศไทย) ผงกลูโคส ได้รับจากบริษัท กรไทย จำกัด (ราชบุรี, ประเทศไทย) โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STPP) ซื้อจากบริษัท อติตยา เบอร์ล่า เคมีคัลส์ (ประเทศไทย) จำกัด (สมุทรปราการ, ประเทศไทย) กรดไนตริก ( $\text{HNO}_3$ ) และกรดไฮโดรคลอริก (HCl) สั่งซื้อจากบริษัท Carlo Erba Reagents S.A.S. Inc. (Val-de-Reuil, France) เอทานอลซื้อจากบริษัท Merck KGaA Inc. (Darmstadt, Germany) กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) และทริส-มาลีเอท (Tris-maleate) ซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)



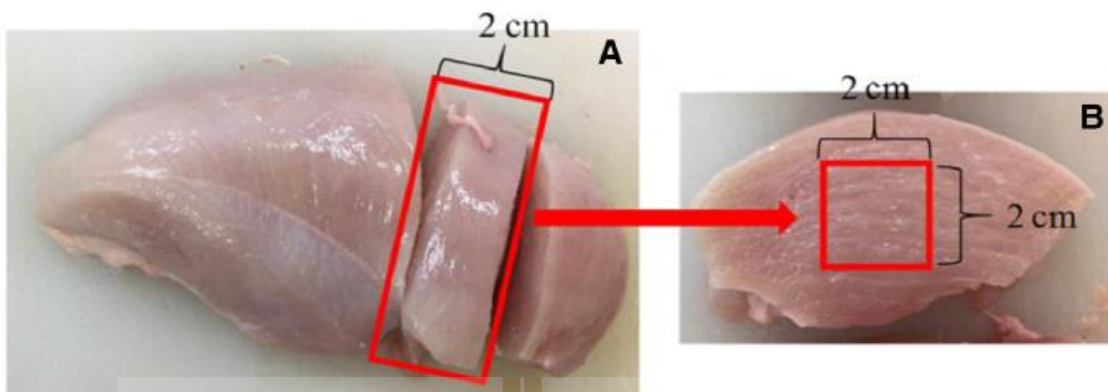
### 3.2.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้ออกไก่ขนาด

ใช้เนื้อส่วนอก (*Pectoralis major*) ของเนื้อทางการค้า (พันธุ์ Ross; เพศผู้ อายุ  $48 \pm 2$  วัน น้ำหนักตัว  $3.0 \pm 0.2$  กิโลกรัม) ที่เลาะกระดูกและหนัง ซึ่งได้รับจากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ (บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน), นครราชสีมา, ประเทศไทย) โดยควบคุมตัวอย่างเนื้ออกไก่ให้มีขนาดระหว่าง 250-280 กรัมต่อชิ้น และหนาไม่เกิน 4-5 เซนติเมตร หลังจากการเชือด แخذตัวอย่างในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5.0-5.5 กิโลกรัม (ประมาณ 20 ชิ้น) แล้วนำตัวอย่าง 3 กลุ่มแรก ไปนวดภายใต้สุญญากาศที่ 80 kPa เป็นระยะเวลา 65 นาที ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียส ใช้เครื่องนวดเนื้อสุญญากาศ (vacuum tumbler) (DVTS-50, Davison's Butcher Supply, Los Angeles, CA, USA) โดยนวดกับส่วนผสมที่เป็นสารละลาย ดังนี้ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% กลูโคสเข้มข้น 3% และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเข้มข้น 2% ให้ความเข้มข้น 16.5% (w/w) ของตัวอย่างเนื้ออกไก่ ส่วนตัวอย่างกลุ่มที่ 4 ใช้เป็นตัวอย่างควบคุมคือไม่มีการนวดผสมกับสารละลาย ทำการนวดตัวอย่างเนื้ออกไก่ 3 ชั่วโมง

เปอร์เซ็นต์การดูดซับส่วนผสม (marinade uptake) หลังการนวด จากสมการ

$$\text{การดูดซับส่วนผสม (marinated uptake, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังการนวด} - \text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการนวด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนการนวด}} \times 100$$

หลังจากนวดนำตัวอย่างมาเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 ชั่วโมง และสุ่มเก็บตัวอย่าง 3 ชิ้น จากแต่ละช่วงเวลา คือ 0, 0, 2, 6, 12, 16, และ 20 ชั่วโมง มาตัดตามขวางบริเวณส่วนที่หนาที่สุดของชิ้น เนื้ออกให้หนาประมาณ 2 ซม. แล้วจึงตัดแต่งเลือกเฉพาะบริเวณกลางชิ้นเนื้อให้มีขนาด  $2 \times 2 \text{ cm}^2$  (รูปที่ 3.2) นำชิ้นเนื้อที่ตัดได้มาบดแยกแต่ละชิ้น สำหรับวิเคราะห์ปริมาณโซเดียม ฟอสฟอรัส และกลูโคส



รูปที่ 3.2 ชิ้นเนื้อที่ตัดจากเนื้ออกไก่หลังการนวด (A) และบริเวณชิ้นเนื้อที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ (B)

### 3.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมและฟอสฟอรัส

นำตัวอย่างเนื้อบด (300 กรัม) มาย่อยด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 65% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องย่อยสลายตัวอย่างด้วยระบบไมโครเวฟ (microwave digestion oven) (Multiwave 3000, Anton Paar, Ashland, VA, USA) ที่กำลัง 1,200 วัตต์ 30 บาร์ และ 200 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ตามวิธีของ Bou, Guardiola, Padro, Pelfortb, และ Codonya (2004) ปรับปริมาตรตัวอย่างหลังย่อยเท่ากับ 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำปราศจากไอออน วิเคราะห์โซเดียมและฟอสฟอรัสโดยใช้เทคนิค inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES, Optima 8000, Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA) ควบคุมการทำงานของเครื่องด้วยความถี่คลื่นวิทยุที่กำลัง 1,300 วัตต์ อัตราการไหลของ plasma ที่ 15 ลิตร/นาที่ อัตราการไหลของ nebulizer gas ที่ 0.55 ลิตร/นาที่ อัตราการไหลของ auxiliary gas ที่ 0.2 ลิตร/นาที่ และอัตราการไหลของปั๊ม 1.5 มิลลิลิตร/นาที่ วิเคราะห์โซเดียมและฟอสฟอรัสที่มีความยาวคลื่น 589.592 และ 213.617 นาโนเมตร โดยระบบมองพลาสมาแบบแนวนอน (axial mode) ตามลำดับ ใช้สารมาตรฐาน ICP ของโซเดียมและฟอสฟอรัส (SCP Science, Baie D'Urfé, QC, Canada) และทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน

### 3.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

ตรวจสอบความสามารถในการแพร่ผ่านของกลูโคสในเนื้ออกไก่ นวด จากปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในเนื้อตามวิธีของ Jayasena และคณะ (2014) โดยผสมตัวอย่างเนื้อบด (1 กรัม) กับเอทานอลร้อนเข้มข้น 80% (50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างที่สกัดได้มาปั่นเหวี่ยงที่  $2,000 \times g$  (Sorvall Legend MACH 1.6R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ทำการสกัดซ้ำอีกสองครั้ง นำส่วนของเหลวที่ได้มา

กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 (a Whatman filter paper no.1) และระเหยให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน (99.999%) จากนั้นนำตัวอย่างแห้งมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปั่นเหวี่ยงที่  $10,000 \times g$  เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ปฏิกิริยาการเปลี่ยนสีของกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (a dinitrosalicylic (DNS) acid method) นำแต่ละตัวอย่างมาผสมกับสารละลาย DNS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) (Jenway, Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK) คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเปรียบเทียบกับสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และแสดงค่าเป็น มก./ตัวอย่างเนื้อ 100 กรัม ทำการวิเคราะห์ทั้งหมด 3 กลุ่มตัวอย่างที่เป็นอิสระต่อกัน

### 3.2.5 การสกัดฮีโมโกลบินจากเลือดไก่

เก็บตัวอย่างเลือดไก่จากไก่เนื้อทางการค้าอายุ  $48 \pm 2$  วัน ที่สายการผลิตในโรงเชือดไก่ทางการค้า (บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน)) ผสมตัวอย่างเลือดกับโซเดียมซิเตรททันทีที่ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 3.8% เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด สกัดฮีโมโกลบินจากตัวอย่างเลือดตามวิธีของ Lueangsakulthai และคณะ (2017) โดยปั่นเหวี่ยงตัวอย่างเลือดที่  $2,500 \times g$  (Thermo Electron LED GmbH) เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อกำจัดน้ำเลือด (plasma) และเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เก็บตัวอย่างเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cells) เติมน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 5 เท่าของตัวอย่าง ผสมให้เข้ากันอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที นำน้ำละลายฮีโมโกลบิน (hemolysate) ไปปั่นเหวี่ยงที่  $4,500 \times g$  เป็นเวลา 40 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ตักชั้นไขมันจากเยื่อหุ้มเซลล์ที่ลอยอยู่ด้านบนออก เก็บชั้นของเหลวซึ่งมีฮีโมโกลบินอยู่มาทำแห้ง (lyophilized) (Lyovac GT2-S, GEA Lyophil GmbH, Huerth, Germany) นำตัวอย่างแห้งที่ได้เก็บไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ต่อไป ความบริสุทธิ์ของฮีโมโกลบินวิเคราะห์ด้วยการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)) เจลส่วนบน (stacking gel) 4% และเจลส่วนล่าง (running gel) 12.5% ตามวิธีของ Laemmli (1970)

### 3.2.6 การเสียดสภาพจากความร้อนของฮีโมโกลบิน

นำตัวอย่างฮีโมโกลบินแห้ง (lyophilized Hb) มาเติมทริส-มาลิเอท บัฟเฟอร์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7) ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ผสมอยู่เข้มข้นต่างกัน (500, 1000, และ 1500 มิลลิโมลาร์,

pH 7), กลูโคส (150, 350 มิลลิโมลาร์, pH 7) และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (10, 55, และ 100 มิลลิโมลาร์) ที่ pH 7 และ pH 9 ซึ่งตัวอย่างทั้งหมดมีโปรตีนเท่ากันคือ 20 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร รวมถึงศึกษาผลรวมของส่วนผสมคือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ กลูโคสเข้มข้น 350 มิลลิโมลาร์ และ โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเข้มข้น 55 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 7 และ pH 9 ด้วยเช่นกัน วิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้ microdifferential scanning calorimetry (Micro DSC7 evo, Setaram Instrumentation, Caluire, France) โดยใส่ตัวอย่าง (250 ไมโครลิตร) ในถ้วยแอสแตนเลส และใช้ทริส-มาลิเอท บัฟเฟอร์ (pH 7) เป็นสารอ้างอิง จากนั้นความร้อนตัวอย่างจาก 20 ถึง 90 องศาเซลเซียส ที่อัตราการให้ความร้อน 1 องศาเซลเซียส/นาที ตรวจสอบวิเคราะห์อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ( $T_d$ ) และค่าเอนทัลปี (enthalpy values) 3 ซ้ำ

### 3.2.7 ผลของอุณหภูมิการให้ความร้อนต่อการเกิดจุดเลือดแดง

เตรียมตัวอย่างเนื้ออกไก่ขนาด ตามวิธีที่อธิบายในข้อ 2.2.1 โดยเติมส่วนผสมคือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% ผงกลูโคส 3% และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเข้มข้น 2% ส่วนตัวอย่างเนื้ออกไก่ที่ไม่ได้ขนาดใช้เป็นตัวอย่างควบคุม จากนั้นบรรจุตัวอย่างในถุงสุญญากาศ (1 ชั้น/ถุง) และให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิจนกระทั่งอุณหภูมิแกนกลาง (core temperature) เท่ากับ 50, 70, 80, และ 85 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นระยะเวลา 1 นาที จนกระทั่งอุณหภูมิแกนกลางถึง 85 องศาเซลเซียส จึงคงไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที ตรวจสอบติดตามอุณหภูมิแกนกลางโดยใช้เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple type K) (54 II, 80PT-5A, Fluke Corp., Moorpark, CA, USA) วัดตัวอย่างจำนวน 20 ชิ้นต่อการศึกษาแต่ละอุณหภูมิแกนกลาง เตรียมตัวอย่างจำนวน 3 ซ้ำสำหรับวิเคราะห์ นำตัวอย่างที่ผ่านความร้อนแล้วทั้งหมดมาตัดตามขวางเพื่อตรวจสอบจุดเลือดแดงโดยใช้สายตา นอกจากนี้ ตรวจสอบวัดการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ที่แต่ละอุณหภูมิแกนกลาง โดยคำนวณดังนี้

$$\text{การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนทำให้สุก} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังทำให้สุก}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนทำให้สุก}} \times 100$$

### 3.2.8 การส่องภาพจากกล้องจุลทรรศน์ (Microscopy)

การเปลี่ยนแปลงของเลือดที่เหลื่อค้างในเส้นเลือดของเนื้ออกไก่ขนาดสุก ตรวจสอบโดยใช้เทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์ โดยนำเนื้ออกไก่สุกมาตัดตามขวางบริเวณที่หนาที่สุดของชิ้นเนื้อให้ได้ความหนาประมาณ 1.5 ถึง 2.5 เซนติเมตร ตรวจสอบจุดเลือดแดงในตัวอย่างที่ตัดแล้วทุกชิ้นด้วยสายตา

จากนั้นนำจุดเลือดแดงที่พบมาตัดตามยาวให้มีขนาดประมาณ  $1.5 \times 1.5 \text{ cm}^2$  วางตัวอย่างบน specimen chucks ขนาด 3.5 เซนติเมตร แล้วฝังชิ้นเนื้อใน OCT® (Bio-optica, Milano, Italy) จากนั้นตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อให้มีความหนา 8 ไมครอน ด้วยเครื่อง cryostat microtome (AST500, AMOS Scientific, Clayton South Victoria, Australia) แล้วนำตัวอย่างไปวางบนแผ่นสไลด์ (glass slide) ย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ตามวิธีมาตรฐาน (Cardiff, Miller, & Munn, 2014) ตรวจสอบเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (a light microscope) ด้วยกำลังขยายเลนส์วัตถุ (objective lens) 40 เท่า (SMZ-U, Nikon Corp., Tokyo, Japan)

### 3.2.9 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเนื้ออกไก่ 3 กลุ่มซึ่งเป็นอิสระต่อกัน รายงานค่าเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของผลส่วนผสมที่ใช้ขนาดต่อความสามารถในการแพร่ผ่านและการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินโดยใช้ SPSS 23.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's multiple range test) ที่  $p < 0.05$

## 3.3 การลดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่นวดสุกโดยการให้ความร้อนด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำ

### 3.3.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้ออกไก่นวด

ใช้เนื้อส่วนอก (*Pectoralis major*) ของเนื้อทางการค้า ที่เลาะกระดูกและหนัง ปริมาณ 10 กิโลกรัม ซึ่งได้รับจากโรงงานแปรรูปเนื้อไก่ (บริษัท เจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน), นครราชสีมา, ประเทศไทย) มีขนาดระหว่าง 250-280 กรัมต่อชิ้น และมีความหนาไม่เกิน 4-5 เซนติเมตร โดยเก็บตัวอย่างทันทีหลังจากการเชือด แล้วแช่ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเนื้ออกไก่ไปนวดภายใต้สุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำกว่า 8 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 65 นาที ในเครื่องนวดเนื้อสุญญากาศ (vacuum tumbler) (DVTS-50, Davison's Butcher Supply, Los Angeles, CA, USA) ส่วนผสมที่ใช้ขนาดประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 5% (บริษัท เกลือพิมาย จำกัด, นครราชสีมา, ประเทศไทย) กลูโคสเข้มข้น 3% (บริษัท กรไทย จำกัด, ราชบุรี, ประเทศไทย) และโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (sodium tripolyphosphate, STPP)

เข้มข้น 2% (บริษัท อติตยา เบอร์ล่า เคมีคัลส์ (ประเทศไทย) จำกัด, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) โดยเติมให้ได้ความเข้มข้น 16.5% (w/w) ของตัวอย่างเนื้ออกไก่ ทำการนวดตัวอย่างเนื้ออกไก่ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างไก่ที่นวดแล้วในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งตัวอย่างเป็น 3 กลุ่ม เพื่อให้ความร้อนตามวิธีการที่อธิบายในข้อ 3.3.2

### 3.3.2 การให้ความร้อน (cooking)

การให้ความร้อนตัวอย่างใช้เตาไมโครเวฟในระดับอุตสาหกรรม (NE 1756, 18L, Panasonic Corp., Osaka, Japan) ที่ความถี่ 2,450 MHz และ power output of 1.7 กิโลวัตต์ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า การให้ความร้อนก่อน (pre-heating) เป็นเวลานานด้วยไมโครเวฟทำให้อุณหภูมิภายในตัวอย่างเนื้อไก่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการไหม้ และ/หรือ การระเบิดของเนื้อเยื่อ ดังนั้น การให้ความร้อนก่อนจึงใช้ที่เวลา 6 และ 7 นาที ซึ่งทำให้ได้ค่าอุณหภูมิภายในตัวอย่างประมาณ 50-70 องศาเซลเซียส โดยไม่เกิดข้อบกพร่องทางคุณภาพ ให้ความร้อนโดยบรรจุตัวอย่างเนื้ออกไก่อุ่น 3 ชิ้น ( $300 \pm 20$  กรัม/ชิ้น) ในกล่องโฟม (polypropylene box) แล้วนำไปวางบริเวณกลางตู้ไมโครเวฟ (microwave chamber) และให้ความร้อนเป็นระยะเวลา 6 และ 7 นาที เพื่อให้ได้การให้ความร้อนอย่างสม่ำเสมอ จะหยุดการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นระยะทุก 2, 4, 5, และ 6 นาที สำหรับการให้ความร้อนที่เวลา 6 นาที และ 2, 4, 5, 6, และ 7 นาที สำหรับการให้ความร้อนที่เวลา 7 นาที ตรวจวัดอุณหภูมิแกนกลางทันทีในแต่ละช่วงเวลาที่หยุดให้ความร้อน โดยใช้เทอร์โมคัปเปิล (thermocouple type K) (54 II, 80PT-5A, Fluke Corp., Moorpark, CA, USA) จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟจำนวน 2 ชิ้น วางในเตาอบไอน้ำ (steam oven) (Model 101, Rational, Landsberg am Lech, Bavaria, Germany) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 92 องศาเซลเซียส ที่ไอน้ำกลั่นตัว (dew point) 100% และความเร็วของพัดลมระดับ 3 ตรวจวัดตามอุณหภูมิภายในตัวอย่างระหว่างการให้ความร้อนด้วยไอน้ำอย่างต่อเนื่องโดยใช้เทอร์โมคัปเปิลที่ติดตั้งในเตาหนึ่ง และให้ความร้อนด้วยไอน้ำจนกระทั่งอุณหภูมิแกนกลางเท่ากับ 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส

### 3.3.3 พูเรียรัทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR Spectroscopy)

เตรียมตัวอย่างทั้งดิบและสุกสำหรับวัด IR โดยตัดตัวอย่างตามขวางและฝึกลงใน OCT® (Bio-optica, Milano, Italy) แข็งขันที่ด้วยไนโตรเจนเหลว และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปตัด การตัดตัวอย่างนั้นทำที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยตัดตัวอย่างหนา 8 ไมโครเมตรด้วย

เครื่องcryostat microtome (AST500, AMOS Scientific, Clayton South Victoria, Australia) แล้วนำตัวอย่างที่ตัดได้วางบนแผ่นสไลด์ (Barium fluoride (BaF<sub>2</sub>)) ที่ใส (infrared transparent) และหนา 2 มิลลิเมตร ทำให้ตัวอย่างแห้งข้ามคืนในโถแก้วสุญญากาศ (vacuum chamber) ตรวจวัดอินฟราเรดสเปกตรัมด้วยเครื่อง Vortex 70 FTIR spectrometer (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) เชื่อมต่อกับกล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 36 เท่า (Hyperion 2000, Bruker, Ettlingen, Germany) และเครื่องตรวจจับ (MCT D315 detector) ซึ่งทำให้เย็นด้วยไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) งานวิจัยนี้ทำการตรวจวัด SR-FTIR ที่ beamline BL4.1 ที่สถาบันวิจัยแสงซินโครตรอน (the Synchrotron Light Research Institute (SLRI)) (นครราชสีมา, ประเทศไทย) ซึ่งใช้แหล่งกำเนิดแสงเป็นแสงซินโครตรอนเข้าอินเทอร์เฟอโรมิเตอร์ (interferometer) ผ่านทางเครื่องมือ (instrument port) ที่ออกแบบสำหรับปล่อยคลื่นแสงช่วงอินฟราเรดสำหรับวิเคราะห์ ทำการตรวจวัดโดยใช้ mapping mode ที่ช่วงเลขคลื่นระหว่าง 4000–600 cm<sup>-1</sup> ที่การแยก (resolution) 6 cm<sup>-1</sup> และ 64 สแกน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิได้จากการทำ curve fitting ที่ช่วงสเปกตรัมของ amide I ที่เลขคลื่น 1700-1600 cm<sup>-1</sup> โดยใช้โปรแกรม OPUS software (version 7.0, Bruker optics Inc, Billerica, MA, USA).

### 3.3.4 คุณภาพของเนื้อออกไ้สุก

คุณภาพของเนื้อออกไ้สุกที่ตรวจวัด คือ ตรวจวัดการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ปริมาณความชื้น ค่า pH ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity, WHC) และค่าเนื้อสัมผัสและสี ซึ่งวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมงหลังทำสุก

ตรวจวัดการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) อ้างอิงจากน้ำหนักของตัวอย่างหลังจากนวด คำนวณดังนี้

$$\text{การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังนวด} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังทำให้สุก}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังนวด}} \times 100$$

การตรวจวัดค่า pH โดยนำตัวอย่างเนื้อออกไ้มาบดให้เป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำปราศจากไอออนที่อัตราส่วน 1:5 (w/v) เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้เครื่องปั่นผสม (homogenizer) (T25 digital Ultra-Turrax, IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA) ตรวจวัดค่า pH ในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง a glass electrode pH meter (Mettler Toledo™ S220 SevenCompact, Schwerzenbach, Switzerland) ซึ่งมีการปรับเทียบกับบัฟเฟอร์มาตรฐานที่ pH 4.00 และ pH 7.00 ก่อนนำมาวัด

ตรวจวัดปริมาณความชื้นของตัวอย่างหลังทำสุกตามวิธีของ the Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2010)

ตรวจวัดค่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (WHC) ของเนื้ออกไก่ทอดสุก โดยการปั่นเหวี่ยง ซึ่งดัดแปลงเล็กน้อยจากวิธีของ Laycock, Piyasena, และ Mittal (2003) โดยนำตัวอย่างเนือบด (2 กรัม) วางบนกระดาษกรอง (Whatman no.1) แล้วปั่นเหวี่ยง (Sorvall Legend MACH 1.6R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 6,000 x g เวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่ได้หลังการปั่นเหวี่ยง และคำนวณค่า WHC อ้างอิงจากปริมาณความชื้นเริ่มต้นของตัวอย่างเนื้อไก่ ตามสูตรดังนี้

$$\text{การสูญเสีย น้ำ (water loss, \%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนปั่นเหวี่ยง} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังปั่นเหวี่ยง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนปั่นเหวี่ยง}} \times 100$$

$$\text{ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (WHC, \%)} = \frac{\text{ปริมาณความชื้น (\%)} - \text{การสูญเสีย น้ำ (\%)}}{\text{ปริมาณความชื้น (\%)}} \times 100$$

ตรวจวัดค่าแรงเฉือนของเนื้อ (Warner-Bratzler shear force) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) (TA.XT. Plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK) วัดตัวอย่างโดยใช้ load cell ขนาด 25 กิโลกรัม ที่ความเร็วการเคลื่อนที่ของคานกัด (crosshead speed) 10 มิลลิเมตร/วินาที ทำการตัดตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนแล้วให้มีขนาด 1.9 x 2.5 x 2.0 เซนติเมตร (กว้าง x ยาว x หนา) สำหรับวัดค่าแรงเฉือน 5 ซ้ำต่อสภาวะการให้ความร้อน

ประเมินค่าสีของเนื้ออกไก่สุกตัดตามขวางโดยใช้เครื่อง Hunter lab/Color Quest XE (Hunter Associates Laboratory Inc., Reston, VA., USA) บันทึกค่าความสว่าง (lightness, L\*) ค่าสีแดง (redness, a\*) ค่าสีเหลือง (yellowness, b\*) วัดค่าสีจากตัวอย่างเนื้ออกไก่ 5 ชิ้น (strips) สำหรับแต่ละสภาวะการให้ความร้อน

### 3.3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลจากตัวอย่างเนื้ออกไก่ทอด 3 กลุ่มซึ่งเป็นอิสระต่อกัน การตรวจวัดค่าทั้งหมดในการทดลองนอกจากที่ระบุไว้ ได้จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อกลุ่มตัวอย่าง วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูลโดยใช้ SPSS (Version 23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)



เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธีของดันแคน (Duncan's multiple range test) ที่  $p < 0.05$  และรายงานค่าเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

### 3.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี

#### 3.4.1 สารเคมี

คอลลาเจนชนิดที่ I (เอ็นร้อยหวายวัว) เอนไซม์เพปซิน (EC no. 3.4.23.1) ไฮดรอกซีโพรลีน คลอรามิน-ที ไฮเดรทพอลินซิโอแคลตุ ฟีนอล ชื่อจากบริษัท Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) นินไฮดริน ชื่อจากบริษัท Biohrom (Cambridge, UK) โพรตีนมาร์คเกอร์และสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส ชื่อจากบริษัท Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, USA) และสารเคมีอื่น ๆ ชื่อมาจาก Carlo Erba (Valde Reuil, France)

#### 3.4.2 การเก็บและเตรียมวัตถุดิบ

หลอดลมไก่ได้รับมาจากบริษัท ตะนาวศรีกรีนฟู้ด จังหวัดนครปฐม ตัวอย่างถูกบรรจุเก็บไว้ในถุงบรรจุแบบสุญญากาศ หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปล้างทำความสะอาดและแช่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ  $-20$  องศาเซลเซียส

#### 3.4.3 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น เถ้า และ โปรตีน

นำตัวอย่างหลอดลมไก่มาหั่นและปั่นให้ละเอียด นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้า และปริมาณโปรตีน โดยดำเนินการตามวิธีการของ AOAC (2016) 925.10, 923.03 และ 990.03 ((AOAC), 2016) ค่าแฟคเตอร์ที่นำมาใช้ในการคำนวณปริมาณโปรตีนเท่ากับ 6.25

#### 3.4.4 วิเคราะห์ปริมาณไขมัน

การวิเคราะห์ดัดแปลงตามวิธีของ Folch (Folch et al., 1957) ซึ่งตัวอย่าง 6 กรัม ทำการสกัดขั้นต้นโดยใช้คลอโรฟอร์มต่อเมทานอล อัตราส่วน 2:1 ด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูง (Nissei AM-8, Nihonseiki Kaisha Ltd., Tokyo, Japan) ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยง (Sorvall ST16R, Thermo Fisher Scientific Inc., Langensfeld, Germany) ที่ความเร็ว 10,000  $\times$  g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนของเหลวเหนือตะกอนและกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นทำการสกัดซ้ำโดยใช้ตัวทำละลายคลอโรฟอร์ม 12 มิลลิลิตร น้ำปราศจากไอออน (Distilled water: DI water) 12 มิลลิลิตรและสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น

0.58% 2 มิลลิลิตร ทำการสกัดด้วยการเขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้นสารละลายชั้นล่างถูกแยกออกและทำการขจัดตัวทำละลายน้ำโดยใช้โซเดียมซัลเฟต ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) ปริมาณ 2 กรัม กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 และขจัดตัวทำละลายคลอโรฟอร์มด้วยการใช้ความร้อนระเหยออกผ่านกระบะทรายที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที แล้วนำไปอบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ นำค่าที่ได้มาคำนวณหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันทั้งหมด

### 3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนและคอลลาเจน

การวิเคราะห์ที่ดัดแปลงตามวิธีของ da Silva (da Silva et al., 2015) ซึ่งตัวอย่างหลอดลมไก่ 10 มิลลิกรัม แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 7 โมลาร์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทำการไฮโดรไลซ์ตัวอย่างด้วยหม้อน้ำเชื่อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เติมสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 3.5 โมลาร์ และทำการกรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นบีบตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลอง แล้วเติมคลอรามินที (Chloramine-T) ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 นาที ในที่มืด แล้วเติมเอนริชแอลดีไฮด์รีเอเจนต์ (Ehrlich's aldehyde reagent) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 550 นาโนเมตร โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) นำค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่วัดได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน แล้วคำนวณหาปริมาณคอลลาเจนโดยใช้ค่าแฟคเตอร์ 8.0 (Venn & Maroudas, 1977)

### 3.4.6 การสกัดคอลลาเจนแบบดั้งเดิม

เพื่อทำการขจัดส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกจาก โดยการกวนตัวอย่างในสารละลายโซเดียม ไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายเท่ากับ 1:10 (w/v) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาดำหนด ทำการล้างตัวอย่างด้วยน้ำปราศจากไอออน จนตัวอย่างมีค่า pH เป็นกลาง (pH = 7.00)

นำตัวอย่างจากการปรับสภาพมากวนในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายเท่ากับ 1:15 (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกสารละลายกรดอะซิติกออกจากตัวอย่างด้วยการปั่นเหวี่ยง (CR22G-III, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) ที่ความเร็ว 15,000 x g เป็นเวลา 20 นาที แยกเอาส่วนน้ำและเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.0 โมลาร์ โดย

สารละลายเกลือสุดท้ายเท่ากับ 2.6 โมลาร์ จากนั้นทำการเก็บเกี่ยวตะกอนคอลลาเจนด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 17,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ละลายส่วนตะกอนคอลลาเจนและทำการแยกเกลือโซเดียมคลอไรด์และกรดอะซิติกออกด้วยวิธีการแพร่ผ่านเยื่อเมมเบรน (dialysis) ที่ขนาดของช่องเลือกผ่าน (MWCO) (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA) เท่ากับ 3.5 kDa การแพร่ผ่านทำในสภาวะน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำแห้งคอลลาเจนที่สกัดได้ด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (GT2-S, GEA Lyophil GmbH, Hürth, Germany)

นำตัวอย่างมาสกัดด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่มีเอนไซม์เพปซินระดับความสามารถของการละลายตัวอย่าง 50 ยูนิตต่อกรัม ใช้อัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายเท่ากับ 1:15 (w/v) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บตัวอย่างสารละลายคอลลาเจนและทำการให้ตกตะกอนปริมาณผลผลิตของคอลลาเจนคำนวณตามสูตรดังนี้

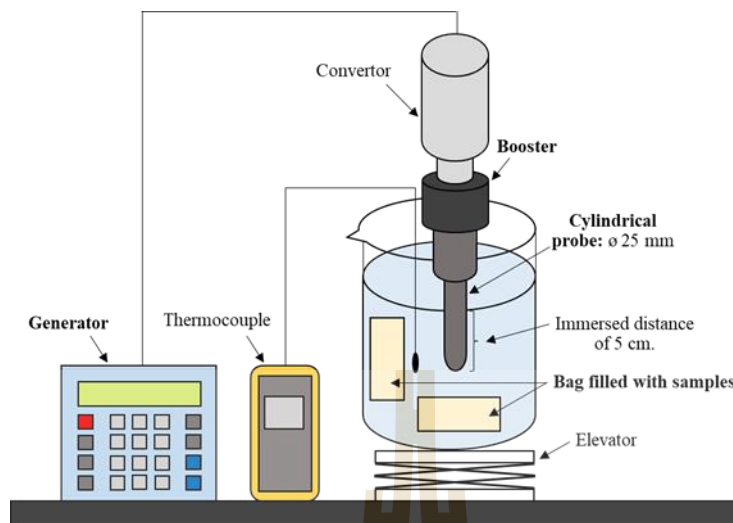
$$\% \text{ปริมาณผลผลิต} = \left[ \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังทำแห้ง}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \right] \times 100$$

$$\% \text{คอลลาเจนที่เก็บเกี่ยวได้} = \left[ \frac{\text{ปริมาณคอลลาเจนหลังทำแห้ง}}{\text{ปริมาณคอลลาเจนตัวอย่าง}} \right] \times 100$$

### 3.4.7 การสกัดคอลลาเจนด้วยกระบวนการใช้คลื่นความถี่สูง

นำตัวอย่างที่ผ่านการปรับสภาพ 35 กรัมผสมกับน้ำปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร แล้วบรรจุในถุงโพลีเอทิลีน นำตัวอย่างมาไว้ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำ 300 มิลลิลิตร และ น้ำแข็ง 200 กรัม ตามรูปที่ 3.3 จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมข้างต้นมาผ่านการให้คลื่นความถี่สูง (Q500, Qsonica LLC., Newtown, CT, USA) ทำการควบคุม pulse mode ในรูปแบบให้คลื่นเสียง (acting) 5 วินาที และพัก (resting) 5 วินาที

ทำการให้คลื่นความถี่เสียง 10.93, 17.87 และ 31.27 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที โดยตัวอย่างจะถูกกลับทุก 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนด เติมสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์และสกัดตัวอย่างด้วยกรดและเอนไซม์เพปซินเป็นเวลา 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง สภาวะที่เหมาะสมจะถูกประเมินจากผลผลิตและปริมาณคอลลาเจน โดยการวัดค่าพลังงานของอัลตราซาวด์ (Ultrasound power) มีหน่วยเป็นวัตต์ คำนวณได้จากสูตร Margulis และ Margulis 2003 (Margulis & Margulis, 2003)



รูปที่ 3.3 แผนภาพแสดงการวางอุปกรณ์อัลตราซาวด์

#### 3.4.8 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

โครงสร้างระดับจุลภาคของคอลลาเจนที่ผ่านกระบวนการก่อนสกัดด้วยต่างและตัวอย่างที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดส่องกราด (JSM-6010LV, Japan Electron Optics Laboratory Technics Co. Ltd., Tokyo, Japan) ตัวอย่างจะถูกติดไว้บนแผ่นสไลด์ด้วยเทปคาร์บอนและเคลือบด้วยทองคำโดยเครื่องเคลือบตัวอย่าง (JFC-1100E, Japan Electron Optics Laboratory Technics Co. Ltd., Tokyo, Japan) ส่องดูลักษณะโครงสร้างของคอลลาเจนด้วยความต่างศักย์เร่ง 15 kV ที่กำลังขยาย 500 เท่า

#### 3.4.9 การวิเคราะห์หองค์ประกอบกรดอะมิโน

ละลายตัวอย่างคอลลาเจน 0.1 กรัม ด้วยไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาปรับสภาพให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 3.5 โมลาร์และกรองกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเครื่องวิเคราะห์กรดอะมิโน (Biochrom 30 plus, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) ใช้คอลัมน์ชนิด cation exchange (u-3183 High resolution, 200 mm of bed length and 4.6 mm of diameter, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย ลิเทียมซิเตรทบัฟเฟอร์ (pH 2.80-3.55) และ ลิเทียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ (pH 14.0) การวิเคราะห์ใช้ Ninhydrin เป็น post-column derivatization ด้วยอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แสดงปริมาณกรดอะมิโนในหน่วยจำนวนกรดอะมิโนต่อ 1,000 กรดอะมิโน

### 3.4.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคไมโครดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริ มิเตอร์ ( $\mu$ DSC)

การสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยความร้อนวิเคราะห์ตามวิธีการของ Carsote และ Badea (Carsote & Badea, 2019) ทำการชั่งตัวอย่าง 5 มิลลิกรัมใส่ถาดตัวอย่าง เติมน้ำหรือกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ จากนั้นตั้งตัวอย่างไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวิเคราะห์การสูญเสียสภาพโดยใช้เครื่องดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ ( $\mu$ DSC) (7 evo micro calorimetry, Setaram Instrumentation, Caluire-et-Cuire, France) ให้ความร้อนตัวอย่างที่อุณหภูมิ 20-70 องศาเซลเซียส ควบคุมอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที

### 3.4.11 การวิเคราะห์ลักษณะสเปกตรัม

#### 3.4.11.1 วิเคราะห์การดูดกลืนแสงยูวี

นำตัวอย่างคอลลาเจน 5 มิลลิกรัม ละลายในกรดอะซิติกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เขย่าตัวอย่างความเร็วรอบ 150 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000  $\times$  g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนที่เป็นของเหลวเหนือตะกอนและนำไปละลาย 0.5 มิลลิกรัม โปรตีนต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการ Biuret method (Gornall et al., 1949) จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดค่าดูดแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Libra S22, Biochrom Ltd., Cambridge, UK) ที่ความยาวคลื่น 200 และ 400 นาโนเมตร ความเร็วในการวัดอยู่ที่ 4 นาโนเมตรต่อวินาที

#### 3.4.11.2 วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเซอร์คูลาร์ไดโครอิสซึมสเปกโทรสโกปี

ตัวอย่างคอลลาเจนถูกเตรียมเหมือนการวัดการดูดกลืนแสงยูวี โดยนำตัวอย่างไปละลายให้ได้ 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและวัดโดยใช้เครื่อง NanoDrop UV-vis spectrophotometer (OneC, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) ที่ความยาวคลื่น 205 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Anthis และ Clore จากนั้นนำตัวอย่างไปวัดด้วยเครื่อง CD spectrophotometer (Jasco J-815, Jasco International Co., Ltd., Tokyo, Japan) บันทึกสเปกตรัมที่ความยาวคลื่นระหว่าง 260 และ 190 นาโนเมตร ความเร็วในการวัดอยู่ที่ 50 นาโนเมตรต่อนาที

#### 3.4.11.3 ฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

นำตัวอย่างคอลลาเจนไปวางบนผลึกคริสตัล (Pike Technology Inc., Madison, WI, USA) ตรวจวัดอินฟราเรดสเปกตรัมด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer (Tensor 27, Bruker Co., Ettlingen, Germany) ใช้เทคนิควิเคราะห์แบบ Attenuated Total Reflectance (ATR) การบันทึกเส้นสเปกตรัม

ในช่วง 4,000 ถึง 900  $\text{cm}^{-1}$  ที่การแยก (resolution) 4  $\text{cm}^{-1}$  และ 64 สแกน การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิได้จากการทำ curve fitting ที่ช่วงสเปกตรัมของ amide I ที่เลขคลื่น 1700-1600  $\text{cm}^{-1}$  ช่วงสเปกตรัมของ  $\beta$ -sheet random coil  $\alpha$ -helix และ  $\beta$ -turn ที่เลขคลื่น 1,626-1639 1,640-1,649 1,650-1,663 และ 1,675-1,696  $\text{cm}^{-1}$  ช่วงสเปกตรัมที่เลขคลื่น 1,415-1,485  $\text{cm}^{-1}$  และช่วงสเปกตรัมของ amide III ที่เลขคลื่น 1,200-1,300  $\text{cm}^{-1}$  โดยใช้โปรแกรม OPUS software (version 7.2, Bruker optics Inc, Billerica, MA, USA)

#### 3.4.12 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีน

ละลายตัวอย่างคอลลาเจนด้วยสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 10% แยกส่วนตะกอนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นผสมตัวอย่างที่ละลายแล้วเข้ากับบัฟเฟอร์ สารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ที่ pH 6.8 ในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้น 4% สารละลายกลีเซอรอล (Glycerol) เข้มข้น 20% สารละลายโบรโมฟีนอลบลู (bromophenol blue) เข้มข้น 0.02% และสารเบต้าเมอแคปโทเอทานอล ( $\beta$ -mercaptoethanol) 10% ทำการแยกโปรตีนผ่านเจลกากและเจลแยก เข้มข้น 4.0% และ 7.5% โดยความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้ในการแยกโปรตีนคือ 20 ไมโครกรัม ทำการหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry et al. (1951) ทำการแยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 80 โวลต์ เป็นเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง ทำการย้อมแถบโปรตีนด้วยสีย้อม โคแมสซีบลู อาร์-250 (Coomassie Blue R-250) ในเมทานอลเข้มข้น 10% (v/v) และกรดอะซิติกเข้มข้น 25% (v/v) เป็นเวลา 30 นาที บันทึกภาพเจลโดยใช้ gel document system system (Fire reader V4, Uvitec Ltd., Cambridge, UK) และวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ UV1-ID software, version 16.0 (Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

#### 3.4.13 การระบุชนิดโปรตีน

ชนิดคอลลาเจนการระบุตามวิธีการของ Sharma (Sharma et al., 2014) ทำการแยกเอา protein band ที่ได้จากการแยกด้วย SDS-PAGE มาล้างเจลออกด้วยแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ต่ออะซีโตนไตรลีนอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำเจลไปใส่สารละลายไดไรโอธรีทอล เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ในสารละลายแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที และนำไปใส่สารละลายไอโอโดอะเซเตมิต เข้มข้น 55 มิลลิโมลาร์ในแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในห้องมืดเป็นเวลา 30 นาที และล้างเจลด้วย

แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ต่ออะซีโตนไตรลในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 10 นาที ทำการย่อยเจลด้วยแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีทริปซิน 20 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการสกัดเพปไทด์ด้วย สารละลายฟอริก 1% ในต่ออะซีโตนไตรล เข้มข้น 50% และสารละลายกรดฟอริก 1% ใน ต่ออะซีโตนไตรล เข้มข้น 85% ทำแห้งตัวอย่างด้วยเครื่อง refrigerated centrifugal vacuum concentrator (CentriVap, Labconco Corp., Kansas City, MO, USA) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาใส่สารละลายกรดฟอริก 1% ใน ในอะซีโตนไตรล เข้มข้น 2% ทำแยกตะกอนออกด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ตัวอย่างที่ย่อยแล้วด้วยเครื่อง nano-liquid chromatography system (EASY-nLC II, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany) และ ion trap mass spectrometer (Amazon Speed ETD, Bruker) ตัวอย่าง 3 ไมโครลิตร ฉีดลงใน EASY-Column (10 cm, ID 75  $\mu$ m, 3  $\mu$ m, C18-A2, Thermo Fisher Scientific, Madison, WI, USA) โดยเฟสเคลื่อนที่ประกอบด้วย A สารละลายกรดฟอริก 0.1% และ B สารละลายกรดฟอริก 0.1% ใน ในอะซีโตนไตรล ด้วยอัตราการไหล 500 นาโนลิตรต่อนาที ตั้งโปรแกรมการชะตัวอย่างดังนี้ linear gradient 5-35% B 50 นาที และ 80% B 10 นาที วิเคราะห์สเปกตรัม LC-MS/MS spectra ด้วย Compass Data Analysis version 4.0 ระบุชนิดคอลลาเจนโดยใช้ข้อมูลของ NCBI's protein database on Metozoa (animals) (<http://www.matrixscience.com>)

#### 3.4.14 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์จำนวนซ้ำของการทดลอง 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยองค์ประกอบเคมีของวัตถุดิบและตัวอย่างก่อนกระบวนการสกัดเปรียบเทียบโดยใช้วิธี *student's t-test* ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ข้อมูลการวิเคราะห์อื่นๆจะถูกนำมาวิเคราะห์วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS package (SPSS เวอร์ชัน 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

### 3.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนแอกโตไมโอซินจากปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

#### 3.5.1 วัสดุและสารเคมี

ปลานิลสด (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนัก 1-1.5 กิโลกรัมต่อตัวจากตลาดในจังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย ล้างทำความสะอาดปลาและแล่เอาเฉพาะส่วนของเนื้อปลาเก็บไว้ในถุงบรรจุแบบสุญญากาศสำหรับสกัดโปรตีนแอกโตไมโอซิน

สารเคมีที่ใช้สำหรับการวิจัยจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) ได้แก่ phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP) และ 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) สารเคมีจากบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland) ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) และ 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากบริษัท Bio-Rad (Hercules, CA, USA) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (analytical grade)

#### 3.5.2 การสกัดโปรตีนแอกโตไมโอซิน

การสกัดโปรตีนแอกโตไมโอซินดำเนินการโดยตัดแปลงตามวิธีการของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 2003) นำเนื้อปลาสด 100 กรัมมาปั่นผสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ PMSF เข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่อง Homogenizer (T25 digital ULTRA-TURRAX, IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA) จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนที่ตกตะกอนและนำมาปั่นผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์เดิมจากนั้นปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง นำตะกอนที่ได้ปั่นผสมด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้นสูง (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์, pH 7.0) ปริมาตร 1 ลิตร จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตัวอย่างเฉพาะส่วนใส นำส่วนใสที่ได้มาเติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรเดิมเพื่อตกตะกอนโปรตีนแอกโตไมโอซินโดยใช้การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซล



เฉลี่ย 10 นาที นำตะกอนมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,500 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อไล่น้ำออกจากตัวอย่างโปรตีน เก็บเฉพาะส่วนของตะกอนเพื่อนำมาวิเคราะห์ต่อไป

### 3.5.3 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์รักษาความเข้มข้นสูง

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์รักษาความเข้มข้นสูงดำเนินการโดยใช้เครื่อง ultrasonic (Q500 sonicator, Qsonica L.L.C, Newtown, CT, USA) ด้วยไททาเนียมโพรบ (titanium probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 12 มิลลิเมตร ความถี่ 20 KHz ระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน ตัวอย่างจะถูกแช่ในอ่างน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิของให้อยู่ที่ 4 – 8 องศาเซลเซียส ขั้นตอนการใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับตัวอย่างโปรตีนแอกโตไมโอซินดำเนินการโดย นำโปรตีนแอกโตไมโอซินที่สกัดได้จำนวน 5 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0.1, 0.2, 0.3, 0.6 และ 1.2 โมลาร์) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตัวอย่างถูกนำไปให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่แอมพลิจูด 40, 70, และ 100% โดยใช้วิธีการให้คลื่น 2 วินาทีและพัก 5 วินาที (pulse mode) จนกระทั่งเวลาการให้คลื่นครบ 3 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในส่วนใส (extractable protein) ด้วยวิธี Bradford โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน (Bradford, 1976)

จากการทดลองข้างต้น การใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับตัวอย่างโปรตีนที่แอมพลิจูด 40 และ 70% ในสถานะที่มีเกลือเข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ ถูกเลือกใช้เป็นสถานะสำหรับการทดสอบผลของระยะเวลาในการให้คลื่น โดยนำโปรตีนแอกโตไมโอซินจำนวน 5 กรัม ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ตัวอย่างจะได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่แอมพลิจูด 40 และ 70% เป็นเวลา 3, 6, และ 9 นาทีแบบ pulse mode จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที เก็บส่วนใสและนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน, Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล และ surface hydrophobicity วิเคราะห์ขนาดของอนุภาค, zeta potential, และความขุ่น รวมถึงการทดสอบโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE และ light microscopy สำหรับตัวอย่างที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่แอมพลิจูด 40 และ 70% เป็นเวลา 6 นาที ตัวอย่างที่ไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์จะถูกใช้เป็นตัวควบคุม การคำนวณความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์ดำเนินการด้วยวิธี calorimetry โดยใช้ thermocouple โดยวัดออกมาในหน่วยของวัตต์ต่อหน่วยพื้นที่ (วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; W/cm<sup>2</sup>) ตามวิธีของ Jambrak และคณะ (Jambrak et al., 2009) สำหรับการวิจัยนี้ คลื่นอัลตราซาวด์ที่แอมพลิจูด 40, 70, และ 100% เทียบเท่าได้กับค่าความเข้ม 7.04, 13.37, และ 20.62 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

### 3.5.4 การทดสอบกิจกรรมของ $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase

การทดสอบกิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของโปรตีนแอคโตไมโอซินดำเนินการโดยการดัดแปลงจากวิธีของ Benjakul และคณะ (Benjakul et al., 1997) ตัวอย่างที่เตรียมด้วยสภาวะที่มีเกลือเข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Tris-maleate (pH 7.0) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร, สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ( $\text{CaCl}_2$ ) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งหมดบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม ATP เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรทันที และบ่มตัวอย่างต่อเป็นเวลา 8 นาที หลังจากครบ 8 นาทีแล้วเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) เข้มข้น 15% (w/v) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาส่วนผสมทั้งหมดถูกนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว  $3,500 \times g$  เป็นเวลา 5 นาที ปริมาณอินทรีย์ฟอสเฟส (inorganic phosphate; Pi) อิสระในส่วนใส่ถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค UV/Vis spectrophotometer (GENESYS 10S, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) โดยใช้  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  เป็นสารมาตรฐาน ค่าการดูดกลืนแสงวัดที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ถูกแสดงในหน่วย  $\mu\text{mol of Pi/mg protein/min}$

### 3.5.5 วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl group) และหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา (reactive sulfhydryl group)

ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดและหมู่อิสระดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 2003) การวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดดำเนินการโดยใช้ตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 หรือ 0.6 โมลาร์, sodium phosphate buffer เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) ที่มียูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ เติม Ellman's reagent (สารละลาย DTNB เข้มข้น 0.1% ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา ตัวอย่างจะถูกบ่มในบัฟเฟอร์ที่ปราศจากยูเรียที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร

ปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลคำนวณโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (molar extinction coefficient) ที่  $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  และแสดงในหน่วย  $\text{mol}/10^5 \text{ g protein}$  (Ellman, 1959)

### 3.5.6 การวิเคราะห์ปริมาณ surface hydrophobicity

ปริมาณ surface hydrophobicity ดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 2003) โดยเจือจางโปรตีนแอคโตไมโอซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 หรือ 0.6 โมลลาร์อย่างใดอย่างหนึ่ง, pH 7.0) เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, และ 0.3 มิลลกรัม/มิลลิลิตร) นำสารละลายโปรตีนปริมาตร 2 มิลลิลิตรมาเติม ANS เข้มข้น 8 มิลลิโมลลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร และบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องในที่มืดนาน 10 นาที จากนั้นวัดค่า fluorescent intensity ของตัวอย่างโดยใช้เครื่อง spectrofluorometer (FP-8300, JASCO, Easton, MD, USA) ที่ความยาวคลื่น excitation 375 นาโนเมตร และ emission 485 นาโนเมตร คำนวณ surface hydrophobicity (S0-ANS) ของตัวอย่างจากค่าความชัน (slope) ของกราฟที่พล็อตระหว่าง relative fluorescence (R) และ สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีน (Monahan et al., 1995) ดังสมการ

$$R = \frac{F - F_0}{F_0}$$

โดยที่ F คือ ค่า fluorescent intensity ของตัวอย่างที่มี ANS และ F<sub>0</sub> คือค่า fluorescent intensity ของ ANS ที่ไม่ได้เติมตัวอย่าง

### 3.5.7 วิเคราะห์ขนาดอนุภาค (particle size) และ zeta potential

เจือจางโปรตีนแอคโตไมโอซินให้ได้ความเข้มข้น 0.2 มิลลกรัม/มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลลาร์ที่มีสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 หรือ 0.6 โมลลาร์อย่างใดอย่างหนึ่ง, pH 7.0) วิเคราะห์ขนาดอนุภาคและ zeta potential ของแอคโตไมโอซินโดยใช้เครื่อง Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)

### 3.5.8 วิเคราะห์ความขุ่น (turbidity)

การวิเคราะห์ความขุ่นดำเนินการโดยดัดแปลงจากวิธีของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 1999) เจือจางโปรตีนแอคโตไมโอซินให้ได้ความเข้มข้น 0.2 มิลลกรัม/

มิลลิลิตร ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีสารละลายเกลือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 หรือ 0.6 โมลาร์อย่างใดอย่างหนึ่ง, pH 7.0) ใส่ตัวอย่างลงในควิเวตชนิด ควอตซ์ (quartz cuvette) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที วัดการเปลี่ยนแปลงความขุ่นโดยใช้ UV/Vis spectrophotometer ที่เชื่อมต่อกับเครื่องทำความเย็น แบบระบายอากาศ (air cooled single cell Peltier cooler) ที่ความยาวคลื่น 320 นาโนเมตร โดยวัด ค่าการดูดกลืนแสงทุกๆ 1 นาที

### 3.5.9 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ตัวอย่างโปรตีนที่ผ่านและไม่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวนด์ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ (สารละลายผสมระหว่าง Tris-HCl เข้มข้น 0.125 โมลาร์, SDS เข้มข้น 4% และ glycerol เข้มข้น 20%, pH 6.8) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นโหลดโปรตีนจำนวน 20 ไมโครกรัมลงในเจลโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่ง ประกอบด้วย running gel 10% และ stacking gel 4% (สำหรับตัวอย่างที่ละลายในเกลือเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยที่ไม่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวนด์ใช้ปริมาณตัวอย่างสำหรับโหลดลงเจล 2.25 ไมโครกรัม) ตั้ง ค่าสำหรับการแยกสารโดยใช้แรงดันไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ จากนั้นเจลที่ได้จะถูกนำมาย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.125% และล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% นำเจลที่ได้มาถ่ายรูปด้วยเครื่อง UVITEC imaging system (Fire reader V4, Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

### 3.5.10 การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscopy)

โครงสร้างจุลภาค (microstructure) ของโปรตีนแอคโตไมโอซินของตัวอย่างที่ผ่านและไม่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวนด์ถูกวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Eclipse Ts2, Nikon Instruments Inc., Tokyo, Japan) โดยนำตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตรมาหยดลงบนแผ่นแก้ว สไลด์และส่องดูลักษณะโครงสร้างของโปรตีนผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

### 3.5.11 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความ เชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 23.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

### 3.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติด้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลานิล

#### 3.6.1 วัสดุและสารเคมี

เอนไซม์ Alcalase® 2.4 L FG (2.4 Anson Unit/g; AU/g) จาก จากบริษัท Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) สารเคมีจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) ได้แก่เอนไซม์เพปซิน (จาก porcine gastric mucosa), เอนไซม์ pancreatin (จาก porcine pancreas), 3-morpholinopyridone hydrochloride (SIN-1), dihydrorhodamine 123 (DHR 123, ≥ 95.0%), fluorescein sodium salt (FL, BioReagent), 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS, 5.0%, w/v, BioReagent), reduced *L*-glutathione (GSH, ≥ 98.0%), cytochrome C, aprotinin, hippuryl-His-Leu acetate salt (Hip-His-Leu), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS, ≥ 98.0%), 3-(2-pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid monosodium salt hydrate (ferrozine, 97.0%), (±)-6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid (Trolox, 97.0%), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-*s*-triazine (TPTZ, ≥ 99.0%), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), และ 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) สารเคมีจากบริษัท ACROS Organics™ (Morris Plains, NJ, USA) ได้แก่ 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH, 98.0%) และ tryptophan (99.0%) ส่วน *L*(+)-ascorbic acid จากบริษัท CARLO ERBA Reagents S.A.S (Rodano, Italy) เพปไทด์สังเคราะห์ AGNQVLNLQADLPK (AK-14) และ NTFLFFK (NK-7) จากบริษัท GL Biochem (Shanghai) Ltd. (Shanghai, China) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) และ fetal bovine serum (FBS) จากบริษัท HyClone (HyClone, Logan, UT, USA) Trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), *L*-Gln, และ non-essential amino acids (NEAAs) จากบริษัท Gibco (CA, USA) Acetonitrile (ACN) และ trifluoroacetic acid (TFA) สำหรับงานวิเคราะห์เกรด HPLC และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (analytical grade)

### 3.6.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) สดซื้อจากตลาดใน จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย มาล้างห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีภายใน 1 ชั่วโมง โดยบรรจุใส่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง ล้างปลา ตัดหัว และกำจัดหนังออก จากนั้นนำเนื้อปลาไปสับโดยใช้เครื่องสับเนื้อ (Kenwood A920, Havant, UK) กำจัดไขมันจากเนื้อปลานิลสดด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่อัตราส่วนตัวอย่างต่อตัวทำละลายที่ 1: 4 (w/v) ที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ทำ 2 รอบ จากนั้นเนื้อปลานิลสดที่กำจัดไขมันแล้ววางไว้ในตู้ดูดควันและทำให้แห้งในเตาอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัวอย่างจะนำไปบดและผ่านตะแกรงขนาด 230-mesh จะได้ตัวอย่างเป็นผงโปรตีนจากปลานิล (P) ซึ่งจะถูกรับในถึงสุญญากาศและเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ proximate composition ประกอบด้วยปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน และเถ้าด้วยวิธี AOAC (2000)

โปรตีนจากปลานิล (P) ผงปริมาณ 2 กรัมละลายด้วย  $\text{NaHCO}_3$  เข้มข้น 0.15 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 10%, w/v) ปรับ pH เป็น  $8.0 \pm 0.1$  ด้วย NaOH เข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นเติมเอนไซม์ Alcalase ในระดับ 5% (ของปริมาณโปรตีน) ย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2, 6, 10, และ 16 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 rpm หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วด้วยน้ำแข็ง ปรับ pH เป็น  $7.0 \pm 0.1$  และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่  $10,000 \times g$  ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จะได้ตัวอย่างดังนี้คือ  $H_2$ ,  $H_6$ ,  $H_{10}$  และ  $H_{16}$  จากเวลาย่อย 2, 6, 10, และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ นำไปวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างหลังจากผ่านระบบย่อยอาหารจำลอง (*In vitro* gastrointestinal (GI) digestion) ในข้อ 3.6.3 ส่วนตัวอย่างควบคุม A0 คือใช้น้ำแทนโปรตีนปลานิลและเติมเอนไซม์ Alcalase ต้มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และตัวอย่างควบคุม  $P_0-A_0$  คือโปรตีนปลานิลต้มที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และเติมเอนไซม์ Alcalase ต้ม (เวลาที่ 0)

### 3.6.3 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง (*In vitro* gastrointestinal (GI) digestion)

ศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างหลังจากผ่านระบบย่อยอาหารจำลอง GI โดยใช้เอนไซม์เพปซิน (pepsin) และ แพนครีเอติน (pancreatin) ดัดแปลงตามวิธีของ Minekus et al. (2014) ดังนั้นการย่อยในกระเพาะอาหาร (gastric digestion, GD) เตรียมโดยผสมไฮโดรไลเสทปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมของเหลวในระบบจำลองของกระเพาะอาหาร (simulated gastric fluid, SGF)

ปริมาตร 3.2 มิลลิลิตรและ  $\text{CaCl}_2$  เข้มข้น 0.075 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH เป็น  $3.0 \pm 0.1$  ด้วย HCl เข้มข้น 6 โมลาร์ และปรับให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 9.2 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์เพปซิน ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตรลงใน SGF (ให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สุดท้ายคือ 2,000 U/มิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm

จากสารผสมของ SGF ข้างต้นปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำมาย่อยในลำไส้เล็ก (intestinal digestion, ID) โดยเติมสารละลายในระบบจำลองของลำไส้เล็ก (simulated intestinal fluid, SIF) ปริมาตร 5.5 มิลลิลิตร เติม NaOH เข้มข้น 10 โมลาร์ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น  $> 5.6$  และเติม  $\text{CaCl}_2$  เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 0.3 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับ pH เป็น  $7.0 \pm 0.1$  ปรับปริมาตรทั้งหมดให้ได้ 17.5 มิลลิลิตรบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีเติมเอนไซม์แพนครีเอติน ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตรลงใน SIF (ให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์สุดท้ายคือ 100 U/มิลลิลิตร) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและเขย่าด้วยความเร็ว 160 rpm

หยุดการทำงานของเอนไซม์ gastric (GD) หรือ gastric-intestinal digesta (GID) ด้วยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีด้วยน้ำแข็ง ตัวอย่างไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยจากเอนไซม์ gastric (GD) ดังนี้  $\text{H}_2\text{-GD}$ ,  $\text{H}_6\text{-GD}$ ,  $\text{H}_{10}\text{-GD}$  และ  $\text{H}_{16}\text{-GD}$  ส่วนตัวอย่างไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยจากเอนไซม์ gastric-intestinal digesta (GID) ดังนี้  $\text{H}_2\text{-GID}$ ,  $\text{H}_6\text{-GID}$ ,  $\text{H}_{10}\text{-GID}$  และ  $\text{H}_{16}\text{-GID}$  โดยทั้งสองกลุ่มตัวอย่างไฮโดรไลเสทย่อยที่ 2, 6, 10, และ 16 ชั่วโมงตามลำดับ ตัวอย่างจากกลุ่ม gastric (GD) และ gastric-intestinal digesta (GID) นำไปวิเคราะห์ทางเคมีในลำดับถัดไป ส่วนตัวอย่างจากกลุ่ม gastric-intestinal digesta (GID) นำไปทำแห้งและวิเคราะห์กิจกรรมด้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์

ส่วนของโปรตีนที่ผ่านการย่อยในระบบจำลอง GI ทำเช่นเดียวกันกับตัวอย่างไฮโดรไลเสทได้ ตัวอย่างคือ P-GD และ P-GID ที่เกิดจากการย่อยจากเอนไซม์ gastric (GD) และ gastric-intestinal digesta (GID) ตามลำดับ เตรียมตัวอย่างควบคุมเอนไซม์ (Enzyme blank) โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากอิออน (deionized water, DI) แทนตัวอย่าง ตามขั้นตอนข้างต้น เพื่อใช้หักลบค่าที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ แสดงค่าตัวอย่างต่างๆ ดังนี้ pepsin ( $\text{Pep}_0$ ), pancreatin ( $\text{Pan}_0$ ) และ enzyme blank (Pep-Pan-I) ซึ่งตัวอย่างในกลุ่มนี้จะเตรียมเช่นเดียวกันกับวิธีข้างต้นแต่ไม่เติมโปรตีนหรือไฮโดรไลเสท ส่วนตัวอย่างควบคุม A0 นำมาศึกษาผลการย่อยในระบบ GI จะได้ตัวอย่างคือ A0-GID

### 3.6.4 วิเคราะห์ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH) และความสามารถในการย่อย (Digestibility)

วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน ( $\alpha$ -amino group) ของตัวอย่างโดยทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลิวซีน (leucine) เป็นสารมาตรฐาน นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร (เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 1% หรือ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) เติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ ที่ pH 8.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK) แสดงค่าการย่อยสลาย ในหน่วยมิลลิโมลาร์ของกลุ่มแอลฟาอะมิโนเทียบกับลิวซีน (leucine) คำนวณค่าระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ตามสมการดังนี้ (1) (Benjakul & Morrissey, 1997) คำนวณค่าความสามารถในการย่อย (Digestibility) ตามสมการดังนี้ (2)

$$DH (\%) = \left( \frac{L_t - L_0}{L_{total,p} - L_0} \right) \times 100, \quad (1)$$

$$Digestibility (\%) = \left( \frac{L_{ad} - L_{bd}}{L_{total,h} - L_{bd}} \right) \times 100, \quad (2)$$

โดย  $L_t$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ของไฮโดรไลสที่เวลาต่างๆ  $L_0$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ของส่วนในเวลาที่ 0 และ  $L_{total,p}$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ทั้งหมด ที่ได้จากนำส่วนในบางส่วนย่อย ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่ 110 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง  $L_{bd}$  และ  $L_{ad}$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ของไฮโดรไลสก่อนและหลังย่อยใน GI ตามลำดับ  $L_{total,h}$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ทั้งหมดที่สนใจ ส่วน  $L_{total,p}$  คือปริมาณ  $\alpha$ -amino ซึ่งถูกใช้แทนที่โดย  $L_{total,h}$  ผลการคำนวณหลังจากการลบ enzyme blanks

### 3.6.5 วิเคราะห์การกระจายน้ำหนักโมเลกุลน้ำหนักโมเลกุล (Molecular weight (MW) distribution) โดย Size exclusion chromatography (SEC)

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย mobile phase ในอัตราส่วนของ 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ต่อดอะซิโตนไนไตรล์ (acetonitrile) เป็น 7:3 (v/v) ฉีดตัวอย่าง



ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในคอลัมน์ Superdex Peptide 10/300 GL (10×300 mm, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) อัตราการไหล 1.0 มิลลิลิตร/นาที ถูกชะออกทั้งหมด 27 มิลลิลิตร และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร โดยใช้สารมาตรฐานเพื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลดังนี้ Aprotinin (6,512 Da), AK-14 (1,481 Da), NK-7 (916 Da), Hip-His-Leu (429 Da), และ tryptophan (204 Da) ซึ่งใช้ Cytochrome C (12,400 Da) สำหรับการคำนวณ void volume ( $V_0$ ) พล็อตกราฟมาตรฐานระหว่าง LogMW และ  $K_{av}$  (Wu, Mansy, Wu, Surerus, Foster, & Cowan, 2002)

### 3.6.6 วิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมี

#### 3.6.6.1 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> (TEAC assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงตามวิธีของ Re et al. (1999) โดยปิเปตตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรและสารละลาย 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 15 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยมิลลิกรัม Trolox ต่อมิลลิกรัมสมมูลของลิวิซิน

#### 3.6.6.2 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Ferric ion (FRAP assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระตามดัดแปลงตามวิธีของ Benzie & Strain (1996) โดยวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเป็นเฟอร์รัส โดยปิเปตส่วนใส 100 ไมโครลิตรซึ่งมีปริมาณเพปไทด์เข้มข้น 0.13 มิลลิกรัมสมมูลของลิวิซินต่อมิลลิลิตร และสารละลายผสม 1000 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ อะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร พีเอช 3.6 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

#### 3.6.6.3 ความสามารถในการจับกับโลหะ (FICC assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถในการจับกับโลหะเฟอร์รัสไอออน ตามวิธีของ Decker & Welch (1990) โดยปิเปตตัวอย่างเพปไทด์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 1000 ไมโครลิตร FeCl<sub>2</sub> เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร

50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีในที่มืด และเติม ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน EDTA ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน EDTA

#### 3.6.6.4 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิล (ORAC assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลโดยดัดแปลงจาก Dávalos, Gómez-Cordovés, & Bartolomé (2004) การกรวิเคราะห์ใช้จานหลุมสี่ดำ 96-wells ปิดตัวอย่างเพปไทด์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-wells จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) และ fluorescein (FL) ที่ความเข้มข้น 280 นาโนโมลาร์ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม AAPH (ความเข้มข้น 48 มิลลิโมลาร์) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 75 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) วัดความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (emission wavelength) 520 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ทุกๆ 1 นาทีเป็นเวลา 110 นาที ตัวอย่าง blanks คือ ตัวอย่างที่เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) แทนเพปไทด์ คำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) โดยใช้ SkanIt™ software 4.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

#### 3.6.6.5 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลไนไตรท์ ( $ONOO^-$ Scavenging)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยการยับยั้งอนุมูลเปอร์ออกซิลไนไตรท์ (peroxynitrite scavenging ability) โดยดัดแปลงจาก Kooy & Royall (1994) เตรียมสารละลาย stock ของ SIN-1 และ DHR 123 ในสารละลาย PBS ที่มี deoxygenated (เย็น) ปริมาตร 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) และเจือจางใหม่ด้วย PBS 50 มิลลิโมลาร์ เพื่อใช้ต่อไป ปิดตัวอย่างเพปไทด์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-wells (แบบจานหลุมสี่ดำ) จากนั้นเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (pH 7.4) DHR 123 ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ SIN-1 ที่ความเข้มข้น 40 ไมโครโมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วัดความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 500 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (emission wavelength) 536 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader (Varioskan LUX Multimode Microplate Reader, Thermo Fisher

Scientific, Waltham, MA, USA) ทุกๆ 2.5 นาทีเป็นเวลา 120 นาที ตัวอย่าง blanks คือ ตัวอย่างที่เติมน้ำปราศจากไอออน (deionized water, DI) แทนเพปไทด์ คำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) โดยใช้ SkanIt™ software 4.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน GSH equivalents/กรัมโปรตีน

### 3.6.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

#### 3.6.7.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2: Human liver cancer HepG-2 cells, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) เลี้ยงเซลล์ในขวดขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) ผสมด้วย Fetal bovine serum (FBS) เข้มข้น 10%, L-Gln เข้มข้น 1% (v/v), NEAAs เข้มข้น 1% (v/v) และ เพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin, 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เข้มข้น 1% (v/v) จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% จนกระทั่งเซลล์แพร่กระจายตามพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80 ถึง 90% จากนั้นทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดโดยการเติมสารละลาย Trypsin-EDTA เข้มข้น 0.05% ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซาไลน์ pH 7.4 เก็บเซลล์นี้ใช้ในการทดลอง

#### 3.6.7.2 การวิเคราะห์ความเป็นพิษและการป้องกันความเป็นพิษ (cytotoxicity and cytoprotection) ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ดูดเซลล์ที่เตรียมตามข้อ 3.6.7.1 ใส่ในงานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์เต็ม (DMEM) จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการรอดชีวิต (cell viability) โดยวิธี 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) วิเคราะห์ cytotoxicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยในระบบ GI ที่บ่ม 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 -15 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิเต็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง AAPH ที่ความเข้มข้น 50% lethality นำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี cytoprotection assay โดยบ่มเซลล์ที่ 36 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของ AAPH 0 - 60 มิลลิโมลาร์ ที่ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ cytoprotection ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยในระบบ GI ที่บ่ม 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 และ 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิเต็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น AAPH ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดของออกซิเดชันในเซลล์เป็นเวลา 12

ชั่วโมง เซลล์ที่ถูกและไม่ถูกเหนี่ยวนำโดย AAPH และตัวอย่างควบคุมทางบวกคือเซลล์ที่เติมกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มทดลองเหล่านี้เติมจะตัวอย่างที่ผ่านการย่อยใน GI ในแต่ละหลุมที่กำหนด นำไปวิเคราะห์ MTT assay โดยเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ออีก 2 ชั่วโมงในห้องมืด และเติมสารละลาย DMSO เข้มข้น ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง SPECTROstar NANO system ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany)

### 3.6.7.3 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ (Intracellular ROS scavenging capacity)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) โดยดัดแปลงตามวิธีของ Wolfe & Liu (2007) เก็บเกี่ยวเซลล์ HepG-2 ที่เลี้ยงใน Tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร โดยการใช้วิธี Trypsinize เติมเซลล์ HepG-2 ( $6 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม) ที่อยู่ใน complete media ลงไปในหลุมของ 96 well plate costar black/clear bottom เติมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยในระบบ GI และ DCFH-DA ที่ความเข้มข้น 25 ไมโครโมลาร์ (ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มี FBS ) ลงในแต่ละหลุมที่กำหนดและบ่ม 1 ชั่วโมง ล้าง media ออกจากเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า และเติม AAPH ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า แล้วบ่มต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ DCFH จะถูกออกซิไดซ์เป็น DCF ซึ่งสามารถเรืองแสงได้ ถ้าเพปไทด์ที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะทำให้การเรืองแสงของ DCF ลดลงซึ่งติดตามด้วยเครื่อง SPECTROstar NANO system ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (emission wavelength) 538 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของตัวอย่างแสดงในหน่วย DCF fluorescence intensity ซึ่งเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย DCFH-DA เพียงอย่างเดียวเป็น cell blank ส่วนเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย DCFH-DA และ APPH ซึ่งทำให้เซลล์เป็น oxidative stress คือเซลล์ควบคุมทางลบ และเซลล์ควบคุมทางบวกคือเซลล์ที่เติมกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มทดลองเหล่านี้จะเติมตัวอย่างที่ผ่านการย่อยใน GI ในแต่ละหลุมที่กำหนด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ (cellular antioxidant activity, CAA) คำนวณตามวิธีของ Kellett, Greenspan, & Pegg (2018) ดังสมการ (3)

$$\text{CAA unit} = \left( 1 - \frac{\text{Fluorescence intensity}_{\text{sample}}}{\text{Fluorescence intensity}_{\text{oxidative stress control}}} \right) \times 100 \quad (3)$$

### 3.6.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำและแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD เปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 ค่าเฉลี่ยด้วย independent sample t-tests ส่วนผลการทดลองที่มีมากกว่า 2 ปัจจัยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp) วิเคราะห์องค์ประกอบหลัก PCA และ Pearson correlation analysis โดยใช้โปรแกรม OriginPro 2018 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

## 3.7 คุณลักษณะของเพปไทด์จากปลาไนและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์

### 3.7.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA) ได้แก่ 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS, 5.0%, w/v) 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS,  $\geq$  98.0%), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazoly)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), และ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) สารเคมีจากบริษัท ACROS Organics™ (Morris Plains, NJ, USA) ได้แก่ 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH, 98.0%) และ tryptophan (99.0%) ส่วน L(+)-ascorbic acid จากบริษัท CARLO ERBA Reagents S.A.S (Rodano, Italy) Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) และ fetal bovine serum (FBS) จากบริษัท HyClone (HyClone, Logan, UT, USA) และ Trypsin-EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) จากบริษัท Gibco (CA, USA) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (analytical grade)

การเตรียมโปรตีนจากเนื้อปลาไนแบบแห้ง (ผง) และผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทเตรียมจากวิธีของ Zhang, Noisa & Yongsawatdigul (2020) กำจัดไขมันโดยโปรตีนจากเนื้อปลาไนผงปริมาณ 2

กรัมละลายด้วย  $\text{NaHCO}_3$  เข้มข้น 0.15 โมลาร์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร (ปริมาณโปรตีน 10%, w/v) ปรับ pH เป็น  $8.0 \pm 0.1$  ด้วย  $\text{NaOH}$  เข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ในระดับ 5% (ของปริมาณโปรตีน) ย่อยตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง เขย่าด้วยความเร็วรอบ 160 rpm หยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นอย่างรวดเร็วด้วยน้ำแข็ง ปรับ pH เป็น  $7.0 \pm 0.1$  และปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่  $10,000 \times g$  ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ส่วนในที่ได้เป็นโปรตีนไฮโดรไลสจากเนื้อปลานิลเก็บที่  $-80$  องศาเซลเซียส สำหรับวิเคราะห์ต่อไป

### 3.7.2 การทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (Chromatography)

#### 3.7.2.1 การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography (SEC)

โปรตีนไฮโดรไลสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ฉีดในคอลัมน์ Superdex Peptide 10/300 GL (10x300 mm, GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) ต่อกับเครื่อง Fast protein liquid chromatography (FPLC; ÄKTA pure 25, Version 1.8.0.6, GE Healthcare Bioscience Co., Uppsala, Sweden) ใช้ mobile phase A คือ DI water และ mobile phase B คือ 0.1% กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ใน 30% อะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile, ACN) โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์ (ตารางที่ 3.1) เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร/fraction ตรวจสอบตามเวลาที่ 214 และ 280 นาโนเมตร นำเพปไทด์จาก SEC fraction (SF) ไปทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งและละลายกลับด้วย 0.1% TFA (v/v) ใน 2% ACN (v/v) สำหรับวิเคราะห์ต่อไป วิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  assay ของเพปไทด์ (10 ไมโครโมลาร์เทียบเท่าลิวซีน) คำนวณไฮโดรไลส (H) เริ่มต้น peptide yield (%) และความสัมพันธ์กิจกรรมต้านออกซิเดชัน

#### 3.7.2.2 การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Reverse-phase fast protein liquid chromatography (RP-FPLC)

คัดเลือกส่วนของไฮโดรไลสที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วยวิธี  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  assay สูงสุด จากกระบวนการ Size exclusion chromatography (SEC) คือ SF8 ทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RPC คือ SOURCE™ 5RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare Bioscience Co., Uppsala, Sweden) ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) A คือ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ในน้ำปราศจากไอออน และ mobile phase B คือ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ในอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์ (ตารางที่

3.1) เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร/fraction ตรวจสอบที่ 214 และ 280 นาโนเมตร เพปไทด์จาก RPC ประกอบด้วย  $R_1F_6$ ,  $R_1F_7$ ,  $R_1F_8$ , และ  $R_1F_9$  มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS<sup>o+</sup> assay สูงสุด (เพปไทด์ที่ 10 ไมโครโมลาร์) เก็บเพปไทด์ทั้ง 4 นี้จาก RPC นำไปทำบริสุทธิ์อีกรอบโดยใช้คอลัมน์ RPC โดยใช้ mobile phase A และ B เช่นเดียวกันกับ RPC รอบแรก โปรแกรม elution เพปไทด์ดังตารางที่ 3.1 เก็บเพปไทด์ได้ 16 fraction จาก RPC รอบสอง ซึ่งเพปไทด์ที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS<sup>o+</sup> assay สูงสุด (เพปไทด์ที่ 1 ไมโครโมลาร์) นำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนและคุณลักษณะของเพปไทด์ในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.1 โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์สำหรับการทำบริสุทธิ์

| Segments   | Target %B | Elution volume (mL) | Flow rate (mL/min) | Segments | Target %B | Elution volume (mL) | Flow rate (mL/min) |
|--|-----------|---------------------|--------------------|----------|-----------|---------------------|--------------------|
| <i>SEC of H</i>                                      |           |                     |                    |          |           |                     |                    |
| Sampling   | 0.00      | 0.30                | 0.80               | 7        | 100.00    | 0.70                | 0.80               |
| 1  | 0.00      | 5.00                | 0.80               | 8        | 2.50      | 0.00                | 0.80               |
| 2  | 100.00    | 0.00                | 0.80               | 9        | 2.50      | 1.30                | 0.80               |
| 3  | 100.00    | 0.80                | 0.80               | 10       | 100.00    | 0.00                | 0.80               |
| 4  | 2.50      | 0.00                | 0.80               | 11       | 100.00    | 7.00                | 0.80               |
| 5  | 2.50      | 2.20                | 0.80               | 12       | 0.00      | 0.00                | 0.80               |
| 6  | 100.00    | 0.00                | 0.80               | 13*      | 0.00      | 33.00               | 0.80               |
| <i>RPC<sub>1</sub> of SF<sub>8</sub></i>             |           |                     |                    |          |           |                     |                    |
| Sampling   | 2.00      | 0.30                | 0.20               | 5        | 85.00     | 3.00                | 0.40               |
| 1  | 2.00      | 4.70                | 0.20               | 6        | 2.00      | 2.50                | 1.00               |
| 2  | 10.00     | 20.00               | 0.40               | 7*       | 2.00      | 13.00               | 1.00               |
| 3  | 22.50     | 12.50               | 0.40               | 8*       | 2.00      | 1.00                | 0.20               |
| 4  | 85.00     | 7.50                | 0.40               |          |           |                     |                    |
| <i>RPC<sub>2</sub> of R<sub>1</sub>F<sub>6</sub></i> |           |                     |                    |          |           |                     |                    |
| Sampling   | 12.00     | 0.60                | 0.20               | 5        | 90.00     | 5.00                | 0.20               |
| 1  | 12.00     | 6.00                | 0.20               | 6        | 12.00     | 0.00                | 1.00               |
| 2  | 13.50     | 0.00                | 0.20               | 7*       | 12.00     | 10.00               | 1.00               |
| 3  | 13.50     | 3.00                | 0.20               | 8*       | 12.00     | 1.00                | 0.20               |
| 4  | 90.00     | 0.00                | 0.20               |          |           |                     |                    |
| <i>RPC<sub>2</sub> of R<sub>1</sub>F<sub>7</sub></i> |           |                     |                    |          |           |                     |                    |
| Sampling   | 13.00     | 0.60                | 0.20               | 4        | 13.00     | 0.00                | 1.00               |
| 1  | 13.00     | 17.50               | 0.20               | 5*       | 13.00     | 10.00               | 1.00               |
| 2  | 90.00     | 0.00                | 1.00               | 6*       | 13.00     | 1.00                | 0.20               |
| 3  | 90.00     | 5.00                | 1.00               |          |           |                     |                    |
| <i>RPC<sub>2</sub> of R<sub>1</sub>F<sub>8</sub></i> |           |                     |                    |          |           |                     |                    |
| Sampling   | 16.00     | 0.60                | 0.20               | 4        | 16.00     | 0.00                | 1.00               |

|  |       |       |      |    |       |       |      |
|--|-------|-------|------|----|-------|-------|------|
| 1  | 16.00 | 17.50 | 0.20 | 5* | 16.00 | 10.00 | 1.00 |
| 2  | 90.00 | 0.00  | 1.00 | 6* | 16.00 | 1.00  | 0.20 |
| 3  | 90.00 | 5.00  | 1.00 |    |       |       |      |
| <i>RPC<sub>2</sub> of R<sub>1</sub>F<sub>9</sub></i> |       |       |      |    |       |       |      |
| Sampling   | 22.00 | 0.60  | 0.20 | 4  | 22.00 | 0.00  | 1.00 |
| 1  | 29.00 | 14.00 | 0.30 | 5* | 22.00 | 10.00 | 1.00 |
| 2  | 90.00 | 0.00  | 0.30 | 6* | 22.00 | 1.00  | 0.20 |
| 3  | 90.00 | 5.00  | 0.30 |    |       |       |      |

\* for column equilibration

### 3.7.3 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

คัดเลือกส่วนของเพปไทด์ที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงนำมาวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Ultimate 3000 LC System (Dionex Ltd., Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.) ที่ต่อกับระบบ micrOTOF Q II mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) และ electrospray ionization แสดงรูปแบบ peptide mass ในโหมด positive ion โดยใช้ Auto MS/MS ในช่วง 50 -1500 m/z และ nanocolumn (Acclaim PepMap 100 C18, 3 mm, 100A, 75 mm i.d. × 150 mm) แยกเพปไทด์โดยใช้คอลัมน์ Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 50 mm, 2.7-Micron column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U. S.) ใช้ mobile phase A คือ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ในน้ำปราศจากไอออน และ mobile phase B คือ 0.1% (v/v) กรดไตรฟลูออโรอะซิติก (trifluoro acetic acid; TFA) ในอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile) ด้วยอัตราการไหล 0.3 มิลลิลิตร/นาที อุณหภูมิคอลัมน์ 27 องศาเซลเซียส โปรแกรมการชะ (elution) ดังตารางที่ 3.2

#### ตารางที่ 3.2 โปรแกรมการชะ (elution) เพปไทด์สำหรับเครื่อง LC-MS/MS

| Segments   | Retention time (min) | Target %B | Segments | Retention time (min) | Target %B |
|--|----------------------|-----------|----------|----------------------|-----------|
| <i>R<sub>2</sub>F<sub>1,2</sub> and R<sub>2</sub>F<sub>2,2-2,5</sub></i> |                      |           |          |                      |           |
| 1  | 0                    | 5         | 6        | 50                   | 80        |
| 2  | 0                    | 5         | 7        | 55                   | 80        |
| 3  | 5                    | 13        | 8        | 57                   | 5         |
| 4  | 40                   | 30        | 9        | 60                   | 5         |
| 5  | 45                   | 40        |          |                      |           |
| <i>R<sub>2</sub>F<sub>1,3-1,4</sub></i>                                  |                      |           |          |                      |           |
| 1  | 0                    | 5         | 5        | 45                   | 80        |
| 2  | 0                    | 5         | 6        | 55                   | 80        |
| 3  | 5                    | 14        | 7        | 57                   | 5         |
| 4  | 40                   | 25        | 8        | 60                   | 5         |



| $R_2F_{3,1-3,5}$ |    |    |   |    |    |
|------------------|----|----|---|----|----|
| 1                | 0  | 5  | 6 | 45 | 80 |
| 2                | 0  | 5  | 7 | 56 | 80 |
| 3                | 3  | 16 | 8 | 57 | 5  |
| 4                | 38 | 28 | 9 | 60 | 5  |
| 5                | 43 | 55 |   |    |    |
| $R_2F_{4,2}$     |    |    |   |    |    |
| 1                | 0  | 5  | 6 | 45 | 80 |
| 2                | 0  | 5  | 7 | 56 | 80 |
| 3                | 3  | 20 | 8 | 57 | 5  |
| 4                | 38 | 25 | 9 | 60 | 5  |
| 5                | 43 | 55 |   |    |    |
| $R_2F_{4,3-4,5}$ |    |    |   |    |    |
| 1                | 0  | 5  | 6 | 45 | 80 |
| 2                | 0  | 5  | 7 | 56 | 80 |
| 3                | 3  | 20 | 8 | 57 | 5  |
| 4                | 38 | 32 | 9 | 60 | 5  |
| 5                | 43 | 55 |   |    |    |

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาลำดับกรดอะมิโน (*de novo* amino acid sequence) ด้วยโปรแกรม PepNovo (v1.2.5) (<https://proteomics.ucsd.edu/ProteoSAFe/index.jsp>) พิจารณาคัดเลือก เปปไทด์โดยระบุเป็น *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia, taxid: 8128) และ PepNovo score (100%) และระบุโปรตีนที่มี homologous proteins จากฐานข้อมูล NCBI Protein Blast (BLASTP 2.9.0+ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins>) และ/หรือ UniProtKB (peptide search <https://www.uniprot.org/peptidesearch/>) (May 17<sup>th</sup> – 25<sup>th</sup>, 2019) ระบุ ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่มีความเข้มของสัญญาณที่สูงใน basic peak chromatograms (BPC) ของ MS spectrum ซึ่งจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่บ่งชี้ถึงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเช่น W, Y, K, C, P และ H เพื่อใช้ในการคัดเลือกสำหรับวิเคราะห์ในการย่อยอาหารจำลองทางคอมพิวเตอร์ (*in silico* simulated GI digestion)

### 3.7.4 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลองทางคอมพิวเตอร์ (*in silico* simulated gastrointestinal (GI) digestion)

การวิเคราะห์ในการย่อยอาหารจำลองทางคอมพิวเตอร์ (*in silico* simulated GI digestion) โดยใช้โปรแกรม PeptideCutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) (May 25<sup>th</sup>, 2019)

เลือกใช้เอนไซม์เพปซิน (pepsin, pH 1.3 และ pH > 2) ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ซึ่งมีความจำเพาะต่ำ (C-term- [FYWMLL]) เปรียบเทียบระหว่างเพปไทด์ก่อนและหลังย่อยจากฐานข้อมูลดังกล่าวข้างต้นกับฐานข้อมูล BIOPEP ( Minkiewicz, Iwaniak, & Darewicz, 2019) (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/index.php/pl/biopep>) (June 6<sup>th</sup>, 2019) จะได้เพปไทด์ทั้งหมด 15 ท่อน (เพปไทด์ก่อนย่อย (เริ่มต้น) 9 ท่อน และหลังย่อย GI 6 ท่อน) นำไปสังเคราะห์เพปไทด์จากบริษัท GL Biochem (Shanghai) Ltd. (Shanghai, China) และวิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันในลำดับต่อไป

### 3.7.5 วิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์

ปริมาณเพปไทด์โดยวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโน ( $\alpha$ -amino group) ของตัวอย่างโดยทำปฏิกิริยากับ 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลิวซีน (leucine) เป็นสารมาตรฐาน นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร (เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต (SDS) เข้มข้น 1% หรือ น้ำปราศจากไอออน (deionized water) เติมสารละลายฟอสเฟต เข้มข้น 0.2125 โมลาร์ ที่ pH 8.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (Stone, Staffordshire, ST15 OSA, UK) แสดงค่าการย่อยสลายในหน่วยมิลลิโมลาร์ของกลุ่มแอลฟาอะมิโนเทียบกับลิวซีน (leucine).

### 3.7.6 วิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS<sup>•+</sup>

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระดัดแปลงตามวิธีของ Re et al. (1999) โดยปีเปตตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรและสารละลาย 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1950 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร น้ำ DI ใช้แทน blank แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> (ABTS<sup>•+</sup> scavenging capacity) ดังสมการ

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ scavenging capacity (\%)} = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100\%$$

โดย  $A_{\text{blank}}$  และ  $A_{\text{sample}}$  คือค่าการดูดกลืนแสงของ blank และตัวอย่างตามลำดับ

### 3.7.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

#### 3.7.7.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เซลล์ที่ใช้ในการทดลองคือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2: Human liver cancer HepG-2 cells, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) เลี้ยงเซลล์ในขวดขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) ผสมด้วย Fetal bovine serum (FBS) เข้มข้น 10%, L-Gln เข้มข้น 1% (v/v), NEAAs เข้มข้น 1% (v/v) และ เพนนิซิลิน-สเตรปโตมัยซิน (penicillin-streptomycin, 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เข้มข้น 1% (v/v) จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% จนกระทั่งเซลล์แพร่กระจายตามพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80 ถึง 90% จากนั้นทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดโดยการเติมสารละลาย Trypsin-EDTA เข้มข้น 0.05% ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS, pH 7.4 เก็บเซลล์นี้ใช้ในการทดลอง

#### 3.7.7.2 การวิเคราะห์ความเป็นพิษ (cytotoxicity) ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ดูดเซลล์ที่เตรียมตามข้อ 3.7.7.1 ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์  $2 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์เต็ม (DMEM) จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการรอดชีวิต (cell viability) โดยวิธี 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT assay) วิเคราะห์ cytotoxicity ของเพปไทด์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10 – 100 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิเต็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์ MTT assay โดยเติมสารละลาย MTT ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า ที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ออีก 2 ชั่วโมงในห้องมืด และเติมสารละลาย DMSO เข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง SPECTROstar NANO system ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany)

#### 3.7.7.3 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ (Intracellular ROS scavenging capacity)

เก็บเกี่ยวเซลล์ HepG-2 ที่เลี้ยงใน Tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร โดยการใช้วิธี Trypsinize เต็มเซลล์ HepG-2 ( $6 \times 10^4$  เซลล์/หลุม) ที่อยู่ใน complete media ลงไปในหลุมของ 96 well plate costar black/clear bottom เต็มเพปไทด์ และ DCFH-DA ที่ความเข้มข้น

25 ไมโครโมลาร์ (ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่มี FBS ) ลงในแต่ละหลุมที่กำหนดและบ่ม 1 ชั่วโมง ล้าง media ออกจากเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า และเติม AAPH ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า แล้วบ่มต่อไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ DCFH จะถูกออกซิไดซ์เป็น DCF ซึ่งสามารถเรืองแสงได้ ถ้าเพปไทด์ที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะทำให้การเรืองแสงของ DCF ลดลงซึ่งติดตามด้วยเครื่อง SPECTROstar NANO system ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (emission wavelength) 538 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของตัวอย่างแสดงในหน่วย DCF fluorescence intensity ซึ่งเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย DCFH-DA เพียงอย่างเดียวเป็น cell blank ส่วนเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดย DCFH-DA และ APPH ซึ่งทำให้เซลล์เป็น oxidative stress คือเซลล์ควบคุมทางลบ และเซลล์ควบคุมทางบวกคือเซลล์ที่เติมกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร กลุ่มทดลองเหล่านี้จะเติมตัวอย่างเพปไทด์ในแต่ละหลุมที่กำหนด ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ (cellular antioxidant activity, CAA) คำนวณตามวิธีของ Kellett, Greenspan, & Pegg (2018) ดังสมการ

$$CAA \text{ unit} = \left( 1 - \frac{\text{Fluorescence intensity}_{\text{sample}}}{\text{Fluorescence intensity}_{\text{oxidative stress control}}} \right) \times 100$$

โดย oxidative stress group คือเซลล์ที่เติม DCFH-DA และ APPH ไม่มีเพปไทด์

### 3.7.8 การศึกษาการแสดงออกของยีน (Gene expression)

ดูดเซลล์ที่เตรียมไว้ใส่จานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม ปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์  $6 \times 10^5$  เซลล์/หลุม บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มทดลอง 2 แบบดังนี้ 1) เติมเพปไทด์ในเซลล์เพียงอย่างเดียวที่ 10 – 100 ไมโครโมลาร์ บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง 2) เติมเพปไทด์ในเซลล์ที่ 10 – 100 ไมโครโมลาร์ และเติม AAPH ที่ความเข้มข้น 600 ไมโครโมลาร์ ในสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่า บ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ใช้เป็นกลุ่มตัวอย่าง “peptide + AAPH” ล้าง media ออกจากเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ PBS ที่ความเข้มข้น 1 เท่าและเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.05% trypsin-EDTA

เริ่มการสกัด RNA ด้วยการใช้ชุดสกัด NucleoSpin® RNA Plus kit อ้างอิงวิธีการสกัดจากบริษัท (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG., Düren, Germany) ตรวจสอบปริมาณและคุณภาพของ RNA โดยใช้ LVis plate ด้วยเครื่อง SPECTROstar NANO system (BMG Labtech GmbH,

Ortenberg, Baden-Württemberg, Germany) RNA (ปริมาณ 1 ไมโครกรัม) มาสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยเทคนิค Real time-polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ชุดสังเคราะห์ ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (FSQ-301, Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) เพิ่มปริมาณโดย cDNA ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตรผสมกับสารผสม ในปริมาณ 12 ไมโครลิตร (RNase-free DI ปริมาณ 5.25 ไมโครลิตร, primer เข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ปริมาณ 0.5 ไมโครลิตร และ Vivantis 2xTaq Master Mix ปริมาณ 6.25 ไมโครลิตร (PLMM01, Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia)) Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene (GAPDH) ใช้เป็น housekeeping gene วิเคราะห์การแสดงออกของยีน GPx1, SOD1 และ CAT ออกแบบ Primer ให้ครอบคลุมบริเวณแสดงออกทั้งหมดของยีนโดยได้ primer หนึ่งคู่ มีลำดับเบสดังนี้ forward primer และ reward primer ได้แก่ GAPDH (247 bp), forward: 5'-ACC TGA CCT GCC GTC TAG AA-3', reverse: 5'-TCC ACC CTG TTG CTG TA-3'; CAT (380 bp), forward: 5'-TCC GGG ATC TTT TTA ACG CCA TTG-3', reverse: 5'-TCG AGC ACG GTA GGG ACA GTT CAC-3'; SOD1 (272 bp), forward: 5'-CTA GCG AGT TAT GGC GAC-3', reverse: 5'-CAT TGC CCA AGT CTC CAA C-3'; GPx1 (224 bp), forward: 5'-CGC CAA GAA CGA AGA GAT TC-3', reverse: 5'-CAA CAT CGT TGC GAC ACA C-3' ทำการเพิ่มยีนด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR) และตรวจหาผลผลิต PCR ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วย Agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1.5% Agarose (BIO 101, Inc.) ในสารละลาย ethidium bromide ใช้ VC 100 bp Plus DNA Ladder เป็น DNA Molecular weight markers (0.1 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร, NL1407, Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Selangor Darul Ehsan, Malaysia) ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ต้านออกซิเดชันคำนวณโดยเทียบความสัมพันธ์กับยีน GAPDH ที่ใช้เป็น housekeeping gene

### 3.7.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำและแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ SD เปรียบเทียบความแตกต่างของ 2 ค่าเฉลี่ยด้วย independent sample t-tests ส่วนผลการทดลองที่มีมากกว่า 2 ปัจจัยวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (IBM SPSS Statistics for Windows, version 23.0. Armonk, NY: IBM Corp)

### 3.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์รักษาความเข้มข้นเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

#### 3.8.1 วัสดุและสารเคมี

ซูริมิจากปลาทรายแดงแช่แข็งได้รับการสนับสนุนจากโรงงานผลิตซูริมิ จังหวัดสมุทรสาคร (ประเทศไทย) โดยที่ตัวอย่างซูริมิที่ใช้จะต้องไม่มีส่วนผสมของโปรตีนจากไข่ขาว จากนั้นตัดแบ่งซูริมิให้ได้ขนาด 500 กรัมเพื่อบรรจุถุงสุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

สารเคมีจากบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland) ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) และ 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) สารเคมีจากบริษัท 5'-triphosphate disodium salt hydrate (ATP) และ 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS) สารเคมีสำหรับใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis จากบริษัท Bio-Rad (Hercules, CA, USA) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ (analytical grade)

#### 3.8.2 การเตรียมซูริมิที่สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นต่างๆ

ละลายเนื้อซูริมิแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน และตัดให้ได้ขนาดลูกบาศก์ 3 เซนติเมตร จากนั้นนำมาสับด้วยเครื่อง Stephan vacuum cutter (UM 5 universal, Stephan Machinery Co., Columbus, OH, USA) นาน 1 นาที จากนั้นเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.5, 1, และ 2% (w/w) ของน้ำหนักซูริมิทั้งหมดและสับอย่างต่อเนื่องนาน 1 นาที ปรับความชื้นของตัวอย่างที่เติมเกลือ 0.5, 1, และ 2% เป็น 81.5, 81, และ 80% (w/w) ตามลำดับ ด้วยน้ำแข็ง สับตัวอย่างต่อเนื่องอีก 1 นาที หลังจากนั้นปรับความเร็วในการสับเป็นระดับสูงและสับต่อเนื่อง 3 นาทีภายใต้สภาวะสุญญากาศ ระหว่างการสับตัวอย่าง อุณหภูมิของตัวอย่างจะถูกควบคุมให้ต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียสโดยใช้เครื่อง Chiller (RTE-101, NesLab, Newington, NH, USA) เนื้อซูริมิ (surimi paste) ที่ได้จะถูกนำมาบรรจุถุงสุญญากาศเพื่อใช้สำหรับการทดลอง

#### 3.8.3 การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์รักษาความเข้มข้นกับตัวอย่างเนื้อซูริมิ

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับตัวอย่างเนื้อซูริมิดำเนินการโดยใช้เครื่อง ultrasonic processor (Q500 sonicator, Qsonica L.L.C, Newtown, CT, USA) ที่ความถี่ 20 kHz นำเนื้อซูริมิ 540 กรัมที่บรรจุอยู่ในถุงสุญญากาศใส่ลงในคอนเทนเนอร์ที่บรรจุน้ำผสมน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่างให้อยู่ระหว่าง 4 – 8 องศาเซลเซียสระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน (sonication) ตัวอย่างจะได้รับคลื่นอัลตราซาวด์โดยใช้โพรบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 มิลลิเมตร ที่แอมพลิจูด 70, 85, และ 100% เป็น

เวลานาน 30 นาทีโดยทำการให้คลื่นในลักษณะ pulse mode (ให้คลื่น 5 วินาที และพัก 5 วินาที) ตัวอย่างที่ไม่ได้ให้คลื่นอัลตราซาวนด์จะถูกใช้เป็นตัวควบคุม คำนวณความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวนด์ ดำเนินการด้วยวิธี calorimetry โดยใช้ thermocouple (54 Series II thermometer, Fluke Corp., Everett, WA, USA) โดยวัดออกมาในหน่วยของวัตต์ต่อหน่วยพื้นที่ (วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; W/cm<sup>2</sup>) ตามวิธีของ Jambrak และคณะ (Jambrak et al., 2009) สำหรับการวิจัยนี้ คลื่นอัลตราซาวนด์ที่แอมพลิจูด 70, 85, และ 100% เทียบเท่ากับค่าความเข้ม 10.01, 13.28, และ 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

### 3.8.4 การทดสอบความสามารถในการสกัดโปรตีน

เนื้อซูริมีที่มีความเข้มข้นของเกลือ 0.5, 1, และ 2% ถูกนำมาปั่นผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-maleate ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) ที่อัตราส่วน 1:9 (w/v) โดยใช้เครื่อง homogenizer (T25 digital ULTRA-TURRAX, IKA Works, Inc., Wilmington, NC, USA) สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1, 0.21, และ 0.43 โมลาร์ถูกนำมาใช้สำหรับตัวอย่างเนื้อซูริมีที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5, 1 และ 2% ตามลำดับ จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 x g (Sorvall ST 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใส (ส่วนของโปรตีนที่สกัดได้) นำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ด้วยวิธี Bradford (Bradford, 1976) โดยใช้ BSA เป็นสารละลายมาตรฐาน

### 3.8.5 การทดสอบกิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase ที่คงเหลือ

เจือจางโปรตีนให้มีความเข้มข้น 4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ด้วยบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดตัวอย่างในความเข้มข้นของเกลือที่ต่างกัน ตามที่อธิบายไว้ในข้อ 3.8.4 ปิเปตตัวอย่างโปรตีนที่เจือจางแล้วปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Tris-maleate ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl<sub>2</sub>) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized-water) ให้ได้ปริมาตรรวมเป็น 4.75 มิลลิลิตร วัดกิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase ตามวิธีของ Endoo และ Yongsawatdigul (Endoo & Yongsawatdigul, 2014) กิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase ถูกแสดงในหน่วย  $\mu\text{mol of Pi/mg protein/min}$  กิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase คงเหลือ (%) ของเนื้อซูริมี คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$\text{กิจกรรมของ Ca}^{2+}\text{-ATPase ที่คงเหลือ (\%)} = (A \times 100)/A_0$$

โดยที่ A<sub>0</sub> และ A คือ กิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase ของตัวอย่างที่ไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์และหลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ ตามลำดับ

### 3.8.6 วิเคราะห์ปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl group) และหมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา (reactive sulfhydryl group)

ปิเปตตัวอย่างโปรตีนปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดในแต่ละสภาวะ ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ที่มียูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) สำหรับวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด ในขณะที่หมู่ซัลฟ์ไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาจะใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่มีสารละลายยูเรีย จากนั้นวัดปริมาณของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้ง 2 ชนิดโดยใช้ Ellman's reagent (สารละลาย DTNB เข้มข้น 0.1% ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 7.0) ตามวิธีของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 2003) โดยแสดงในหน่วยของ  $\text{mol}/10^5 \text{ g protein}$

### 3.8.7 การวิเคราะห์ surface hydrophobicity

เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Sodium phosphate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1, 0.21 หรือ 0.43 โมลาร์, pH 7.0) ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีน 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, และ 0.3 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วิเคราะห์ surface hydrophobicity โดยใช้สารละลาย ANS ตามวิธีของ Yongsawatdigul และ Park (Yongsawatdigul & Park, 2003) คำนวณ surface hydrophobicity (S0-ANS) ของตัวอย่างจากค่าความชัน (slope) ของกราฟที่พล็อตระหว่าง relative fluorescence (R) และ สัดส่วนความเข้มข้นของโปรตีน (Monahan et al., 1995)

### 3.8.8 การเตรียมเจลซูริมิ และวิเคราะห์คุณสมบัติของเจล

อัดเนื้อซูริมิใส่ในใส่โพลีไวนิลิดีนคลอไรด์ (polyvinylidene chloride) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร แล้วนำไปต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากให้ความร้อนแล้ว ตัวอย่างจะถูกนำมาแช่ในน้ำเย็นทันทีเป็นเวลา 20 นาที และทิ้งไว้ข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเจลซูริมิออกมาไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนวิเคราะห์เนื้อสัมผัส และสี การวิเคราะห์คุณลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิดำเนินการโดยใช้เครื่อง texture analyzer (TA. XT plus Stable Micro Systems, Surrey, UK) โดยตัดตัวอย่างให้มีความยาว 3 เซนติเมตร วิเคราะห์แรงดึงที่จุดขาด (Breaking force) (g) และระยะทาง (distance) (mm) ด้วย spherical plunger probe ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร ที่ความเร็ว (test speed) 1 mm/s (Yongsawatdigul & Piyadhamviboon, 2004) สำหรับค่าสีของตัวอย่าง ( $L^*$ ,  $a^*$ , และ  $b^*$ ) ดำเนินการโดยใช้เครื่อง Colorimeter (ColorQuest XE, HunterLab, Reston, VA, USA) ค่าความขาว คำนวณโดยใช้สมการ



$L^* - 3b^*$  (Park, 1994) โดยที่  $L^*$  คือค่าความสว่าง (lightness);  $a^*$  คือ ค่าความแดง/เขียว และ  $b^*$  คือ ค่าความเหลือง/น้ำเงิน

### 3.8.9 วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) ที่ละลายใน trichloroacetic acid (TCA)

ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Oligopeptides) ที่ละลายใน trichloroacetic acid (TCA) ดำเนินการวิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Yongsawatdigul และ Piyadhamviboon (Yongsawatdigul & Piyadhamviboon, 2005) นำตัวอย่าง 3 กรัมมาเติม TCA แซ่เย็นเข้มข้น 5% ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นผสมโดยใช้เครื่อง homogenizer และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสสำหรับนำมาวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่ละลายใน TCA ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารละลายมาตรฐาน ปริมาณโปรตีนแสดงในหน่วย  $\mu\text{mol tyrosine/g sample}$

### 3.8.10 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

ละลายเจลซูริมีจำนวน 1 กรัม ในสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และปั่นผสมด้วย homogenizer นำส่วนผสมทั้งหมดมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสมาเจือจางด้วย treatment buffer (สารละลายผสมระหว่าง Tris-HCl เข้มข้น 0.125 โมลลาร์, SDS 4%, และ กลีเซอรอล 20%, pH 6.8) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) จากนั้นนำส่วนผสมทั้งหมดมาให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีและรอให้เย็นก่อนนำมาไหลลงเจล เตรียมเจลอะคริลิไซด์ที่ประกอบด้วยส่วนของ running gel 10% และ stacking gel 4% คำนวณโปรตีนให้มีปริมาณ 20 ไมโครกรัมเพื่อไหลลงบนเจล ตั้งค่าสำหรับการแยกสารโดยใช้แรงดันไฟฟ้าคงที่ 100 โวลต์ จากนั้นเจลที่ได้จะถูกนำมาย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.125% และล้างสีส่วนเกินด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% นำเจลที่ได้มาถ่ายรูปด้วยเครื่อง UVITEC imaging system (Fire reader V4, Uvitec Ltd., Cambridge, UK)

### 3.8.11 การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

วิเคราะห์โครงสร้างลำดับที่สอง (secondary structure) ของโปรตีนโดยใช้เครื่อง FT-IR spectrometer (Bruker Tensor 27, Karlsruhe, Germany) หลังจากนำตัวอย่างไปผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้ว (lyophilization) ตัวอย่างจะถูกนำมาสแกนเป็นจำนวน 64 ครั้งจาก 500 ถึง

4000  $\text{cm}^{-1}$  ที่ความละเอียด 4  $\text{cm}^{-1}$  แถบแคบ (spectra) ถูกวัดที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์ spectra ด้วยโปรแกรม OPUS version 7.5 (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, Germany)

### 3.8.12 การวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM)

วิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค (microstructure) ของเจลซูริมิที่ได้และไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ความเข้มสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่มีสมรรถนะสูง (field emission scanning electron microscope) (ZEISS Gemini, Carl Zeiss, Germany) โดยตัดเจลซูริมิให้มีความหนา 2-3 เซนติเมตร และนำไปทำแห้งด้วยการแช่เยือกแข็ง จากนั้นนำตัวอย่างมาวางลงบน bronze stub โดยใช้เทปคาร์บอน (carbon tape) และเคลือบเป็นฟิล์มบางๆ (sputter-coating) ด้วยทอง จากนั้นสังเกตตัวอย่างที่ค่าแรงดันเร่ง (accelerating voltage) เท่ากับ 3 กิโลโวลต์ (kV) และกำลังขยาย 200 เท่า

### 3.8.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจะนำมาวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน รวมถึงวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS (version 23.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

## 3.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของการสั้นของซูริมิจากปลาเขตร้อน

### 3.9.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างซูริมิจากปลาปากคมแช่แข็ง ได้รับจาก บริษัท อ้นตามันซูริมิ อินดัสทรีส์ จำกัด (สมุทรสาคร, ประเทศไทย) และตัวอย่างซูริมิจากปลาปากคมแช่แข็ง ได้รับจาก บริษัท บริษัท อนุสรณ์มหาชัย จำกัด (สมุทรสาคร, ประเทศไทย) โดยตัวอย่างซูริมิทั้ง 2 ชนิด ไม่มีส่วนผสมของไข่ขาว จากนั้นตัดตัวอย่างให้มีขนาดชิ้นละ 1 กิโลกรัม และเก็บรักษาในตู้แช่เยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) ตลอดระยะเวลาการทดลอง กรดแอสคอร์บิกซื้อจาก บริษัท Northeast Pharmaceutical Group Co., Ltd (Shenyang, China) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 50%) ซื้อจาก บริษัท Ecochem Ltd. (Christchurch, New Zealand) Sodium dodecyl sulfate (SDS) ซื้อจาก บริษัท CARLO ERBA

Reagents (Val de Reuil Cedex, France) สาร 5-5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ซื้อมาจาก บริษัท Acros Organics (New Jersey, USA) และสารเคมีอื่นที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นสารเคมีเกรดสำหรับงานวิเคราะห์

### 3.9.2 การเตรียมเจลซูริมิ

ละลายตัวอย่างซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดง โดยทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็น จากนั้นตัดเป็นลูกบาศก์ขนาด 1 เซนติเมตร สับตัวอย่างด้วยเครื่องบดสับ (Stephan chopper) (UM 5Universal, Stephan U. Söhne GmbH & Co., Hameln, Germany) เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส ระหว่างการสับซูริมิ เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เท่ากับ 2% (w/w) แล้วสับอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 นาที จากนั้นเติมน้ำแข็งเพื่อปรับให้มีความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างเพสท (paste) เท่ากับ 78% (w/w) และสับผสมเป็นเวลา 1 นาที เติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0, 0.1, 0.15, 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0, 0.05, 0.1 และ 0.15% ในระหว่างการเติมน้ำแข็ง ทำให้เป็นสุญญากาศเป็นเวลา 3 นาที และสับต่อด้วยความเร็วสูงเป็นเวลา 3 นาที นำซูริมิเพสท ที่ได้มาบรรจุภายใต้สุญญากาศ และใส่เข้าไป (stuff) ในบรรจุภัณฑ์สำหรับใส่ไส้กรอก (polyvinylidene chloride casings) (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร) โดยใช้เครื่อง vertical sausage stuffer จากนั้นทำการให้ความร้อน 2 วิธี คือ การให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที และอีกวิธีหนึ่งคือ การให้ความร้อนเพื่อเซตตัว (setting) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เจลซูริมิเย็นทันทีด้วยการแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไว้ข้ามคืน ก่อนนำมาวิเคราะห์

### 3.9.3 คุณสมบัติของเจล

วิเคราะห์เนื้อสัมผัสของเจล ด้วยวิธีทดสอบแรงกดทะลุ (empirical punch test) โดยใช้หัววัด spherical probe ขนาด 5 มิลลิเมตร ต่อกับเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Texture Analyzer) (Stable-Micro Systems, TA-XT Plus, Surrey, UK) ใช้ความเร็วการเจาะ (penetration speed) ที่ 1 มิลลิเมตร/วินาที โดยบ่มเจล (equilibrated) ที่อุณหภูมิห้อง ( $25 \pm 2$  องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แล้วตัดให้มีรูปร่างเป็นแท่งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร และยาว 3 เซนติเมตร ก่อนนำมาวัด (Park, 2005) ค่าสีของเจลซูริมิ ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง HunterLab spectrophotometer (ColorQuest XE, Hunter Associates Laboratory, Reston, VA, USA) ในระบบ CIE ค่าความขาวคำนวณโดยใช้สมการคือ  $L^* - 3b^*$  (Park, 1994)

### 3.9.4 การแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE))

วิเคราะห์รูปแบบ (Pattern) ของเจลซูริมิโดยใช้ SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli's (1970) โดยผสม SDS เข้มข้น 10% ที่ร้อน (10 มิลลิลิตร) ในตัวอย่าง (1 กรัม) และปั่นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 2 นาที โดยใช้เครื่องปั่นผสม (an IKA T25D homogenizer) (IKA Works, Inc., Germany) และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการสกัดด้วยการเติมและไม่เติม  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) เข้มข้น 10% แล้วปั่นเหวี่ยงที่  $8,000 \times g$  (Sorvall ST-16B, Thermo Fisher Scientific, Osterode am Harz, Germany) เวลา 20 นาที เพื่อกำจัดเศษตะกอนที่ไม่ละลาย วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของส่วนของเหลวที่ได้หลังปั่นเหวี่ยง (supernatant) ตามวิธี Lowry method (Lowry et al., 1951) สำหรับการวิเคราะห์อิเล็กโตรโฟรีซิส (electrophoresis) นั้น ตัวอย่างที่ไม่เติม  $\beta$ -ME ให้นำของเหลวที่สกัดได้มาผสมกับบัฟเฟอร์ (treatment buffer) ซึ่งประกอบด้วย 0.125 โมลาร์ Tris-Cl, pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol ที่อัตราส่วน 1:1 (v/v) ส่วนตัวอย่างที่เติม  $\beta$ -ME นำมาผสมกับบัฟเฟอร์ที่มี 10%  $\beta$ -ME จากนั้นนำตัวอย่างที่ผสมบัฟเฟอร์แล้ว มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เวลา 5 นาที แล้วเปิดตัวอย่าง (โปรตีน 20 ไมโครกรัม) ลงบน 7.5% polyacrylamide gel โดยใช้เจลส่วนบน (stacking gel) เข้มข้น 4% ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสภายใต้ 100 โวลต์ หลังจากเกิดการแยกของโปรตีน นำเจลที่ได้มาแช่ในสารละลายย้อมสีเข้มข้น 0.125% (w/v) (Coomassie Brilliant Blue R-250 ในเมทานอลเข้มข้น 40% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10%) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้สีหลุดออก (destained) ในเมทานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% จนกระทั่งสังเกตเห็นแถบของโปรตีนได้ชัดเจน บันทึกภาพของเจลโดยใช้เครื่อง UVITEC Gel Documentation System (Uvitec Ltd, Cambridge, UK)

### 3.9.5 วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (Total sulfhydryl group content, TSH)

ตรวจวิเคราะห์หมู่ T-SH ของเจลซูริมิ ตามวิธีของ Ellman's method (Ellman, 1959) โดยใช้สาร 5-5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ทำการละลายโปรตีน โดยปั่นผสม (homogenizing) เจลซูริมิ (0.5 กรัม) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ซึ่งมี 10 มิลลิโมลาร์ EDTA, 2% SDS, และ ยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ผสมอยู่ โดยใช้ความเร็วในการปั่นผสมที่ 11,000 rpm เวลา 2 นาที ด้วยเครื่องปั่นผสม (an IKA T25D homogenizer) (IKA Works, Inc., Germany) จากนั้นนำส่วนสารละลาย (supernatants) (4 มิลลิลิตร) มาผสมกับ 0.1%

DTNB ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ซึ่งมียูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์, 2% SDS และ 10 มิลลิโมลาร์ EDTA ผสมอยู่ ป่มสารผสมที่ได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร (Stone, Staffs, UK) คำนวณหมู่ T-SH โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์การดูดแสง (extinction coefficient) เท่ากับ  $13,600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  ของ 2-nitro-5-triobenzoic acid (TNB)

### 3.9.6 สเปกโตรสโกปีของการสั่น (Vibrational spectroscopy)

ตรวจวัดอินฟราเรดสเปกตรัมในช่วงเลขคลื่นระหว่าง  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  ด้วยเครื่อง FT-IR spectrometer เชื่อมต่อกับ an attenuated total reflectance (ATR) (FT-IR, Platinum ATR, T27/Hyp2000, Bruker Limited, Leipzig, Germany) โดยวางตัวอย่างแห้ง (lyophilized samples) ประมาณ 1 มิลลิกรัมบนผิวของหัววัด ATR crystal และยัดเข้าไปในเครื่อง FT-IR spectrometer วัดสเปกตรัมที่ 64 สแกน ความละเอียด  $4 \text{ cm}^{-1}$  ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) กำจัด background interference และวิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมที่บันทึกได้โดยใช้โปรแกรม OPUS software version 7.0 (Bruker, Leipzig, Germany) ทำ curve-fitting เพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (protein secondary structures) ตามวิธีของ Miller, Bourassa, & Smith, (2013) โดยสเปกตรานั้นผ่านการทำ baseline correction และ normalization ก่อนนำไปวิเคราะห์ผล

รามานสเปกตรัมของซูริมิเพสท (surimi paste)/เจล ตรวจวัดด้วยเครื่อง laser Raman spectrometer (FT-Raman spectrometer, Vertex 70-Ram II, Bruker Limited, Leipzig, Germany) ที่อุณหภูมิห้อง โดยบรรจุตัวอย่างซูริมิในที่ใส่ตัวอย่าง (sample holder) วางในเครื่อง และวัดตัวอย่างที่พลังงานเลเซอร์ 500 มิลลิวัตต์ ความละเอียด (spectral resolution)  $4 \text{ cm}^{-1}$  64 สแกน ในช่วงเลขคลื่น  $400-4000 \text{ cm}^{-1}$  (Kobayashi, Mayer, & Park, 2017) วิเคราะห์ข้อมูลสเปกตรัมที่บันทึกได้โดยใช้โปรแกรม OPUS software version 7.0 ตรวจวัดทั้งหมด 30 สเปกตรัมต่อตัวอย่าง และทำอนุพันธ์อันดับสอง (the second derivatization) โดยใช้ Savitzky-Golay algorithm หลังจากปรับเส้นเรียบ (thirteen-point smoothing) และทำ normalized เพื่อเพิ่ม spectral resolution (Perisic, Afseth, Ofstad, & Kohler, 2011) คำนวณพื้นที่ของพีค (peak area) ของสเปกตรัมที่ผ่านการทำอนุพันธ์อันดับสอง (the second derivative) ในส่วนของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรง (aliphatic residues) ที่เลขคลื่น 2980, 2936, 2874, และ  $1450 \text{ cm}^{-1}$  สารประกอบไฮโดรคาร์บอนแบบวง (aromatic residues) ที่เลขคลื่น 1280, 757, และอัตราส่วนของ  $850/830 \text{ cm}^{-1}$

### 3.9.7 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA)

นำสเปกตรัมที่ผ่านการทำอนุพันธ์อันดับสอง (second derivatization) โดยใช้ the Savitzky-Golay algorithm หลังจากปรับเส้นเรียบ (thirteen-point smoothing) และทำ normalized ด้วย Extended Multiplicative Signal Correlation (EMSC) (Thumanu et al., 2014) ของแต่ละตัวอย่าง (30 spectra) มาวิเคราะห์ PCA โดยใช้ the Unscrambler X software (version 10.5, CAMO's software AS, Oslo, Norway) ที่สเปกตรัมช่วงเลขคลื่น 3500-2800  $\text{cm}^{-1}$  และ 1700-500  $\text{cm}^{-1}$  ใช้ข้อมูลจากกราฟ loading plot ในการเลือกช่วงสเปกตรัมที่ทำให้ข้อมูลเกิดความแปรปรวนมากที่สุด นอกจากนี้ยังนำค่าตรวจวัดทางเคมี-กายภาพ (physicochemical data) โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (secondary structure) การเปลี่ยนแปลงของหมู่ไฮโดรคาร์บอนสายตรงและแบบวง (aliphatic and aromatic groups) จาก FT-Raman และค่าเลขคลื่นของ FT-IR ที่ได้จากกราฟ loading plot มาวิเคราะห์ PCA ร่วมกัน เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของเจลและข้อมูลจากสเปกโตรสโกปีของการสั่น ซึ่งเป็นผลจากชนิดของซูรีมิและการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

### 3.9.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ประเมินผลของความเข้มข้นของกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อคุณสมบัติการเกิดเจลของซูรีมิ โดยใช้ IBM SPSS software (SPSS 20.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, US) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance, ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบทางสถิติ และใช้วิธี Duncan's multiple range tests เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและอภิปรายผล

#### 4.1 ขาวขึ้นรูปเสริมโปรตีน ไฟเบอร์และโปรตีนผสมไฟเบอร์

##### 4.1.1 ผลของการเติมโปรตีนและใยอาหารต่อ

##### 4.1.1.1 ผลการวิเคราะห์ค่าสี ( $L^*$ $a^*$ $b^*$ )

จากการวิเคราะห์ค่าสีของตัวอย่างขาวขึ้นรูป พบว่าค่า  $L^*$  (ค่าความสว่าง),  $a^*$  (ค่าสีแดง) และ  $b^*$  (ค่าสีเหลือง) ของตัวอย่าง control, 10SPI, 20SPI, 10WPI, 20WPI, 10FS, 20FS, 20HM, 40HM และ 10FS20HM มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งค่า  $L^*$  เป็นค่าที่บ่งบอกถึงความสว่าง โดยที่ค่าตั้งแต่ 0-100 ซึ่งค่า 0 หมายถึงสีดำ และ 100 หมายถึงสีขาว ซึ่งจะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่มีการเติม fiber sol ทำให้ตัวอย่างขาวขึ้นรูปมีค่า  $L^*$  มากที่สุด ซึ่งแสดงว่าตัวอย่างมีความขาวที่สุด ส่วนค่า  $a^*$  และ  $b^*$  เป็นค่าที่ใช้กำหนดสีที่ประสานตามนุษย์รับรู้ โดยที่ค่า  $a$  เป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีออกแดง ค่า  $a$  เป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีออกเขียว ส่วนค่า  $b$  เป็นบวก หมายถึงวัตถุมีสีออกเหลือง และค่า  $b$  เป็นลบ หมายถึงวัตถุมีสีออกน้ำเงิน ซึ่งจากการทดลองนี้ค่า  $a^*$  และ  $b^*$  มีค่าเป็นบวกทั้งหมดแสดงว่าสีของตัวอย่างขาวขึ้นรูปทั้งหมดมีสีออกไปทางแดงและเหลือง โดยแต่ละตัวอย่างก็จะมีค่า  $a^*$  และ  $b^*$  มากหรือน้อยแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับส่วนผสมที่เติมเข้าไป ซึ่งตัวอย่าง control, 10FS และ 20FS มีค่า  $a^*$  น้อยที่สุด แสดงว่ามีสีออกเหลืองอ่อนที่สุด และการเติม fiber sol ไม่ได้ทำให้สีของขาวขึ้นรูปที่ได้แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม และตัวอย่าง control และตัวอย่าง 10FS มีค่า  $b^*$  ต่ำที่สุดและไม่แตกต่างกันในทางสถิติ แสดงว่าสีออกแดงน้อยที่สุดและการเติม fiber sol ปริมาณ 10% ไม่ได้ทำให้สีของขาวขึ้นรูปแตกต่างจากตัวอย่างควบคุม แต่การเติม SPI ปริมาณ 20% ส่งผลให้ค่า  $a^*$  และ  $b^*$  สูงที่สุด เนื่องจาก SPI มีสีออกเหลืองอยู่แล้วดังนั้นเมื่อนำมาเป็นส่วนประกอบในขาวขึ้นรูปจึงส่งผลให้ขาวขึ้นรูปที่ได้มีสีเหลืองเข้มขึ้นด้วย

ตารางที่ 4.1 ค่าสี ( $L^*$ ,  $a^*$  และ  $b^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป

| ตัวอย่างที่ | ตัวอย่าง      | เวลาที่ใช้หุง<br>(min) | ข้าวต่อน้ำที่ใช้หุง ( $g_{น้ำ}/g_{ข้าว}$ ) |
|-------------|---------------|------------------------|--|
| 1           | Control       | 16±1 <sup>bc</sup>     | 1.8 <sup>de</sup>                          |
| 2           | 10SPI         | 17±0 <sup>bc</sup>     | 1.9 <sup>e</sup>                           |
| 3           | 20SPI         | 20±5 <sup>c</sup>      | 1.9 <sup>e</sup>                           |
| 4           | 10WPI         | 18±1 <sup>bc</sup>     | 1.7 <sup>de</sup>                          |
| 5           | 20WPI         | 18±1 <sup>bc</sup>     | 1.7 <sup>de</sup>                          |
| 6           | 10FS          | 14±1 <sup>ab</sup>     | 1.4 <sup>bc</sup>                          |
| 7           | 20FS          | 11±1 <sup>a</sup>      | 1.2 <sup>a</sup>                           |
| 8           | 20HM          | 18±1 <sup>bc</sup>     | 1.7 <sup>de</sup>                          |
| 9           | 40HM          | 17±1 <sup>bc</sup>     | 1.6 <sup>cd</sup>                          |
| 10          | 10FS20HM      | 15±1 <sup>b</sup>      | 1.4 <sup>ab</sup>                          |
| 11          | 20WPI20HM10FS | 10±1 <sup>a</sup>      | 1.6 <sup>cd</sup>                          |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.2 เวลาและปริมาณน้ำที่ใช้หุงของข้าวขึ้นรูป

| ตัวอย่าง | $L^*$                    | $a^*$                 | $b^*$                   |
|----------|--------------------------|-----------------------|-------------------------|
| Control  | 62.4±1.2 <sup>bcd</sup>  | 0.6±0.0 <sup>ab</sup> | 13.7±0.4 <sup>a</sup>   |
| 10SPI    | 58.3±0.3 <sup>ab</sup>   | 2.9±0.2 <sup>e</sup>  | 20.9±0.1 <sup>ef</sup>  |
| 20SPI    | 58.5±0.6 <sup>ab</sup>   | 5.2±0.4 <sup>f</sup>  | 23.4±0.3 <sup>g</sup>   |
| 10WPI    | 60.5±1.9 <sup>abcd</sup> | 1.7±0.8 <sup>cd</sup> | 22.2±0.4 <sup>fg</sup>  |
| 20WPI    | 59.0±1.4 <sup>abc</sup>  | 2.7±0.4 <sup>e</sup>  | 20.2±2.6 <sup>def</sup> |
| 10FS     | 63.9±0.1 <sup>d</sup>    | 0.4±0.3 <sup>a</sup>  | 15.7±0.7 <sup>ab</sup>  |
| 20FS     | 63.5±0.2 <sup>d</sup>    | 0.2±0.1 <sup>a</sup>  | 19.3±0.4 <sup>cde</sup> |
| 20HM     | 60.5±4.1 <sup>abcd</sup> | 1.3±0.3 <sup>bc</sup> | 17.4±1.8 <sup>bc</sup>  |
| 40HM     | 57.6±1.3 <sup>a</sup>    | 2.2±0.2 <sup>de</sup> | 17.6±0.6 <sup>bc</sup>  |



|               |                         |                       |                         |
|---------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------|
| 10FS20HM      | 58.9±2.7 <sup>abc</sup> | 1.8±0.4 <sup>cd</sup> | 18.0±0.1 <sup>bcd</sup> |
| 20WPI20HM10FS | 63.0±0.7 <sup>cd</sup>  | 2.6±0.1 <sup>e</sup>  | 20.6±0.2 <sup>ef</sup>  |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.1.1.2 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางการหุงต้ม (Cooking properties)

ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางการหุงต้มของข้าวขึ้นรูป โดยการหุงระยะเวลาที่ใช้ในการหุงข้าวจนสุก ซึ่งตรวจสอบโดยการกดด้วยกระจกแล้วไม่มีไตแข็งตรงกลางของเม็ดข้าว พบว่าเวลาที่ใช้ในการหุงข้าวขึ้นรูปจะอยู่ในช่วง 10-20 นาที ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยตัวอย่าง 20WPI20HM10FS ใช้ระยะเวลาในการหุงให้สุกน้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากมีการมีการเติมส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แป้งลงไปถึง 40% ทำให้มีแป้งเป็นองค์ประกอบอยู่เพียง 60% จึงใช้เวลาในการทำให้สุกน้อยที่สุด

ผลของปริมาณน้ำที่ใช้หุง พบว่า ตัวอย่าง control, 10SPI, 20SPI, 10WPI, 20WPI และ 20HM มีปริมาณน้ำที่ใช้หุงเท่ากับ 1.8, 1.9, 1.9, 1.7, 1.7 และ 1.7 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยการที่เติม Soy protein isolate นั้นทำให้ใช้ปริมาณน้ำที่ใช้ในการหุงข้าวมากที่สุด คือ 1.9 เนื่องจาก Soy protein มีคุณสมบัติในการจับกับน้ำได้ดี (คีนจันท์, 2560) นั่นคือดูดน้ำมากขึ้น จึงใช้น้ำและเวลาในการหุงมากกว่าสูตรอื่น ๆ ส่วน hi-maize เป็น RS2 จึงมีปริมาณแป้งใกล้เคียงกับ control จึงให้ปริมาณน้ำที่ใช้หุงใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณน้ำที่ใช้หุงของตัวอย่าง 10FS, 20FS, 40HM, 10FS20HM และ 20WPI20HM10FS ที่เท่ากับ 1.4, 1.2, 1.6, 1.4 และ 1.6 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณน้ำที่ใช้หุงน้อยกว่า เนื่องจาก ปริมาณแป้งที่มีในสูตรมีส่วนลดลง จึงดูดน้ำเข้าไปได้น้อย เมื่อเทียบกับ control

#### 4.1.1.3 ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของข้าวขึ้นรูปสุก

จากการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุกด้วยการกดแบบเมล็ดเดียว ให้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.3 พบว่าค่า Hardness ของตัวอย่าง control, 10SPI, 10WPI, 10FS, 20FS, และ 20HM เท่ากับ 2,012, 2,002, 2,027, 2,039 และ 1,929 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แสดงให้เห็นว่าการเติม ingredients อื่น ๆ ที่ 10% นั้นไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสของข้าวขึ้นรูป และการเติม fiber sol เพิ่มขึ้นเป็น 20% ก็ไม่ได้ทำให้ค่า Hardness ของข้าวขึ้นรูปแตกต่างไปจากตัวอย่าง control เช่นกัน อาจเนื่องจาก fiber sol นั้นมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี จึงส่งผลให้ฟอร์มเจลกับแป้งได้ดี และค่า Hardness ของตัวอย่าง 20SPI, 20WPI, 40HM และ 10FS20HM มีค่าเท่ากับ 1,751, 1,797, 1,580 และ 1,671 ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่ม

ingredients อื่น ๆ เป็น 20% นั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสค่า Hardness ลดลง เนื่องจาก Soy protein isolate กับ Whey protein isolate นั้นเข้าไปขัดขวางการเกิดเจลของแป้ง ส่งผลให้เจลของข้าวขึ้นรูปที่ได้มีความอ่อนตัวตัวอย่าง control และค่า Hardness ของตัวอย่าง 20WPI20HM10FS มีค่าน้อยที่สุด (1,219 N) แสดงว่าข้าวขึ้นรูปนี้มีความอ่อนนุ่มมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่น ๆ อาจเนื่องจากการเติม ingredients อื่น ๆ ในปริมาณมาก (โปรตีน 20% และไฟเบอร์ 20%) อาจไปขัดขวางการเกิดเจลของสตาร์ช ทำให้ความแข็งแรงของเจลแป้งลดลง

#### ตารางที่ 4.3 ค่าความแข็ง (Hardness) ของข้าวขึ้นรูป


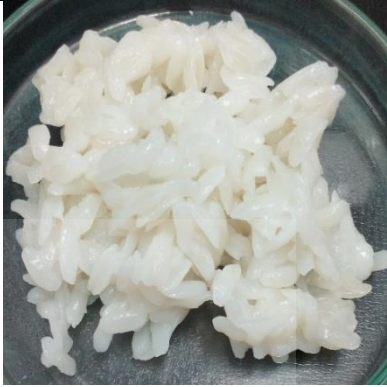






| ตัวอย่าง      | Hardness (N)           |
|---------------|------------------------|
| Control       | 2,012±45 <sup>e</sup>  |
| 10SPI         | 2,002±36 <sup>e</sup>  |
| 20SPI         | 1,751±60 <sup>cd</sup> |
| 10WPI         | 2,027±14 <sup>e</sup>  |
| 20WPI         | 1,797±25 <sup>d</sup>  |
| 10FS          | 2,039±31 <sup>e</sup>  |
| 20FS          | 1,929±74 <sup>e</sup>  |
| 20HM          | 1,943±46 <sup>e</sup>  |
| 40HM          | 1,580±51 <sup>b</sup>  |
| 10FS20HM      | 1,671±37 <sup>bc</sup> |
| 20WPI20HM10FS | 1,219±102 <sup>a</sup> |









หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

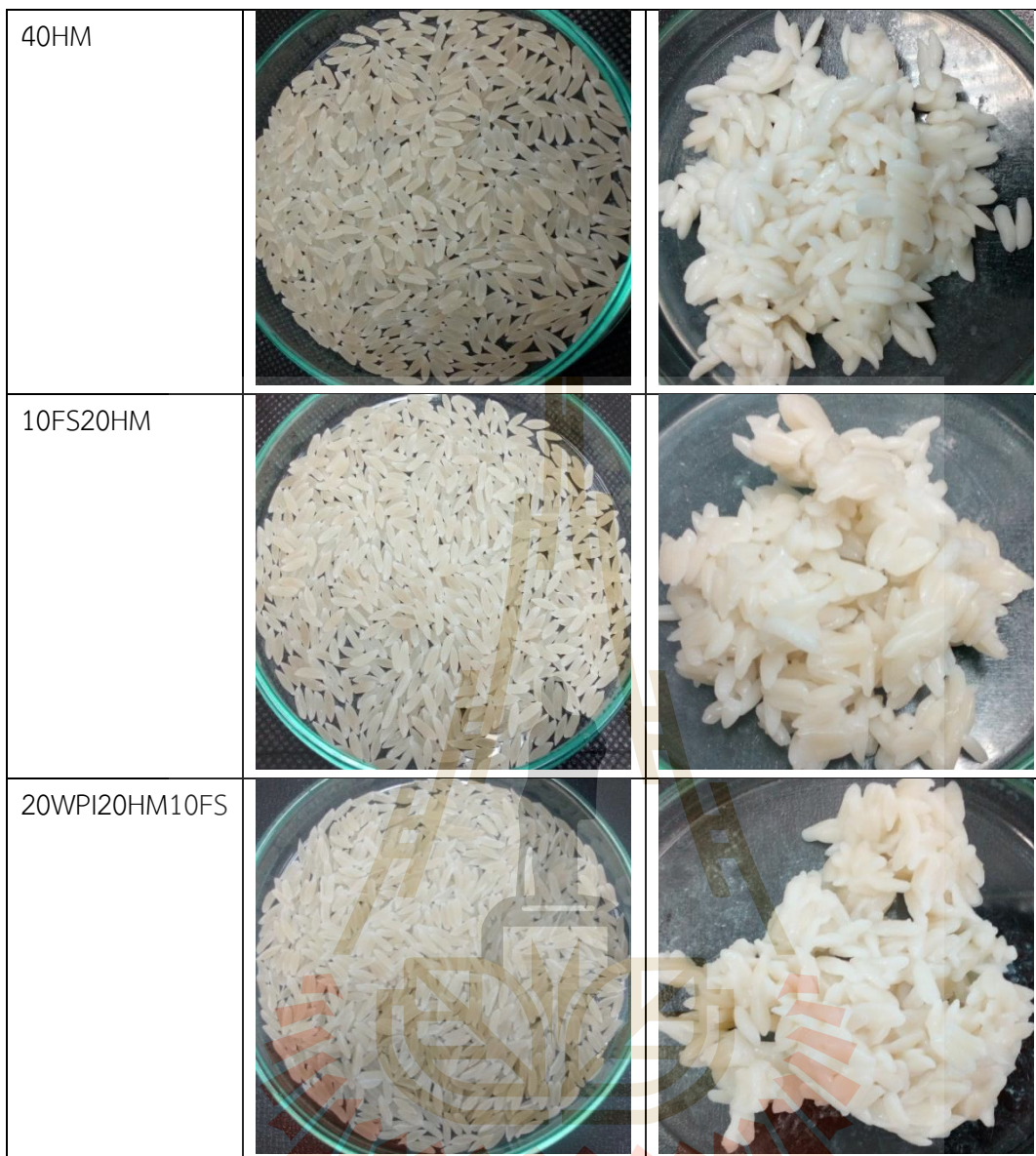
#### 4.1.1.4 แสดงลักษณะปรากฏของข้าวขึ้นรูปด้วยภาพถ่าย

ข้าวขึ้นรูปที่ได้จากแป้งข้าวผสม ingredients ตามสูตรต่าง ๆ เมื่อทำการเอกซ์ทรูชันแล้วได้ข้าวขึ้นรูปที่มีลักษณะที่เหมือนหรือคล้ายคลึงกับข้าวสาร โดยใช้หน้าแปลนที่ออกแบบมาเป็นรูปเมล็ดข้าว และเมื่อนำหุงสุกก็น่าจะมีลักษณะที่เหมือนหรือคล้ายกับข้าวหุงสุกเช่นกัน ดังที่แสดงในตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ลักษณะปรากฏข้าวขึ้นรูปที่เป็นข้าวสารและข้างหุงสุก

| ตัวอย่าง | ข้าวขึ้นรูป   | ข้าวขึ้นรูปสุก   |
|----------|---|--|
| control  |    |    |
| 10SPI    |   |   |
| 20SPI    |  |  |
| 10WPI    |  |  |

|       |   |  |
|-------|---|--|
| 20WPI |    |    |
| 10FS  |   |   |
| 20FS  |  |  |
| 20HM  |  |  |



#### 4.1.1.5 การย่อยของข้าวชั้นรูปหุงสุก

จากการทดสอบการย่อย เพื่อหาค่าดัชนีน้ำตาล (eGI) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการจัดจำแนกอาหารตามอัตราในการดูดซับคาร์โบไฮเดรต โดยตรวจติดตามปริมาณน้ำตาลในเลือดที่เพิ่มขึ้นหลังจากรับประทานอาหารเปรียบเทียบกับอาหารมาตรฐาน (Foster-Powell and Miller, 1995) ซึ่งจะสามารถแบ่งกลุ่มอาหารที่เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตตามค่า GI ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ Low GI คือมีค่า GI น้อยกว่าหรือเท่ากับ 55, Medium GI คือมีค่า GI อยู่ในช่วง 56-69 และ High GI คือมีค่า GI มากกว่าหรือเท่ากับ 70 ซึ่งจากการตรวจวิเคราะห์จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่มีการเติม ingredient อื่น ๆ เพิ่มลงไป ทำให้ข้าวชั้นรูปมีค่า eGI ลดลงต่ำกว่า control (high GI) ไปอยู่ในช่วงปานกลางถึงต่ำ (ดังตารางที่ 4.5) ซึ่งที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากการเติม ingredient อื่น ๆ ลงไป ทำให้ข้าวชั้นรูปมีปริมาณแป้งลดลง และ ingredient บางตัวยังไปช่วยเสริมโครงสร้างเจลแป้งให้มีความแข็งแรงมากขึ้น หรืออาจ

ไปฟอร์มโครงสร้างกับสตาร์ช จนเป็นผลให้เอนไซม์เข้าไปย่อยสตาร์ชได้ยากขึ้น การเติมโปรตีนหรือไฟเบอร์ระดับ 10-20% ส่งผลต่อค่า eGI ไม่แตกต่างกัน ตัวอย่างกลุ่มที่มีการเติม Hi maize มีค่า eGI ต่ำที่สุด เนื่องจาก hi maize มีคุณสมบัติเป็น resistant starch ประเภทที่ 2 ที่มีปริมาณ RS อยู่ประมาณ 50% อีกทั้งยังมีค่า gelatinization temperature ที่สูงมากกว่า 100 องศาเซลเซียส ดังนั้นเมื่อหุงที่อุณหภูมิน้ำเดือด จึงอาจมาแบ่ง hi maize บางส่วนที่ไม่เจลาทีไนซ์ ส่งผลให้เอนไซม์ย่อยได้ยากขึ้น และตัวอย่างในกลุ่มที่เติม fiber sol มีค่า eGI สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มตัวอย่างที่มีการเติมส่วนประกอบอื่นเพิ่มเข้าไป ซึ่งอาจเป็นผลจาก fiber sol เป็นใยอาหารชนิดละลายน้ำซึ่งอาจจะละลายออกมาอยู่ในส่วนของส่วนของสารละลายในระหว่างการทดสอบจึงไม่มีผลในการไปขัดขวางการย่อยของเอนไซม์

#### ตารางที่ 4.5 ค่า eGI ของข้าวขึ้นรูปหุงสุก

| ตัวอย่าง      | eGI                    |
|---------------|------------------------|
| control       | 86.2±5.6 <sup>e</sup>  |
| 10SPI         | 63.1±2.3 <sup>c</sup>  |
| 20SPI         | 55.7±1.4 <sup>ab</sup> |
| 10WPI         | 58.4±0.6 <sup>b</sup>  |
| 20WPI         | 58.0±0.9 <sup>b</sup>  |
| 10FS          | 69.7±1.2 <sup>d</sup>  |
| 20FS          | 68.0±3.1 <sup>d</sup>  |
| 20HM          | 52.5±0.4 <sup>a</sup>  |
| 40HM          | 53.2±1.3 <sup>a</sup>  |
| 10FS20HM      | 56.9±1.3 <sup>b</sup>  |
| 20WPI20HM10FS | 59.1±0.2 <sup>b</sup>  |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.1.1.6 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส scoring test

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสในเบื้องต้นเพื่อใช้ในการคัดเลือกตัวอย่างข้าวชั้นรูปหุงสุกที่ให้ลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสใกล้เคียงข้าวหุงสุก โดยใช้การทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบอภิปรายกลุ่ม พบว่าตัวอย่างที่กลุ่มผู้ทดสอบให้ความเห็นว่ามีลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสคล้ายข้าวสุกมากที่สุด ได้แก่ ตัวอย่าง 40HM, 20FS และ 10FS20HM จากนั้นจึงนำกลุ่มตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกมาทำการทดสอบประสาทสัมผัสแบบ scoring และ hedonic scale test ในด้านประสาทสัมผัสด้านสี, ลักษณะปรากฏ, กลิ่นรส และ aftertaste ของตัวอย่าง พบว่า 40HM, 20FS และ 10FS20HM มีระดับคะแนนที่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% (แสดงดังตารางที่ 4.6) โดยที่ตัวอย่าง 40HM มีคะแนนอยู่ที่ 3.50 คือมีสีขาวปานกลาง, 10FS20HM มีคะแนน 5.20 นั่นคือมีสีขาวอมเหลือง และ 20FS ที่มีคะแนน 6.57 มีสีเหลืองเล็กน้อย

ตารางที่ 4.6 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสแบบระดับคะแนน scoring test\* ในข้าวชั้นรูปสุก

| ลักษณะทาง    | ตัวอย่าง               |                        |                        |
|--------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ประสาทสัมผัส | 40HM                   | 20FS                   | 10FS20HM               |
| Color        | 3.50±1.53 <sup>a</sup> | 6.57±1.14 <sup>c</sup> | 5.20±1.47 <sup>b</sup> |
| Appearance   | 4.93±2.38 <sup>a</sup> | 6.63±1.88 <sup>b</sup> | 6.27±1.84 <sup>b</sup> |
| Flavor       | 5.04±1.93 <sup>a</sup> | 6.13±1.61 <sup>b</sup> | 6.00±1.58 <sup>b</sup> |
| Texture      | 2.97±1.38 <sup>a</sup> | 3.43±1.63 <sup>a</sup> | 2.97±1.25 <sup>a</sup> |
| Aftertaste   | 6.79±1.42 <sup>b</sup> | 5.64±1.73 <sup>a</sup> | 5.81±1.49 <sup>a</sup> |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) \*ระดับคะแนน scoring test แบบ 9-point

ส่วนคะแนนด้านลักษณะปรากฏของตัวอย่าง 20FS และ 10FS20HM มีคะแนนเท่ากับ 6.63 และ 6.27 แสดงว่าตัวอย่าง 20FS และ 10FS20HM มีรูปร่างเหมือนข้าวสุกเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ 40HM (4.93) ที่มีรูปร่างไม่เหมือนข้าวสุกเล็กน้อย ด้านระดับคะแนนกลิ่นรสของตัวอย่าง 40HM (5.04) มีระดับคะแนนน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับ 20FS และ 10FS20HM ที่มีคะแนน 6.13 และ 6.00 แสดงว่าตัวอย่าง 40HM มีกลิ่นรสไม่เหมือนข้าวสุกเล็กน้อย และระดับคะแนนด้าน aftertaste ของตัวอย่าง 40HM มีคะแนนเท่ากับ 6.79 นั่นคือมีกลิ่นและรสชาติแป้งหลังการกรกลิ่นมากกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่าง

20FS และ 10FS20HM ส่วนคะแนนเนื้อสัมผัส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นที่ 95%

#### 4.1.1.7 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส *hedonic scale test*

จากการประเมินทางประสาทสัมผัสความชอบในด้านต่าง ๆ ของตัวอย่าง 40HM, 20FS และ 10FS20HM (ดังแสดงในตารางที่ 4.7) พบว่าความชอบด้านสี, ลักษณะปรากฏ และ เนื้อสัมผัส ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่ผลการประเมินความชอบด้านกลิ่นรสของตัวอย่าง 40HM มีคะแนนความชอบน้อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการประเมินแบบระดับคะแนน (scoring) เนื่องจากระดับคะแนน ของ 40HM อยู่ในระดับเฉย ๆ (ในตารางที่ 4.6) คือมีกลิ่นรสเหมือนข้าวสุกเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 4.7 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านความชอบ *hedonic test*\* ในข้าวขึ้นรูปสุก

| ลักษณะทาง             | ตัวอย่าง               |                         |                         |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| ประสาทสัมผัส          | 40HM                   | 20FS                    | 10FS20HM                |
| Color                 | 4.77±1.91 <sup>a</sup> | 4.83±1.79 <sup>a</sup>  | 5.27±1.53 <sup>a</sup>  |
| Appearance            | 5.27±2.20 <sup>a</sup> | 5.03±1.92 <sup>a</sup>  | 5.40±1.79 <sup>a</sup>  |
| Flavor                | 4.90±1.67 <sup>a</sup> | 6.03±1.43 <sup>b</sup>  | 5.80±1.63 <sup>b</sup>  |
| Texture               | 5.23±1.87 <sup>a</sup> | 6.03±1.64 <sup>a</sup>  | 5.97±1.73 <sup>a</sup>  |
| Aftertaste            | 4.43±1.50 <sup>a</sup> | 5.03±1.43 <sup>b</sup>  | 5.03±1.56 <sup>ab</sup> |
| Overall acceptability | 4.90±1.85 <sup>a</sup> | 5.42±1.39 <sup>ab</sup> | 5.87±1.17 <sup>b</sup>  |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ระดับคะแนนความชอบแบบ 9-point

ส่วนความชอบด้าน aftertaste ของตัวอย่าง 40HM, 20FS และ 10FS20HM เท่ากับ 4.43, 5.03 และ 5.03 ซึ่งการยอมรับด้าน aftertaste ของตัวอย่าง 40HM มีคะแนนน้อยที่สุด เนื่องมาจากระดับคะแนน (scoring) ของตัวอย่าง 40HM มีค่าเท่ากับ 6.79 (ตารางที่ 4.6) นั่นคือมีกลิ่นและรสชาติแปร่งเล็กน้อย ทำให้เป็นตัวอย่างที่การยอมรับได้น้อย ส่วนการประเมินความชอบโดยรวมของทั้ง 3 ตัวอย่าง พบว่า 10FS20HM นั้นมีคะแนนเท่ากับ (5.87) ความชอบโดยรวมอยู่ระดับกลาง ๆ แต่มากที่สุดเมื่อเทียบกับ ตัวอย่าง 40HM กับ 20FS



#### 4.1.1.8 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัส ประเมินอายุการเก็บระยะเวลา 6 เดือน ในตัวอย่างสูตร ที่ 11: 20WPI20HM10FS

ตัวอย่างในสูตรที่ 11 คือ 20WPI20HM10FS เป็นตัวแทนของจ๊วอย่างที่ถูกเลือกมาใช้ในการทดสอบหาอายุการเก็บรักษา เนื่องจากเป็นสูตรนี้มีการเติมทั้งโปรตีนและไฟเบอร์ในปริมาณสูงที่สุด และติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเก็บรักษาโดยการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านสีและกลิ่นที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยวิธี scoring test แบบ 5-point และประเมินผลการยอมรับของผู้ทดสอบ ในตัวอย่างข้าวขึ้นรูปและข้าวหุงสุก โดย แบ่งการทดสอบเป็น 3 สถานะการเก็บคือ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจากผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสด้านสีของข้าวขึ้นรูปแบบ scoring test (ดังแสดงในตารางที่ 4.8) พบว่าคะแนนด้านสีของข้าวขึ้นรูปที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียสตลอดการเก็บ 180 วัน มีการเปลี่ยนแปลงสีเข้มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวันแรกที่คะแนนเท่ากับ 1 คือสี Beige ซึ่งสอดคล้องกับผลค่าสีแดง (a\*) ของข้าวขึ้นรูปที่ 4 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.2) คือค่าสีแดงไม่เปลี่ยนแปลงเลยเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ส่วนข้าวขึ้นรูปที่ 27 องศาเซลเซียสตลอดการเก็บ 180 วัน มีคะแนนสีเท่ากับ 2.58 เมื่อเทียบกับแถบสีอ้างอิงอยู่ระหว่าง Beige แต่ยังไม่ถึง Sepia และข้าวขึ้นรูปที่ 45 องศาเซลเซียสมีคะแนนสี 4.92 แสดงว่าสีของข้าวขึ้นรูปที่ 45 องศาเซลเซียสมีสีระดับ Sepia ในแถบสีอ้างอิง

ตารางที่ 4.8 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องสี แบบ scoring test\* ในข้าวขึ้นรูป

| Day | คะแนนเฉลี่ยด้าน Color |                 |                 |
|-----|-----------------------|-----------------|-----------------|
|     | 4 องศาเซลเซียส        | 27 องศาเซลเซียส | 45 องศาเซลเซียส |
| 0   | 1.00±0.00             | 1.00±0.00       | 1.00±0.00       |
| 15  | 1.00±0.00             | 1.00±0.00       | 1.08±0.29       |
| 30  | 1.00±0.00             | 1.42±0.51       | 3.33±0.49       |
| 45  | 1.92±0.51             | 1.58±0.51       | 3.67±0.65       |
| 60  | 2.00±0.00             | 2.12±0.39       | 3.92±0.51       |
| 75  | 2.00±0.43             | 2.25±0.45       | 4.17±0.39       |
| 90  | 1.75±0.62             | 2.17±0.72       | 4.42±0.51       |
| 105 | 1.75±0.62             | 2.17±0.58       | 4.42±0.67       |
| 120 | 2.00±0.43             | 2.33±0.65       | 4.58±0.51       |
| 135 | 1.58±0.51             | 2.50±0.52       | 4.75±0.45       |

|     |           |           |           |
|-----|-----------|-----------|-----------|
| 150 | 2.00±0.74 | 2.58±0.67 | 4.67±0.49 |
| 165 | 2.00±0.60 | 2.67±0.78 | 4.92±0.29 |
| 180 | 1.83±0.58 | 2.58±0.51 | 4.92±0.29 |

หมายเหตุ: \*ระดับคะแนนแบบ 5-point

การประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่น โดยวิธี scoring test แบบ 5-point ตลอดการเก็บ 180 วัน (ตารางที่ 4.9) พบว่าตัวอย่างข้าวขึ้นรูปทั้ง 3 สภาวะการเก็บ คือ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส มีคะแนนประเมินเฉลี่ยเท่ากับ 1.08, 1.08 และ 1.25 ตามลำดับ ซึ่งยังอยู่ในระดับกลิ่นปกติ

ตารางที่ 4.9 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่น แบบ scoring test\* ในข้าวขึ้นรูป

| Day | คะแนนเฉลี่ยด้าน Flavor |                 |                 |
|-----|------------------------|-----------------|-----------------|
|     | 4 องศาเซลเซียส         | 27 องศาเซลเซียส | 45 องศาเซลเซียส |
| 0   | 1.00±0.00              | 1.00±0.00       | 1.00±0.00       |
| 15  | 1.00±0.00              | 1.00±0.00       | 1.00±0.00       |
| 30  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.08±0.29       |
| 45  | 1.25±0.45              | 1.08±0.29       | 1.17±0.39       |
| 60  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.17±0.58       |
| 75  | 1.25±0.45              | 1.17±0.39       | 1.17±0.39       |
| 90  | 1.17±0.39              | 1.17±0.39       | 1.17±0.39       |
| 105 | 1.08±0.29              | 1.25±0.45       | 1.17±0.39       |
| 120 | 1.17±0.39              | 1.08±0.29       | 1.08±0.29       |
| 135 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.33±0.49       |
| 150 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.08±0.29       |
| 165 | 1.17±0.39              | 1.08±0.29       | 1.00±0.00       |
| 180 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.25±0.62       |

หมายเหตุ: \*ระดับคะแนนแบบ 5-point

จากการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับโดยรวมของข้าวขึ้นรูป (แสดงในตารางที่ 4.10) พบว่าการเก็บรักษาที่สภาวะการเก็บรักษาที่ 4 และ 27 องศาเซลเซียส ผู้ประเมินให้การยอมรับลักษณะโดยรวมทั้ง 12 คน ส่วนที่สภาวะการเก็บรักษา 45 องศาเซลเซียสในวันที่ 180 ผู้ประเมิน

สามารถยอมรับได้เพียง 3 คน แต่มี 9 คน และผู้ประเมินไม่สามารถยอมรับลักษณะโดยรวมได้ โดยให้เหตุผลว่า ข้าวขึ้นรูปมีสีน้ำตาลแดงเข้มกว่ามากเมื่อเทียบกับวันแรกและลักษณะเม็ดข้าวไม่น่ารับประทาน

**ตารางที่ 4.10** ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับโดยรวมของข้าวขึ้นรูปที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

| Day | Overall acceptability (คน) |        |                 |        |                 |        |
|-----|----------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
|     | 4 องศาเซลเซียส             |        | 27 องศาเซลเซียส |        | 45 องศาเซลเซียส |        |
|     | accept                     | reject | accept          | reject | accept          | reject |
| 0   | 12                         | -      | 12              | -      | 12              | -      |
| 15  | 12                         | -      | 12              | -      | 10              | 2      |
| 30  | 12                         | -      | 12              | -      | 11              | 1      |
| 45  | 12                         | -      | 12              | -      | 8               | 4      |
| 60  | 12                         | -      | 12              | -      | 7               | 5      |
| 75  | 12                         | -      | 12              | -      | 6               | 6      |
| 90  | 12                         | -      | 12              | -      | 6               | 6      |
| 105 | 12                         | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 120 | 12                         | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 135 | 12                         | -      | 12              | -      | 5               | 7      |
| 150 | 12                         | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 165 | 12                         | -      | 12              | -      | 5               | 7      |
| 180 | 12                         | -      | 12              | -      | 3               | 9      |

ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่นโดยวิธี scoring test แบบ 5-point ตลอดการเก็บ 180 วัน พบว่าตัวอย่างข้าวขึ้นรูปทั้ง 3 สภาวะการเก็บนำมาหุงสุก มีคะแนนประเมินเฉลี่ยเท่ากับ 1.00, 1.00 และ 1.17 ตามลำดับ (ดังแสดงในตารางที่ 4.11) ซึ่งยังอยู่ในระดับกลิ่นปกติ ส่วนการยอมรับเรื่องสีของข้าวขึ้นรูปสุก (ตารางที่ 4.12) ที่สภาวะการเก็บรักษา 4 องศาเซลเซียส มีจำนวนผู้ที่สามารถยอมรับเรื่องสีได้ทั้งหมด 12 คน ที่สภาวะการเก็บรักษา 27 องศาเซลเซียส มีจำนวนผู้ที่สามารถยอมรับเรื่องสีได้ 10 คน และ 2 คน ไม่สามารถยอมรับเรื่องสีได้โดยให้เหตุผลว่า เริ่มเปลี่ยนเป็นสี

น้ำตาลแดง และที่สภาวะการเก็บรักษา 45 องศาเซลเซียส มีจำนวนผู้ที่สามารถยอมรับเรื่องสีได้เพียง 2 คน และไม่สามารถยอมรับเรื่องสีได้ 10 คน เนื่องจาก มีสีเข้มและคล้ำกว่าวันแรกมาก

**ตารางที่ 4.11** ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสเรื่องกลิ่น โดยวิธี scoring test\* ในข้าวขึ้นรูปสุก ที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

| Day | คะแนนเฉลี่ยด้าน Flavor |                 |                 |
|-----|------------------------|-----------------|-----------------|
|     | 4 องศาเซลเซียส         | 27 องศาเซลเซียส | 45 องศาเซลเซียส |
| 0   | 1.00±0.00              | 1.00±0.00       | 1.00±0.00       |
| 15  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.33±0.65       |
| 30  | 1.00±0.00              | 1.08±0.29       | 1.17±0.39       |
| 45  | 1.08±0.29              | 1.17±0.58       | 1.33±0.78       |
| 60  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.08±0.29       |
| 75  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.17±0.65       |
| 90  | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.25±0.62       |
| 105 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.17±0.58       |
| 120 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.17±0.39       |
| 135 | 1.08±0.29              | 1.08±0.29       | 1.17±0.78       |
| 150 | 1.08±0.29              | 1.17±0.58       | 1.08±0.29       |
| 165 | 1.00±0.00              | 1.08±0.29       | 1.42±0.67       |
| 180 | 1.00±0.00              | 1.00±0.00       | 1.17±0.39       |

หมายเหตุ: \*ระดับคะแนนแบบ 5-point

ตารางที่ 4.12 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับเรื่องสีในข้าวขึ้นรูปสุกที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

| Day | Color acceptability (คน) |        |                 |        |                 |        |
|-----|--------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
|     | 4 องศาเซลเซียส           |        | 27 องศาเซลเซียส |        | 45 องศาเซลเซียส |        |
|     | accept                   | reject | accept          | reject | accept          | reject |
| 0   | -                        | -      | -               | -      | -               | -      |
| 15  | -                        | -      | -               | -      | -               | -      |
| 30  | -                        | -      | -               | -      | -               | -      |
| 45  | 12                       | -      | 12              | -      | 7               | 5      |
| 60  | 12                       | -      | 12              | -      | 6               | 6      |
| 75  | 12                       | -      | 12              | -      | 5               | 7      |
| 90  | 12                       | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 105 | 12                       | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 120 | 12                       | -      | 12              | -      | 3               | 9      |
| 135 | 12                       | -      | 12              | -      | 5               | 7      |
| 150 | 12                       | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 165 | 12                       | -      | 12              | -      | 1               | 11     |
| 180 | 12                       | -      | 10              | 2      | 2               | 10     |

จากการประเมินผลทางประสาทสัมผัสการยอมรับในกลิ่นของข้าวขึ้นรูปแบบหุงสุกในตารางที่ 4.13 พบว่าผู้ประเมินทั้ง 12 คน สามารถยอมรับในเรื่องกลิ่นของข้าวขึ้นรูปที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสได้ และข้าวที่เก็บรักษาที่ 27 องศาเซลเซียสมีเพียง 1 คนที่ไม่ให้การยอมรับด้านกลิ่นของข้าวขึ้นรูปสุก โดยให้เหตุผลว่า มีกลิ่นของส่วนผสมชัดเจนขึ้นมากกว่าวันแรก และกลิ่นไม่เหมือนข้าวปกติ ส่วนข้าวขึ้นรูปที่ผ่านการเก็บที่ 45 องศาเซลเซียสพบว่ามี 8 คนที่สามารถยอมรับเรื่องกลิ่นของข้าวขึ้นรูปหุงสุกได้ และ 4 คนที่ไม่สามารถยอมรับเรื่องกลิ่นของข้าวขึ้นรูปหุงสุก โดยให้เหตุผลว่า มีกลิ่นข้าวไหม้ กลิ่นเหมือนแป้งมัน และมีกลิ่นเหมือนน้ำตาล จึงไม่สามารถยอมรับได้ และผลการทดสอบเรื่องการยอมรับโดยรวมของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุก (ตารางที่ 4.14) พบว่าผู้ประเมินทั้ง 12 คน สามารถยอมรับตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุกที่เก็บในสภาวะ 4 องศาเซลเซียสได้ และมี 1 คนที่ไม่สามารถยอมรับข้าวขึ้นรูปสุก

ที่ 27 องศาเซลเซียส เนื่องจากสีที่เข้มขึ้นและกลิ่นที่ไม่เหมือนข้าวปกติ มีกลิ่นนมเล็กน้อยจึงไม่สามารถยอมรับได้ ส่วนข้าวขึ้นรูปสุกที่ 45 องศาเซลเซียสมีผู้ประเมิน 11 คน ที่ไม่สามารถยอมรับได้ เนื่องจากมีสีน้ำตาลแดงเข้มและคล้ำมากเกินไป มีกลิ่นไม่ปกติแต่ไม่ใช่กลิ่นหืน เป็นลักษณะกลิ่นของข้าวไหม้ชัดเจน จึงไม่เป็นที่ยอมรับ

**ตารางที่ 4.13** ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับเรื่องกลิ่นของขึ้นรูปสุกที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

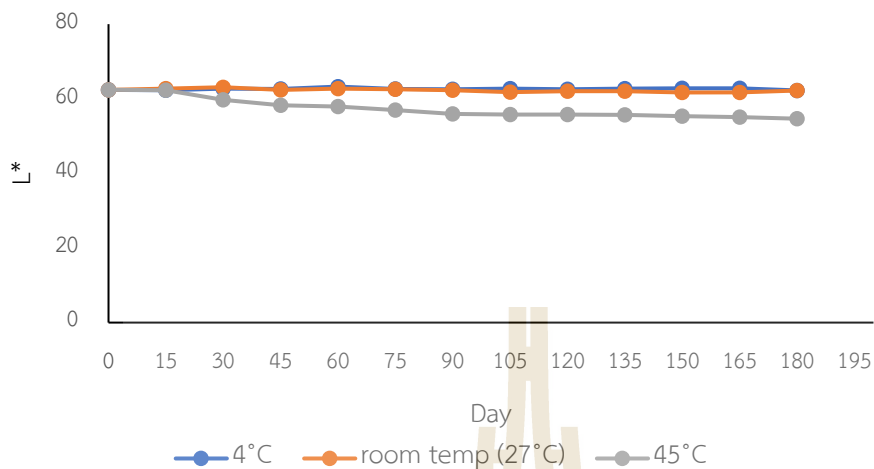
| Day | Flavor acceptability (คน) |        |                 |        |                 |        |
|-----|---------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
|     | 4 องศาเซลเซียส            |        | 27 องศาเซลเซียส |        | 45 องศาเซลเซียส |        |
|     | accept                    | reject | accept          | reject | accept          | reject |
| 0   | -                         | -      | -               | -      | -               | -      |
| 15  | -                         | -      | -               | -      | -               | -      |
| 30  | -                         | -      | -               | -      | -               | -      |
| 45  | 12                        | -      | 12              | -      | 11              | 1      |
| 60  | 12                        | -      | 12              | -      | 12              | -      |
| 75  | 12                        | -      | 12              | -      | 10              | 2      |
| 90  | 12                        | -      | 12              | -      | 10              | 2      |
| 105 | 12                        | -      | 12              | -      | 10              | 2      |
| 120 | 12                        | -      | 12              | -      | 8               | 4      |
| 135 | 12                        | -      | 12              | -      | 9               | 3      |
| 150 | 12                        | -      | 12              | -      | 11              | 1      |
| 165 | 12                        | -      | 12              | -      | 7               | 5      |
| 180 | 12                        | -      | 11              | 1      | 8               | 4      |

ตารางที่ 4.14 ผลการประเมินทางประสาทสัมผัสด้านการยอมรับโดยรวมของข้าวขึ้นรูปสุกที่สภาวะการเก็บรักษา 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

| Day | Overall acceptability (คน) |        |                 |        |                 |        |
|-----|----------------------------|--------|-----------------|--------|-----------------|--------|
|     | 4 องศาเซลเซียส             |        | 27 องศาเซลเซียส |        | 45 องศาเซลเซียส |        |
|     | accept                     | reject | accept          | reject | accept          | reject |
| 0   | 12                         | -      | 12              | -      | 12              | -      |
| 15  | 12                         | -      | 12              | -      | 11              | 1      |
| 30  | 12                         | -      | 12              | -      | 12              | -      |
| 45  | 12                         | -      | 12              | -      | 8               | 4      |
| 60  | 12                         | -      | 12              | -      | 6               | 6      |
| 75  | 12                         | -      | 12              | -      | 7               | 5      |
| 90  | 12                         | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 105 | 12                         | -      | 12              | -      | 3               | 9      |
| 120 | 12                         | -      | 12              | -      | 5               | 7      |
| 135 | 12                         | -      | 12              | -      | 4               | 8      |
| 150 | 12                         | -      | 12              | -      | 3               | 9      |
| 165 | 12                         | -      | 12              | -      | 1               | 11     |
| 180 | 12                         | -      | 11              | 1      | 1               | 11     |

#### 4.1.1.9 ผลค่าสี ( $L^*$ $a^*$ $b^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป

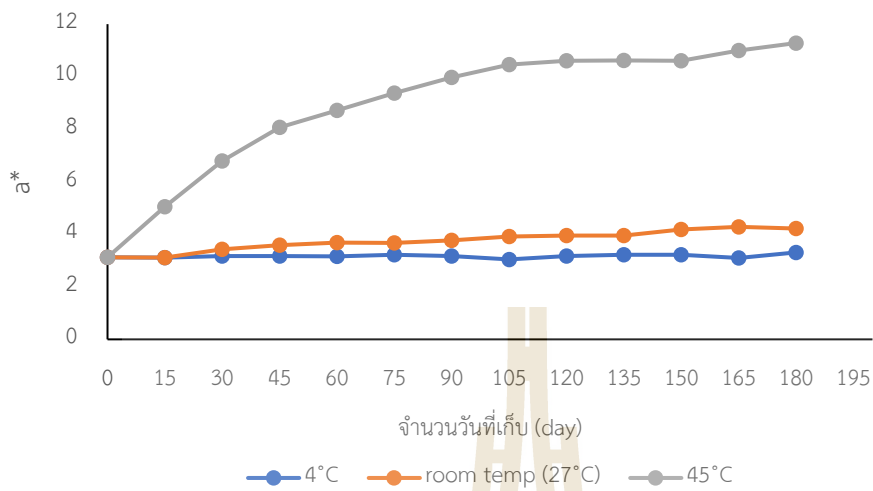
ผลของการเปลี่ยนแปลงของสีข้าวขึ้นรูปสูตร 20WPI20HM10FS (สูตรที่ 11) ต่ออายุการเก็บ 6 เดือน พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส สีของข้าวขึ้นรูป มีค่า  $L^*$  (ความสว่าง) ลดลงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.1 แต่การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส มีค่าความสว่าง ( $L^*$ ) ลดลงมากเรื่อย ๆ หลังจาก 15 วัน เนื่องจาก เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านสีของเมล็ดข้าวเป็นสีน้ำตาลแดง



**รูปที่ 4.1** ค่าความสว่าง ( $L^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน

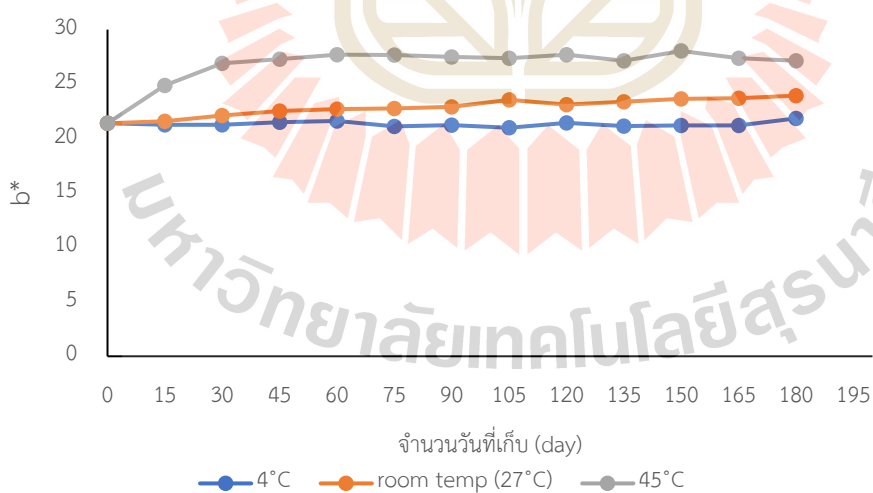
ส่วนค่าสีแดง ( $a^*$ ) ในรูปที่ 4.2 มีค่าสีแดงเริ่มต้น (วันที่ 0) เท่ากับ 3.12 โดยที่การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีแดงตลอดจนครบ 180 วัน ส่วนการเก็บที่อุณหภูมิห้อง มีค่าสีแดงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาขึ้น แต่การเก็บที่ 45 องศาเซลเซียส มีค่าสีแดงเพิ่มมากขึ้น (11.28) เมื่อระยะเวลาขึ้นเช่นกัน การเกิดสีน้ำตาลแดงของข้าวขึ้นรูป อาจเกิดจากส่วนผสมที่เป็น fiber sol เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด ซึ่ง fiber sol คือ resistant maltodextrin ซึ่งมีปริมาณร้อยละของน้ำตาลรีดิวส์ ซึ่งอยู่ที่ 8-12 ทำให้เกิดสีน้ำตาล





รูปที่ 4.2 ค่าสีแดง ( $a^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน







ค่าสีเหลือง ( $b^*$ ) รูปที่ 4.3 การเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีเมื่อเทียบกับวันที่ 0 ส่วนการเก็บที่ 27 องศาเซลเซียสค่าสีเหลืองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้นตามการเปลี่ยนแปลงค่าสีแดงที่เพิ่มขึ้น



รูปที่ 4.3 ค่าสีเหลือง ( $b^*$ ) ของข้าวขึ้นรูป ที่การเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน

4.1.1.10 แสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของข้าวขึ้นรูปตามสภาวะการเก็บรักษาด้วย  
ภาพถ่าย

ตารางที่ 4.15 ภาพถ่ายของข้าวขึ้นรูปและข้าวขึ้นรูปสุกที่การเก็บรักษาที่ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

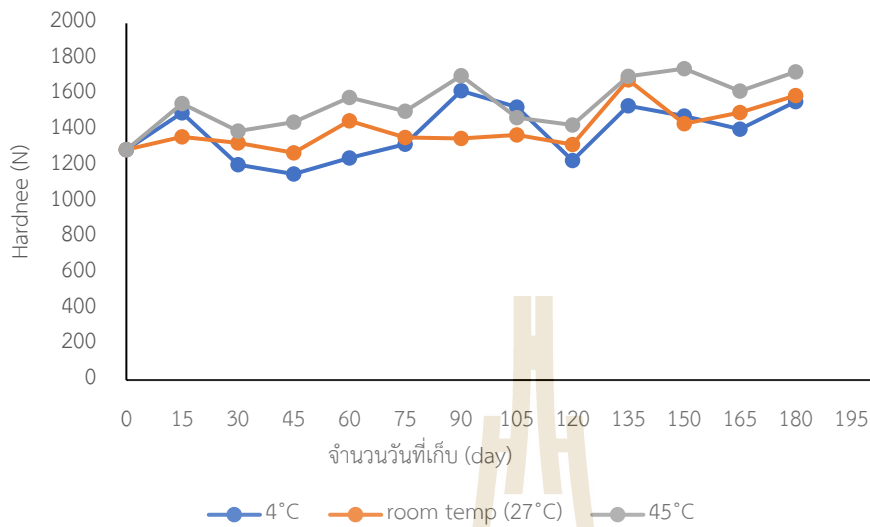
| ระยะเวลา/สภาวะการ<br>เก็บรักษา | ข้าวขึ้นรูป   | ข้าวขึ้นรูปสุก   |
|--------------------------------|---|--|
| 0 วัน                          |    |    |
| 6 เดือน/4 องศาเซลเซียส         |   |   |
| 6 เดือน/27 องศา<br>เซลเซียส    |  |  |



ข้าวขึ้นรูปสูตรที่ 11 20WPI20HM10FS ที่ผ่านการเก็บรักษา ที่สภาวะการเก็บ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะปรากฏ เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 6 เดือน ดังที่แสดงด้วยภาพถ่ายในตารางที่ 4.15 จะเห็นได้ว่า เมื่อครบระยะเวลาการเก็บ 6 เดือน ที่การเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมี การเปลี่ยนแปลงคือ สีของข้าวขึ้นรูปเป็นสีน้ำตาลแดงสอดคล้องกับผลการประเมินทางประสาทสัมผัส คือมีสีใกล้เคียงกับ สี Sepia และสอดคล้องกับผลค่าสีจากการวัดสี ซึ่งมีค่าสีแดงเท่ากับ 11.28

#### 4.1.1.11 ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสของข้าวขึ้นรูปสุก ที่ผ่านการเก็บรักษา ไว้ในอุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียส

ผลการวิเคราะห์เนื้อสัมผัสข้าวขึ้นรูปสุก ในตัวอย่างสูตร 20WPI20HM10FS พบว่าค่าความแข็ง (Hardness) ของข้าวขึ้นรูปที่สภาวะการเก็บ 4 และ 27 องศาเซลเซียส มีแนวโน้มไม่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อพิจารณาค่า Hardness ในระหว่างการเก็บรักษาจนถึง 6 เดือน พบว่าค่า Hardness เพิ่มขึ้นเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 135 และที่สภาวะการเก็บ 45 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับ 4 และ 27 องศาเซลเซียส แสดงในรูปที่ 4.4 โดยกราฟค่า Hardness ของ 45 องศาเซลเซียส จะอยู่เหนือ 4 และ 27 องศาเซลเซียส และตลอดอายุการเก็บที่สภาวะ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน ค่า Hardness มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเนื่องจากการเก็บที่อุณหภูมิสูง มีผลให้ amylose เข้ามาพัวพันเกี่ยวกับส่วนปลายสาย amylopectin ทำให้โครงสร้างผลึกแข็งแรงยิ่งขึ้น (Hormdok and Noomhorm, 2007)



**รูปที่ 4.4** กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าความแข็ง (Hardness) ของข้าวขึ้นรูปที่การเก็บรักษาไว้ใน อุณหภูมิ 4, 27 และ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน

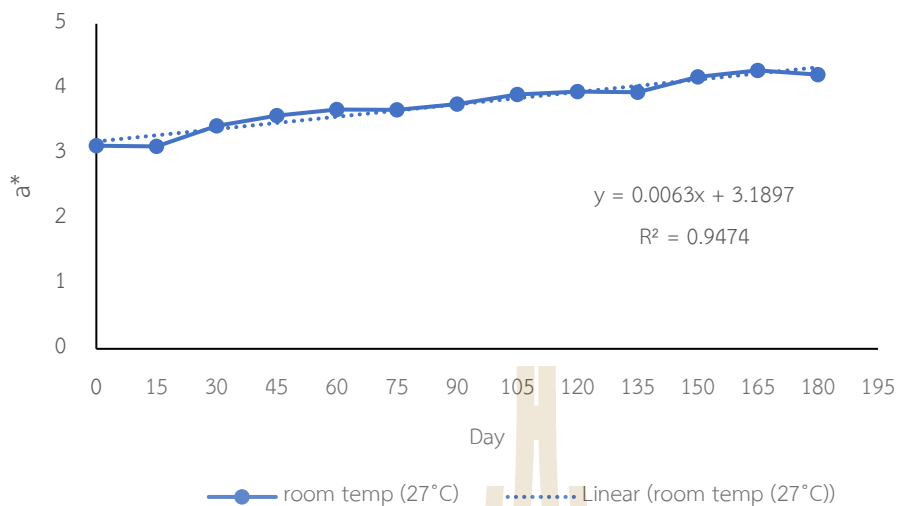
#### 4.1.1.12 ผลการประเมินอายุการเก็บของข้าวขึ้นรูป

จากการประเมินผลทางประสาทสัมผัสของข้าวขึ้นรูปสุกเรื่องการยอมรับเรื่องสี พบว่าใน ตัวอย่างข้าวขึ้นรูปสุกที่สภาวะการเก็บ 45 องศาเซลเซียส มีการประเมินว่าไม่สามารถยอมรับได้ถึง 11 คน ในวันที่ 165 (ตารางที่ 4.11) จึงใช้เป็นเกณฑ์เทียบเพื่อหาค่าคุณภาพเมื่อผู้ประเมินไม่สามารถ ยอมรับได้ ( $Q_e$ ) ในกราฟค่าสีแดงของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปที่สภาวะการเก็บ 45 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.2) มีค่าสีแดงเท่ากับ 11.00 และคำนวณหาอายุการเก็บได้จากสมการพื้นฐานของปฏิกิริยาอันดับศูนย์ตาม หลักจลนศาสตร์

$$Q_e = Q_0 - kt_s$$

$Q_e$  = ค่าคุณภาพเมื่อเวลาสุดท้ายของอายุการเก็บ,  $Q_0$  = ค่าคุณภาพเริ่มต้น,  $k$  = ค่าคงที่ของการ เกิดปฏิกิริยา (Reaction rate constant) และ  $t_s$  = อายุการเก็บ

โดย  $Q_0$  คือค่าสีแดงเริ่มต้น (วันที่ 0) มีค่า 3.12 และผลทางจลนพลศาสตร์เคมี แสดง ความสัมพันธ์ระหว่าง ค่าสีแดง ( $a^*$ ) กับวันต่าง ๆ เมื่อจัดรูปสมการจลนพลศาสตร์จะได้ปฏิกิริยาลำดับ ศูนย์ เนื่องจากค่าสีแดงที่เพิ่มขึ้นตามวันที่เปลี่ยนแปลง ดังนั้นสมการปฏิกิริยาลำดับศูนย์ คือ  $[A] = kt + [A]_0$  ซึ่งสอดคล้องกับสมการเส้นตรง  $y = mx+b$  ทำให้  $k$  หาได้จากความชันของกราฟ (รูปที่ 4.5) ค่าสี แดงข้าวขึ้นรูปที่การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ซึ่งค่า  $k = 0.0063$



**รูปที่ 4.5** ค่าสีแดง ( $a^*$ ) ของตัวอย่างข้าวขึ้นรูปที่การเก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 6 เดือน

ดังนั้นการทำนายอายุการเก็บเรื่องของข้าวขึ้นรูปที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) จะมีค่าเท่ากับ 41 เดือน และจากการประเมินผลทางประสาทสัมผัสเรื่องการยอมรับเรื่องกลิ่นเป็นเวลา 6 เดือนในข้าวขึ้นรูปสุกที่เก็บรักษาใน 45 องศาเซลเซียส ซึ่งผู้ประเมินยังสามารถยอมรับเรื่องกลิ่นได้ ดังนั้นการทำนายอายุการเก็บเรื่องกลิ่นอาจมีอายุการเก็บได้นานกว่า 6 เดือน

#### 4.1.2 การศึกษาผลของการเติมโปรตีนในเส้นสปาเก็ตตี้สตาร์ชข้าวเจ้า

##### 4.1.2.1 คุณสมบัติทางความร้อน

สมบัติการเกิดเจลลาตินในเซชันของของผสมสตาร์ชข้าวเจ้าและโปรตีนชนิดต่าง ๆ และเอกซ์ทรูเดตสปาเก็ตตี้จากสตาร์ชข้าวเจ้าและสตาร์ชข้าวเจ้าผสมโปรตีน CK, WPI และ SPI ที่ปริมาณ 20-40% (ดังแสดงในตารางที่ 4.16) พบว่าการเติมโปรตีน CK, WPI และ SPI ส่งผลให้ค่า onset temperature ( $T_o$ ) และ gelatinization temperature ( $T_p$ ) สูงกว่า control ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของค่า  $T_o$  และ  $T_p$  เกิดขึ้นจากหลากหลายปัจจัยร่วมกัน โดยปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลง  $T_o$  และ  $T_p$  คือความสามารถในการดูดซับน้ำของเม็ดแป้งซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญ (Mira, Persson and Villwock, 2007) การที่โปรตีนสามารถจับกับน้ำได้ดี รวมถึงการเกิด interaction กันระหว่างโปรตีนกับสตาร์ชก็จะส่งผลต่อการเกิดเจลลาตินในเซชันของเม็ดแป้ง (Ribotta et al., 2007) โดยโปรตีนที่จับกับน้ำได้ดีกว่านั้นจะไปแย่งจับกับน้ำแทนสตาร์ช จึงส่งผลให้ปริมาณน้ำสำหรับการเกิดเจลลาตินในเซชันของสตาร์ชเหลือลดน้อยลงไป ดังนั้นค่า  $T_o$  และค่า  $T_p$  ของตัวอย่างที่เติม CK, WPI และ SPI จึงมีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มี

การเติมโปรตีน (control) และการเติม 40% SPI ส่งผลให้ค่า  $T_0$  สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มของ raw mixture เนื่องจากมีโปรตีนที่ไปแย่งจับกับน้ำมากขึ้นจึงยิ่งทำให้น้ำที่จะเจลาติไนซ์สตาร์ชมีปริมาณน้อยลง สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Yang and Chang (1999) ที่พบว่าปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ทำให้  $T_0$  และ  $T_p$  ของสตาร์ชสูงขึ้น แต่ในตัวอย่างที่เติม WPI พบว่าค่า  $T_0$  และ  $T_p$  เพิ่มขึ้นจาก control เมื่อเปรียบเทียบกับการเติมโปรตีนทั้ง 3 ชนิด เนื่องจาก WPI เป็นโปรตีนชนิดที่สามารถละลายน้ำ ส่วนเอนทาลปีของการเกิดเจลาติเซชันของตัวอย่างที่มีการเติมโปรตีนมีค่าต่ำกว่า control และเมื่อปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปเพิ่มขึ้นจาก 20 ถึง 40% ส่งผลให้ค่าเอนทาลปีลดลง เนื่องจากการเติมโปรตีนลงไปแทนที่สตาร์ชทำให้สตาร์ชมีปริมาณลดลง จึงส่งผลให้พลังงานที่ใช้ในการเจลาติไนซ์สตาร์ชลดลงด้วย

ในตัวอย่าง extruded พบว่าการเติมโปรตีนทำให้ค่า  $T_p$  เพิ่มขึ้นเนื่องจากโปรตีนจับกับน้ำ ส่งผลให้มีน้ำที่จะเข้าสู่สตาร์ชน้อยลง นอกจากนี้ยังพบพิคของการเปลี่ยนแปลงพลังงานในช่วงที่ต่ำกว่า อุณหภูมิเจลาติไนเซชันนั้นเป็นพิคที่บ่งชี้ถึงการเกิดรีโทรเกรเดชันของสตาร์ช ที่ค่า  $T_0$ ,  $T_p$  และเอนทาลปีโดยรวมไม่แตกต่างกันมากนัก

ตารางที่ 4.16 คุณสมบัติทางความร้อนของสตาร์ชข้าวเจ้า โปรตีนต่าง ๆ และเอกซ์ทรูเดต

| สถานะ | ตัวอย่าง | Onset 1 (องศาเซลเซียส) | Peak 1 (องศาเซลเซียส) | Enthalpy 1 (J/g)   | Onset 2 (องศาเซลเซียส) | Peak 2 (องศาเซลเซียส) | Enthalpy 2 (J/g)   |
|-------|----------|------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|--------------------|
| Raw   | Control  | nd                     | nd                    | nd                 | 72.54 <sup>a</sup>     | 78.25 <sup>a</sup>    | 8.58 <sup>k</sup>  |
|       | 20CK     | nd                     | nd                    | nd                 | 74.35 <sup>bcd</sup>   | 79.50 <sup>bc</sup>   | 5.56 <sup>h</sup>  |
|       | 20WPI    | nd                     | nd                    | nd                 | 73.58 <sup>abc</sup>   | 79.00 <sup>ab</sup>   | 6.81 <sup>j</sup>  |
|       | 20SPI    | nd                     | nd                    | nd                 | 74.24 <sup>bcd</sup>   | 79.75 <sup>bc</sup>   | 6.18 <sup>i</sup>  |
|       | 40CK     | nd                     | nd                    | nd                 | 75.05 <sup>cd</sup>    | 80.25 <sup>c</sup>    | 4.85 <sup>g</sup>  |
|       | 40WPI    | nd                     | nd                    | nd                 | 73.35 <sup>ab</sup>    | 79.25 <sup>b</sup>    | 5.83 <sup>hi</sup> |
|       | 40SPI    | nd                     | nd                    | nd                 | 75.32 <sup>e</sup>     | 80.42 <sup>c</sup>    | 3.84 <sup>f</sup>  |
|       | Extruded | Control                | 50.69 <sup>a</sup>    | 59.58 <sup>a</sup> | 1.14 <sup>a</sup>      | 78.00 <sup>e</sup>    | 82.50 <sup>d</sup> |
| 20CK  |          | 52.01 <sup>abc</sup>   | 59.83 <sup>a</sup>    | 1.09 <sup>a</sup>  | 78.66 <sup>e</sup>     | 84.03 <sup>ef</sup>   | 0.45 <sup>ab</sup> |
| 20WPI |          | 53.57 <sup>cd</sup>    | 60.38 <sup>ab</sup>   | 0.93 <sup>a</sup>  | 79.38 <sup>efg</sup>   | 83.17 <sup>de</sup>   | 1.54 <sup>e</sup>  |
| 20SPI |          | 51.16 <sup>abc</sup>   | 59.60 <sup>a</sup>    | 1.17 <sup>a</sup>  | 80.77 <sup>g</sup>     | 84.13 <sup>f</sup>    | 0.98 <sup>cd</sup> |
| 40CK  |          | 54.01 <sup>d</sup>     | 60.04 <sup>ab</sup>   | 0.99 <sup>a</sup>  | 79.68 <sup>fg</sup>    | 85.59 <sup>g</sup>    | 0.10 <sup>a</sup>  |
| 40WPI |          | 52.57 <sup>bcd</sup>   | 60.79 <sup>b</sup>    | 1.12 <sup>a</sup>  | 80.91 <sup>g</sup>     | 84.29 <sup>f</sup>    | 0.69 <sup>bc</sup> |
| 40SPI |          | 50.64 <sup>a</sup>     | 59.88 <sup>a</sup>    | 1.22 <sup>a</sup>  | 80.50 <sup>g</sup>     | 84.00 <sup>ef</sup>   | 0.62 <sup>bc</sup> |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ), nd คือ not detected

#### 4.1.2.2 ความต้านทานต่อแรงดึง

ลักษณะเนื้อสัมผัสของเส้นสปาเก็ตตี้เป็นตัวแปรหนึ่งที่มีความสัมพันธ์กับการกระจายตัวและปฏิสัมพันธ์ (interaction) ของโปรตีนที่เติมเพิ่มเข้าไปในกระบวนการเอกซ์ทรูชัน เช่น ในพาสต้าที่ผลิตโดยแป้งสาลี โปรตีนกลูเตนจะทำหน้าที่เป็นโครงข่ายภายในโครงสร้างแป้ง ซึ่งเป็นผลให้คุณสมบัติในการพองตัวของเม็ดแป้งลดลง และยังส่งผลต่อคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ได้แก่ ความแข็ง (hardness) ความแน่นเนื้อ (firmness) ความยืดหยุ่น (elastic) และความเหนียวติดผิวหน้า (surface stickiness) ของผลิตภัณฑ์อีกด้วย จากการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสของตัวอย่างเส้นสปาเก็ตตี้ที่ต้มสุกโดยการทดสอบความต้านทานต่อแรงดึง พบว่าการเพิ่มโปรตีนมีผลต่อค่าความต้านทานต่อแรงดึงของเส้นสปาเก็ตตี้ (ดังแสดงในตารางที่ 4.17) โดยโปรตีนทำให้เส้นสปาเก็ตตี้มีความต้านทานต่อแรงดึงลดลง และเมื่อใส่โปรตีนเข้าไปในปริมาณที่มากขึ้นก็จะยิ่งทำให้เส้นสปาเก็ตตี้มีค่าความต้านทานต่อแรงดึงลดลง หรือทำให้เส้นสปาเก็ตตี้ขาดง่ายขึ้น เนื่องจากโปรตีนเข้าไปขัดขวางการเกิดโครงสร้างเจลที่แข็งแรงของสตาร์ช ซึ่ง Li, Yeh and Fan (2007) ก็ได้รายงานว่าภาพถ่าย SEM ของเจล corn starch (CS) มี pore size ของเจลโครงข่าย (gel network) ขนาดเล็กกว่า gel network ของ soy protein concentrate (SPC) แสดงให้เห็นว่าเจลสตาร์ชมีโครงข่ายที่แข็งแรงมากกว่าเจลโครงข่ายโปรตีน และการเพิ่ม CS ปริมาณ 28.6% ลงไปใน SPC ทำให้โครงสร้างของเจลอ่อนแอลง

#### 4.1.2.3 Kinetic digestion

อัตราการการย่อยของสตาร์ชเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อค่า glycemic response ของอาหาร ซึ่งการวิเคราะห์แบบ Log of slope (LOS) เป็นวิธีที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอัตราการย่อยและสามารถแยกความแตกต่างในการย่อยของสตาร์ชได้อย่างชัดเจน (Edwards, Warren, Milligan, Butterworth and Ellis, 2014) โดยการวิเคราะห์แบบ LOS นั้นจะทำให้สามารถหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่จุดสุดท้าย (end-point product concentration:  $C_{\infty}$ ) และอัตราการย่อย (pseudo first-order digestibility rate constant:  $k$ ) ที่เกิดขึ้นในอัตราการย่อยอาหารจากเร็วไปช้าตามกระบวนการย่อยสลาย (Butterworth, Warren, Grassby, Patel and Ellis, 2012) ในอาหารที่มีสตาร์ชเป็นองค์ประกอบจะมีอัตราการย่อยที่หลากหลาย การวิเคราะห์ด้วย LOS สามารถแสดงเส้นตรงได้ 2 ช่วง หรือมากกว่านั้น โดยความชันของเส้นตรงแต่ละช่วงคืออัตราการย่อยของแต่ละช่วง เช่น  $k_1$ ,  $k_2$  และสามารถหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสที่จุดสุดท้ายในแต่ละช่วงได้ เช่น  $C_{\infty 1}$ ,  $C_{\infty 2}$  (Edwards et al., 2014) ดังนั้นการวิเคราะห์แบบ LOS จึงเหมาะสมที่จะแสดงให้เห็นถึงความสามารถย่อยได้ของอาหาร



จากการวิเคราะห์การย่อยตัวอย่างเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก พบว่าตัวอย่างที่เติมโปรตีนแสดงลักษณะ digestion curve 2 แบบ คือ single-phase และ two-phase pseudo-first order โดยค่า  $C_{\infty}$  และ อัตราการย่อยของช่วงแสดงในตารางที่ 18 ตัวอย่าง control และตัวอย่างที่เติมโปรตีน 20% แสดงลักษณะ digestion curve แบบ single-phase pseudo-first order ดังรูปที่ 4.6 ค่า  $k$  ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติม SPI, WPI และ CK ปริมาณ 20% ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง อัตราการย่อยของตัวอย่าง แต่ค่า  $C_{\infty}$  ของ control สูงกว่าตัวอย่างที่เติมโปรตีน 20% เนื่องจาก ตัวอย่าง control มีสตาร์ชเป็นส่วนผสมหลักเพียงอย่างเดียว (100%) ในขณะที่ตัวอย่างอื่น ๆ ที่เติมโปรตีนอื่น ๆ จะเหลือสตาร์ชเป็นส่วนประกอบอยู่ 80% และการเติมโปรตีนต่างชนิดกันก็ไม่มีผลต่อค่า  $C_{\infty}$  ของตัวอย่าง และตัวอย่างที่เติมโปรตีน 40% แสดง digestion curve เป็นแบบ two-phase pseudo-first order ดังรูปที่ 4.8 ซึ่งทำให้ทราบว่า การเติมโปรตีน 40% ส่งผลให้ตัวอย่างมีลักษณะการย่อยเป็น 2 ช่วง ซึ่งอัตราการย่อยในช่วงแรกจะย่อยได้เร็วกว่าการย่อยในช่วงหลัง แต่เมื่อเปรียบเทียบค่า  $k$  ของการเติมโปรตีนต่างชนิดกันที่ปริมาณ 40% พบว่าค่า  $k$  ของตัวอย่างทั้ง 2 ช่วงของตัวอย่างที่เติม SPI, WPI และ CK ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ค่า  $C_{\infty 2}$  ของตัวอย่างที่เติม SPI มีค่าน้อยที่สุด ซึ่งอาจเป็นเพราะ SPI สามารถช่วยลดหรือขัดขวางการเข้าไปย่อยสตาร์ชโดยเอนไซม์ได้ดีกว่าโปรตีน WPI และ CK และเมื่อคำนวณค่า eGI จากโดยการคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของการย่อย แล้วนำค่า AUC ของตัวอย่างเทียบกับค่า AUC ของ reference food พบว่าค่า eGI พบว่าตัวอย่าง control มีค่า eGI ต่ำที่สุด (ดังตารางที่ 4.17) แต่เมื่อเติมโปรตีนลงที่ปริมาณ 20 และ 40% จะส่งผลให้ค่า eGI ของตัวอย่างเพิ่มขึ้น โดยการเติมโปรตีน 40% ส่งผลให้ค่า eGI เพิ่มขึ้นมากกว่าตัวอย่างที่เติมโปรตีน 20% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อยตัวอย่าง control ได้น้อยที่สุด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเนื่องจากเจลของระบบที่มีสตาร์ชเพียงอย่างเดียวมีความแข็งแรงมากที่สุด แต่เมื่อใส่โปรตีนเข้าไปโปรตีนอาจเข้าไปแทรกอยู่ตามเจลของสตาร์ชซึ่งส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่าความต้านทานต่อแรงดึงของเส้นสปาเก็ตตี้ที่ลดลงเมื่อเติมโปรตีนเข้าไป เมื่อเจลไม่แข็งแรงจึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าไปย่อยสตาร์ชได้ง่ายขึ้น และผลของชนิดโปรตีนที่เติมเข้าไป พบว่า CK ทำให้ค่า eGI สูงกว่าการเติมโปรตีนชนิดอื่นทั้งที่ระดับ 20 และ 40% ซึ่งอาจเป็นผลมาจาก CK ซึ่งเป็นโปรตีนที่ได้จากการนำอกไก่ไปอบจนสุก ทำให้โปรตีนเสียสภาพและเมื่อผสมกับสตาร์ชและผ่านกระบวนการเอกซ์ทรูชันก้อนโปรตีนก็จะกระจายเกาะอยู่ภายในเจลแป้ง และเมื่อนำเส้นสปาเก็ตตี้ที่ได้จากการเอกซ์ทรูชันที่มีการเติม CK ลงไปต้มให้สุก และย่อยด้วยเอนไซม์ก็อาจทำให้ก้อนโปรตีน CK หลุดออกจากเจลสตาร์ช ส่งผลให้เกิดช่องว่างที่ทำให้เอนไซม์เข้าไปย่อยสตาร์ชได้ง่ายยิ่งขึ้น

ตารางที่ 4.17 ค่า eGI และความต้านทานต่อแรงดึงของเส้นสไปเก้ตตี้มัสสุก

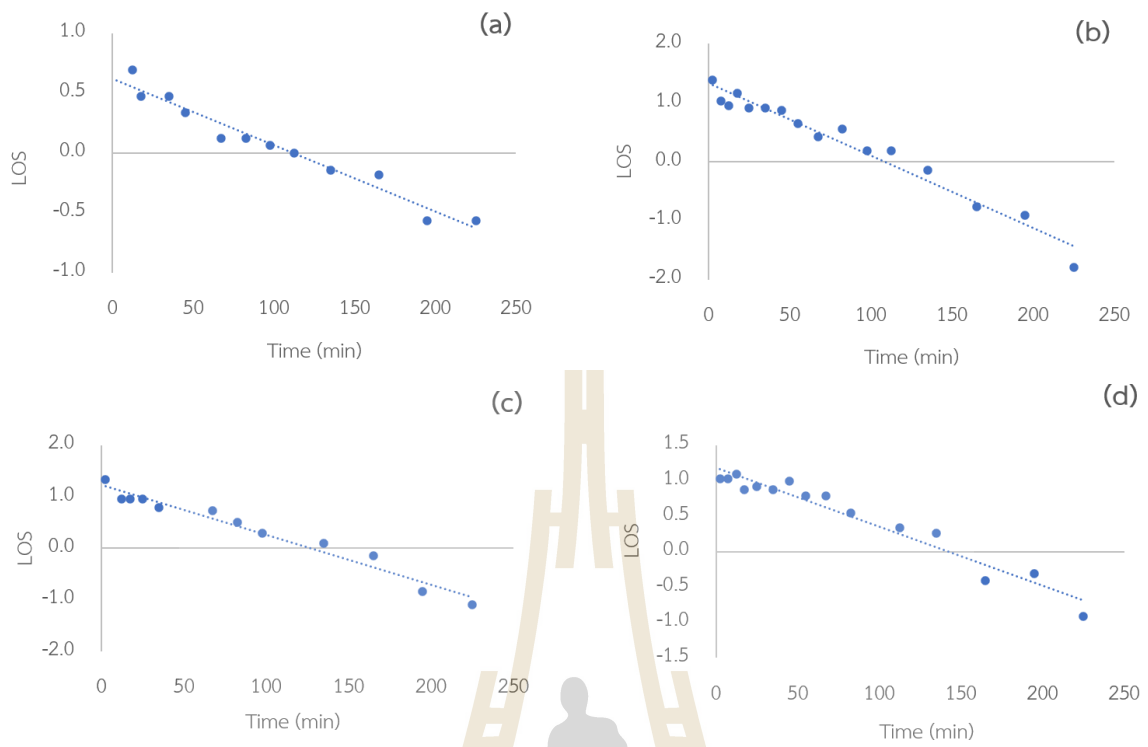
| ตัวอย่าง | eGI                   | Tensile force (g)     |
|----------|-----------------------|-----------------------|
| control  | 51.0±1.3 <sup>a</sup> | 43.1±5.0 <sup>d</sup> |
| 20CK     | 63.3±0.9 <sup>c</sup> | 18.5±4.3 <sup>b</sup> |
| 20WPI    | 64.1±0.7 <sup>c</sup> | 16.9±3.1 <sup>b</sup> |
| 20SPI    | 59.2±0.4 <sup>b</sup> | 27.7±5.7 <sup>c</sup> |
| 40CK     | 73.3±1.4 <sup>e</sup> | 11.8±2.4 <sup>a</sup> |
| 40WPI    | 68.8±0.8 <sup>d</sup> | 13.6±2.8 <sup>a</sup> |
| 40SPI    | 68.2±2.0 <sup>d</sup> | 12.2±2.6 <sup>a</sup> |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

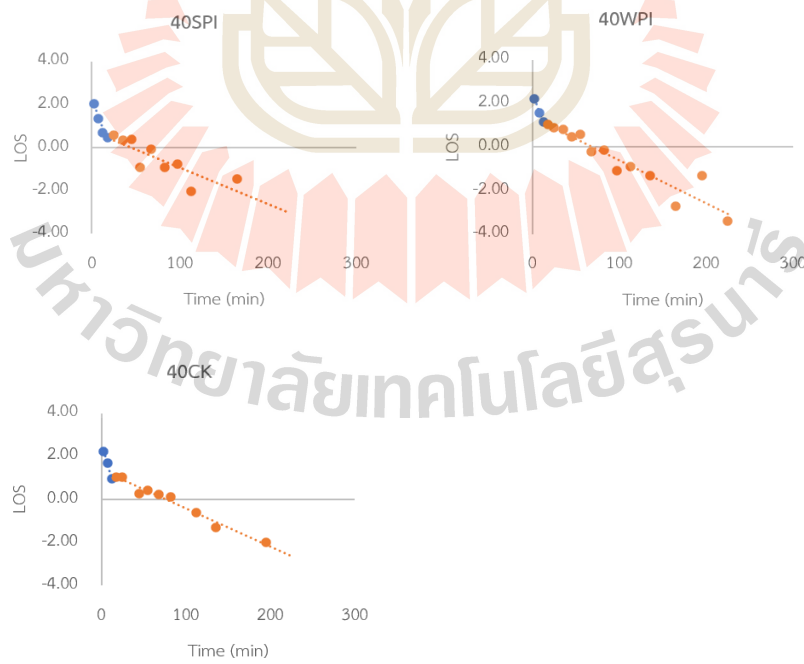
ตารางที่ 4.18 อัตราการย่อยและค่า  $C_{\infty}$

| ตัวอย่าง | $k$ ( $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ )   | $C_{\infty}$ (%)            |                           |
|----------|---|-----------------------------|---------------------------|
| CONTROL  | 5.1±0.9 <sup>a</sup>                        | 422.26±94.16 <sup>c</sup>   |                           |
| 20CK     | 10.1±2.0 <sup>a</sup>                       | 335.39±35.76 <sup>b</sup>   |                           |
| 20WPI    | 10.0±3.3 <sup>a</sup>                       | 362.85±62.27 <sup>bc</sup>  |                           |
| 20SPI    | 9.8±3.8 <sup>a</sup>                        | 371.58±75.10 <sup>bc</sup>  |                           |
|          | $K_1$ ( $\times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ ) | $k_2$ ( $\text{min}^{-1}$ ) | $C_{\infty 2}$ (%)        |
| 40CK     | 120.3±6.1 <sup>b</sup>                      | 17.8±0.7 <sup>a</sup>       | 212.05±9.24 <sup>b</sup>  |
| 40WPI    | 106.3±3.8 <sup>b</sup>                      | 21.4±1.4 <sup>a</sup>       | 197.44±4.23 <sup>b</sup>  |
| 40SPI    | 107.8±24.0 <sup>b</sup>                     | 23.0±4.7 <sup>a</sup>       | 161.55±19.63 <sup>a</sup> |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



รูปที่ 4.6 digestion curve เส้นสปาเก็ตตี้สุกในตัวอย่าง control (a), 20SPI (b), 20WPI (c) และ 20CK (d)

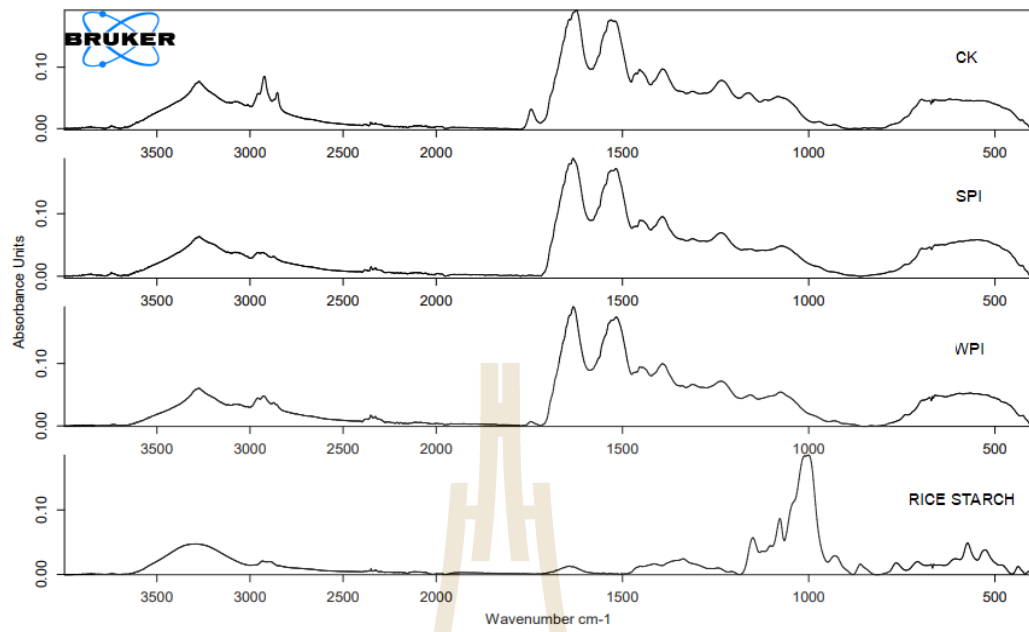


รูปที่ 4.7 digestion curve เส้นสปาเก็ตตี้สุกในตัวอย่าง 40SPI (a), 40WPI (b) และ 40CK (c)

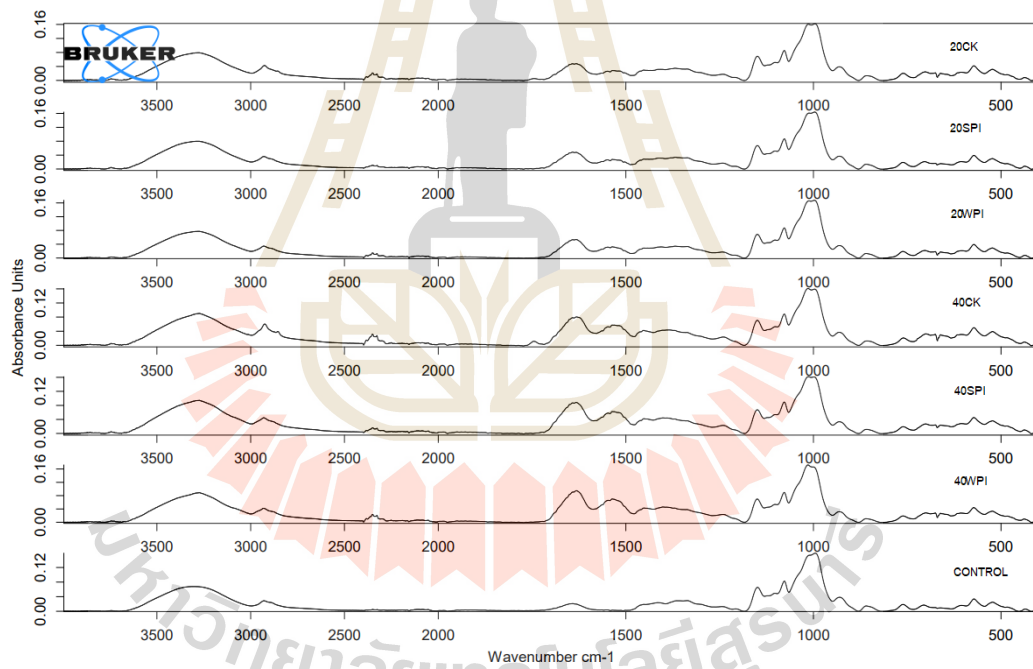
#### 4.1.2.4 ลักษณะโครงสร้างของสเปกตรัมโปรตีนสูง

ศึกษาปฏิสัมพันธ์ทางเคมีของสตาร์ชข้าวเจ้า โปรตีน และระหว่างโปรตีนกับสตาร์ชข้าวเจ้าในเส้นสเปกตรัมด้วยเครื่อง FTIR ดังรูปที่ 4.8 สตาร์ชข้าวเจ้าพบพีคที่ความยาวคลื่นที่  $2932\text{ cm}^{-1}$  ที่แสดงถึงการสั่นแบบยืดหดของพันธะ C-H (C-H stretching) ตำแหน่ง  $1077\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง C-O-H bending ตำแหน่ง  $3298$  แสดงถึงการสั่นแบบยืดหดของพันธะ O-H ตำแหน่ง  $1643\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการสั่นแบบยืดหดของพันธะ COO- ตำแหน่ง  $1337\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการบิดแบบ twisting ของ  $\text{CH}_2$  ตำแหน่ง  $1150$  และ  $1000\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการบิดแบบ stretching ของ C-O, C-C ตำแหน่ง  $1000\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงตำแหน่งของ C-C and C-O stretching และพีคที่แสดงการสั่น C-O stretching ที่ตำแหน่ง  $930\text{ cm}^{-1}$  แสดงการสั่นแบบ skeletal mode vibrations ของ 1,4 glycosidic linkage (C-O-C) และพีคอื่น ๆ ใน fingerprint region ที่แสดงถึงการสั่นแบบ skeletal mode vibrations ของ pyranose ring สำหรับ FTIR spectrum ของโปรตีน SPI, WPI และ CK พบพีคที่ตำแหน่ง  $1642$  และ  $1531\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง amide I และ II พีคที่  $2924$  and  $2854\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจาก stretch vibrations ของ  $-\text{C}-\text{H}(\text{CH}_2)$  and  $-\text{C}-\text{H}(\text{CH}_3)$  ของ fatty acids และตำแหน่ง  $1745\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึง C=O stretching ของ ester หรือ carboxylic (ไม่พบใน SPI)

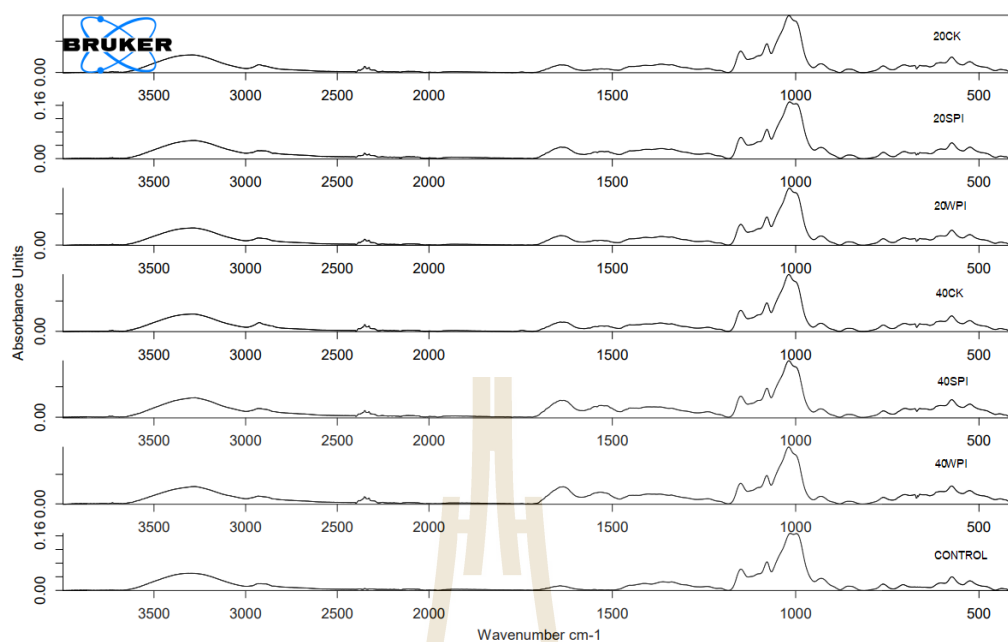
FTIR spectrum ของเอกซ์ทราคตและเส้นสเปกตรัมที่ต้มสุกแสดงดังรูปที่ 4.9 และ 4.10 จากการศึกษาโครงสร้าง secondary structure ของโปรตีนที่ตำแหน่ง amide I ผลการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.19 พบว่า alpha-helix ในเอกซ์ทราคตและเส้นที่ต้มสุกมีค่าลดลงจากตัววัตถุดิบเริ่มต้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (protein denaturation)



รูปที่ 4.8 FTIR spectrum ของสตาร์ชข้าวเจ้า และโปรตีนชนิดต่าง ๆ



รูปที่ 4.9 FTIR spectrum ของเอกซ์ทราคเตดเส้นสปาเก็ตตี้



รูปที่ 4.10 FTIR spectrum ของเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก

ตารางที่ 4.19 Relative secondary structural ของโปรตีน เอกซ์ทราเกตและเส้นสปาเก็ตตี้ต้มสุก

| สถานะ        | ตัวอย่าง | Relative secondary structural (%) |                                     |                            |                           |
|--------------|----------|-----------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---------------------------|
|              |          | $\beta$ -sheet                    | Random coil                         | $\alpha$ -helix            | $\beta$ -turns            |
| Raw material | Control  | 54.37±3.30 <sup>b</sup>           | 13.77±2.14 <sup>ab</sup>            | 21.47±2.06 <sup>g</sup>    | 10.43±3.15 <sup>a</sup>   |
|              | CK       | 53.70±0.10 <sup>ab</sup>          | 15.17±0.42 <sup>bcd</sup>           | 20.50±1.70 <sup>fg</sup>   | 10.67±2.01 <sup>a</sup>   |
|              | WPI      | 54.83±1.65 <sup>bc</sup>          | 13.70±0.95 <sup>ab</sup>            | 18.47±1.96 <sup>ef</sup>   | 13.00±0.70 <sup>abc</sup> |
|              | SPI      | 56.13±1.44 <sup>bcd</sup>         | 16.57±1.19 <sup>cd</sup>            | 16.57±2.15 <sup>cde</sup>  | 10.73±1.66 <sup>a</sup>   |
| Extruded     | Control  | 50.28±3.98 <sup>a</sup>           | 14.57±1.91 <sup>b<sup>c</sup></sup> | 20.23±3.75 <sup>fg</sup>   | 15.10±1.65 <sup>cd</sup>  |
|              | 20CK     | 56.84±2.48 <sup>bcde</sup>        | 11.92±1.04 <sup>a</sup>             | 17.45±0.90 <sup>de</sup>   | 13.78±2.10 <sup>ab</sup>  |
|              | 20WPI    | 61.62±2.63 <sup>f</sup>           | 13.95±1.63 <sup>ab</sup>            | 12.20±0.80 <sup>a</sup>    | 12.27±1.09 <sup>ab</sup>  |
|              | 20SPI    | 53.65±2.44 <sup>ab</sup>          | 14.25±1.86 <sup>abc</sup>           | 16.03±1.32 <sup>bcde</sup> | 16.07±1.87 <sup>d</sup>   |
|              | 40CK     | 61.00±2.15 <sup>f</sup>           | 13.15±1.38 <sup>ab</sup>            | 14.42±2.02 <sup>abc</sup>  | 11.45±1.91 <sup>ab</sup>  |
|              | 40WPI    | 58.12±0.95 <sup>cdef</sup>        | 16.98±1.20 <sup>d</sup>             | 14.27±1.73 <sup>abc</sup>  | 10.62±1.20 <sup>a</sup>   |
|              | 40SPI    | 59.22±4.29 <sup>def</sup>         | 14.43±2.41 <sup>bc</sup>            | 14.27±1.62 <sup>abc</sup>  | 12.07±1.88 <sup>ab</sup>  |
| Cooked       | Control  | 58.28±1.52 <sup>def</sup>         | 14.13±1.64 <sup>ab</sup>            | 15.85±1.91 <sup>bcd</sup>  | 11.75±2.26 <sup>ab</sup>  |

|       |                           |                           |                            |                           |
|-------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|---------------------------|
| 20CK  | 59.28±2.34 <sup>def</sup> | 15.13±2.41 <sup>bcd</sup> | 14.12±1.31 <sup>abc</sup>  | 11.43±3.36 <sup>ab</sup>  |
| 20WPI | 58.97±1.45 <sup>def</sup> | 13.58±1.63 <sup>ab</sup>  | 14.72±1.28 <sup>abcd</sup> | 12.75±1.72 <sup>abc</sup> |
| 20SPI | 60.25±3.86 <sup>ef</sup>  | 13.08±1.64 <sup>ab</sup>  | 13.28±1.70 <sup>ab</sup>   | 13.28±1.86 <sup>abc</sup> |
| 40CK  | 59.85±2.36 <sup>def</sup> | 11.90±0.88 <sup>a</sup>   | 16.78±3.51 <sup>cde</sup>  | 11.43±2.43 <sup>ab</sup>  |
| 40WPI | 59.17±1.80 <sup>def</sup> | 15.28±1.87 <sup>bcd</sup> | 14.72±0.92 <sup>abcd</sup> | 10.85±1.17 <sup>a</sup>   |
| 40SPI | 60.38±1.23 <sup>ef</sup>  | 14.17±0.70 <sup>ab</sup>  | 13.87±1.51 <sup>abc</sup>  | 11.58±1.58 <sup>ab</sup>  |

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเดียวกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

#### 4.1.3 สรุปผลการวิจัย

การเติมโปรตีน และ/หรือใยอาหารทำให้ข้าวขึ้นรูปมีค่า  $L^*$  ไม่แตกต่างจาก control แต่ค่า  $a^*$  และ  $b^*$  มากกว่า control (ยกเว้นตัวอย่างที่เติม Fiber sol) โดยการเติมโปรตีน และ/หรือใยอาหาร 10% ให้ผลในด้าน hardness ไม่ค่อยแตกต่างจาก control ส่วนการเติม 20% ของโปรตีน และ/หรือใยอาหารทำให้ค่า hardness ต่ำกว่า control อาจเนื่องมาจากส่วนผสมอื่น ๆ ที่เติมเข้าไปไปขัดขวางความสมบูรณ์ (integrity) ของเจลแป้ง ซึ่งตัวอย่างข้าวขึ้นรูปที่มีการเติมโปรตีน และ/หรือใยอาหารทุกตัวอย่างมีค่า eGI ต่ำกว่า control เนื่องจากการเติมส่วนประกอบอื่น ๆ เข้าไปทำให้ปริมาณแป้งมีสัดส่วนน้อยลง และการเติม hi-maize ทำให้ข้าวขึ้นรูปมีค่า eGI อยู่ในในกลุ่ม GI ต่ำ และตัวอย่าง 40HM, 20FS และ 10FS20HM เป็นตัวอย่างที่กลุ่มผู้ทดสอบลงความเห็นว่าเป็นข้าวขึ้นรูปหุงสุกที่มีลักษณะปรากฏและเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับข้าวสุกมากที่สุด และจากการนำตัวอย่างทั้ง 3 ไปทดสอบและประเมินอายุการเก็บรักษา พบว่าเมื่อนำมาจากการเปลี่ยนแปลงทางด้านสีของข้าวขึ้นรูปที่เก็บรักษาในอุณหภูมิห้อง (27 องศาเซลเซียส) ข้าวขึ้นรูปจะสามารถเป็นไว้ได้นานถึง 41 เดือน และหากพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่น พบว่าข้าวขึ้นรูปที่เก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีอายุการเก็บได้นานกว่า 6 เดือน

ในส่วนของเส้นสปาเก็ตตี้ข้าวเจ้า พบว่าในเส้นสปาเก็ตตี้มีพิคของการเกิดริโรเกรเดชันของสตาร์ชเกิดขึ้น อีกทั้งการเติมโปรตีนทั้ง 3 ชนิด ทำให้เส้นสปาเก็ตตี้มีความแข็งแรงลดลง หรือขาดง่ายกว่า control อีกทั้งยังทำให้ค่า eGI สูงกว่า control อีกด้วย ซึ่งเป็นผลมาจากโปรตีนที่เติมเข้าไปทำให้ความสมบูรณ์และความแข็งแรงของเจลแป้งลดลง นอกจากนี้ปริมาณโปรตีนที่เติมลงไปยังส่งผลต่อรูปแบบการย่อย โดยการเติมโปรตีนปริมาณ 20% สปาเก็ตตี้ที่ได้จะแสดงรูปแบบการย่อยเป็น single-

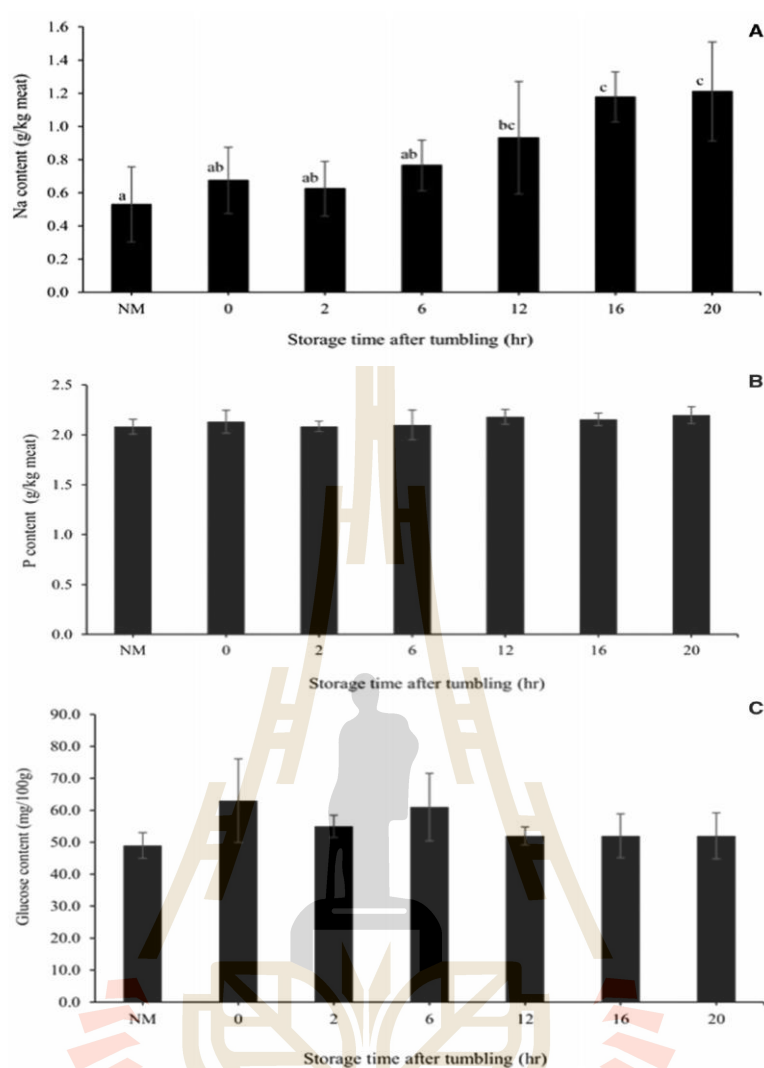
phase order ในขณะที่เมื่อเติมโปรตีน 40% สป่าเกิดขึ้นที่ได้แสดงรูปแบบการย่อยเป็นแบบ two-phase pseudo-first order แต่ค่าอัตราการย่อย ( $k$ ) ที่ได้จากการเติมโปรตีนทั้ง SPI, WPI และ CK ไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาที่ระดับประมาณโปรตีนที่เท่ากัน จึงกล่าวได้ว่าชนิดของโปรตีนไม่มีผลต่ออัตราการย่อย

## 4.2 ผลของส่วนผสมในการนวดเนื้อต่อการสูญเสียสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบินและความสัมพันธ์กับการเกิดจุดเลือดแดงในเนื้ออกไก่สุก

### 4.2.1 ความสามารถในการแพร่ผ่านของส่วนผสม

ปริมาณโซเดียมที่บริเวณกึ่งกลางของส่วนที่หนาที่สุดของชิ้นเนื้ออกไก่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นจนกระทั่งหลังจาก 12 ชั่วโมง จึงมีค่าคงที่ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.11a) ในทางตรงกันข้าม ปริมาณฟอสเฟตและกลูโคสไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ( $p > 0.05$ , รูปที่ 4.11b,c) ฟอสฟอรัสและกลูโคสแทรกผ่านเข้าไปในเนื้ออกไก่ได้ต่ำกว่าโซเดียมไอออน ( $\text{Na}^+$ ) โดยระหว่างการนวดภายใต้สุญญากาศนั้น โครงสร้างกล้ามเนื้อของอกไก่ถูกทำลายจากการบีบและคลายซ้ำๆ ทำให้ส่วนผสมที่ใช้นวดแทรกผ่านเข้าไปในเนื้อได้ง่ายขึ้น (Gao et al., 2015; Lee, Youm, Owens, & Meullenet, 2011) ซึ่งพบว่าสามารถดูดซับได้ 6 - 10% งานวิจัยก่อนหน้าพบว่า การเก็บรักษาหลังจากการนวดทำให้ไมโอซินละลายได้มากขึ้น พร้อมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคขององค์ประกอบในเนื้อ (meat matrix) (Andersen, Andersen, & Bertram, 2007; Chupaj, Malila, Petracci, Benjakul, & Visessanguan, 2016) จากผลวิจัยนี้พบว่าโซเดียมสามารถแทรกผ่านเข้าไปในบริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้อไก่ได้มากกว่า อย่างไรก็ตาม สารประกอบที่มีมวลโมเลกุล (molecular weight, MW) ใหญ่กว่า เช่น ฟอสเฟต (ประมาณ 370 กรัม/โมล) และ กลูโคส (ประมาณ 180 กรัม/โมล) ทำให้ถูกจำกัดการแพร่ผ่าน (Graiver, Pinotti, Califano, & Zaritzky, 2006; Xiong & Kupski, 1999) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าโซเดียมคลอไรด์เป็นส่วนผสมหลักที่สามารถแพร่ผ่านถึงบริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้ออกไก่ ดังนั้นจึงสามารถส่งผลทำให้เกิดการเสียหายของไมโอโกลบินและฮีโมโกลบินแม้กระทั่งไมโอโกลบินและฮีโมโกลบินที่อยู่ในเส้นเลือดได้มากกว่าฟอสเฟตและกลูโคสซึ่งถูกดูดซับเข้าไปในบริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้ออกไก่ได้น้อยมาก

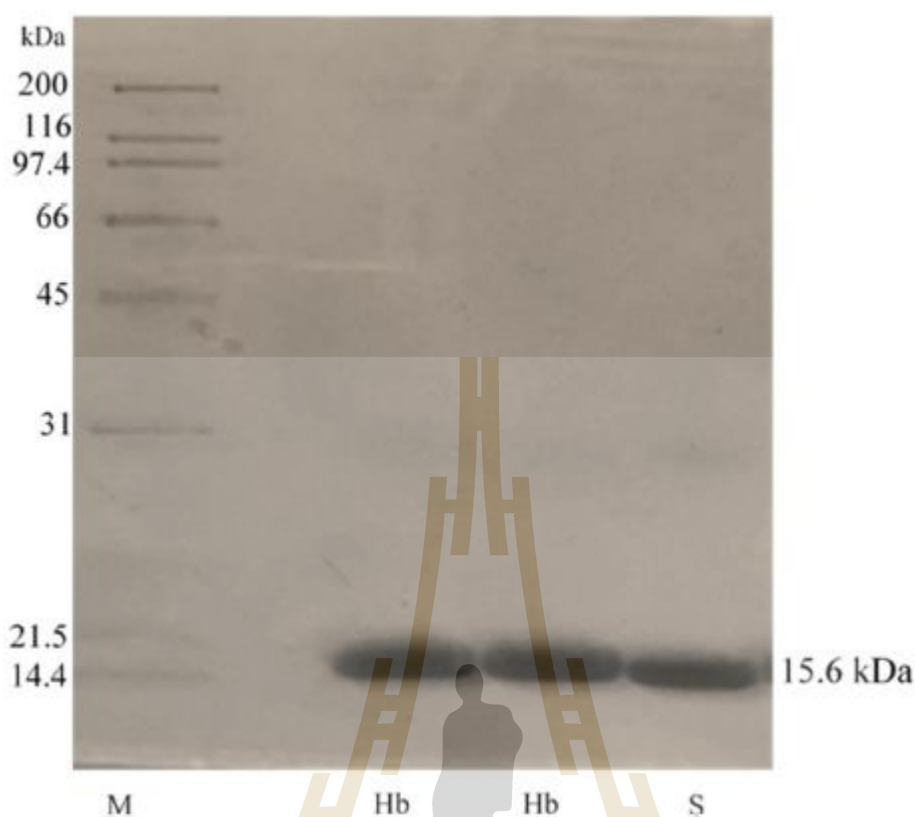




**รูปที่ 4.11** การเปลี่ยนแปลงปริมาณของส่วนผสมในบริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้ออกไก่ขนาดภายใต้สุญญากาศ เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่างกัน (n=9): ปริมาณโซเดียม (A); ฟอสฟอรัส (B); และกลูโคส (C) ตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) [NM (non-marinated samples) คือ ตัวอย่างที่ไม่ขนาดกับส่วนผสม].

#### 4.2.2 ผลของส่วนผสมต่อการเสียดสภาพทางความร้อนของฮีโมโกลบิน

ฮีโมโกลบินที่สกัดได้จากไก่มีมวลโมเลกุล (MW) ประมาณ 15.6 kDa มีความบริสุทธิ์ 93% (รูปที่ 4.12) ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีน tetramer (MW 64.5 kDa) ซึ่งประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (subunits) (Shi et al., 2015) มวลโมเลกุลของมอนอเมอร์ของฮีโมโกลบินในสัตว์ปีกมีค่าอยู่ระหว่าง 12.5-16.3 kDa (Abbasi & Lutfullah, 2002; Ahn & Maurer, 1989; Kranen et al., 1999)



รูปที่ 4.12 รูปแบบโปรตีนของฮีโมโกลบิน จากการวิเคราะห์ SDS-PAGE โดยใช้โพลีอะครีลาไมด์เจล 12.5% (M) Marker และ (S) สารมาตรฐานฮีโมโกลบินจากวัว (bovine Hb)

อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ( $T_d$ ) ของฮีโมโกลบิน เมื่อมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ลดลงจาก 67 เป็น 65.8 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0.5 ถึง 1.5 โมลาร์ ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.20) บ่งชี้ถึงผลของการลดเสถียรภาพโครงสร้างฮีโมโกลบินจากการเติมโซเดียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์จะลดปฏิกิริยาระหว่างตัวทำละลายที่ละลายในน้ำ (aqueous solvents) กับฮีโมโกลบิน เนื่องจากสามารถจับน้ำได้ดีกว่า ทำลายแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ และทำให้โครงสร้างของฮีโมโกลบินเปิดตัว (Mao, Sheng, & Pan, 2007). Ahn และ Maurer (1989) รายงานเช่นกันว่าโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2.5% ลดอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของฮีโมโกลบินในไก่วงให้ มีค่าเท่ากับ 68 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ฮีโมโกลบินที่ผสมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตในระดับความเข้มข้นต่ำ (10 มิลลิโมลาร์) ที่ pH 7 นั้นมีเสถียรภาพทางความร้อนเพิ่มขึ้นถึง 72.5 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.20) ฟอสเฟตไอออนเพิ่มแรงดึงดูดของตัวทำละลายและลดการละลายได้ของโมเลกุลที่ไม่มีขั้วทำให้แรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำและเสถียรภาพทางความร้อนเพิ่มขึ้น (Lindman et al., 2006; Moller et al., 2012) อย่างไรก็ตาม ค่า pH โดยทั่วไปของเนื้อไก่แฉกด้วยโซเดียมไตรโพลี

ฟอสเฟตมีค่าประมาณ pH 9 ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการศึกษาในสภาวะจำลองเล็กน้อย ที่ pH 9 เสถียรภาพของโครงสร้างของฮีโมโกลบินจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของฟอสเฟตเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.20) ซึ่งสอดคล้องกับค่าเอนทัลปีที่ลดลง ( $\Delta H$ , ตารางที่ 4.20) ที่ pH 9 โปรตีนกล้ามเนื้อเกิดประจุลบซึ่งส่งเสริมให้เกิดแรงผลักรวมกันในโมเลกุลและเกิดการเปิดตัวของโครงสร้างโปรตีน ส่งผลให้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ( $T_d$ ) และ  $\Delta H$  มีค่าลดลง ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสที่เติมเพิ่มขึ้น พร้อมกับค่า  $\Delta H$  ที่เพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.20) กลูโคสนั้นทำให้รัศมีของโครงสร้างโปรตีนที่มีน้ำล้อมรอบ (hydrated radius) ลดลงและส่งเสริมการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ ส่งผลให้เสถียรภาพทางความร้อนเพิ่มขึ้น (Alfonso et al., 2007; Oshima & Kinoshita, 2013) ฮีโมโกลบินที่เติมส่วนผสมร่วมกันทั้ง 3 ชนิด ทั้งที่ pH 7 หรือ pH 9 มีเสถียรภาพทางความร้อนน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.20) ผลของการลดเสถียรภาพจากการเติมส่วนผสมนั้นบ่งชี้ได้จากฮีโมโกลบินเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำในระบบโครงสร้างเนื้อ (meat system) นั้น โซเดียมคลอไรด์เป็นเพียงส่วนผสมหลักชนิดเดียวที่สามารถแทรกผ่านเข้าไปในกล้ามเนื้อ โดยมีความเข้มข้นประมาณ 3.1 กรัม/กก. เนื้อ ซึ่งเท่ากับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นประมาณ 66 มิลลิโมลาร์ ที่ปริมาณความชื้น 80% ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้มีค่าต่ำกว่ามากเมื่อเทียบกับค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่น้อยที่สุดที่ทดสอบในฮีโมโกลบินที่สกัดได้ซึ่งศึกษาในระบบจำลอง ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลที่สันนิษฐานได้ว่าการเสียสภาพของฮีโมโกลบินที่บริเวณกึ่งกลางของชิ้นเนื้อน่าจะเกิดจากอุณหภูมิที่มากกว่า 69 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของตัวอย่างควบคุมของฮีโมโกลบิน ในทางตรงกันข้าม ฮีโมโกลบินที่อยู่บริเวณผิวของเนื้อไก่ขนาดที่ pH 9 เกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิต่ำกว่าคือ 65.8 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4.20)

ตารางที่ 4.20 ผลของส่วนผสมที่ใช้ขนาดเนื้อต่ออุณหภูมิที่ทำให้เกิดเสถียรภาพทางความร้อน ( $T_d$ ) และ เอนทาลปี ( $\Delta H$ ) ของฮีโมโกลบินที่สกัดจากไก่

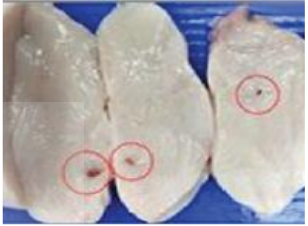
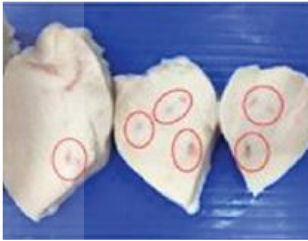



| ส่วนผสม                               | ความเข้มข้น<br>(มิลลิโมลาร์) | $T_d$<br>(องศาเซลเซียส) | เอนทาลปีของการเสถียรภาพ,<br>$\Delta H$ (จูล/กรัม) |
|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------|---|
| ตัวอย่างควบคุม                        | -                            | $69.4 \pm 0.35^e$       | $15.21 \pm 0.32^h$                                |
| โซเดียมคลอไรด์                        | 500                          | $67.0 \pm 0.25^{cd}$    | $11.51 \pm 0.17^{de}$                             |
|                                       | 1000                         | $66.3 \pm 0.51^{bc}$    | $9.78 \pm 0.10^c$                                 |
|                                       | 1500                         | $65.8 \pm 0.74^b$       | $7.82 \pm 0.18^a$                                 |
| โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (pH $\approx$ 7) | 10                           | $72.5 \pm 0.31^g$       | $16.57 \pm 0.24^k$                                |
|                                       | 55                           | $69.4 \pm 0.14^e$       | $12.09 \pm 0.21^{fg}$                             |
|                                       | 100                          | $69.5 \pm 0.39^e$       | $11.88 \pm 0.53^{ef}$                             |
| โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (pH $\approx$ 9) | 10                           | $66.1 \pm 0.12^{bc}$    | $12.50 \pm 0.40^g$                                |
|                                       | 55                           | $61.9 \pm 0.77^a$       | $11.21 \pm 0.20^d$                                |
|                                       | 100                          | $61.4 \pm 1.09^a$       | $8.53 \pm 0.60^b$                                 |
| กลูโคส                                | 150                          | $69.6 \pm 0.38^e$       | $15.82 \pm 0.12^i$                                |
|                                       | 350                          | $70.0 \pm 0.28^{ef}$    | $16.08 \pm 0.15^i$                                |
|                                       | 600                          | $70.6 \pm 0.69^f$       | $18.07 \pm 0.04^l$                                |
| ฮีโมโกลบิน (pH $\approx$ 7)           | 1000 (NaCl)                  | $67.9 \pm 0.38^d$       | $10.21 \pm 0.19^c$                                |
| ในส่วนผสมร่วมกันทั้ง 3 ชนิด           | 55 (STPP)                    |                         |   |
|                                       | 350 (Glucose)                |                         |   |
| ฮีโมโกลบิน (pH $\approx$ 9)           | 1000 (NaCl)                  | $65.8 \pm 0.63^b$       | $10.00 \pm 0.15^c$                                |
|                                       | 55 (STPP)                    |                         |   |
| ในส่วนผสมร่วมกันทั้ง 3 ชนิด           | 350 (Glucose)                |                         |   |

n=3, ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.2.3 การเกิดจุดเลือดแดงและการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss)

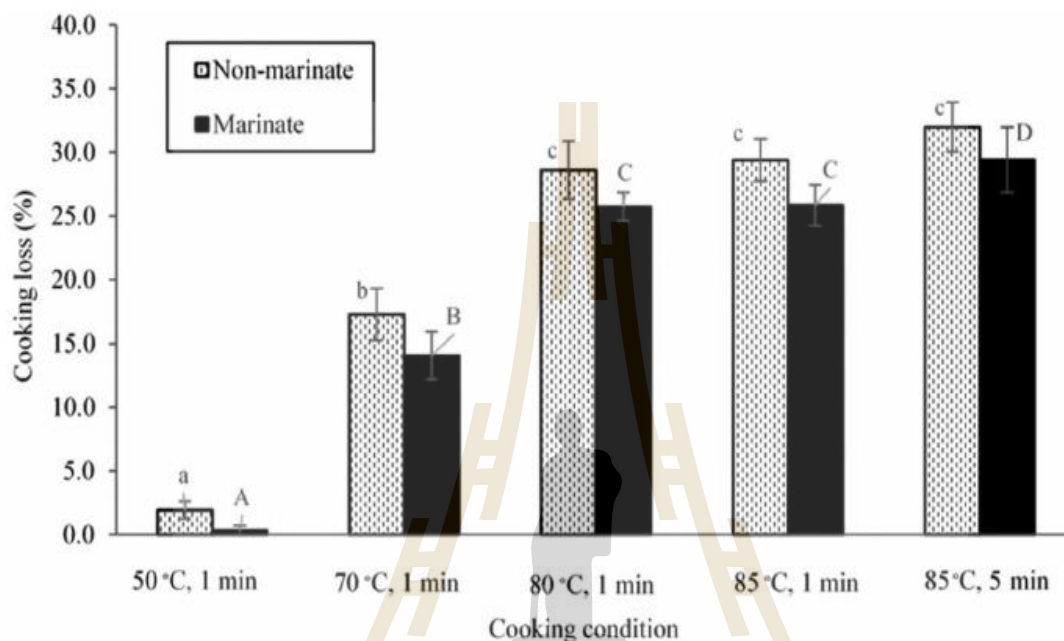
การเกิดจุดเลือดแดงสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนในทุกตัวอย่างที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 50 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที (ตารางที่ 4.21) การเกิดจุดเลือดแดงลดลง 1.7% และ 3.3% เมื่ออุณหภูมิแกนกลางเพิ่มขึ้นถึง 80 องศาเซลเซียส ในตัวอย่างที่ไม่นวดและตัวอย่างที่นวด ตามลำดับ ตัวอย่างที่นวดพบจุดเลือดแดงมากกว่าตัวอย่างที่ไม่นวด ตัวอย่างที่นวดดูดซับน้ำได้ดีกว่า ส่งผลให้ปริมาณความชื้นและพลังงานในการนำความร้อน (heat conduction) สูงกว่า (Alvarado & Mckee, 2007) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียหาย ( $T_d$ ) ของฮีโมโกลบินบริสุทธิ์จากไก่ที่ใช้ศึกษาในระบบจำลองมีค่าประมาณ 69 องศาเซลเซียส และยังคงพบจุดเลือดแดงถึงแม้ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ฮีโมโกลบินภายในเซลล์ที่เหลื่อค้างในเส้นเลือดจะถูกป้องกันโดยเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งประกอบด้วยโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) ไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane lipids) และทรานซ์ เมมเบรน โปรตีน (transmembrane proteins) (Singh, Ponnappan, Verma, & Mittal, 2019) ดังนั้น อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียหายของฮีโมโกลบินภายในเซลล์จึงสูงกว่าฮีโมโกลบินที่ได้จากการสกัด Farahani และคณะ (1999) รายงานว่าการเสียหายจากความร้อนของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีค่าสูงกว่าฮีโมโกลบินขึ้นกับค่าเวลาในการผ่อนคลาย (relaxation time) เมื่อวิเคราะห์โดย magnetic resonance imaging (MRI) จึงอธิบายได้ว่าทำไมการให้ความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 80 องศาเซลเซียส ไม่สามารถกำจัดจุดเม็ดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์และไม่พบจุดเลือดแดงที่อุณหภูมิแกนกลาง 85 องศาเซลเซียส คงไว้เป็นเวลา 1 หรือ 5 นาที ทั้งในตัวอย่างที่ไม่นวดและตัวอย่างที่นวด (ตารางที่ 4.21) ดังนั้น การให้ความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 85 องศาเซลเซียส สามารถแก้ปัญหาจุดเลือดแดงได้

ตารางที่ 4.21 การเกิดจุดเลือดแดงที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน (n=60)

| อุณหภูมิแกนกลาง (องศา เซลเซียส),<br>ระยะเวลา (นาที) | ชนิดตัวอย่าง | การเกิดจุดเลือดแดง (%) | ภาพ   |
|---|--------------|------------------------|---|
| 50 องศาเซลเซียส, 1 นาที                             | ไม่ขนาด      | 100                    |    |
|   | ขนาด         | 100                    |   |
| 70 องศาเซลเซียส, 1 นาที                             | ไม่ขนาด      | 100                    |    |
|   | ขนาด         | 100                    |   |
| 80 องศาเซลเซียส, 1 นาที                             | ไม่ขนาด      | 1.7                    |   |
|   | ขนาด         | 3.3                    |   |
| 85 องศาเซลเซียส, 1 นาที                             | ไม่ขนาด      | 0                      |  |
|   | ขนาด         | 0                      |   |
| 85 องศาเซลเซียส, 5 นาที                             | ไม่ขนาด      | 0                      |  |
|   | ขนาด         | 0                      |   |

การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญส่งผลต่อน้ำหนักของผลิตภัณฑ์ไก่สุกที่ได้ (yield) การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกของเนื้ออกไก่ขนาดนั้นมีค่าต่ำกว่าเนื้ออกไก่ที่ไม่ขนาด โซเดียมคลอไรด์และ/หรือฟอสเฟตเหนียวช่วยให้โครงสร้างไมโอไฟบริลลาร์โปรตีนเปิดตัวทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นจึงกักเก็บน้ำในโครงสร้างได้มากขึ้น (Khan et

al., 2016; Smith & Young, 2007) การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิ การให้ความร้อนเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) แต่อุณหภูมิแกนกลางที่ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ส่งผลให้ค่า การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกใกล้เคียงกัน ( $p > 0.05$ , รูปที่ 4.13)



**รูปที่ 4.13** ผลของอุณหภูมิแกนกลางต่อการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ของเนื้ออกไก่ที่นวด (marinated) และไม่นวด (non-marinated) ตัวอย่างที่นวดและตัวอย่างที่ไม่นวดแตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของตัวอย่างที่ไม่นวดและตัวอย่างที่นวดตามลำดับ ( $p < 0.05$ )

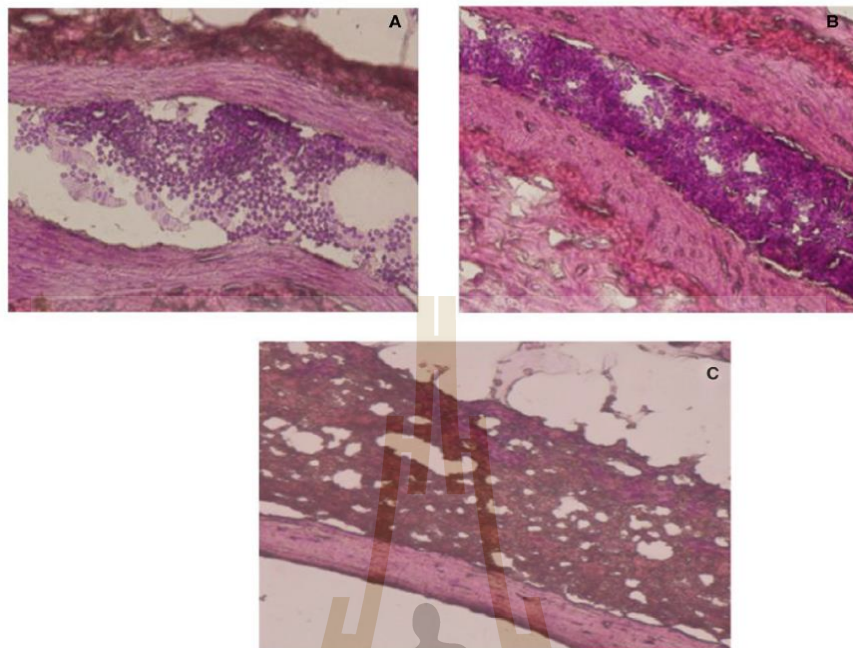
ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Bae และคณะ (2018) ซึ่งรายงานว่าผลผลิตที่ได้หลังการทำสุก (cooking yields) ของเนื้ออกไก่ที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1% - 2% มีค่าใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 80 และ 85 องศาเซลเซียส ( $p > 0.05$ ) งานวิจัยก่อนหน้ารายงานว่า การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกในเนื้อนวด (marinated meat) มีค่าอยู่ระหว่าง 24% - 30% (Barbantia & Pasquini, 2005; Chupaj et al., 2016; Gamage, Mutucumarana, & Andrew, 2017; Pérez-Juan, Kondjoyan, Picouet, & Realini, 2012) นอกจากนี้ การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกและอุณหภูมิที่มีค่าสูงอาจเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของไขมันในผลิตภัณฑ์เนื้อสุก Min, Cordray, และ Ahn (2010) รายงานว่าการให้ความร้อนเพื่อทำให้สุก ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของโปรตีนฮีม ส่งผลให้ปลดปล่อย heme iron ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างการ

เก็บรักษา ถึงแม้การให้ความร้อนที่สูงมากเป็นการประกันว่าสามารถกำจัดการเกิดจุดเลือดแดงได้ แต่จะมีผลอย่างยิ่งต่อการสูญเสียน้ำหนักหลังการทำให้สุกและยังเพิ่มโอกาสในการเกิดออกซิเดชันของไขมันระหว่างการเก็บรักษาได้ งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนเนื้ออกไก่จนกระทั่งอุณหภูมิแกนกลางถึง 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที สามารถกำจัดการเกิดจุดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ โดยไม่มีผลต่อการสูญเสียน้ำหนักหลังการทำสุก

#### 4.2.4 การวิเคราะห์ภาพจากกล้องจุลทรรศน์

ตรวจสอบโครงสร้างทางจุลภาคของเซลล์เม็ดเลือดที่อยู่ในเส้นเลือดใน *Pectoralis major* หลังได้รับความร้อนถึงอุณหภูมิแกนกลางต่างกัน พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cells, RBCs) ของเนื้ออกไก่มีรูปร่างกลมและกระจายอยู่ภายในเส้นเลือด (รูปที่ 4.14a) ในขณะที่เกิดการจับตัวกันที่อุณหภูมิแกนกลาง 50 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.14b) ซึ่งสอดคล้องกับการพบการเกิดจุดเลือดแดง 100% เมื่ออุณหภูมิแกนกลางถึง 85 องศาเซลเซียส เซลล์เม็ดเลือดแดงจะกลายเป็นสีน้ำตาลและเกิดการจับรวมตัวกันเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.14c) สอดคล้องกับการหายไปของจุดเลือดแดงเช่นกัน ความร้อนเหนี่ยวนำให้โครงสร้างโกลบินเปิดตัวและเกิดเป็นโครงสร้างของเฟอร์ริฮีโมโครม (ferrihemochrome) ซึ่งมีสีน้ำตาล (Suman et al., 2016) เซลล์เม็ดเลือดแดงบางเซลล์จะอยู่ในรูปแบบโครงสร้างเดิมที่ยังไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง (native form) และมีสีแดงที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส จะเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล สอดคล้องกับการหายไปของจุดเลือดแดง จากการส่องกล้องจุลทรรศน์ยืนยันว่าจุดเลือดแดงเกิดจากการเสียสภาพที่ไม่สมบูรณ์ของเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือด ดังนั้น การให้ความร้อนที่เพียงพอที่ทำให้โครงสร้างฮีโมโกลบินเกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์สามารถกำจัดจุดเลือดแดงให้หมดไปได้





**รูปที่ 4.14** เซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลืค้ำอยู่ในเส้นเลือดของเนื้ออกไก่ขนาดสุกที่ได้รับความร้อนในสภาวะต่างกัน: (A) เนื้อดิบ, (B) เนื้อสุกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และ (C) เนื้อสุกที่ได้รับความร้อนที่อุณหภูมิแกนกลาง 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

#### 4.2.5 สรุปผลการวิจัย

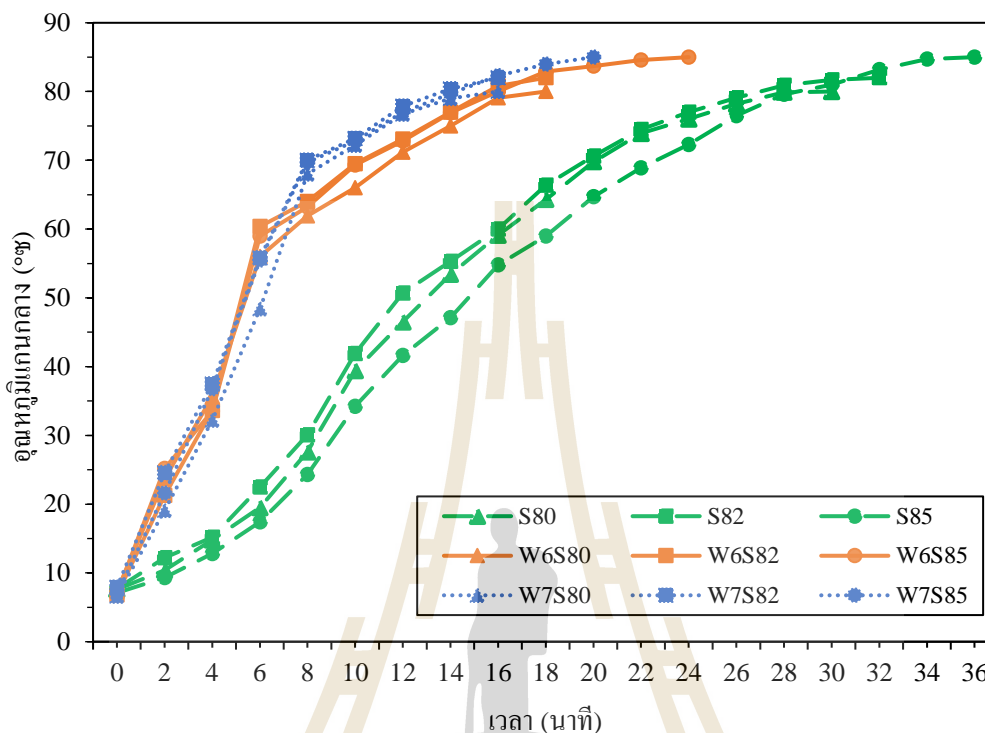
จากการศึกษาระหว่างส่วนผสมที่ใช้ขนาดพบว่า โซเดียมคลอไรด์ถูกดูดซึมเข้าไปในเนื้อได้ดีที่สุดหลังนวด การเติมโซเดียมคลอไรด์อย่างเดียวและโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตที่ค่า pH มีความเป็นด่างจะลดเสถียรภาพของโครงสร้างฮีโมโกลบิน ส่งผลให้ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสถียรภาพลดลง กลูโคสอย่างเดียวเพิ่มเสถียรภาพทางความร้อนของโครงสร้างฮีโมโกลบิน อย่างไรก็ตามผลร่วมกันของส่วนผสมทั้ง 3 ชนิดนั้น ลดเสถียรภาพของโครงสร้างฮีโมโกลบิน ส่งผลให้อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสถียรภาพลดลง จุดเลือดแดงมีสาเหตุหลักเกิดจากการเสถียรภาพของโครงสร้างฮีโมโกลบินในเส้นเลือดที่ไม่สมบูรณ์ เนื้ออกไก่ขนาดควรให้ความร้อนให้อุณหภูมิแกนกลางที่ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สามารถกำจัดจุดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์

### 4.3 การลดจุดเดือดแดงในเนื้ออกไก่ทอดสุกโดยการให้ความร้อนด้วยเทคนิคไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำ

#### 4.3.1 รูปแบบของเวลา-อุณหภูมิ (Time-temperature profiles)

อุณหภูมิเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วระหว่างการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ และค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อใช้ไอน้ำให้ความร้อน (รูปที่ 4.15) ความร้อนจากไมโครเวฟเกิดจากการหมุนของโมเลกุลที่มีขั้วและการนำความร้อนจากการเคลื่อนที่ของไอออนที่ละลายน้ำ ทำให้โมเลกุลเกิดการสั่นสะเทือน และเกิดความร้อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายในเนื้ออกไก่ทอด ในทางตรงกันข้าม การถ่ายเทความร้อนจากไอน้ำด้วยวิธีดั้งเดิม ทำให้เกิดการพาและ/หรือการนำความร้อน ส่งผลให้อัตราการเกิดความร้อนช้ากว่า (Awuah, Ramaswamy & Tang, 2015; Li, Tang, Yan & Li, 2019) อัตราการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพียงอย่างเดียวมีค่าประมาณ 7.6-8.3 องศาเซลเซียส/นาที ในขณะที่อัตราการให้ความร้อนด้วยไอน้ำเพียงอย่างเดียวคือ 2.4-2.7 องศาเซลเซียส/นาที Pérez-Juan, Kondjoyan, Picouet และ Realini (2012) รายงานว่าอัตราการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟในเนื้อวัวนวดสุกคือ 15.6-16.8 องศาเซลเซียส/นาที อัตราการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟในเนื้อนวดสุกขึ้นกับความเข้มข้นของไอออนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำที่ใช้ขนาด ซึ่งจะมีผลทำให้สมบัติไดอิเล็กทริก (dielectric properties) เพิ่มขึ้น (Lyng, Zhang & Brunton, 2005) อย่างไรก็ตามการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเพียงอย่างเดียวทำให้เกิดความร้อนที่ไม่สม่ำเสมอ โดยไม่สามารถควบคุมได้ (thermal runaway) ซึ่งทำให้เกิดการไหม้ (burning) ในทางตรงกันข้าม การใช้ไอน้ำเพียงอย่างเดียวให้ความร้อนเนื้ออกไก่ทอดต้องใช้เวลารวมถึง 26.2-32.1 นาที เพื่อให้อุณหภูมิแกนกลางเท่ากับ 80-85 องศาเซลเซียส เมื่อปรับใช้สองกระบวนการนี้ร่วมกัน จะลดระยะเวลาลงเท่ากับ 13.6-23.2 นาที ซึ่งสามารถลดเวลาในกระบวนการผลิตได้ถึง 28-48% ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.22) การลดเวลาในการทำสุกยังสามารถคงคุณค่าสารอาหารไว้ได้ดีกว่า ได้ผลผลิตสูง รวมถึงช่วยประหยัดพลังงาน (Joseph, 2017; Yarmand & Homayouni, 2011) Yarmand และ Homayouni (2011) รายงานว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ทำให้ระยะเวลาการทำสุกสั้น ส่งผลให้รักษาปริมาณวิตามินบี 1 (thiamin) ในไก่สุกได้ถึง 98% ในขณะที่วิธีดั้งเดิมมีค่าเพียง 77% นอกจากนี้ Jouquand และคณะ (2015) รายงานว่าการทำสตูว์เนื้อวัวแดง (beef burgundy) ให้สุกด้วยไมโครเวฟ (4.6 kWh) มีการใช้พลังงานต่ำกว่าการใช้วิธีดั้งเดิม (6.5 kWh) ซึ่งลดเวลาการทำสุกได้ 56% การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟนั้นเป็นกระบวนการที่ใช้พลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่า เนื่องจากความร้อนเกิดขึ้นจากภายใน (Pathare & Roskilly, 2016) จากผลงานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า การ

ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำช่วยลดเวลาการให้ความร้อนในตัวอย่างอกไก่ขนาด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนจากไอน้ำเพียงอย่างเดียว



**รูปที่ 4.15** รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ (temperature profiles) ในเนื้ออกไก่เมื่อให้ความร้อนด้วยไอน้ำและใช้วิธีร่วมกันระหว่างไมโครเวฟและให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน S80, S82, S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ W6S80, W6S82, W6S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 6 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ W7S80, W7S82, W7S85 คือ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 7 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 80, 82 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

#### 4.3.2 คุณภาพของเนื้ออกไก่สุก

กระบวนการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำไม่มีผลต่อการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (cooking loss) ในเนื้ออกไก่ขนาด เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ไอน้ำให้ความร้อนเพียงอย่างเดียว ที่อุณหภูมิแกนกลางที่เท่ากัน ( $p > 0.05$ , ตารางที่ 4.22) การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิแกนกลางที่ให้ความร้อนเพิ่มขึ้น มีรายงานว่า การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ทำให้

เกิดการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้วิธีดั้งเดิม (Dominguez, Gómez, Fonseca & Lorenzo, 2014; Li et al., 2019; Yarmand & Homayouni, 2009) การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ส่งผลให้มีอัตราการให้ความร้อนที่สูงกว่า จึงเกิดการทำลายกล้ามเนื้อได้มากกว่า ปริมาณน้ำที่สูญเสียออกมาระหว่างการให้ความร้อนจึงมากกว่า (Nikmaram, Yarmand, Emamjomeh & Darehabi, 2011) ผลงานวิจัยนี้บ่งชี้ว่า การให้ความร้อนร่วมกันระหว่างไมโครเวฟและการใช้ไอน้ำ ทำให้การเสียดสภาพของเลือดในเนื้อเพิ่มขึ้น โดยไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญต่อการสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก

**ตารางที่ 4.22** ผลของการให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟ ตามด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิแกนกลางต่างกัน ต่อคุณภาพของเนื้อสุกและการเกิดจุดเลือดแดงของเนื้ออกไก่ขนาด (n = 9)

| อุณหภูมิแกนกลาง (องศาเซลเซียส) | ระยะเวลาการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ (นาที) | ระยะเวลาการให้ความร้อน (นาที) | การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุก (%) | การเกิดจุดเลือดแดง (%) |
|--------------------------------|---|-------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| 80                             | 0   | 26.2 ± 1.8 <sup>c</sup>       | 26.5 ± 2.0 <sup>b</sup>             | 44.4                   |
|                                | 6   | 17.0 ± 1.5 <sup>ef</sup>      | 26.3 ± 2.8 <sup>b</sup>             | 33.3                   |
|                                | 7   | 13.6 ± 1.6 <sup>g</sup>       | 26.9 ± 2.3 <sup>ab</sup>            | 22.2                   |
| 82                             | 0   | 28.8 ± 2.4 <sup>b</sup>       | 28.1 ± 1.8 <sup>ab</sup>            | 33.3                   |
|                                | 6   | 17.7 ± 0.8 <sup>e</sup>       | 27.6 ± 0.3 <sup>ab</sup>            | 11.1                   |
|                                | 7   | 15.1 ± 1.6 <sup>fg</sup>      | 27.8 ± 1.1 <sup>ab</sup>            | 0                      |
| 85                             | 0   | 32.1 ± 2.4 <sup>a</sup>       | 28.5 ± 1.1 <sup>ab</sup>            | 0                      |
|                                | 6   | 23.2 ± 1.2 <sup>d</sup>       | 28.4 ± 0.9 <sup>ab</sup>            | 0                      |
|                                | 7   | 19.5 ± 1.0 <sup>e</sup>       | 29.7 ± 0.1 <sup>a</sup>             | 0                      |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ค่า pH ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (WHC) และค่าแรงเฉือนของเนื้อ (shear force) มีค่าใกล้เคียงกัน โดยไม่ขึ้นกับกระบวนการให้ความร้อน ( $p > 0.05$ , ตารางที่ 4.23) ค่าเฉลี่ย pH ของเนื้อสุกในทุกตัวอย่างมีค่าอยู่ระหว่าง 6.30-6.36 ( $p > 0.05$ , ตารางที่ 4.23) จากผลการวิจัย อธิบายได้ว่าให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำไม่ทำให้ค่าแรงผลักของน้ำ (water expulsion) ใน

เนื้อสุกเพิ่มขึ้น ค่าแรงเฉือนของเนื้อสัมพันธ์กับความเหนียวเนื้อ เกิดจากการเสียสภาพจากความร้อนของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (myofibrillar proteins) (Laakkonen, Wellintong & Sherbon, 1972; Pathare & Roskilly, 2016). Nikmaram et al. (2011) รายงานว่าค่าแรงเฉือนของเนื้อลูกวัว (veal muscle) สุกที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ การคั่ว (roasting) และการตุ๋น (braising) มีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเสียสภาพของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่เกิดขึ้นนั้นเหมือนกัน เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการให้สุกดังกล่าว อย่างไรก็ตาม การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟที่พลังงานสูง (700 W) ในเนื้อจามรี (yak meat) ส่งผลให้มีค่าแรงเฉือนในเนื้อต่ำกว่าตัวอย่างที่ผ่านการต้ม ซึ่งน่าจะเกิดจากกล้ามเนื้อเกิดการหดตัวจากความร้อนอย่างรวดเร็ว (Li et al., 2019) จากงานวิจัยนี้ บ่งชี้ได้ว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้น้ำไม่มีผลต่อคุณภาพของเนื้อสุก

อย่างไรก็ตามตัวอย่างเนื้อสุกที่ได้รับความร้อนจากไมโครเวฟร่วมกับการใช้น้ำ แสดงค่าปริมาณความชื้นและค่าสีที่แตกต่างกันมากกว่า การให้ความร้อนโดยใช้น้ำเพียงอย่างเดียว ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.23) ปริมาณความชื้นของตัวอย่างสุกที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นระยะเวลาานมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่ได้รับความร้อนจากไอน้ำ ( $p < 0.05$ ) การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟทำให้ความชื้นเกิดการระเหยจากตัวอย่างได้มากกว่า (Datta & Rakesh, 2013) นอกจากนี้ ตัวอย่างเนื้อนวดสุกที่ได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้น้ำ มีค่าความสว่าง ( $L^*$ ) สูงกว่า และมีค่าสีแดง ( $a^*$ ) และค่าสีเหลือง ( $b^*$ ) ต่ำกว่าตัวอย่างให้ความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิแกนกลาง  $82^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.23) ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับ Ergonul (2017) ซึ่งบ่งชี้ว่า ค่า  $a^*$  และ  $b^*$  ในเนื้ออกไก่สุกที่ให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่ทำให้สุกโดยการลวก มีรายงานว่ากรดของค่า  $a^*$  ในเนื้อสุก เกิดจากการออกซิเดชันและการเสียสภาพทางความร้อนของไมโอโกลบิน ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างของเฟอร์ริฮีโมโครม (ferrihemochrome) ที่มีสีน้ำตาล (Suman, Nair, Joseph & Hunt, 2016) ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟและการใช้น้ำทำให้เนื้ออกไก่นวดสุกที่อุณหภูมิแกนกลาง  $82^{\circ}\text{C}$  องศาเซลเซียส มีค่าสีแดงลดลง

ตารางที่ 4.23 คุณภาพของเนื้ออกไก่ขนาดสุกที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำ

| อุณหภูมิแกนกลาง<br>(องศาเซลเซียส) | ระยะเวลาการให้<br>ความร้อนด้วย<br>ไมโครเวฟ<br>(นาที) | pH          | ปริมาณ<br>ความชื้น<br>(%)  | ความสามารถ<br>ในการอุ้มน้ำ<br>ของเนื้อ<br>(%) | แรงฉีก<br>(กิโลกรัม) | L*                       | a*                      | b*                        |
|-----------------------------------|--|-------------|----------------------------|---|----------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
| 80                                | 0  | 6.36 ± 0.04 | 72.03 ± 0.47 <sup>a</sup>  | 53.45 ± 2.82                                  | 3.18 ± 0.23          | 82.6 ± 0.4 <sup>a</sup>  | 2.5 ± 0.3 <sup>ab</sup> | 14.1 ± 0.3 <sup>bc</sup>  |
|                                   | 6  | 6.33 ± 0.02 | 70.14 ± 0.46 <sup>c</sup>  | 56.33 ± 1.80                                  | 3.19 ± 0.15          | 82.2 ± 0.7 <sup>ab</sup> | 2.2 ± 0.2 <sup>cd</sup> | 13.7 ± 0.3 <sup>d</sup>   |
|                                   | 7  | 6.37 ± 0.01 | 70.24 ± 0.35 <sup>c</sup>  | 56.00 ± 1.08                                  | 3.20 ± 0.32          | 82.4 ± 0.8 <sup>ab</sup> | 2.3 ± 0.2 <sup>bc</sup> | 14.0 ± 0.2 <sup>bcd</sup> |
| 82                                | 0  | 6.30 ± 0.07 | 71.35 ± 0.45 <sup>ab</sup> | 54.20 ± 1.60                                  | 3.03 ± 0.09          | 80.8 ± 0.2 <sup>c</sup>  | 2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 15.3 ± 0.1 <sup>a</sup>   |
|                                   | 6  | 6.31 ± 0.03 | 70.85 ± 0.45 <sup>bc</sup> | 55.95 ± 3.14                                  | 3.12 ± 0.12          | 81.7 ± 0.5 <sup>ab</sup> | 2.0 ± 0.1 <sup>d</sup>  | 13.9 ± 0.1 <sup>cd</sup>  |
|                                   | 7  | 6.35 ± 0.08 | 70.17 ± 0.83 <sup>c</sup>  | 55.78 ± 3.09                                  | 3.17 ± 0.14          | 82.2 ± 0.6 <sup>ab</sup> | 2.1 ± 0.2 <sup>cd</sup> | 14.0 ± 0.1 <sup>bcd</sup> |
| 85                                | 0  | 6.30 ± 0.11 | 71.19 ± 0.78 <sup>b</sup>  | 54.36 ± 1.33                                  | 3.02 ± 0.21          | 82.0 ± 1.1 <sup>ab</sup> | 2.2 ± 0.3 <sup>cd</sup> | 14.0 ± 0.4 <sup>bcd</sup> |
|                                   | 6  | 6.33 ± 0.02 | 71.08 ± 0.29 <sup>b</sup>  | 55.68 ± 3.16                                  | 3.10 ± 0.15          | 82.4 ± 0.7 <sup>ab</sup> | 2.0 ± 0.1 <sup>d</sup>  | 14.3 ± 0.3 <sup>b</sup>   |
|                                   | 7  | 6.37 ± 0.01 | 70.21 ± 1.15 <sup>c</sup>  | 55.90 ± 3.50                                  | 3.12 ± 0.12          | 81.4 ± 0.6 <sup>bc</sup> | 2.0 ± 0.1 <sup>cd</sup> | 14.1 ± 0.2 <sup>bc</sup>  |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

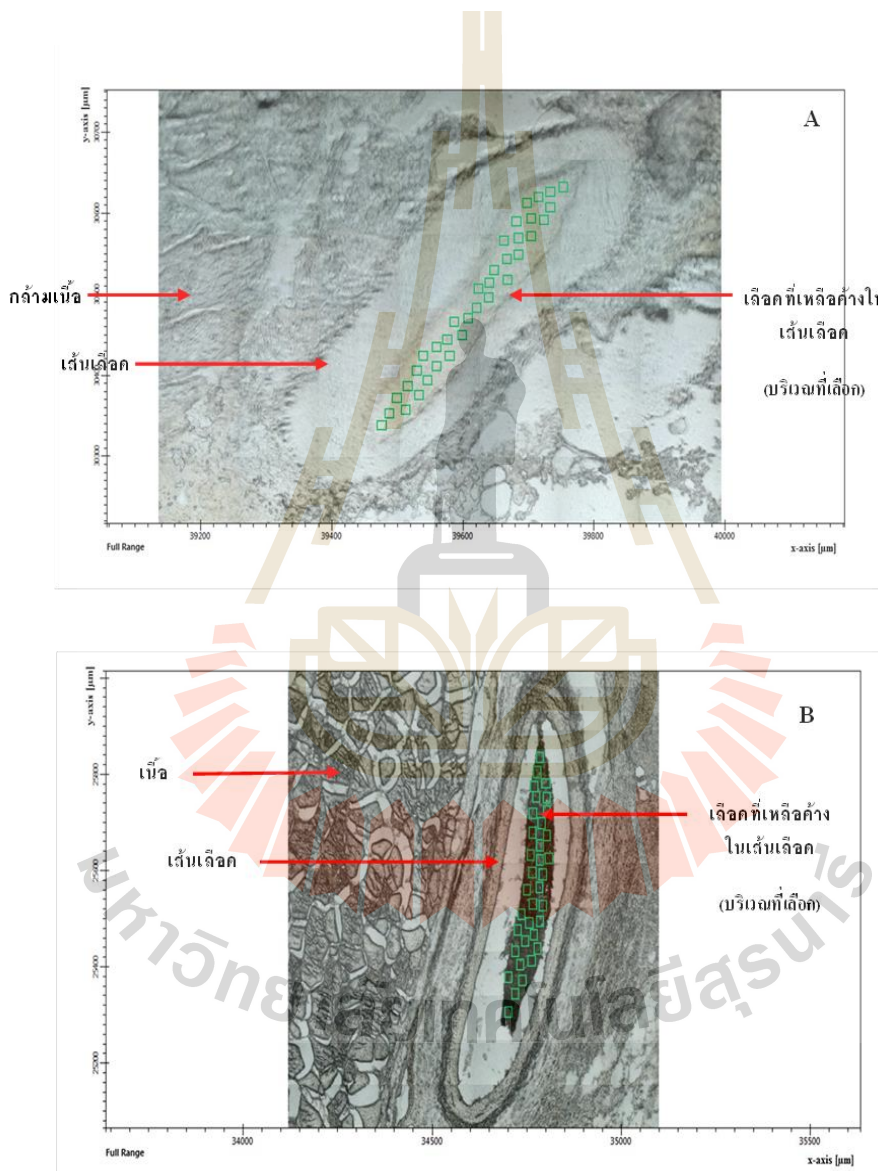
### 4.3.3 การเกิดจุดเลือดแดง

การเกิดจุดเลือดแดงในตัวอย่างที่ทำให้สุกด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำให้ความร้อน พบน้อยกว่าตัวอย่างที่ใช้ไอน้ำให้ความร้อนเพียงอย่างเดียว สำหรับทุกอุณหภูมิแกนกลาง (ตารางที่ 4.22) การให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลานานกว่า แสดงให้เห็นว่าสามารถลดการเกิดจุดเลือดแดงได้มากกว่า ที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส ไม่พบการเกิดจุดเลือดแดง เมื่อผ่านการให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 7 นาที Jantaranikorn และ Yongsawatdigul (2020) รายงานว่า ไม่พบการเกิดจุดเลือดแดงที่อุณหภูมิแกนกลาง 85 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ อย่างไรก็ตาม การสูญเสียน้ำหนักจากการทำให้สุกระหว่างตัวอย่างสุกที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 และ 85 องศาเซลเซียส นั้นมีค่าไม่แตกต่างกัน การทำให้สุกที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส จะช่วยให้ประหยัดพลังงานมากกว่า โดยทั่วไปกระบวนการทำให้สุกโดยการใช้ไอน้ำเพียงอย่างเดียว ที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส มีการประยุกต์ใช้แล้วทางการค้า ซึ่งตรวจพบจุดเลือดแดงบ้างประมาณ 2-3% (Smith & Northcutt, 2003) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟ เป็นเวลา 7 นาที ตามด้วยการใช้ไอน้ำให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดการเกิดจุดเลือดแดงได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่เกิดการสูญเสียผลผลิตอย่างมีนัยสำคัญ การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟจะเพิ่มอุณหภูมิภายในตัวอย่างเนื้ออย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเสียสภาพของเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดได้มากกว่า และเกิดการเปลี่ยนจุดเลือดเป็นสีน้ำตาล (Datta & Rakesh, 2013; Gowen, Abu-Ghannam, Frias & Oliveira, 2006; Suman et al., 2016) ดังนั้น กระบวนการให้ความร้อนร่วมกันของ 2 วิธีนี้ จึงเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับลดการเกิดจุดเลือดแดง และยังใช้พลังงานน้อยอีกด้วย

### 4.3.4 พูเรียรัทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR spectroscopy)

บริเวณของตัวอย่างสำหรับใช้ตรวจวัด SR-FTIR แสดงดังรูปที่ 4.16 ตัวอย่างสุกแสดงปริมาณ  $\alpha$ -helix ต่ำกว่า พร้อมกับมีปริมาณ  $\beta$ -sheet สูงกว่า เมื่อใช้วิธีการให้ความร้อนร่วมกันระหว่างไมโครเวฟกับการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.24). ที่แต่ละอุณหภูมิแกนกลาง ปริมาณ  $\alpha$ -helical ของตัวอย่างที่ได้รับความร้อนด้วยการใช้ไอน้ำอย่างเดียวมีค่าสูงกว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำ ( $p < 0.05$ ) แสดงถึงเกิดการเสียสภาพน้อยกว่า ปริมาณของ  $\beta$ -turn และ aggregated  $\beta$ -sheet มีค่าใกล้เคียงกันที่ทุกสภาวะการให้ความร้อน กระบวนการให้ความร้อนร่วมกัน

ระหว่างไมโครเวฟกับการใช้ไอน้ำ ส่งผลให้ปริมาณ  $\beta$ -sheet เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่ออุณหภูมิแกนกลางเพิ่มขึ้น บ่งชี้ว่าเกิดการเสียสภาพของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิแกนกลางของตัวอย่างเพิ่มขึ้น ส่วนผลของกระบวนการให้ความร้อนต่อการเกิดจุดเลือดแดงนั้น พบว่าการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนที่ระยะเวลา 7 นาที ตามด้วยการใช้ไอน้ำ ที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดปัญหาจุดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอธิบายได้จากความแตกต่างของอินฟราเรดสเปกตรัม



**รูปที่ 4.16** ภาพระดับจุลภาค (micrograph) ของเลือดที่เหลืค้างอยู่ในเส้นเลือดของเนื้อดิบ (A) และตัวอย่างเนื้อสุกเมื่อได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำที่ 82 องศาเซลเซียส (B) ได้จากกล้องจุลทรรศน์ที่มีเลนส์วัตถุที่กำลังขยาย 36 เท่า เชื่อมต่อกับ SR-FTIR

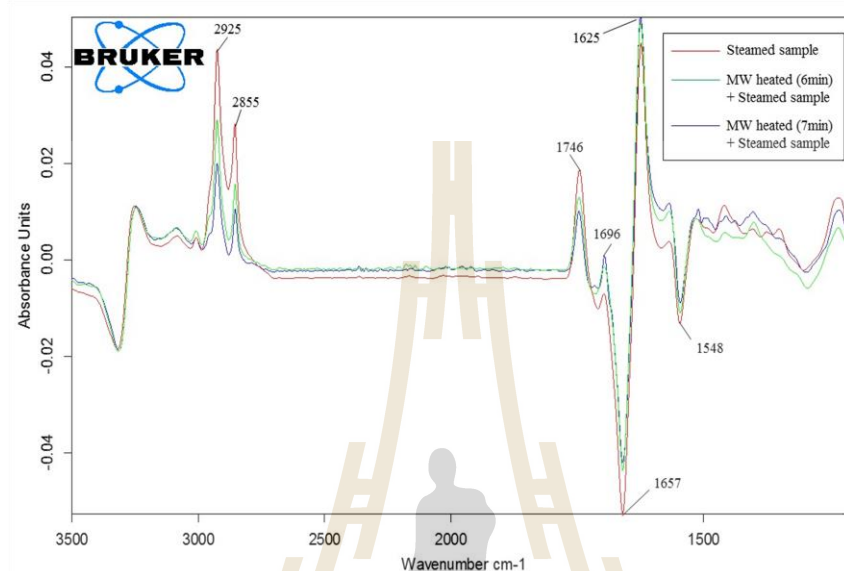


ตารางที่ 4.24 ปริมาณสัมพัทธ์ (%) ของโครงสร้างทุติยภูมิในโปรตีนเนื้ออกไก่ทอดสุกที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟร่วมกับการใช้ไอน้ำ ที่สภาวะการให้ความร้อนต่างกัน

| อุณหภูมิแกนกลาง<br>(องศาเซลเซียส) | ระยะเวลาการให้ความ<br>ร้อนด้วยไมโครเวฟ<br>(นาที) | $\alpha$ -helix                 | $\beta$ -sheet                  | $\beta$ -turn                   | Aggregated $\beta$ -sheet      |
|-----------------------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
|                                   |  | (1654, 1660 $\text{cm}^{-1}$ )  | (1620, 1630 $\text{cm}^{-1}$ )  | (1670, 1680 $\text{cm}^{-1}$ )  | (1610, 1690 $\text{cm}^{-1}$ ) |
| ตัวอย่างดิบ                       | 0  | 50.94 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>   | 24.11 $\pm$ 1.54 <sup>f</sup>   | 19.16 $\pm$ 0.69 <sup>d</sup>   | 5.79 $\pm$ 0.62 <sup>ab</sup>  |
|                                   | 0  | 38.74 $\pm$ 0.68 <sup>b</sup>   | 33.61 $\pm$ 0.50 <sup>e</sup>   | 22.04 $\pm$ 0.60 <sup>ab</sup>  | 5.61 $\pm$ 0.25 <sup>ab</sup>  |
| 80                                | 6  | 37.20 $\pm$ 1.04 <sup>c</sup>   | 35.75 $\pm$ 0.41 <sup>cd</sup>  | 21.50 $\pm$ 0.49 <sup>abc</sup> | 5.54 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>   |
|                                   | 7  | 35.42 $\pm$ 0.32 <sup>e</sup>   | 35.98 $\pm$ 0.49 <sup>bcd</sup> | 22.35 $\pm$ 0.77 <sup>ab</sup>  | 6.25 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>   |
| 82                                | 0  | 38.87 $\pm$ 0.73 <sup>b</sup>   | 34.40 $\pm$ 0.35 <sup>de</sup>  | 21.31 $\pm$ 0.97 <sup>bc</sup>  | 5.42 $\pm$ 0.55 <sup>ab</sup>  |
|                                   | 6  | 36.31 $\pm$ 0.89 <sup>cde</sup> | 36.18 $\pm$ 1.48 <sup>abc</sup> | 21.22 $\pm$ 0.69 <sup>bc</sup>  | 6.30 $\pm$ 0.53 <sup>ab</sup>  |
|                                   | 7  | 35.42 $\pm$ 0.40 <sup>e</sup>   | 36.35 $\pm$ 0.82 <sup>abc</sup> | 22.57 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>   | 5.66 $\pm$ 0.38 <sup>ab</sup>  |
| 85                                | 0  | 38.85 $\pm$ 0.43 <sup>b</sup>   | 35.34 $\pm$ 0.32 <sup>cd</sup>  | 21.44 $\pm$ 0.31 <sup>abc</sup> | 4.36 $\pm$ 0.45 <sup>c</sup>   |
|                                   | 6  | 36.90 $\pm$ 0.69 <sup>cd</sup>  | 37.51 $\pm$ 1.38 <sup>ab</sup>  | 20.71 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>   | 4.88 $\pm$ 0.44 <sup>bc</sup>  |
|                                   | 7  | 35.67 $\pm$ 1.04 <sup>de</sup>  | 37.76 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>   | 21.60 $\pm$ 1.28 <sup>abc</sup> | 4.96 $\pm$ 0.57 <sup>bc</sup>  |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

สเปกตรัมผ่านกระบวนการ (processed) ด้วยการ subtracting สเปกตรัมของเลือดที่เหลือค้างอยู่ในเส้นเลือดที่ทำสุกจากสเปกตรัมของตัวอย่างดิบ จากผลของสเปกตรัมที่แสดงให้เห็นถึงผลของวิธีการให้ความร้อนต่อการเสถียรภาพของเลือด (รูปที่ 4.17)



**รูปที่ 4.17** SR-FTIR สเปกตรัมที่แตกต่างกันของเลือดไก่ที่เหลือค้างในเส้นเลือดที่อุณหภูมิแกนกลาง 82 องศาเซลเซียส [(ตัวอย่างสุก)-(ตัวอย่างดิบ)] หลังจาก processed ด้วย baseline correction และ vector normalization

แบน (band) ที่เด่นชัดที่  $1657\text{ cm}^{-1}$  สอดคล้องกับปริมาณ  $\alpha$ -helix (Yu, Morton, Clerens & Dyer, 2017) แสดงแบนค่าลบสูงที่สุดในตัวอย่างที่ได้รับความร้อนจากไอน้ำ และแบนค่าลบต่ำที่สุดในตัวอย่างที่ได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟเป็นเวลา 7 นาที ร่วมกับการให้ความร้อนจากไอน้ำที่อุณหภูมิแกนกลางที่ 82 องศาเซลเซียส ในขณะที่แบนที่  $1625\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงปริมาณ  $\beta$ -sheet แสดงแบนค่าบวกสูงที่สุดในตัวอย่างที่ได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 7 นาที ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ บ่งชี้ถึงการเกิดการเสถียรภาพของเลือดเกิดขึ้นมากกว่าในตัวอย่างที่ได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟก่อนเป็นเวลา 7 นาที ร่วมกับการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ อัตราการให้ความร้อนที่สูงกว่าของไมโครเวฟ ส่งผลให้เกิดการเสถียรภาพของเลือดสูงกว่า นอกจากนี้ แบนของการสั่นที่เลขคลื่นประมาณ  $2925$  และ  $2855\text{ cm}^{-1}$  สัมพันธ์กับการสั่นแบบงอ (bending) แบบสมมาตร (symmetric) และอสมมาตร (asymmetric) ของเมทิลีน (methylene) (Calabrò & Magazù, 2012) ทั้ง 2 แบน

ของหมู่เมทิลีนนี้พบอย่างชัดเจนในสเปกตร้าของตัวอย่างหลังจากได้รับความร้อนด้วยไอน้ำ ในขณะที่ตัวอย่างที่ได้รับความร้อนด้วยไมโครเวฟความเข้มของทั้ง 2 แบนนี้ จะลดลงเป็นสัดส่วนกับระยะเวลาการให้ความร้อน แบนของหมู่เมทิลีนที่มีค่าความเข้มที่สูงสัมพันธ์กับการเกิดออกซิเดชันของไขมัน การให้ความร้อนด้วยไอน้ำอย่างเดียวยังส่งผลให้เกิดออกซิเดชันของไขมันได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ความร้อนร่วมกันระหว่างไมโครเวฟและการใช้ไอน้ำ ส่วนแบนที่  $1746\text{ cm}^{-1}$  สัมพันธ์กับการสั่นแบบยืดของ C=O ของหมู่คาร์บอนิล (carbonyl group) (Sinanoglou, Cavouras, Xenogiannopoulos, Proestos & Zoumpoulakis, 2018) ซึ่งแสดงความเข้มสูงกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนด้วยไอน้ำ Calabrò และ Magazù (2012) รายงานว่าการเพิ่มความเข้มของแบนของคาร์บอนิลและหมู่เมทิลีนนั้นเนื่องจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) เพราะหมู่ฟังก์ชันทั้ง 2 ชนิดนี้ พบทั่วไปในผลิตภัณฑ์สีน้ำตาลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard browning) แสดงให้เห็นว่าการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะปรากฏสีน้ำตาลมากกว่า โดยทั่วไปแล้ว ผู้บริโภคมีความชอบและคาดหวังให้ผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่ผ่านการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำนั้น มีความสว่างสูง (Abdulhameed, Yang & Abdulkarim, 2016) ดังนั้น การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำน่าจะทำได้ลักษณะปรากฏด้านสีที่เป็นที่ต้องการ จากผล SR-FTIR การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำนั้นเหนี่ยวนำให้เกิดการเสถียรภาพของโปรตีนในเลือดได้ดีกว่าการให้ความร้อนโดยใช้ไอน้ำเพียงอย่างเดียว

#### 4.3.5 สรุปผลการวิจัย

การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำ ช่วยลดการเกิดจุดเลือดแดง เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและทันสมัยกว่าการใช้ไอน้ำเพียงอย่างเดียว การให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟที่เวลา 7 นาที ตามด้วยการใช้ไอน้ำเพื่อให้ได้อุณหภูมิแกนกลางที่ 82 องศาเซลเซียส สามารถกำจัดการเกิดจุดเลือดแดงได้อย่างสมบูรณ์ จากการศึกษาด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานส์ฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีจากแหล่งแสงซินโครตรอน (SR-FTIR spectroscopy) ของเลือดที่เหล็คั่งอยู่ในเส้นเลือดของอกไก่ขนาดสุก โดยการให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำ พบว่ามีโครงสร้าง  $\alpha$ -helix ลดลงและ  $\beta$ -sheet สูงขึ้น แสดงถึงการสูญเสียสภาพของโปรตีนในเลือด การให้ความร้อนก่อนด้วยไมโครเวฟลดระยะเวลาการให้ความร้อนถึง 28-48% เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ความร้อนด้วยไอน้ำอย่างเดียว ดังนั้น การให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟพร้อมกับการใช้ไอน้ำจึงเป็นกระบวนการที่ช่วยลดปัญหาจุดเลือดแดงในผลิตภัณฑ์เนื้ออกไก่ขนาดสุกได้

#### 4.4 การสกัดคอลลาเจนจากหลอดลมไก่ด้วยอัลตราซาวด์และคุณลักษณะทางชีวเคมี

##### 4.4.1 องค์ประกอบทางเคมี

องค์ประกอบหลักที่พบในหลอดลม คือ โปรตีน 68.0% โดยน้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 4.25) มีปริมาณคอลลาเจน 37.6% โดยคิดจากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหัวไก่วง 19.9% หลอดลมเป็ด 32.9% กระดูกอ่อนแกะ 12.3% และกระดูกอ่อนลูกแกะ 8.9% (Blanco et al., 2019; Vidal et al., 2020; Vittayanont & Jaroenviriyapap, 2014) นอกจากนี้หลอดลมไก่ มีองค์ประกอบที่เป็นลิพิด 14.4% และคาร์โบไฮเดรต 14.3% หลังจากใช้ต่าง พบว่ามีปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นเป็น 52.3% เนื่องจากการใช้ต่างจะช่วยแยกองค์ประกอบที่เป็นโปรตีน ไขมัน วิตามิน และคาร์โบไฮเดรตออก ดังนั้นการใช้ต่างจึงจำเป็นสำหรับการสกัดคอลลาเจน

ตารางที่ 4.25 องค์ประกอบทางเคมีของหลอดลมไก่เนื้อ

| องค์ประกอบ       | ปริมาณ (%)               |                          |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
|                  | วัตถุดิบ                 | แช่ด้วยต่างก่อนสกัด      |
| ความชื้น         | 82.6 ± 0.05              | 83.8 ± 0.04              |
| โปรตีน           | 68.0 <sup>b</sup> ± 0.84 | 89.3 <sup>a</sup> ± 0.27 |
| - ไฮดรอกซีโพรลีน | 4.7 <sup>b</sup> ± 0.05  | 6.5 <sup>a</sup> ± 0.52  |
| - คอลลาเจน       | 37.6 <sup>b</sup> ± 0.39 | 52.3 <sup>a</sup> ± 3.98 |
| เถ้า             | 3.3 <sup>a</sup> ± 0.01  | 0.8 <sup>b</sup> ± 0.03  |
| ลิพิดรวม         | 14.4 <sup>a</sup> ± 0.42 | 3.0 <sup>b</sup> ± 0.05  |
| คาร์โบไฮเดรต     | 14.3 <sup>a</sup> ± 0.07 | 7.0 <sup>b</sup> ± 0.09  |

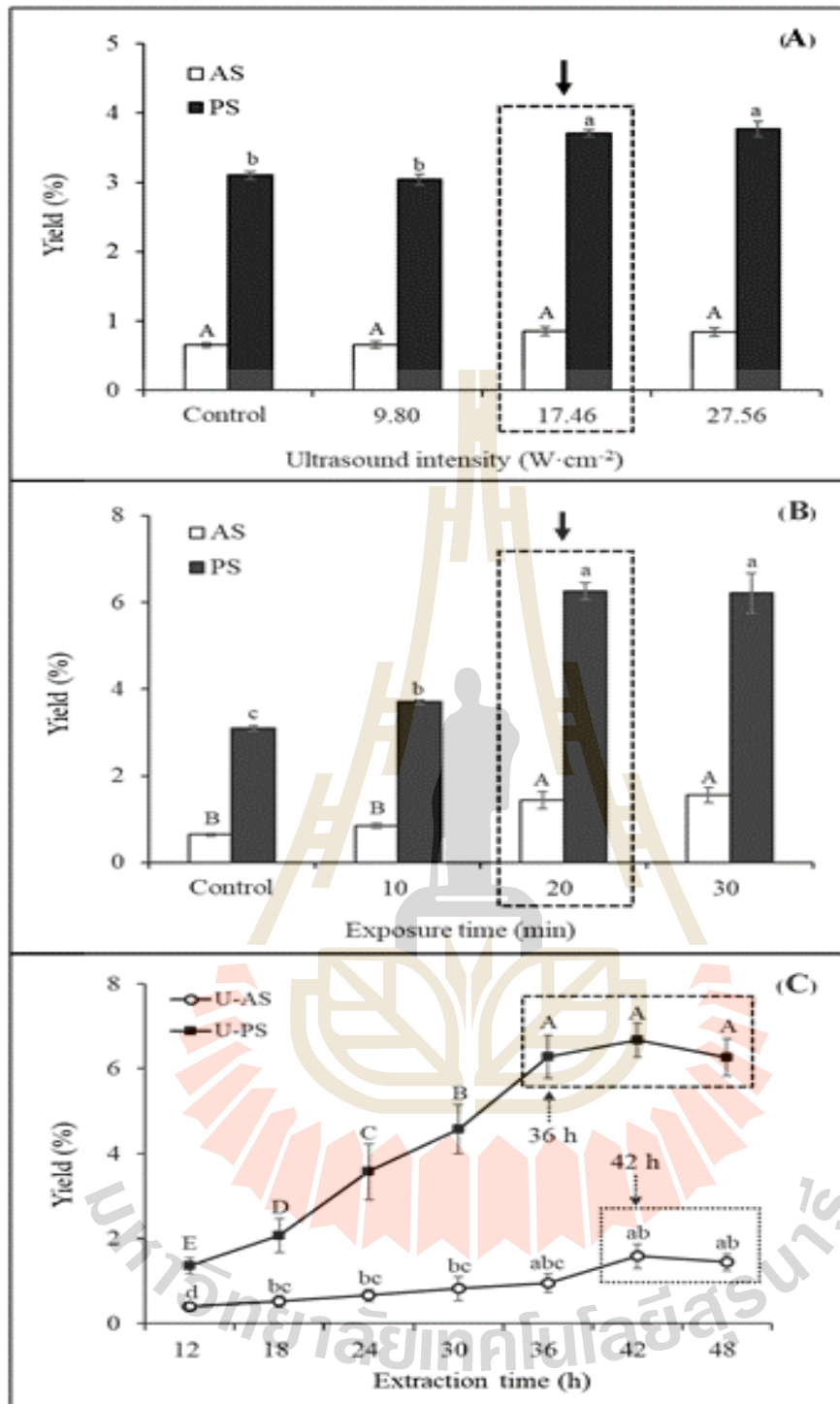
ข้อมูลทั้งหมดคำนวณโดยน้ำหนักแห้ง ยกเว้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตคำนวณจาก 100 - (เถ้า + ไขมันรวม + โปรตีน); ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

##### 4.4.2 ผลผลิตคอลลาเจน

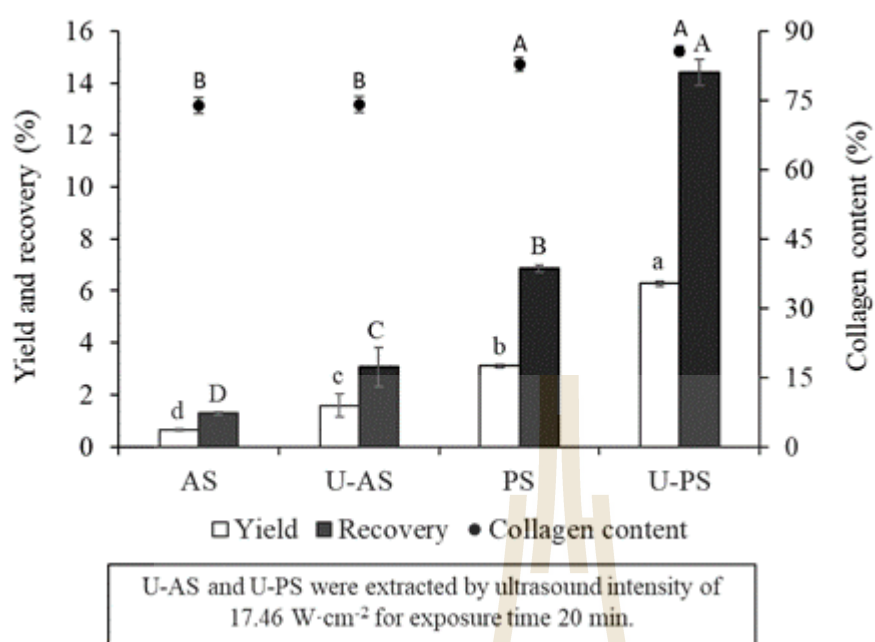
การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (UAE) ที่ระดับความเข้ม 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรส่งผลให้ปริมาณผลิตผลคอลลาเจนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.18A) และเมื่อเพิ่มความเข้มที่ระดับ 27.56 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรไม่สามารถเพิ่มผลิตผลคอลลาเจนได้ และพบว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 9.80 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรได้ปริมาณผลิตผลคอลลาเจนเทียบเท่ากับการสกัดแบบดั้งเดิม การสกัดด้วยกรด (AS) และเอนไซม์เพปซิน (PS) ที่ความเข้ม 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรสามารถชักนำให้เกิด

การแตกของเนื้อเยื่อ ทำให้การกรดและเอนไซม์ทำงานดีขึ้น และการสกัดแบบ UAE ที่ความเข้มข้น 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที สามารถเพิ่มผลิตผลคอลลาเจนได้ ซึ่งการเพิ่มระยะเวลาจะสามารถช่วยเพิ่มการแตกของเนื้อเยื่อได้ดีขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาเป็น 30 นาที ไม่มีผลทำให้ปริมาณผลิตผลคอลลาเจนเพิ่มขึ้น ( $p > 0.05$ ) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์แล้วสกัดด้วยกรดหรือเอนไซม์เพปซิน พบว่าการสกัดด้วยกรดเป็นเวลา 42 ชั่วโมง ได้ผลิตผลคอลลาเจน 1.58% และได้ผลิตผลคอลลาเจนสูงสุดเมื่อสกัดด้วยเอนไซม์เพปซินเป็นเวลา 36 ชั่วโมง (รูปที่ 4.18C) ซึ่งการสกัดแบบ UAE ลดระยะเวลาการสกัดได้ 12.5% และการสกัดแบบ U-AS ลดระยะเวลาการสกัดได้ 25% โดยการสกัดแบบ U-PS โดยเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิมที่ใช้ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (Ali et al., 2018; Liang et al., 2014; Luo et al., 2018) และการสกัด U-AS และ U-PS ส่งผลให้ผลิตผลคอลลาเจนเพิ่มขึ้น 2 เท่า เมื่อเทียบกับการสกัดแบบดั้งเดิม การสกัด UAE โดยสกัดด้วยเอนไซม์เพปซินได้ผลิตผลคอลลาเจนสูงสุดที่ 6.28% และลดระยะเวลา 25% ซึ่งคลื่นอัลตราซาวด์จะไปกระตุ้นโครงสร้างเส้นใยของคอลลาเจน (Li et al., 2009) ทำให้เอนไซม์เพปซินละลายในคอลลาเจนได้ดีขึ้น

จากรูปที่ 4.19 การสกัดแบบดั้งเดิมด้วยกรดและเอนไซม์เพปซิน ได้ผลิตผลคอลลาเจน 0.7% และ 3.1% และ ปริมาณคอลลาเจนที่เก็บเกี่ยวได้ 1.3% และ 6.9% การสกัดด้วยกรดได้ผลิตผลคอลลาเจนน้อยกว่าการสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน โดยเพปซินจะแยกส่วน telopeptide และไอออน  $H_3O^+$  จากกรดจะทำให้เกิดการบวมของคอลลาเจนเพิ่มการละลายและแรงผลักของโครงสร้าง  $\alpha$ -helix โดยการสกัดกรดและเอนไซม์เพปซิน ได้ผลิตผลคอลลาเจนน้อยกว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังและเอ็นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Iswariya et al., 2018; Ju et al., 2020; Tang et al., 2018) คอลลาเจนจากกระดูกอ่อนมีโครงสร้างซับซ้อนกว่าคอลลาเจนจากหนัง (Kittiphattanabawon et al., 2010) งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการสกัดคอลลาเจนจากกระดูกอ่อนปลาฉลามด้วย กรดและเอนไซม์เพปซิน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลิตผลคอลลาเจน 1.3% และ 9.5-10.3% ตามลำดับ และการสกัดคอลลาเจนจากกระดูกสันไก่อด้วยเอนไซม์เพปซิน เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ผลิตผลคอลลาเจน 5.1% (Akram & Zhang, 2020)



รูปที่ 4.18 ผลผลิตคอลลาเจนที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้มต่างกันเป็นเวลา 10 นาที (A), ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มที่ 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรที่เวลาต่างกัน (B), และระยะเวลาสกัดที่แตกต่างกัน ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มที่ 17.46 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นเวลา 20 นาที (C)



รูปที่ 4.19 ผลผลิตคอลลาเจนจากการสกัดแบบดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์

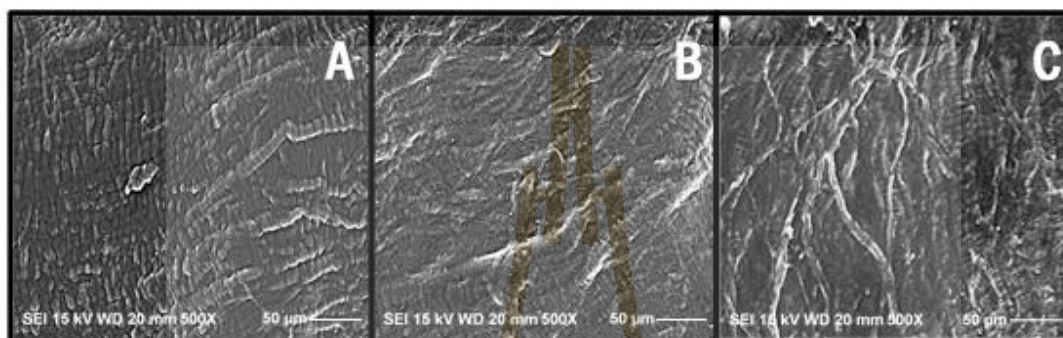
#### 4.4.3 กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องกราด

รูปที่ 4.20 แสดงภาพถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างเนื้อเยื่อหลอดลมสลายเมื่อการใช้อัลตราซาวด์เป็นระยะเวลา 10 นาที (รูปที่ 4.20B) และ เนื้อเยื่อแตกกระจายอย่างเห็นได้ชัดเจนเมื่อใช้อัลตราซาวด์เป็นระยะเวลา 20 นาที (รูปที่ 4.20C) เกิด การแตกกระจายของเนื้อเยื่อในระดับที่รุนแรงขึ้นหลังจากใช้อัลตราซาวด์เป็นระยะเวลา 30 นาที โดย การแตกกระจายของเนื้อเยื่อเกิดจากแรงเฉือนจากความดัน แรงบีบอัดและการลดแรงบีบอัด ( $1.0 \times 10^5$  kPa) (Soria & Villamiel, 2010) มีผลทำให้เนื้อเยื่อแตกกระจาย ดังนั้นการใช้กรดและ เอนไซม์เพปซิน สามารถเพิ่มผลิตผลได้โดยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 20 นาที

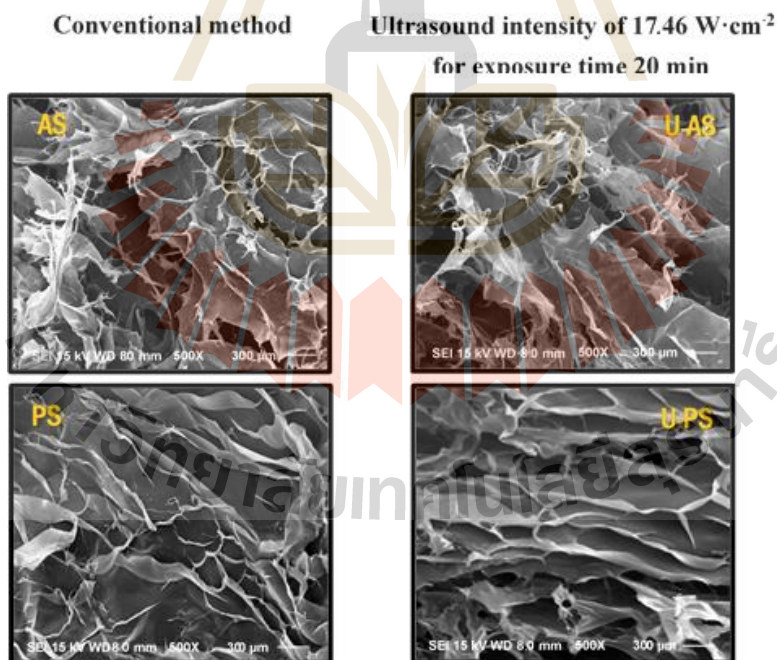
คอลลาเจนสกัดทุกกลุ่มมีโครงสร้างที่เป็นเส้นใย (รูปที่ 4.21) ซึ่งสอดคล้องรายงานที่มี การศึกษาก่อนหน้านี้ (Song et al., 2019; Zhang et al., 2020; Zou et al., 2017) คอลลาเจนที่ได้ จากสกัดด้วยกรดและการใช้อัลตราซาวด์ 20 นาที มีลักษณะโครงสร้างที่สมบูรณ์ คอลลาเจนที่ได้จาก สกัดด้วยเอนไซม์เพปซินและการใช้อัลตราซาวด์ 20 นาทีแล้วสกัดด้วยเอนไซม์เพปซินมีลักษณะ โครงสร้างเป็นแผ่นและที่มีการเรียงตัวเป็นชั้น จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างระดับจุลภาคของคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดและเอนไซม์เพปซินมีลักษณะแตกต่างกัน แต่ การใช้อัลตราซาวด์ไม่มีผลต่อโครงสร้างของคอลลาเจน Yang และคณะ (2001) รายงานว่าลักษณะช่อง

และการเชื่อมต่อง่ายกันมีบทบาทสำคัญต่อปฏิกิริยาทางชีวภาพของคอลลาเจน ได้แก่ การยึดเกาะ เซลล์ การเจริญ การเพิ่มจำนวน และการสร้างเนื้อเยื่อ การใช้คอลลาเจนสมานแผลอาศัยโครงสร้างที่มีลักษณะแผ่นหนาคัลยฟิล์ม (Ge et al., 2020) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนสกัดจากหลอดลมที่ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยมีคุณลักษณะที่เหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ด้านเวชศาสตร์ทางการแพทย์

#### Ultrasound intensity of $17.46 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$



รูปที่ 4.20 ลักษณะโครงสร้างคอลลาเจนที่ละลายด้วยต่างก่อนกระบวนการสกัด (A), ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 10 นาที (B) และ ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ 20 นาที (C) ที่กำลังขยาย 500 เท่า



รูปที่ 4.21 ลักษณะโครงสร้างคอลลาเจน AS; ละลายด้วยกรด PS; ละลายด้วยเอนไซม์เพปซิน U-AS; ใช้คลื่นอัลตราซาวด์แล้วสกัดด้วยกรด U-PS; ใช้คลื่นอัลตราซาวด์แล้วสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน ที่กำลังขยาย 500 เท่า



#### 4.4.4 ลำดับกรดอะมิโน

จากตารางที่ 4.26 กรดอะมิโนที่พบในคอลลาเจนส่วนใหญ่ คือ glycine (Gly) proline (Pro) hydroxyproline (Hyp) กรดอะมิโนที่พบในปริมาณน้อย ได้แก่ histidine (His) hydroxylysine (Hyl) methionine (Met) phenylalanine (Phe) และ tyrosine (Tyr) โดยลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ สารสกัดคอลลาเจนชนิด I ที่มีรายงานว่าพบ ในกระดูกอ่อนปลาสเตอร์เจียนไซบีเรีย กระดูกสันอก เต่า ไม้ และกระดูกปลาหูฉลาม (Ahmed et al., 2019; Cao et al., 2014; Luo et al., 2018; Zhou et al., 2016) การศึกษาครั้งนี้ไม่พบกรดอะมิโน Cysteine (Cys) และ tryptophan (Trp) เนื่องจากถูกทำลายในขั้นตอนการสกัด ซึ่งสอดคล้องที่เคยมีรายงานว่าไม่พบ Trp ในคอลลาเจน (Gauza-Włodarczyk et al., 2017) และพบกรดอะมิโน Cys 2-6 residues (Brown et al., 2000) กระดูกอ่อนประกอบไปด้วยคอลลาเจนชนิด II 80 % โดยกรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุดคือ Hyl 18 residues และ Glu/Gln 88 residues (Aigner & Stöve, 2003; Cao et al., 2014; Cumming et al., 2019; Liang et al., 2014) คอลลาเจนสกัดมีลำดับกรดอะมิโนบ่งบอกว่าเป็นคอลลาเจนชนิด I ซึ่งมีปริมาณ Hyl และ Glu/Gln น้อย แต่มีปริมาณ Ala มาก โดยคล้ายกับลำดับกรดอะมิโนคอลลาเจนที่สกัดจากเกล็ดปลาตะเพียนเงิน หนังกปลาตะเพียนทอง และ เอ็นวัว (Ali et al., 2018; Lee et al., 2020; Jiacheng Wu et al., 2019)

Hyp เป็นอนุพันธ์ของ Pro โดย Pro ถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) โดยกระบวนการ hydroxylation กรดอะมิโน Pro ทำให้โครงสร้างเกลียวสามสายเสถียร คอลลาเจนที่สกัดโดยเอนไซม์เพปซิน (PS และ U-PS) พบปริมาณกรดอะมิโน Pro+Hyp มากกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด (AS และ U-AS) แสดงให้เห็นว่าหลอดเลือดประกอบด้วย intermolecular cross-linked telopeptide ปริมาณมาก ซึ่งจะถูกสลายด้วยเอนไซม์เพปซิน นอกจากนี้ ระดับ Proline hydroxylation ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซินสูงกว่าคอลลาเจนที่ละลายในกรด ซึ่ง hydroxylation เป็นกระบวนการที่ควบคุมความเสถียรของคอลลาเจนผ่านกรดอะมิโนชนิดที่มีวงแหวน (Rappu et al., 2019) Pyrolidine ring ใน กรดอะมิโน Hyp และ Pro เป็นโครงสร้างที่ทำให้เกิดเส้นใย ทำให้โครงสร้างเกลียวสามสายเสถียร ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการคอลลาเจนที่ละลายด้วยเอนไซม์เพปซินเสถียรกว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานคอลลาเจนที่สกัดจากกระดูกอ่อนฉลาม หนังกปลาคาร์พัสทอง และ เกล็ดปลากะพงขาว (Ali et al., 2018; Chuaychan et al., 2015; Jeevithan et al., 2015)

คอลลาเจนที่ละลายด้วยกรดมีกรดอะมิโนแตกต่างจากคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน โดยกรดอะมิโน Ala Asp/Asn Arg Ile Leu Thr Ser และVal ที่พบในคอลลาเจนที่สกัดเอนไซม์เพปซิน มีปริมาณน้อยกว่าที่พบคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด ซึ่งอาจจะเนื่องมาจาก telopeptide region ถูกกำจัดในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน ซึ่งคล้ายรายงานที่เคยมีการศึกษาคอลลาเจนจากปลาไหล ฉลามสีน้ำเงิน และกวาง (Elango et al., 2018; Lodhi et al., 2018; Veeruraj et al., 2013) นอกจากนี้ คอลลาเจนที่สกัดโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์และสกัดด้วยเอนไซม์มีกรดอะมิโนเหมือนคอลลาเจนที่สกัดแบบดั้งเดิม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ไม่มีผลต่อองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนของคอลลาเจน

**ตารางที่ 4.26** ปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดแบบดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์

| กรดอะมิโน | ปริมาณ (residues/1,000 total residues) |                         |                          |                         |
|-----------|--|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
|           | AS                                     | U-AS                    | PS                       | U-PS                    |
| Ala       | 116 <sup>a</sup> ± 1.96                | 112 <sup>a</sup> ± 2.70 | 97 <sup>b</sup> ± 3.47   | 101 <sup>b</sup> ± 0.88 |
| Arg       | 58 <sup>a</sup> ± 3.16                 | 57 <sup>a</sup> ± 2.83  | 52 <sup>b</sup> ± 2.57   | 51 <sup>b</sup> ± 4.05  |
| Asp/Asn   | 48 <sup>a</sup> ± 2.67                 | 47 <sup>a</sup> ± 1.20  | 42 <sup>b</sup> ± 3.46   | 46 <sup>a</sup> ± 1.62  |
| Glu/Gln   | 72 ± 3.10                              | 73 ± 3.11               | 74 ± 1.31                | 73 ± 3.25               |
| Gly       | 308 ± 3.23                             | 311 ± 4.89              | 310 ± 2.26               | 308 ± 2.30              |
| His       | 6 ± 2.57                               | 10 ± 1.20               | 11 ± 0.57                | 8 ± 0.52                |
| Hyl       | 7 ± 1.02                               | 7 ± 0.83                | 8 ± 2.81                 | 9 ± 0.65                |
| Hyp       | 76 <sup>b</sup> ± 1.03                 | 77 <sup>b</sup> ± 1.31  | 105 <sup>a</sup> ± 0.88  | 104 <sup>a</sup> ± 3.81 |
| Ile       | 20 <sup>a</sup> ± 2.60                 | 17 <sup>a</sup> ± 1.00  | 15 <sup>b</sup> ± 0.19   | 14 <sup>b</sup> ± 1.11  |
| Leu       | 47 <sup>a</sup> ± 2.18                 | 45 <sup>a</sup> ± 3.69  | 42 <sup>b</sup> ± 1.61   | 42 <sup>b</sup> ± 1.19  |
| Lys       | 28 ± 1.08                              | 26 ± 3.12               | 25 ± 1.59                | 27 ± 0.51               |
| Met       | 11 ± 1.35                              | 9 ± 4.71                | 9 ± 0.63                 | 8 ± 1.05                |
| Phe       | 11 ± 1.49                              | 10 ± 0.62               | 15 ± 0.85                | 13 ± 1.72               |
| Pro       | 112 <sup>ab</sup> ± 3.75               | 108 <sup>b</sup> ± 0.93 | 115 <sup>ab</sup> ± 4.10 | 118 <sup>a</sup> ± 1.27 |
| Ser       | 29 <sup>a</sup> ± 1.53                 | 29 <sup>a</sup> ± 2.42  | 27 <sup>b</sup> ± 1.27   | 28 <sup>ab</sup> ± 1.82 |
| Thr       | 26 <sup>a</sup> ± 0.92                 | 25 <sup>a</sup> ± 2.52  | 20 <sup>b</sup> ± 2.25   | 19 <sup>b</sup> ± 1.56  |

|            |                          |                          |                          |                          |
|------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Tyr        | 6 ± 0.37                 | 7 ± 4.62                 | 5 ± 0.57                 | 4 ± 0.52                 |
| Val        | 32 <sup>a</sup> ± 1.92   | 30 <sup>ab</sup> ± 2.22  | 29 <sup>b</sup> ± 0.83   | 27 <sup>b</sup> ± 0.66   |
| lmino acid | 188 <sup>b</sup> ± 2.48  | 186 <sup>b</sup> ± 0.72  | 220 <sup>a</sup> ± 4.89  | 222 <sup>a</sup> ± 1.51  |
| PH (%)     | 41.0 <sup>b</sup> ± 0.72 | 42.0 <sup>b</sup> ± 0.60 | 47.7 <sup>a</sup> ± 0.72 | 46.9 <sup>a</sup> ± 2.02 |

PH คือระดับ proline hydroxylation คำนวณจาก  $[\text{Hyp residue} / (\text{Hyp residue} + \text{Pro residue})] \times 100$  ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

#### 4.4.5 ไมโครดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริ มิเตอร์ (μDSC)

ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ( $T_d$ ) และค่าเอนทัลปี  $\Delta OH$  ของคอลลาเจนที่ละลายใน 0.5 โมลาร์ กรดอะซิติก ต่ำกว่าคอลลาเจนที่ละลายในน้ำ (ตารางที่ 4.27)  $T_d$  ต่ำเมื่อละลายคอลลาเจนด้วยกรดอะซิติกนั้น เนื่องจากแรงผลักทางไฟฟ้าสถิตในโครงสร้างแบบเกลียวและการทำลายพันธะไฮโดรเจนด้วยกรด ค่า  $T_d$  และ  $\Delta OH$  ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซินสูงกว่าการสกัดด้วยกรด คอลลาเจนที่สกัดด้วย UAE มีค่า  $T_d$  และ  $\Delta OH$  เทียบเท่าการสกัดแบบดั้งเดิม แสดงให้เห็นว่าอัลตราซาวด์ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนหมดลม

แหล่งที่อยู่และอุณหภูมิร่างกายของสัตว์มีผลต่อเสถียรภาพทางความร้อนของคอลลาเจน คอลลาเจนที่ได้มาจากเปลือกหอยลาย หนังกบ และหนังปลาเตอร์เจียน มีค่า  $T_d$  อยู่ที่ 26.5-33.5 องศาเซลเซียส (Wei et al., 2019; Jiulin Wu et al., 2019; Zhao et al., 2018) วิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของคอลลาเจนที่ได้จากหนังกระต่าย ปอดไก่ ปอดสุกร เอ็นวัว กระดุกแกะ และหนังลูกวัว อยู่ที่ 35.3-45.6 องศาเซลเซียส (GAO et al., 2018; Lin et al., 2011; Martínez-Ortiz et al., 2015; Ran & Wang, 2014; Zou et al., 2020) อุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของคอลลาเจนจากสัตว์บกจะสูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก สัตว์เลื้อยคลาน และสัตว์น้ำ คอลลาเจนจากสัตว์บกมีกรดอะมิโนประมาณ 215-225 residues/1,000 residues และจากสัตว์อื่น ประมาณ 155-180 residues/1,000 residues คอลลาเจนจากหลอดลมที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน มีค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และมีปริมาณกรดอะมิโน 220-222 amino acid residues/1,000 residues ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนจาก PS และ U-PS มีเสถียรภาพทางความร้อนสูงกว่าคอลลาเจนจากสัตว์ชนิดอื่น

Lys และ Hyl cross-linking ในโครงสร้างคอลลาเจนเป็นส่วนที่ทำให้เกิดความเสถียร ซึ่งคอลลาเจน PS และ U-PS มีปริมาณ Lys และ Hyl อยู่ที่ 33 และ 36 residues/1,000 residues ( $p$

> .05) และมีค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพสูง > 42 องศาเซลเซียส Luo (Luo et al., 2018) รายงานว่า คอลลาเจนจากกระดูกอ่อนพลาสติกเจียไนโซปีเรีย ที่ละลายด้วยเพปซินและกรด มีกรดอะมิโน Lys และ Hyl 27 และ 34 residues/1,000 residues และมีค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพอยู่ที่ 28.3 และ 30.5 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Lys และ Hyl ในคอลลาเจนจากกระดูกอ่อนพลาสติกเจียไนอเมริกาที่สกัดด้วยกรดและเอนไซม์เพปซินมีค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพอยู่ที่ 32.9 และ 35.7 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Liang et al., 2014) ดังนั้นสามารถยืนยันได้ว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซินมีเสถียรภาพทางความร้อนสูงกว่าคอลลาเจนที่สกัดด้วยกรด

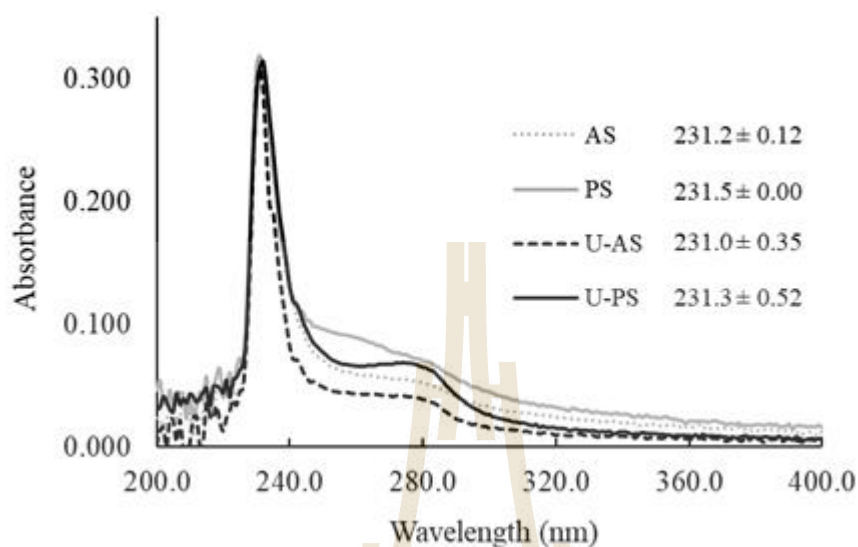
**ตารางที่ 4.27** ค่าอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ ( $T_d$ ) และค่าเอนทาลปี  $\Delta H$  ของคอลลาเจน

| Sample | $T_d$ ( $^{\circ}\text{C}$ ) |                          | $\Delta H$ (J/g)         |                          |
|--------|------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|        | DI Water                     | 0.5 M Acetic acid        | DI Water                 | 0.5 M Acetic acid        |
| AS     | 35.1 <sup>b</sup> ± 0.48     | 32.6 <sup>b</sup> ± 0.32 | 0.11 <sup>b</sup> ± 0.02 | 0.09 <sup>b</sup> ± 0.03 |
| U-AS   | 34.3 <sup>b</sup> ± 0.34     | 31.9 <sup>b</sup> ± 0.41 | 0.13 <sup>b</sup> ± 0.01 | 0.09 <sup>b</sup> ± 0.01 |
| PS     | 45.6 <sup>a</sup> ± 0.17     | 42.1 <sup>a</sup> ± 0.11 | 0.26 <sup>a</sup> ± 0.03 | 0.21 <sup>a</sup> ± 0.01 |
| U-PS   | 45.0 <sup>a</sup> ± 0.22     | 41.8 <sup>a</sup> ± 0.28 | 0.23 <sup>a</sup> ± 0.03 | 0.18 <sup>a</sup> ± 0.06 |

ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์บ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < .05$ )

#### 4.4.6 Ultraviolet (UV) spectroscopy

โครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนจะแสดงผลค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 230 นาโนเมตรแตกต่างกัน (Zhu et al., 2020) คอลลาเจนที่สกัดทุกกลุ่มมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 231 นาโนเมตร (รูปที่ 4.22) คอลลาเจนที่ได้จาก เกล็ดปลาการ์หน้าจืด ฤงลมปลาตุ๊ก ปลาหูน้ำครีบน้ำเงิน และหนังสุกร มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 192 224 235 และ 238 นาโนเมตร (Chinh et al., 2019; Li et al., 2020; Tanaka et al., 2018; Vijayan et al., 2018) โดยโครงสร้าง C=O CONH<sub>2</sub> และ -COOH ของสายเพปไทด์คอลลาเจนสามารถดูดกลืนแสงยูวีได้ (Abdollahi et al., 2018) สเปกตรัมการดูดกลืนแสงของคอลลาเจนมีค่าต่ำแสดงว่ามีปริมาณกรดอะมิโน His Tyr และ Phe residues น้อย และขาดกรดอะมิโน Trp คอลลาเจนที่สกัดด้วยเอนไซม์เพปซินค่าการดูดกลืนแสงยูวีเหมือนคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีดั้งเดิม ( $p > .05$ ) ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน



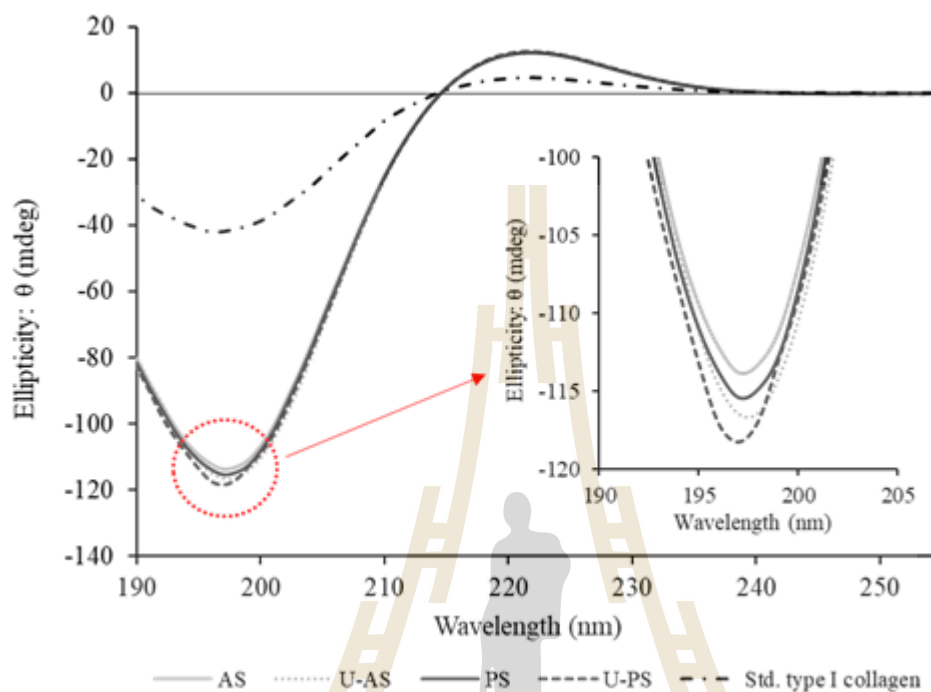
รูปที่ 4.22 ยูวีสเปกตรัมของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน

#### 4.4.7 เซอร์คูลาร์ไดโครอิมสเปกโทรสโกปี (Circular dichroism: CD spectroscopy)

จากผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนถูกวัดโดย CD spectroscopy (รูปที่ 4.23) พบว่าคอลลาเจนทุกกลุ่มมีค่า  $\alpha$  cross zero rotation อยู่ที่ 215 นาโนเมตร ค่า maximum peak อยู่ที่ 222 นาโนเมตร และค่า minimum peak อยู่ที่ 196-197 นาโนเมตร บ่งบอกได้ว่าคอลลาเจนมีโครงสร้าง supercoil (Drzewiecki et al., 2016) โดยค่า negative และ positive ellipticity จะบ่งบอกลักษณะโครงสร้างของโปรตีน (Greenfield, 2006) การลดลงของค่า positive ellipticity และการเพิ่มขึ้นของค่า negative ellipticity ที่ความยาวคลื่น 203-210 นาโนเมตร บ่งบอกว่าโครงสร้างเกลียวสามสายมีการคลายตัว (Cao & Xu, 2008; Drzewiecki et al., 2016; Silva et al., 2016) คอลลาเจนจากกระดูกสันอกไก่ที่สกัดด้วย UAE ที่ความถี่ 2,990 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 36 นาที มีค่า negative ellipticity สูงและการเพิ่มขึ้นของค่า negative ellipticity ที่ความยาวคลื่น 202.2 นาโนเมตร ซึ่งให้เห็นว่าคอลลาเจนสูญเสียโครงสร้างเกลียวสามสาย (Akram & Zhang, 2020) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 20 นาที ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน

คอลลาเจน U-PS มีค่า negative ellipticity ต่ำสุด ( $p < .05$ ) บ่งชี้ว่าโครงสร้างเกลียวสามสายยังไม่เสียหาย และจากค่าอัตราส่วนของ positive ต่อ negative ellipticity หรือ ค่า Rpn ของ

ทุกตัวอย่างมีค่าเท่ากับ 0.1 (ตารางที่ 4.28) บ่งชี้ถึงการคงอยู่ของโครงสร้างเกลียวสามสาย (Usha & Ramasami, 2005) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ไม่ทำให้โครงสร้างเกลียวสามสายในคอลลาเจนหลอดลมเสียหาย



รูปที่ 4.23 สเปกตรัม CD ของคอลลาเจนทุกกลุ่ม

ตารางที่ 4.28 อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสงจากสเปกตรัม FT-IR และอัตราส่วน Rpn ที่คำนวณจากสเปกตรัม CD ของคอลลาเจนที่สกัดวิธีต่างกัน

| ตัวอย่าง             | อัตราส่วนค่าดูดกลืนแสง<br>(Amide III/ 1,454 $\text{cm}^{-1}$ ) | Rpn*        |
|----------------------|--|-------------|
| AS                   | 1.03 ± 0.12  | 0.11 ± 0.01 |
| U-AS                 | 1.07 ± 0.03  | 0.10 ± 0.20 |
| PS                   | 1.06 ± 0.16  | 0.11 ± 0.00 |
| U-PS                 | 1.04 ± 0.07  | 0.10 ± 0.43 |
| Std. type I collagen | 1.01 ± 0.01  | 0.11 ± 0.00 |

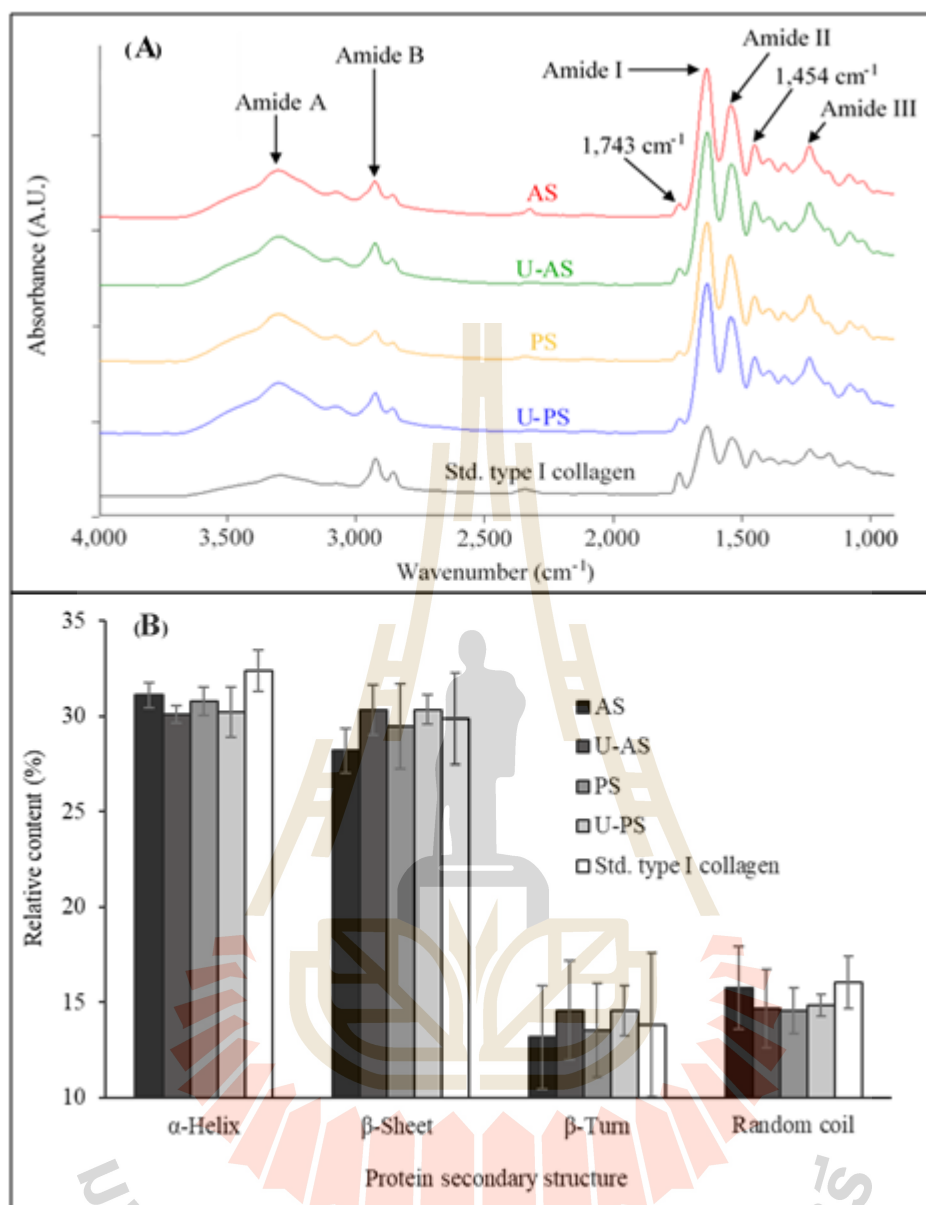
\*Rpn คืออัตราส่วน CD ellipticity ระหว่างค่าสูงสุดและต่ำสุด

#### 4.4.8 Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy

จากผลจากการวิเคราะห์ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Fourier Transform Infrared: FT-IR spectroscopy) แสดงให้เห็นว่าทุกตัวอย่างแสดงพีคทั้งหมด 5 สเปกตรัม สามารถแบ่งสเปกตรัมเป็นกลุ่มเอไมด์ A B I II และ III (รูปที่ 4.24A) โดยคอลลาเจนแสดงแถบสเปกตรัมที่โดดเด่นคือ เอไมด์ I ซึ่งเป็นสเปกตรัมที่เกิดจากการสั่นของพันธะระหว่างอะตอม C=O ของสายเพปไทด์ และ เอไมด์ I และ II สเปกตรัมที่เกิดจากการสั่นของพันธะระหว่างอะตอม C-N และ N-H (Aboul-Enein et al., 2014; Carbonaro & Nucara, 2010) คอลลาเจนทุกตัวอย่างแสดงสเปกตรัมเหมือนกันคือกลุ่ม เอไมด์ I II และ III ช่วงเลขคลื่น 1,635-1,637 1,539-1,547 และ 1,236-1,239  $\text{cm}^{-1}$  ตามลำดับ สเปกตรัมค่อนข้างต่ำที่เลขคลื่น 1,743  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเกิดจากการสั่นของพันธะเอสเทอร์ C=O ของคอเลสเทอรอล โดยไขมันที่มีความหนาแน่นสูง ไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำและไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำมาก จะมีช่วงการสั่นที่เลขคลื่น 1,737-1,744  $\text{cm}^{-1}$  (Krillov et al., 2009) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าคอลลาเจนสกัดมีองค์ประกอบที่เป็นไลโปโปรตีน ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพจำเป็นต้องขจัดไขมันและไลโปโปรตีนออกก่อน

จากรูป 4.24B ซึ่งให้เห็นว่าโครงสร้างหลักของคอลลาเจนเป็น  $\alpha$ -helix ประมาณ 30-32% ( $p > .05$ ) และมีโครงสร้าง  $\beta$ -helix และ random coil เป็นโครงสร้างรอง ซึ่งชี้ให้เห็นการใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 20 นาที ไม่ทำให้โครงสร้างทุติยภูมิคอลลาเจนหลุดลนเสียหาย Akram (Akram & Zhang, 2020) รายงานว่าสกัดโดยใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 2,990 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 36 นาที ทำลายโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจนกระดูกสันอกไก่ ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่สูงและระยะเวลานานทำให้โครงสร้างของคอลลาเจนเปลี่ยนแปลง

อัตราส่วนของเอไมด์ III ช่วงการสั่นที่เลขคลื่น 1,237  $\text{cm}^{-1}$  และ 1,454  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งให้เห็นความมั่นคงของโครงสร้างเกลียวสามสาย หากอัตราส่วนน้อย 0.59 บ่งบอกถึงความไม่มั่นคงของโครงสร้างเกลียวสามสาย (Guzzi Plepis et al., 1996) คอลลาเจนทุกตัวอย่างมีอัตราส่วนเท่ากับ 1.01-1.07 (ตารางที่ 4.28,  $p > .05$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจนยังคงสมบูรณ์ ซึ่งสอดคล้องอัตราส่วนที่มีรายงานใน ปลาตะเพียนทองและปลาฉลาม พบอัตราส่วนเท่ากับ 1.00-1.05 (Ali et al., 2018; Liu et al., 2015) งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 20 นาที ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายและโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจนหลุดลน



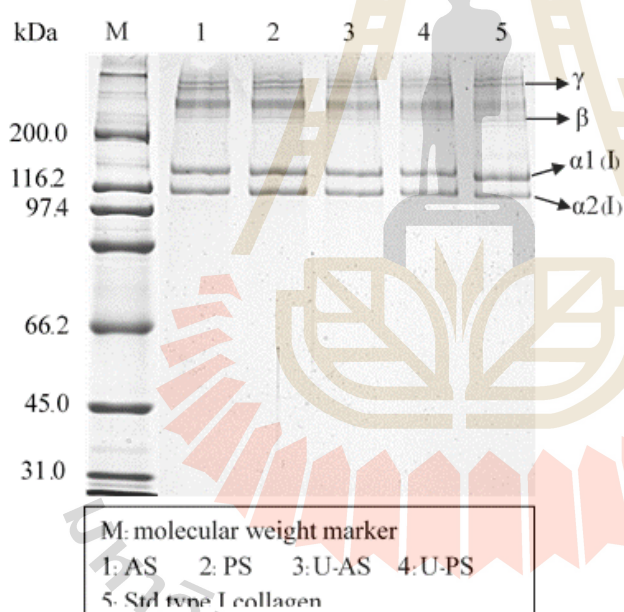
รูปที่ 4.24 FT-IR สเปกตรัม (A) และโครงสร้างทุติยภูมิที่ได้จากเอไมด์ I (B) ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน

#### 4.4.9 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

จากรูปที่ 4.25 ชี้ให้เห็นว่าคอลลาเจนทุกกลุ่มมีองค์ประกอบที่เป็นสาย  $\alpha 1(I)_2$  และ  $\alpha 2(I)$  นอกจากนี้ยังพบสายที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่  $\gamma$ -chains (trimer) และ  $\beta$ -chains (dimer) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าคอลลาเจนสกัดมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ที่มี covalent inter-molecular cross-linkages โดย  $\alpha 1(I)_2$  และ  $\alpha 2(I)$  มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 135 และ 116 kDa ตามลำดับ ซึ่งคล้ายกับคอลลาเจน



ชนิด I จากเอ็นวัว ที่  $\alpha 1(I)2$  และ  $\alpha 2(I)$  มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 130 และ 113 kDa คอลลาเจนสกัดแบบดั้งเดิมและ UAE มีรูปแบบโปรตีนที่เหมือนกัน โดยการสกัดแบบ UAE ไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (<100 kDa) งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่มีรายงานว่าคอลลาเจนจากหลอดลมเป็นคอลลาเจนชนิด I และการใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 20 นาที ไม่ทำให้เกิดการย่อยคอลลาเจนในระดับที่รุนแรง ซึ่งมีรายงานว่าการโครงสร้างโปรตีนสาย  $\alpha 1$ - และ  $\alpha 2$ - ที่สกัดจากหนังปลากะพงขาว ถูกทำลายเมื่อใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 80% แอมพลิจูด เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Kim et al., 2012) การใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่ 2,990 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 36 นาที ทำลายโครงสร้าง  $\beta$ - และ  $\alpha$ -chain ของคอลลาเจนกระดูกสันอกไก่ (Akram & Zhang, 2020) ดังนั้นการใช้อัลตราซาวด์ที่ความถี่สูงและระยะเวลานานมีผลไปทำลายโครงสร้างของคอลลาเจน แต่งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการอัลตราซาวด์ไม่ทำลายโครงสร้างเกลียวสามสายของคอลลาเจน



รูปที่ 4.25 รูปแบบของ SDS-PAGE ของคอลลาเจนที่สกัดด้วยวิธีต่างกัน

#### 4.4.10 ผลการวิเคราะห์ LC-MS/MS

ตารางที่ 4.29 แสดงรูปแบบเปปไทด์ของสาย  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$  ของ คอลลาเจน PS และ U-PS โดย Gly และ Pro พบทุกเปปไทด์ สอดคล้องกับรูปแบบการเรียงตัวของเปปไทด์คอลลาเจนแบบ Gly-Pro-X  $\alpha$ -subunits ของ PS และ U-PS มีลำดับมีลำดับเปปไทด์คล้ายกันและมีลักษณะคล้ายเปปไทด์คอลลาเจนชนิด I โดยลำดับเปปไทด์ GFSGLDGAK และ GQAGVMGFPGPK ซึ่งเป็นคอลลาเจนชนิด I

ที่พบใน ปลานิล ปลา และแกะ (Chen et al., 2014; Zeng et al., 2012) นอกจากนี้ SAGVAVPGPMGPAGPR และ DGEAGAQQPPGPTGPAGER ถูกพบใน  $\alpha 1$  ของคอลลาเจนชนิด I ในไก่เนื้อด้วย โดยสาย  $\alpha 2$  (I) ถูกพบ เพปไทด์ 8 เส้น คล้ายกับที่พบในไก่เนื้อ ซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ว่า หลอดลมเป็นแหล่งคอลลาเจนชนิด II (Cao & Xu, 2008) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าคอลลาเจน หลอดลมเป็นคอลลาเจนชนิด I

**ตารางที่ 4.29** ลำดับกรดอะมิโนสาย  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$  ของคอลลาเจนที่สกัดแบบวิธีดั้งเดิมและใช้คลื่นอัลตราซาวด์

| Band                                    | Peptide sequence hint | Coverage (%) | Protein Identification             | Taxonomy             |
|---|-----------------------|--------------|------------------------------------|----------------------|
| $\alpha 1$ PS<br>and<br>$\alpha 1$ U-PS | SAGVAVPGPMGPAGPR      | 3.85         | Collagen $\alpha 1$ ( I )<br>chain | <i>Gallus gallus</i> |
|   | GFSGLDGAK             |              |                                    |                      |
|   | GQAGVMGFPGPK          |              |                                    |                      |
|   | DGEAGAQQPPGPTGPAGER   |              |                                    |                      |
| $\alpha 2$ PS<br>and<br>$\alpha 2$ U-PS | AADFGPGPMGLMGPR       | 7.70         | Collagen $\alpha 2$ ( I )<br>chain | <i>Gallus gallus</i> |
|   | GEIGPAGNYGPTGPAGPR    |              |                                    |                      |
|   | VGPIGPAGNR            |              |                                    |                      |
|   | GNVGLAGPR             |              |                                    |                      |
|   | GEGGPAGPAGPAGAR       |              |                                    |                      |
|   | GDPGPVGPVGPAGAFGPR    |              |                                    |                      |
|   | GLAGPOGPR             |              |                                    |                      |
| GPPGPSGPPGK                             |                       |              |                                    |                      |

Coverage values คำนวณค่าจำนวนกรดอะมิโนจาก LC-MS/MS และจำนวนกรดอะมิโนทั้งหมดของสาย  $\alpha 1$  และ  $\alpha 2$  (1,453 และ 1,363 residues)

#### 4.4.11 สรุปผลการวิจัย

หลอดลมไก่เป็นแหล่งคอลลาเจน การสกัดแบบดั้งเดิมโดยใช้เอนไซม์เพปซินได้ผลิตผล 3.1% การใช้อัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 17.87 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรเป็นระยะเวลา 20 นาที และสกัดด้วยเอนไซม์เพปซิน 36 ชั่วโมง สามารถเพิ่มผลิตผลได้ 6.28% คอลลาเจนหลอดลมมีคอลลาเจน 80 % และ

การสกัดแบบ UAE ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกลียวสามสายและโครงสร้างทุติยภูมิของคอลลาเจน การสกัดแบบเดิมด้วยกรดแบบที่ละลายในน้ำและ 0.5 โมลาร์ กรดอะซิติกทำให้โครงสร้างคอลลาเจนเสียหาย คอลลาเจนหลอดลมมีองค์ประกอบที่เป็นกรดอะมิโนสูงแต่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นน้อย (His Met Phe และ Trp) และประกอบด้วย  $\alpha 2$ -chain ที่บ่งบอกว่าเป็นคอลลาเจนชนิด I และยืนยันด้วยเพปไทด์ LC-MS/MS งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าการอัลตราซาวด์ไม่ทำลายโครงสร้างของคอลลาเจนและเป็นรายงานแรกที่ยืนยันว่าคอลลาเจนหลอดลมเป็นคอลลาเจนชนิด I

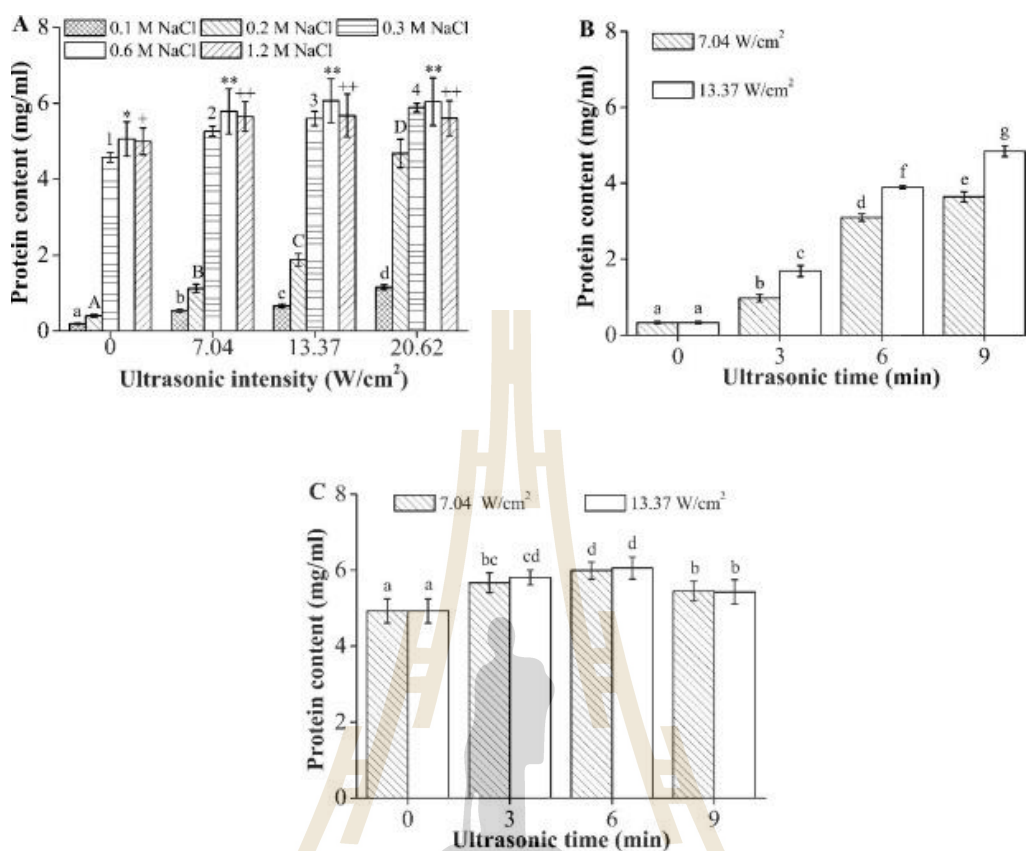
#### 4.5 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงต่อคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของโปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลาไนล (Oreochromis niloticus) ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

##### 4.5.1 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการสกัดโปรตีน

จากการวิจัยพบว่า ปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำ (0.1, 0.2 และ 0.3 โมลาร์) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.26A และในทางตรงกันข้าม พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนของตัวอย่างในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูง (0.6 และ 1.2 โมลาร์) (รูปที่ 4.26A) นอกจากนี้โปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 7.04 และ 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสกับคลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.26B การเปลี่ยนแปลงความดันที่สูงมากของพลังงานของอัลตราโซนิกในระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน ส่งผลให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กขึ้นอย่างรวดเร็วและเกิดการขยายตัวในระหว่างที่มีความดันเป็นลบ (negative pressure excursion) และระเบิดอย่างรุนแรงระหว่างที่มีความดันเป็นบวก (positive excursion) ผลเหล่านี้นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิและความดันที่สูงขึ้น (5,000 เคลวิน และ 1,000 atm) รวมถึงการเพิ่มขึ้นของคลื่นเหนือพลังงานสูงและความปั่นป่วนในเขตของโพรงอากาศ (cavitation zone) (Soria & Villamiel, 2010) (Mason & Lorimer, 1990) การเกิดคลื่นเหนือและความปั่นป่วนจากกระบวนการคาวิเทชัน (Cavitation) อาจส่งผลในการทำลายไมโอไฟบริล (myofibril) และการแยกตัวของไมโอซิน (myosin) ซึ่งทำให้ความสามารถในการสกัดโปรตีนสูงขึ้นเมื่อใช้สภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นต่ำ งานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่า พลังงานของอัลตราโซนิกมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเชิงพื้นที่ (spatial

conformation) และโครงสร้างทางจุลภาคของแอกโตไมโอซินจากเนื้อไก่ ซึ่งส่งผลทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Zou et al., 2018) นอกจากนี้ ความสามารถในการละลายของโปรตีนแอกโตไมโอซินจากเนื้อไก่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาในการให้คลื่นอัลตราซาวด์ (Saleem et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ของตัวอย่างในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์โดยได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 6 นาที เพิ่มขึ้นเพียง 22% เมื่อเทียบกับตัวอย่างกลุ่มควบคุม และการให้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลานานที่ 9 นาที ส่งผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 4.26C ปริมาณโปรตีนที่สามารถสกัดออกมาได้จากแอกโตไมโอซินของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ และได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 9 นาทีที่มีปริมาณเทียบเคียงกับตัวอย่างตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์แต่ไม่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ โดยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์มีผลทำให้ความสามารถในการละลายของแอกโตไมโอซินเพิ่มขึ้น 14.7 เท่าในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (รูปที่ 4.26B) ในขณะที่ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์มีความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้นเพียง 1.2 เท่า (รูปที่ 4.31C) คลื่นอัลตราซาวด์จึงอาจส่งผลต่อการทำลายไมโอไฟบริลและการแยกตัวของไมโอซิน ซึ่งทำให้ความสามารถในการสกัดแอกโตไมโอซินเพิ่มขึ้น งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า คลื่นอัลตราซาวด์มีศักยภาพในการสกัดโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่สภาวะความเข้มข้นของเกลือต่ำ



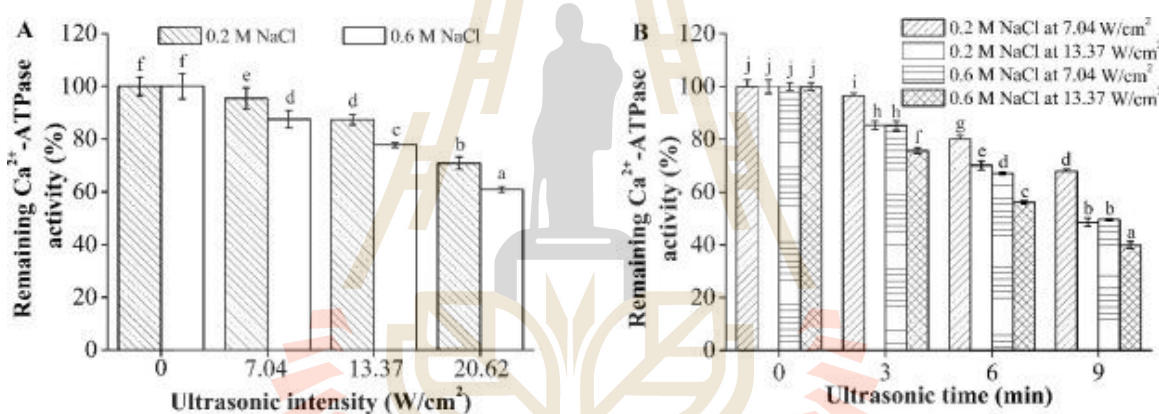


**รูปที่ 4.26** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้โดยใช้โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (A), เวลาในการให้คลื่นเมื่อใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 7.04 และ 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับตัวอย่างโปรตีนที่สกัดในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (B) และ 0.6 โมลาร์ (C) โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรและสัญลักษณ์แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.2 ผลการศึกษากิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase

กิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase ของแอคโตไมโอซินลดลงเมื่อเพิ่มเวลาและความเข้มของคลื่นอัลตราซาวด์ในสถานะของเกลือที่ความเข้มข้นทั้ง 2 ความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 4.27A และ B กิจกรรมของ Ca<sup>2+</sup>-ATPase เป็นวิธีที่สะท้อนให้เห็นถึงความสมบูรณ์ (integrity) ของบริเวณส่วนหัวของไมโอซิน (globular head myosin) (Chan et al., 1995) ดังนั้นการลดลงของกิจกรรม Ca<sup>2+</sup>-ATPase สามารถบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (conformation) ที่บริเวณส่วนหัวของไมโอซินหลังจากผ่านกระบวนการโซนิเคชัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากความดันและพลังงานของคลื่นเสียงที่สูงขึ้น รวมถึง

การเกิดการปั่นป่วนที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวด์ ผลการศึกษาที่คล้ายกันก่อนหน้านี้ระบุว่า กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของแอคโตไมโอซินจากเนื้อไก่ในละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ลดลงหลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 5 – 30 นาที (Saleem & Ahmad, 2016) นอกจากนี้ในงานวิจัยของ Liu และคณะ (Liu et al., 2017) รายงานว่า กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของโปรตีนไมโอซินจากปลาเกี๋ยงเงิน (Silver carp) ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มเวลาและพลังงานของคลื่นอัลตราซาวด์ การวิจัยนี้จากรูปที่ 4.27A และ B จะเห็นว่ากิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของแอคโตไมโอซินที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ยังคงสูงกว่าตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ดังนั้น แอคโตไมโอซินที่สามารถละลายได้สมบูรณ์ที่โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบได้ง่ายเมื่อถูกกระตุ้นด้วยกระบวนการคาวิเทชัน กระบวนการเกิดคาวิเทชันอาจมีผลต่อทำให้การเปิดตัวของโปรตีนที่



เพิ่มมากขึ้นในสถานะที่ใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งส่งผลให้บริเวณ active site ที่ส่วนหัวของไมโอซินเปิดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ลดลง

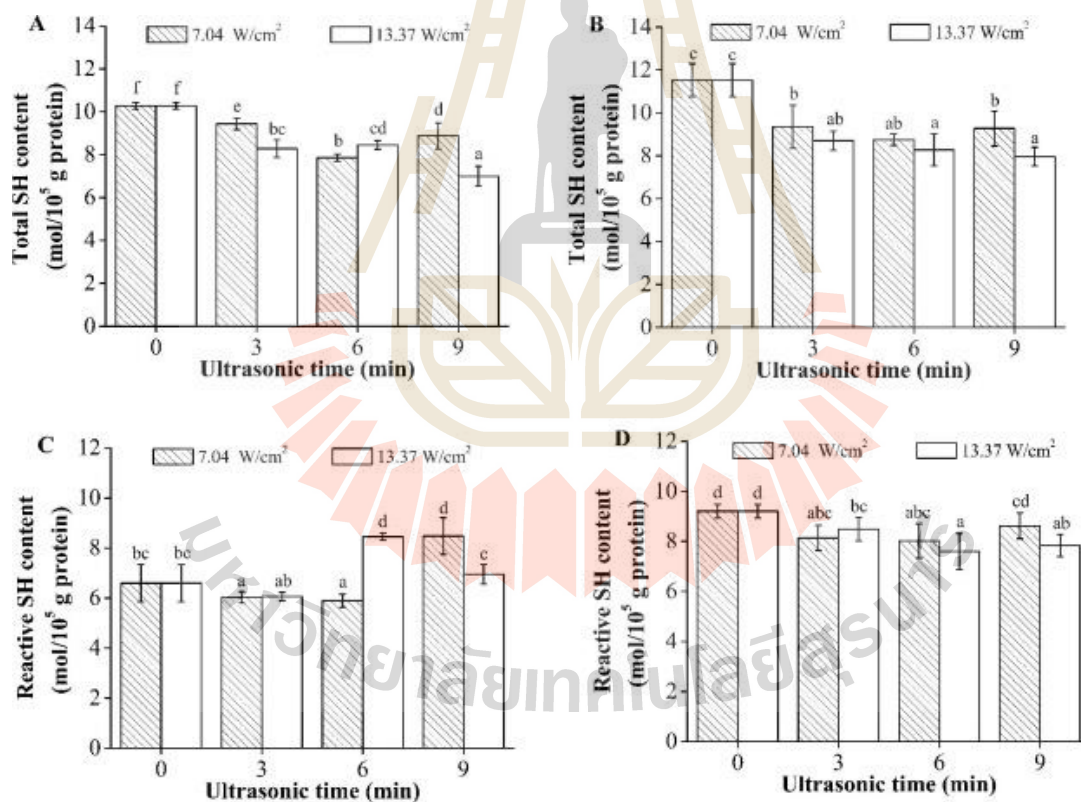
**รูปที่ 4.27** กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.6 โมลาร์ ที่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม (A) และเวลา (B) ต่างๆ โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของแอคโตไมโอซินที่ไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ในสถานะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ เท่ากับ 100%)

#### 4.5.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลไฮดริล

ปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมด คือปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลที่มีอยู่ในโครงสร้างของโปรตีนทั้งหมด ส่วนปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา คือหมู่ซัลไฮดริลที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสาร

DTNB ได้ ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลของตัวอย่างหลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวน์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.2 และ 0.6 โมลาร์ลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 4.28A และ B ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า คลื่นอัลตราซาวน์กระตุ้นการเกิดออกซิเดชัน (oxidation) ของหมู่ซัลไฮดริล อนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากโมเลกุลของน้ำในระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาต่อไปและก่อตัวเป็นโมเลกุลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) (Hu et al., 2013; Milne et al., 2013; Riesz & Kondo, 1992) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จัดเป็นสารออกซิไดซ์ที่มีความแรงมาก จึงสามารถช่วยทำให้เกิดการออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลได้ การเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริล (รูปที่ 4.28A และ B) อาจใช้ในการบ่งบอกถึงการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ในระหว่างกระบวนการโซนิเคชันโดยอาจเกิดขึ้นผ่านบริเวณส่วนหัวของไมโอซิน และอาจเป็นสาเหตุของการลดลงของกิจกรรม  $Ca^{2+}$ -ATPase (รูปที่ 4.27) การวิจัยก่อนหน้าของ Zhang และคณะ (Zhang et al., 2017) รายงานว่า ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่ที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวน์จนถึง 193 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร สำหรับผลการศึกษา พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวน์ความเข้มสูง (13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) สามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลได้มากกว่าตัวอย่างที่ใช้อัลตราซาวน์ความเข้มต่ำ ในทางเดียวกันปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลอิสระของแอกโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ต่ำกว่าปริมาณที่พบในตัวอย่างควบคุมหลังจากที่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวน์ และมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มเวลาในการสัมผัสคลื่นอัลตราซาวน์ (รูปที่ 4.28D) ในระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน หมู่ซัลไฮดริลบางหมู่ถูกเปิดตัวออกมาอยู่บริเวณพื้นผิวของโปรตีนเนื่องจากการเปิดตัวของไมโอซินบางส่วน และการได้รับคลื่นอัลตราซาวน์เป็นเวลานานสามารถกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลได้ และส่งผลให้ปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลอิสระลดลง นอกจากนี้งานวิจัยอื่นก่อนหน้า พบว่า ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของโปรตีนไมโอซินจากปลาเกล็ดเงินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์จะค่อยๆลดลงเมื่อเพิ่มเวลาและกำลังของคลื่นอัลตราซาวน์ (Liu et al., 2017) ปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดในตัวอย่างที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวน์ความเข้มสูง (13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ลดลงประมาณ 31% ซึ่งมากกว่าปริมาณหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา (15%) การลดลงของปริมาณหมู่ซัลไฮดริลนี้อาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันด้วยคลื่นอัลตราซาวน์ ในทางกลับกัน ปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวน์เป็นระยะเวลาสั้น (รูปที่ 4.28C) ผลการศึกษานี้อาจบ่งชี้ได้ว่าหมู่ซัลไฮดริลที่ฝังอยู่ภายใน

โครงสร้างของโปรตีนถูกนำขึ้นมาอยู่บริเวณส่วนของพื้นผิวเนื่องจากการเปิดตัวของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ โดยสาเหตุหลักของการเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้างโปรตีนเป็นผลมาจากแรงกลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการคาวิเทชัน ได้แก่ ความดันและแรงเฉือน นอกจากนี้ ผลการศึกษานี้ยังพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลอย่างเด่นชัด โดยอาจคาดการณ์ได้ว่าการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลได้รับการส่งเสริมภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง เนื่องจากการจับตัวของแอกโตไมโอซินกับหมู่ซัลไฮดริลที่ฝังอยู่ในโครงสร้างโปรตีนมากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณของหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดลดลงมาก รวมถึงการเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลโดยอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการคาวิเทชัน อย่างไรก็ตาม แอกโตไมโอซินที่ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นต่ำ (0.2 โมลาร์) จะอยู่ในรูปแบบของการรวมตัวกัน และมีระดับของการเปิดตัวน้อย ซึ่งนำไปสู่การเกิดออกซิเดชันในระดับต่ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลาที่สั้นกว่า 3 นาที



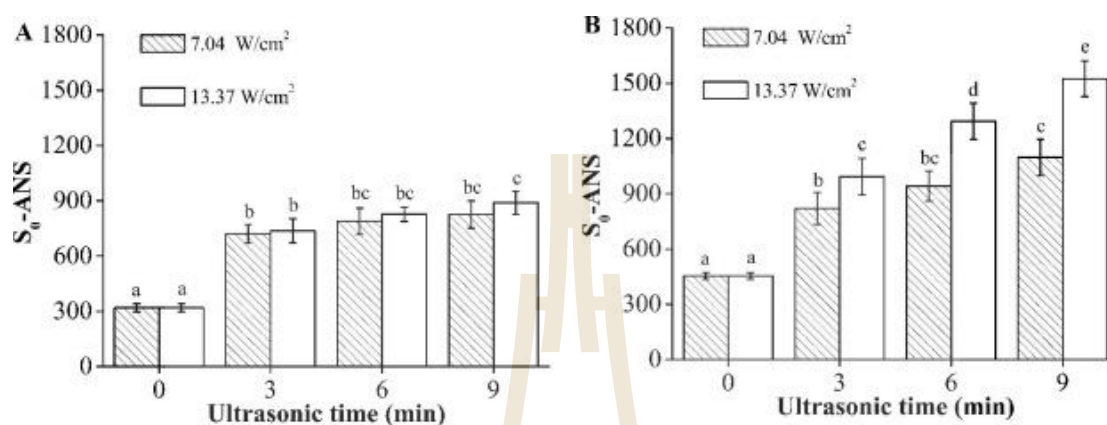
รูปที่ 4.28 ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณหมู่ซัลไฮดริลทั้งหมดและหมู่ซัลไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของแอกโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (A, C) และ 0.6 โมลาร์ (B, D) โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



#### 4.5.4 ผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity

จากการศึกษา พบว่าการใช้คลีนอัลตราซาวด์สามารถกระตุ้นการเปิดตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ โดยจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของ  $S_0$ -ANS ดังแสดงในรูปที่ 4.29 การเพิ่มขึ้นของส่วนที่ไม่ชอบน้ำแสดงให้เห็นว่าสายของไมโอซินมีการเปิดตัว เพราะโดยทั่วไปแล้วส่วนที่ไม่ชอบน้ำจะถูกฝังอยู่ภายในโครงสร้างที่เป็นเกลียว ( $\alpha$ -helix region) ของไมโอซิน (Taguchi et al., 1987) โดยสาเหตุหลักเกิดจากกระบวนการคาวิเทชันที่เกิดขึ้นจากคลื่นอัลตราซาวด์ สภาวะความดันสูงที่เกิดจากกระบวนการคาวิเทชันสามารถบีบอัดโปรตีนและทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนได้ ยิ่งไปกว่านั้นการรวมตัวของฟองอากาศและการดูดซับโมเลกุลของโปรตีนไปยังบริเวณส่วนต่อประสานระหว่างอากาศและของเหลวเกิดขึ้นเมื่อเกิดแรงเฉือนระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีน แรงทางกายภาพเหล่านี้จะช่วยในการแยกตัวของไมโอซิน เป็นผลทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำเปิดตัวมากขึ้น ดังนั้น ปัจจัยเหล่านี้จึงมีส่วนทำให้โปรตีนเกิดการแยกตัวภายใต้สภาวะที่มีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ซึ่งอาจส่งผลทำให้ความสามารถในการสกัดโปรตีนเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.26) นอกจากนี้ค่าของ  $S_0$ -ANS ของตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ต่ำกว่าของตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ เนื่องจากไมโอซินจะเกิดการรวมตัวกันเป็นเส้นใยในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำ โดยเป็นผลมาจากแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) (Wang et al., 2018) จึงส่งผลให้ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 โมลาร์มีค่า  $S_0$ -ANS ต่ำ ในทางตรงกันข้ามสภาวะที่มีความเข้มข้นของไอออนสูงจะนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ เนื่องจากการเปิดตัวของไมโอซินที่เพิ่มขึ้น ค่า  $S_0$ -ANS โปรตีนแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์มีค่าเพิ่มขึ้น 236% หลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้มสูง (13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงส่งผลให้โมเลกุลของไมโอซินกระจายตัวเป็นหน่วยขนาดเล็ก (monomer) ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (Ishioroshi et al., 1983) ทำให้โปรตีนเกิดการเปิดตัวขยายเพิ่มขึ้น และง่ายต่อการเปิดตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ ในทางตรงกันข้าม การเปิดตัวของโปรตีนเมื่อถูกกระตุ้นด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ยังคงมีข้อจำกัดเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของไมโอซิน จากผลการวิเคราะห์ surface hydrophobic จะเห็นได้ว่าคลื่นอัลตราซาวด์กระตุ้นการเปิดตัวของแอคโตไมโอซินให้เพิ่มมากขึ้น โดยผลการศึกษาสามารถใช้เป็นหนึ่งในเหตุผลที่กิจกรรมของ  $Ca^{2+}$ -ATPase ลดลง (รูปที่ 4.27A) เมื่อส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนเปิดตัวออกมามากเกินไปในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์

(รูปที่ 4.29B) อาจทำให้เกิดการรวมตัวกันของโปรตีนผ่านแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ และเป็นสาเหตุทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลงหลังจากผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลานาน (รูปที่ 4.26C)

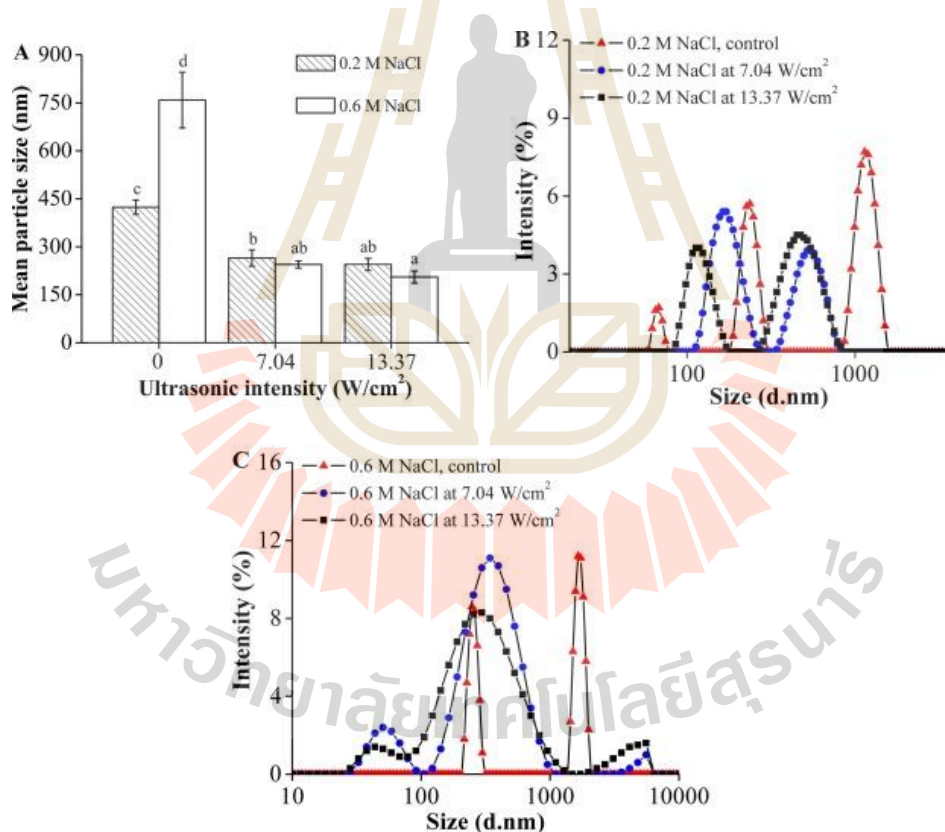


**รูปที่ 4.29** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่า surface hydrophobicity ของ actomyosin ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (A) และ 0.6 โมลาร์ (B) โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.5 ผลการวิเคราะห์ขนาดของอนุภาค

ขนาดของอนุภาคโดยเฉลี่ยของแอกโตไมโอซินของตัวอย่างทั้งในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากให้คลื่นอัลตราซาวด์ แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์จาก 7.04 เป็น 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรไม่ส่งผลต่อขนาดของอนุภาคอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 4.30A โปรตีนแอกโตไมโอซินที่อยู่ภายใต้สภาวะของการให้คลื่นอัลตราซาวด์จะถูกกวนอย่างรุนแรงด้วยพลังงานเฉือนระดับสูง และการปั่นป่วน เป็นผลทำให้ไมโอไฟบริลถูกทำลายและเกิดการแยกตัวของไมโอซิน ก่อนหน้านี้นี้มีงานวิจัยรายงานว่า ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของโปรตีนไมโอไฟบริลาร์จากเนื้อไก่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ลดลงจาก 2084.6 เป็น 271.3 นาโนเมตรหลังจากที่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 193 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (Zhang et al., 2017) นอกจากนี้ การศึกษาของ Liu และคณะ (Liu et al., 2017) รายงานว่า ค่าเฉลี่ยขนาดอนุภาคของไมโอซินจากปลาเกล็ดเงินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ลดลงประมาณ 32% เมื่อตัวอย่างได้ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวด์ที่กำลัง 250 วัตต์ นาน 12 นาที สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้ให้คลื่นอัลตราซาวด์นั้น พบว่า ขนาดอนุภาคของแอกโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์เล็กกว่าตัวอย่างในสารละลายเข้มข้น 0.6 โมลาร์

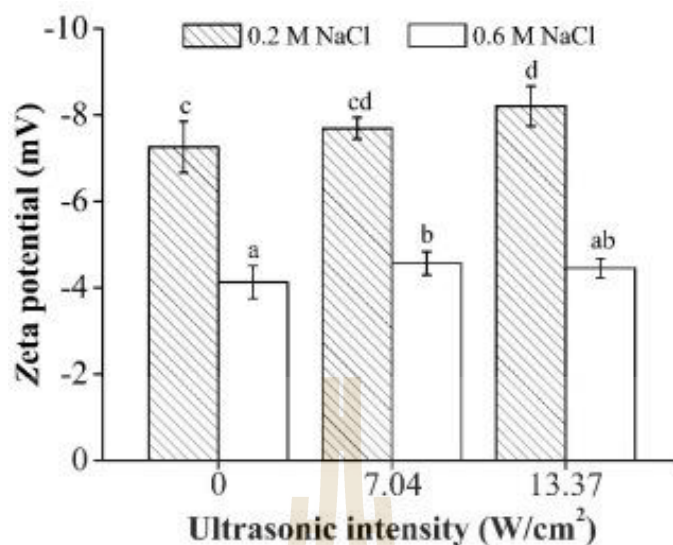
นอกจากนี้ การลดลงของขนาดอนุภาคที่กระตุ้นโดยคลื่นอัลตราซาวด์สำหรับตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์เด่นชัดกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ เนื่องจากการสูญเสียการรวมตัวของเส้นใยโปรตีนที่เป็นผลมาจากการเปิดตัวของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นมากกว่า ดังนั้นจึงง่ายต่อการถูกทำลายด้วยคลื่นอัลตราซาวด์ และเป็นผลทำให้ขนาดของอนุภาคเล็กลง ซึ่งการลดลงของขนาดอนุภาคนี้อาจส่งต่อปริมาณของโปรตีนที่สกัดออกมาได้ (รูปที่ 4.26) เนื่องมาจากการมีพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้นทำให้แรงดึงดูดระหว่างโปรตีนและน้ำ (protein-water interaction) ดีขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่า การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์นั้นไม่เพียงแต่ช่วยทำให้ขนาดของอนุภาคลดลงแล้ว ยังสามารถช่วยปรับปรุงความสม่ำเสมอของการกระจายตัวของอนุภาคร่วมด้วย (รูปที่ 4.30B และ C) การกระจายตัวของอนุภาคที่สม่ำเสมออาจเนื่องมาจากผลของการเฉือน (shearing effect) ที่เกิดจากกระบวนการคาวิเทชัน



**รูปที่ 4.30** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อขนาดอนุภาค (A) และการกระจายตัวของอนุภาคของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (B) และ 0.6 โมลาร์ (C) โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.6 ผลการวิเคราะห์ Zeta potential

โปรตีนแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีค่าสัมบูรณ์ของ zeta potential มากกว่าในตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 4.36 ค่า zeta potential ที่เป็นลบบ่งชี้ถึงการมีปริมาณกรดอะมิโนที่มีประจุลบบนพื้นผิวของแอคโตไมโอซินมากกว่ากรดอะมิโนที่มีประจุบวก ที่ความเข้มข้นของเกลือสูง (0.6 โมลาร์) ส่งผลทำให้ค่าสัมบูรณ์ของ zeta potential ต่ำ อาจเนื่องมาจากความหนาของประจุไฟฟ้า 2 ชั้น (electrical double layer) ลดลงซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของความแรงไอออนของสารตัวกลาง (Salgin et al., 2012) การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Wu และคณะ (Wu et al., 2016) รายงานว่า ค่า zeta potential ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาจากเนื้อหมูที่ pH 7.5 ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 0.8 โมลาร์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำลายการรวมตัวกันของโปรตีน และการเปิดตัวออกของกลุ่มที่มีประจุมากขึ้นโดยเป็นผลมาจากกระบวนการควิเทชัน การเพิ่มขึ้นของค่าสัมบูรณ์ zeta potential ในการวิจัยนี้สอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้าที่ใช้โปรตีนไมโอไฟบริลลาจากเนื้อไก่ (Zhang et al., 2017) ค่าสัมบูรณ์ zeta potential ของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์เพิ่มขึ้นเมื่อใช้คลีนอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (รูปที่ 4.31) และเมื่อเพิ่มความเข้มของคลีนอัลตราซาวด์ต่อไปกลับพบว่าไม่มีผลในการเพิ่มค่า zeta potential (รูปที่ 4.31) จึงเป็นที่น่าสังเกตว่า การใช้คลีนอัลตราซาวด์นั้นมีผลเพียงเล็กน้อยต่อค่า zeta potential ของตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเปิดตัวออกของแอคโตไมโอซินที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์นั้นมากกว่าตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์หลังจากกระตุ้นด้วยคลีนอัลตราซาวด์ (รูปที่ 4.30C)

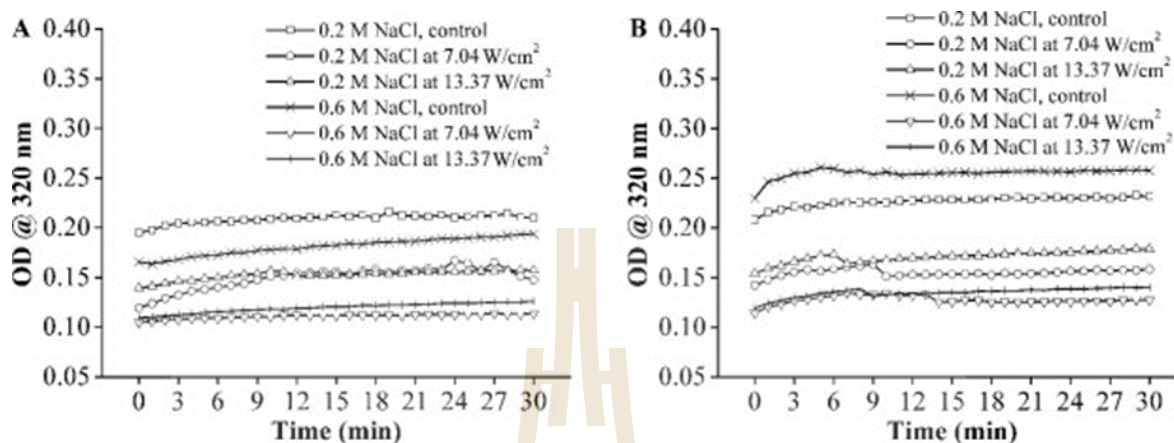


**รูปที่ 4.31** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ต่อค่า zeta potential ของแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ โดยให้คลื่นเป็นเวลา 6 นาที ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.5.7 ผลการวิเคราะห์ความขุ่น

จากการศึกษา พบว่าการให้คลื่นอัลตราซาวนด์มีผลทำให้ความขุ่นของแอคโตไมโอซินลดลงที่อุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียสของตัวอย่างที่ละลายในเกลือทั้ง 2 ความเข้มข้น ดังแสดงในรูปที่ 4.32 ทั้งนี้ความขุ่นที่ลดลงอาจเนื่องมาจากขนาดของอนุภาคที่ลดลง ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเกาะตัวกันของโปรตีนขนาดเล็ก โดยผลการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวนด์มีผลในการลดความขุ่นของไมโอไฟบริลลาร์โปรตีนจากเนื้อไก่ที่ความเข้ม 193 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (Zhang et al., 2017) สำหรับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวนด์ พบว่า ตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์มีค่าความขุ่นมากกว่าตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์เมื่อบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.32A) แต่มีค่าต่ำกว่าเมื่อบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4.32B) โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (0.6 โมลาร์) จะลดแรงดึงดูดทางไฟฟ้า (electrostatic interaction) เนื่องจากผลของการคัดแยก (screening effect) (Haug et al., 2004) ซึ่งอาจจะไปสนับสนุนการละลายของไมโอซินและส่งผลให้ความขุ่นลดลงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่โปรตีนจะเกิดการเปิดตัวได้ดีมากขึ้นในสถานะของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งทำให้ส่วนที่ไม่ชอบน้ำปรากฏมากขึ้นและส่งผลให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การเกิดลักษณะนี้มีผลมาทำให้ค่าความขุ่นสูงกว่าตัวอย่างที่อยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น

0.2 โมลาร์ อย่างไรก็ตาม การใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับโปรตีนนั้นไม่มีผลในการเพิ่มความขุ่นเมื่อเทียบกับการเพิ่มอุณหภูมิ

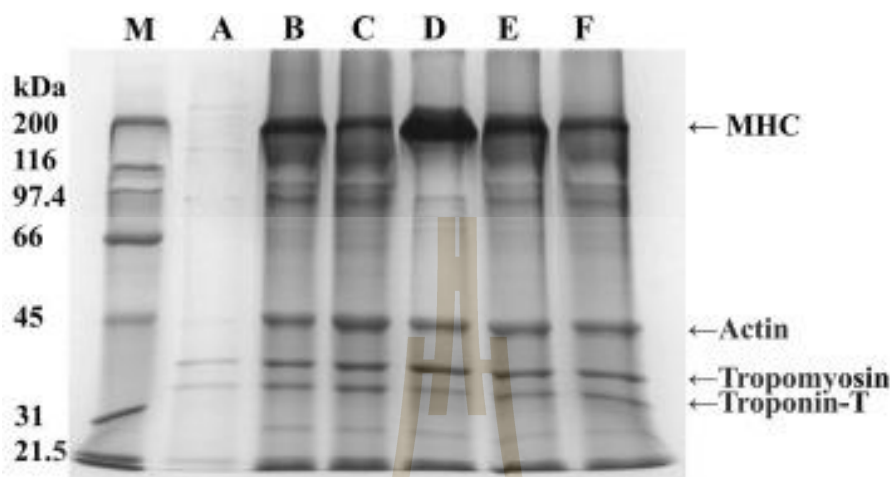


**รูปที่ 4.32** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อการเปลี่ยนแปลงความขุ่นของแอคโตไมโอซินที่ 40 (A) และ 60 (B) องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์ โดยให้เวลาในการรับคลื่นนาน 6 นาที

#### 4.5.8 ผลการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE

ในสถานะที่ไม่มีการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ไมโอซินและแอคตินแทบจะไม่ถูกสกัดในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ แต่โปรตีนถูกละลายออกมาได้มากขึ้นหลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์นาน 6 นาทีที่ความเข้ม 7.04 และ 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (รูปที่ 4.33) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (รูปที่ 4.26) โดยผลการศึกษาที่ยืนยันได้ว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สามารถใช้เป็นวิธีสำหรับสกัดแอคโตไมโอซินที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ แถบสีของไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain; MHC) ของแอคโตไมโอซินที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ทั้งในสถานะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 และ 0.6 โมลาร์บางลงเพิ่มความเข้มของคลื่นจาก 7.04 เป็น 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร นอกจากนี้แถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลน้อย (66-200 kDa) ปรากฏและเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มของคลื่น ปรากฏการณ์ในลักษณะบ่งชี้ว่า MHC ถูกย่อยสลายไปบางส่วนภายใต้สภาวะของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากผลของการเฉือนที่สูง และ/หรือ การตัดพันธะเปปไทด์โดยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากกระบวนการอัลตราซาวด์ (Zhang et al., 2018) การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Liu และคณะ (Liu et al., 2017) พบว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์สามารถกระตุ้นการแตกตัวของ MHC ของไมโอซินจากปลาเกล็ดเงิน นอกจากนี้ เมื่อสังเกตจากการวิเคราะห์ SDS-PAGE พบว่า คลื่น

อัลตราซาวนด์ไม่เพียงแต่จะช่วยในการปรับปรุงความสามารถในการละลายของไมโอซินแล้ว ยังมีส่วนกระตุ้นการสลายของ MHC ในทั้งความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ความเข้มข้น



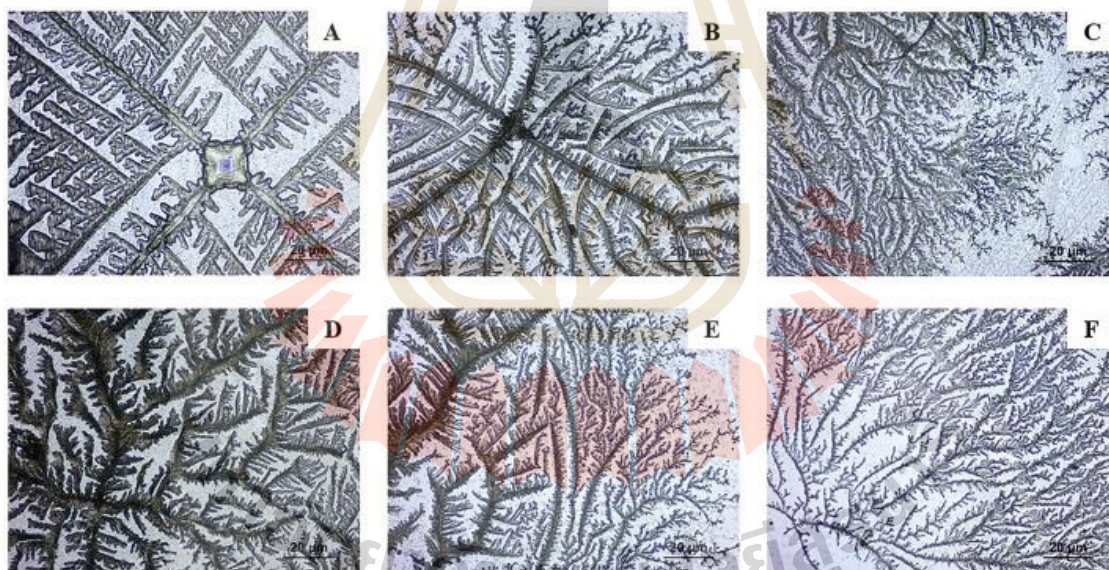
#### รูปที่ 4.33 รูปแบบของ SDS-PAGE ของแอคโตไมโอซินที่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวนด์

โดยที่ M คือ โปรตีนมาตรฐาน (protein markers); A คือตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ควบคุม); B คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; C คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; D คือตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (ควบคุม); E คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; F คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร และให้คลื่นอัลตราซาวนด์นาน 6 นาที

#### 4.5.9 ผลการวิเคราะห์โครงสร้างจุลภาค

ในตัวอย่างที่ไม่ได้ให้คลื่นอัลตราซาวนด์นั้น แอคโตไมโอซินที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ มีมวลรวมของเส้นใยหนาแน่นเทียบกับกับตัวอย่างที่ละลายในโซเดียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ (รูปที่ 4.34A และ D) ผลการวิเคราะห์นี้เป็นหลักฐานที่ชี้ให้เห็นว่าคลื่นอัลตราซาวนด์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและความเป็นเส้นใยของแอคโตไมโอซินอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร พบว่าแอคโตไมโอซินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์เกิดการรวมตัวที่หลวมขึ้นโดยมีเส้นใยที่สั้นและเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 4.34B) และเมื่อความเข้มของอัลตราซาวนด์เพิ่มขึ้นเป็น 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เส้นใยมีขนาด

สั้นและการเกาะตัวน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 4.34C) คลื่นพลังงานเฉือนที่รุนแรงและความปั่นป่วนที่เกิดจากอัลตราซาวนด์มีผลในการทำลายเส้นใยไมโอไฟบริล ทำให้สูญเสียโครงสร้างแบบเส้นใย และมีความยาวสั้นลง ยิ่งไปกว่านั้น ความดันสูงที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิกอาจจะมีช่วยในการส่งเสริมการแยกตัวของเส้นใยที่เกาะกลุ่มกัน แอคโตไมโอซินที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ที่สภาวะของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ พบว่ามีลักษณะของเส้นใยที่สั้นและเล็กกว่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ จึงเป็นที่น่าสังเกตว่า แอคโตไมโอซินในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์นั้นแตกตัวได้ง่ายกว่าตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่เกิดขึ้น ผลการศึกษานี้ได้พิสูจน์ว่าคลื่นอัลตราซาวนด์สามารถกระตุ้น, ขยาย, แยกตัวและแตกตัวของกลุ่มก้อนโปรตีนทั้งในความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ทั้ง 2 ความเข้มข้น ผลของควาวิเทชั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวนด์เด่นชัดมากขึ้นในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ซึ่งเกิดจากโครงสร้างที่หลวมของเส้นใยแอคโตไมโอซินจึงทำให้มีแนวโน้มถูกรบกวนจากคลื่นอัลตราซาวนด์



**รูปที่ 4.34** โครงสร้างจุลภาคของแอคโตไมโอซินที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ (กำลังขยาย 400 เท่า) โดยที่ A คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (ควบคุม); B คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; C คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; D คือตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (ควบคุม); E คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 7.04 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร; F



คือ ตัวอย่างในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ที่ได้รับคลื่นที่ความเข้ม 13.37 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรและให้คลื่นอัลตราซาวด์นาน 6 นาที (scale bar = 20 ไมโครเมตร)

#### 4.5.10 สรุปผลการวิจัย

ความสามารถในการละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินในสถานะที่มีเกลือเข้มข้นต่ำสามารถปรับปรุงได้ด้วยการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของหมู่ซัลไฮดริลมากกว่าการเปิดตัวของหมู่ซัลไฮดริลที่ฝังอยู่ในโครงสร้างของโปรตีนในสถานะที่มีเกลือเข้มข้น 0.6 โมลาร์ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ยังช่วยกระตุ้นการเปิดตัวของสายโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.6 โมลาร์มากกว่าตัวอย่างที่มีเกลือเข้มข้น 0.2 โมลาร์ การเกาะกลุ่มขนาดเล็กของแอคโตไมโอซินที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เกิดขึ้นเมื่อมีอุณหภูมิ 40 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการลดลงของขนาดอนุภาคและการกระจายตัวที่สม่ำเสมอของแอคโตไมโอซินที่เกิดจากการใช้อัลตราซาวด์ ทั้งนี้อัลตราซาวด์ยังเป็นสาเหตุของการย่อยสลายของไมโอซินสายหนัก งานวิจัยครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนแอคโตไมโอซินสามารถถูกสกัดออกมาได้อย่างมีประสิทธิภาพในสถานะที่มีเกลือเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของเทคโนโลยีการใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการผลิตเจลที่มีเกลือต่ำ หรือลดปริมาณเกลือลง และจำเป็นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อประเมินคุณสมบัติของเจลจากเนื้อปลาที่มีการใช้อัลตราซาวด์

### 4.6 การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติด้านออกซิเดชันระดับเซลล์จากปลานิล

#### 4.6.1 ผลด้านออกซิเดชันของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยและการจำลองการย่อยในระบบ กระเพาะอาหาร (gastrointestinal (GI) digestion)

ตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) ทั้ง A0 และ Pep-I เมื่อผ่านการย่อยในกระเพาะอาหาร (simulated gastric fluid, SGF) พบว่าปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมด้านออกซิเดชันมีการเปลี่ยนแปลงน้อยเมื่อเทียบกับตัวอย่างไฮโดรไลสเปปไทด์ปลานิลที่เวลาย่อย 10 ชั่วโมง (H10-GID) ซึ่งมีปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมด้านออกซิเดชันสูงสุด (ตารางที่ 4.30, รูปที่ 4.35) อย่างไรก็ตามตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) Pep-Pan-I เมื่อผ่านการย่อยในจากกระเพาะอาหาร (เพปซิน) ไปสู่ลำไส้เล็ก (แพนกรีเอติน) (simulated intestinal fluid, SIF) พบว่าปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมด้านออกซิเดชัน (TEAC และ ORAC) มีปริมาณ 15 – 40% เมื่อเทียบกับตัวอย่าง H10-GID แสดงถึงการเข้าย่อยที่จำกัดของเพปซิน แต่หลังจากการย่อยในลำไส้เล็กมีการ

เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ซึ่งแสดงว่าเกิดการย่อยพันธะเพปไทด์โดยแพนกรีเอติน เกิดผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนหรือเพปไทด์ เนื่องจากแพนกรีเอตินเป็นเอนไซม์ผสมที่สกัดจากตับอ่อนประกอบด้วย ทริปซิน ไคโมทริปซิน และเอ็กโซเพปติเดสต่างๆ อีกมากมาย (Dave, Hayes, Mora, Montoya, Moughan, & Rutherford, 2016; Whitcomb & Lowe, 2007) ยิ่งไปกว่านั้นเพปไทด์บางชนิดอาจเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ทางการค้าที่เห็นได้จากการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MW distribution) ของตัวอย่างควบคุม Pan0 (ตารางที่ 4.31) นอกจากนี้ตัวอย่างควบคุม A0 สามารถถูกย่อยได้เพปไทด์ที่ต้านอนุมูลอิสระได้ส่งผลให้ A0-GID มีกิจกรรมที่สูงกว่า Pep-Pan-I (ตารางที่ 4.30) ดังนั้นตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) ที่มีปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระบ่งชี้ว่าเอนไซม์ใช้ในการย่อยไฮโดรไลเซสทำให้ได้เพปไทด์ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และส่งเสริมการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลองอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่ตีพิมพ์ส่วนมากไม่ได้อธิบายถึงการมีส่วนร่วมของเพปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหาร มีรายงานการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลเซสที่ได้จากโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา ผิวหนังหรือผลพลอยได้จากซูริมิจากการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลอง (Ketnawa, Martínez-Alvarez, Benjakul, & Rawdkuen, 2016; Ketnawa, Wickramathilaka, & Liceaga, 2018; Samaranayaka, Kitts, & Li-Chan, 2010; Wiriayaphan, Xiao, & Decker, 2015; Yarnpakdee, Benjakul, Kristinsson, & Kishimura, 2015) อย่างไรก็ตามไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเคซีนไฮโดรไลเซสหลังการย่อยอาหาร (Ao & Li, 2013) เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์แพนกรีเอตินจะลดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ORAC ของ dipeptide SM และ TEAC ของ tripeptide NCS (Wang, Li, Wang, & Xie, 2015) ผลการศึกษาของพบว่าตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) ที่เตรียมไว้สำหรับการวิเคราะห์การย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลองมาตรฐานเป็นสิ่งที่จำเป็นและการอ่านค่าจากค่าจากตัวอย่างโดยลบด้วย enzyme blanks เพื่อสะท้อนค่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่แท้จริงของการย่อยไฮโดรไลเซสหรือการย่อยในระบบการย่อยอาหาร

ตารางที่ 4.30 ปริมาณแอลฟา-อะมิโน ( $\alpha$ -amino group) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks)<sup>1</sup>

| Samples                            |       | $A_0$                   | <i>Pep-I</i>            | <i>Pep-Pan-I</i>          | $A_0$ -GID                | $H_{10}$ -GID <sup>#</sup>    |
|------------------------------------|-------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------|
| Parameters                         |       |                         |                         |                           |                           |                               |
| $\alpha$ -Amino<br>(mmol L-Leu)    | Free  | 0.02±0.00 <sup>a</sup>  | 0.01±0.00 <sup>a</sup>  | 1.05±0.01 <sup>b</sup>    | 1.02±0.02 <sup>b</sup>    | 2.69±0.09 <sup>c</sup>        |
|                                    | Total | -                       | -                       | -                         | 2.00±0.15 <sup>a</sup>    | 4.73±0.12 <sup>b</sup>        |
| TEAC ( $\mu$ mol Trolox)           |       | 12.18±0.98 <sup>a</sup> | 39.02±0.00 <sup>b</sup> | 389.54±0.55 <sup>c</sup>  | 487.47±0.65 <sup>d</sup>  | 1004.83<br>±7.35 <sup>e</sup> |
| FRAP ( $\mu$ mol Trolox)           |       | 0.11±0.08 <sup>a</sup>  | 0.03±0.00 <sup>a</sup>  | 1.94±0.04 <sup>c</sup>    | 1.78±0.04 <sup>b</sup>    | 4.64±0.04 <sup>d</sup>        |
| FICC ( $\mu$ mol EDTA)             |       | 5.99±0.40 <sup>a</sup>  | ND                      | 7.33±0.68 <sup>ab</sup>   | 11.59±2.11 <sup>c</sup>   | 8.25±0.35 <sup>b</sup>        |
| ORAC ( $\mu$ mol Trolox)           |       | 12.39±1.09 <sup>a</sup> | 0.57±0.03 <sup>a</sup>  | 235.69±58.40 <sup>b</sup> | 370.63±10.35 <sup>c</sup> | 984.54±34.18 <sup>d</sup>     |
| ONOO <sup>-</sup> ( $\mu$ mol GSH) |       | ND                      | ND                      | 0.59±0.05 <sup>a</sup>    | 1.06±0.16 <sup>b</sup>    | 3.95±0.19 <sup>c</sup>        |

<sup>a-e</sup> ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ). <sup>#</sup>

Without enzyme blank subtraction. '-', the values were not determined; ND, the values were not detected;  $A_0$ , thermally-inactivated Alcalase; *Pep-I*, blank of gastric (pepsin) digestion; *Pep-Pan-I*, blank of GI (pepsin and pancreatin) digestion;  $A_0$ -GID, GI digesta of  $A_0$ ;  $H_{10}$ -GID, GI digesta of 10-h hydrolysate.

**ตารางที่ 4.31** การกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MW distribution) ของไฮโดรไลเซต เพปไทด์จากการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลอง และตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks)<sup>1</sup>

| Sample  | Percentage of area under chromatogram |                           |                          |                           |
|---|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
|   | > 1,250 Da                            | 1,250 – 330 Da            | 330 – 220 Da             | < 220 Da                  |
| Protein hydrolysates  |                                       |                           |                          |                           |
| <i>H</i> <sub>2</sub>   | 12.29±1.31 <sup>c</sup>               | 77.49±1.67 <sup>b</sup>   | 10.00±0.36 <sup>a</sup>  | 0.22±0.12 <sup>a</sup>    |
| <i>H</i> <sub>6</sub>   | 7.60±0.68 <sup>b</sup>                | 75.64±1.88 <sup>ab</sup>  | 15.59±0.57 <sup>b</sup>  | 1.17±0.76 <sup>ab</sup>   |
| <i>H</i> <sub>10</sub>  | 4.46±0.30 <sup>a</sup>                | 75.55±0.92 <sup>ab</sup>  | 18.73±0.70 <sup>c</sup>  | 1.25±0.39 <sup>ab</sup>   |
| <i>H</i> <sub>16</sub>  | 3.61±0.54 <sup>a</sup>                | 73.52±0.34 <sup>a</sup>   | 21.02±0.75 <sup>d</sup>  | 1.85±0.15 <sup>b</sup>    |
| Digesta of protein hydrolysates   |                                       |                           |                          |                           |
| <i>P-GID</i>  | 5.79±0.30 <sup>A</sup>                | 37.50±0.27 <sup>BCD</sup> | 35.27±0.37 <sup>BC</sup> | 21.44±0.36 <sup>D</sup>   |
| <i>H</i> <sub>2</sub> - <i>GID</i>  | 6.13±0.11 <sup>A</sup>                | 37.74±0.38 <sup>CD</sup>  | 35.70±0.32 <sup>BC</sup> | 20.43±0.55 <sup>CD</sup>  |
| <i>H</i> <sub>6</sub> - <i>GID</i>  | 5.71±0.21 <sup>A</sup>                | 38.77±0.61 <sup>D</sup>   | 36.24±0.16 <sup>BC</sup> | 19.28±0.27 <sup>ABC</sup> |
| <i>H</i> <sub>10</sub> - <i>GID</i>                                       | 5.76±0.24 <sup>A</sup>                | 37.59±0.16 <sup>BCD</sup> | 36.61±0.30 <sup>C</sup>  | 20.04±0.27 <sup>BC</sup>  |
| <i>H</i> <sub>16</sub> - <i>GID</i>                                       | 6.07±0.45 <sup>A</sup>                | 37.52±0.26 <sup>BCD</sup> | 36.59±0.46 <sup>C</sup>  | 19.82±0.24 <sup>BC</sup>  |
| Enzyme blanks   |                                       |                           |                          |                           |
| <i>Pan</i> <sub>0</sub>   | 16.47±0.34 <sup>D</sup>               | 36.57±0.49 <sup>BC</sup>  | 28.90±0.96 <sup>A</sup>  | 18.06±0.69 <sup>A</sup>   |
| <i>A</i> <sub>0</sub> - <i>Pep</i> <sub>0</sub> - <i>Pan</i> <sub>0</sub> | 14.96±1.08 <sup>C</sup>               | 36.32±0.11 <sup>B</sup>   | 29.83±1.40 <sup>A</sup>  | 18.90±0.42 <sup>AB</sup>  |
| <i>A</i> <sub>0</sub> - <i>GID</i>  | 8.99±0.43 <sup>B</sup>                | 26.87±0.74 <sup>A</sup>   | 34.57±0.64 <sup>B</sup>  | 29.56±0.71 <sup>E</sup>   |

<sup>1</sup> MW at elution volume ( $V_e$ ) 13.20, 18.10 and 20.77 mL were calculated by formula  $\text{LogMW} = -0.649 \ln(K_{av}) + 2.1656$   $R^2 = 0.988$ , respectively, and used to define the MW distribution of peptides.

<sup>a-d</sup> Different lowercase letters indicate differences in mean values among protein hydrolysates ( $p < 0.05$ ).

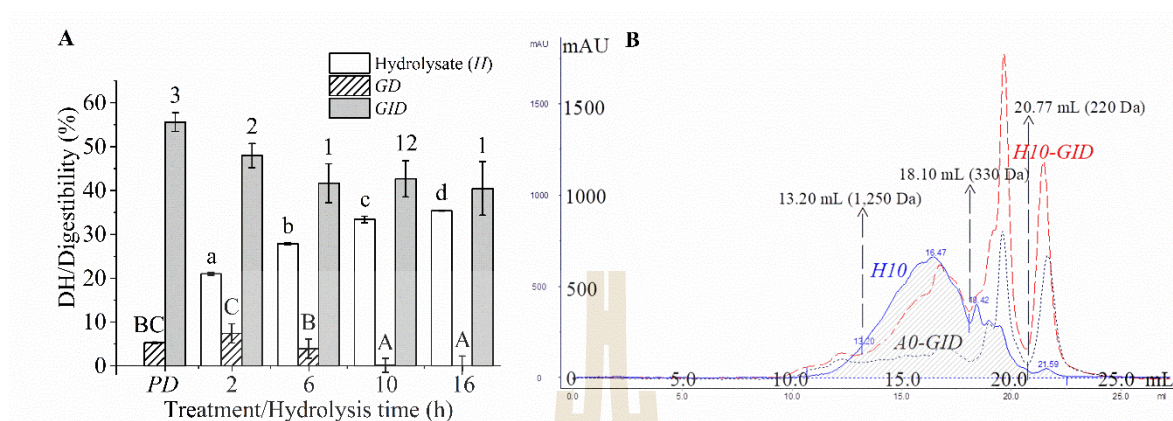
<sup>A-D</sup> Different uppercase letters indicate differences in mean values among digesta and enzyme blanks ( $p < 0.05$ ).

*A*<sub>0</sub>, *Pep*<sub>0</sub>, and *Pan*<sub>0</sub> were referred to as thermally-inactivated Alcalase, pepsin and pancreatin, respectively; *A*<sub>0</sub>-*Pep*<sub>0</sub>-*Pan*<sub>0</sub>, the mixture of *A*<sub>0</sub>, *Pep*<sub>0</sub> and *Pan*<sub>0</sub>; *A*<sub>0</sub>-*GID*, digesta of *A*<sub>0</sub>.

#### 4.6.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis, DH) และการกระจายน้ำหนักโมเลกุล (MW Distribution)

ปริมาณโปรตีนและไขมันหยาบของตัวอย่างเนื้อปลานิลผง (P) เท่ากับ  $83.87 \pm 0.29\%$  (d.b.) และ  $1.91 \pm 0.33\%$  (dw) ตามลำดับระดับการย่อย (DH) ของ P hydrolysate เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 6 ชั่วโมงจากนั้นเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งถึง  $35.36 \pm 0.06\%$  DH ที่ 16 ชั่วโมง (รูปที่ 4.35A) มีรายงานอื่นๆ ที่ให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน (Ketnawa, Martinez-Alvarez, Benjakul, & Rawdkuen, 2016; Raghavan, Kristinsson, & Leeuwenburgh, 2008) ไฮโดรไลเซสทั้งหมดแสดงรูปแบบการรูปแบบโครมาโตแกรม SEC ที่คล้ายกัน โดยเพปไทด์หลัก (~ 75%) ในทุกตัวอย่างมีค่า MW ชัดเจนตั้งแต่ 330 - 1250 Da (ตารางที่ 4.31) ซึ่งเป็นผลจากเพปไทด์ขนาดใหญ่และถูกย่อยให้มีขนาดเล็กลง เนื่องจากกระบวนการไฮโดรไลซิสที่ใช้เวลาย่อยนานสัดส่วนของเพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) <330 Da จะเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของเพปไทด์ขนาดใหญ่ (MW > 1250) เพปไทด์ขนาดเล็กถูกสร้างขึ้นเมื่อ DH เพิ่มขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย โปรตีนและไฮโดรไลเซสถูกย่อยด้วยเพปซินเล็กน้อย แต่ถูกย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญโดยแพนครีเอติน (รูปที่ 4.35A) ไฮโดรไลเซสที่ได้จากผลพลอยได้จากซูริมิของปลาทรายแดง (*Nemipterus* spp.) (Wiryaphan, Xiao, & Decker, 2015) และกระดูกและก้างปลาเทราท์ (Ketnawa, Wickramathilaka, & Liceaga, 2018) ส่วนใหญ่ถูกย่อยโดยแพนครีเอตินแต่จะถูกย่อยด้วยเพปซินเล็กน้อย เอนไซม์เพปซินมีความจำเพาะสูงต่อกรดอะมิโนในกลุ่มสารอะโรมาติกหรือลิซีนทั้งในระดับ P1 และ P1' (Keil, 1992) ส่งผลให้ระดับการย่อยค่อนข้างต่ำในทางตรงกันข้ามแพนครีเอตินเป็นส่วนผสมของ endopeptidases และ exopeptidases ซึ่งมีความจำเพาะกว้าง ๆ (Whitcomb & Lowe, 2007) โปรตีนมีความสามารถในการย่อย (digestibility) ได้สูงสุด ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.35A) ในขณะที่ไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการย่อยได้ต่ำกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งไฮโดรไลซิสที่ถูกย่อยสลายเป็นเวลานาน (> 6 ชั่วโมง) จะถูกย่อยในระบบการย่อย GI ต่ำที่สุด ( $p > 0.05$ , รูปที่ 4.35A) เพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าจะถูกย่อยสลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ย่อยอาหารแต่เพปไทด์ที่สั้นกว่าจะถูกย่อยได้น้อยลง เนื่องจากพันธะเพปไทด์มีสัดส่วนลดลง เพปไทด์หลังย่อยในกระเพาะอาหารทั้งหมดแสดงรูปแบบโครมาโตแกรม SEC ที่คล้ายกัน (รูปที่ 4.35B) และการกระจายน้ำหนักโมเลกุล ( $p > 0.05$ , ตารางที่ 4.31) ประมาณ 55% ของเพปไทด์หลังย่อยในกระเพาะอาหารมีน้ำหนักโมเลกุล <330 Da ดังนั้นโปรตีนและไฮโดรไลเซสจึงถูกย่อยเพื่อให้ได้เพปไทด์ขนาดใกล้เคียงกัน และเพปไทด์ส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุล <330 Da ดังนั้นโปรตีนและไฮโดรไลเซสในที่สุดจะให้เพปไทด์ที่

มีขนาดใกล้เคียงกับการย่อยในระบบการย่อย GI

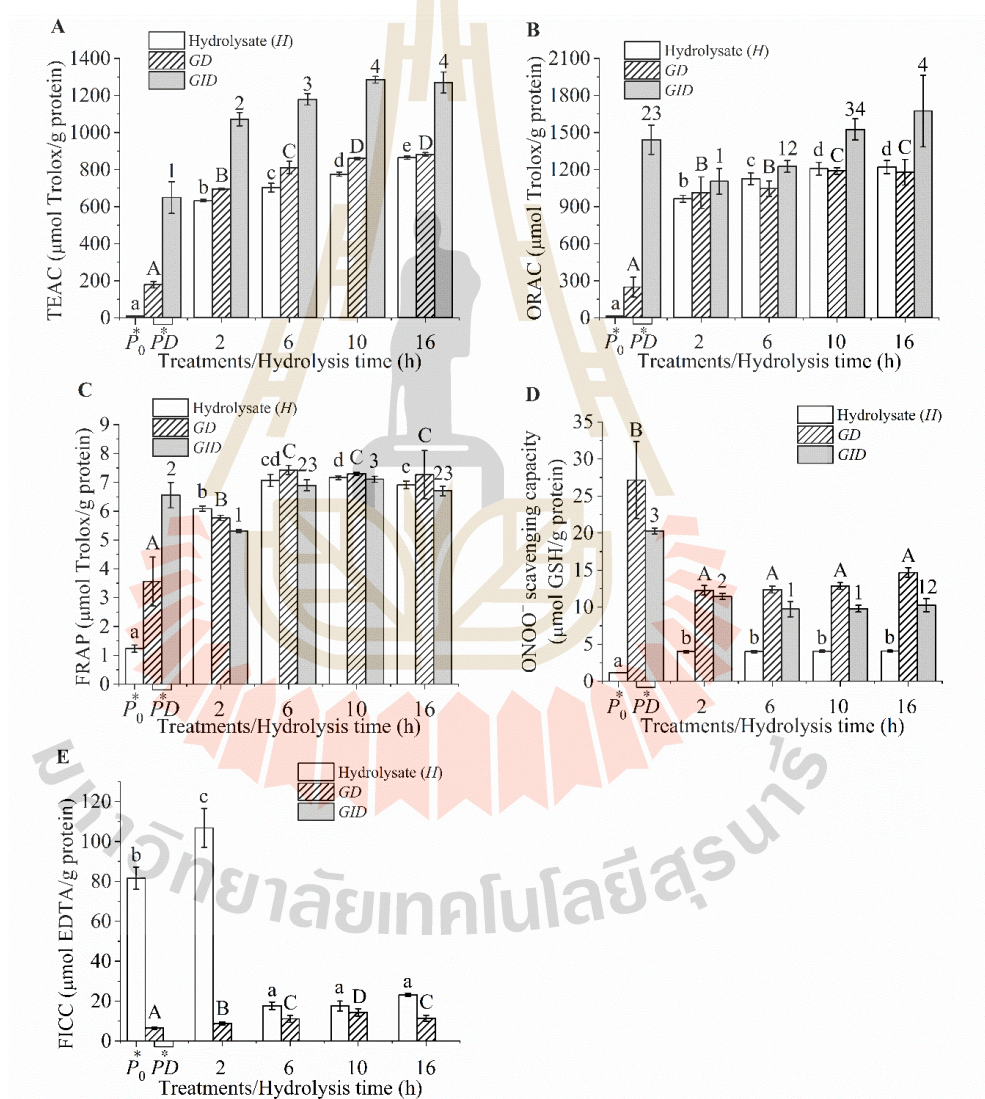


**รูปที่ 4.35** (A) ระดับการย่อย (DH) หรือความสามารถในการย่อย (digestibility) ของโปรตีนไฮโดรไลเสท และ(B) โครมาโตแกรม size exclusion chromatograms (SECs) ของตัวอย่างในกลุ่มควบคุม (enzyme blanks) ดังนี้กลุ่มที่มีอัลคาเลทัม (A<sub>0</sub>-GID), ไฮโดรไลเสทย่อย 10 ชั่วโมง (10-hydrolysate (H<sub>10</sub>)) ก่อนและหลังย่อยด้วยเพปซิน (H<sub>10</sub>-GID), โปรตีนปลาในระบย่อยอาหาร (PD), การย่อยในกระเพาะอาหาร (GD), การย่อยในลำไส้เล็ก (GID)

#### 4.6.3 กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมี

โปรตีนไฮโดรไลเสทของปลานิลก่อนและหลังการย่อยในระบบการย่อย GI มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระทางเคมีต่างๆ (รูปที่ 4.36A - E) พบว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TEAC และ ORAC สูงเมื่อเทียบกับวิธี FRAP และ ONOO<sup>-</sup> scavenging capacity มีรายงานที่สอดคล้องกันว่ากิจกรรมต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทของปลานิลย่อยโดย Flavourzyme, Protamex และ papain (Yarnpakdee, Benjakul, Kristinsson, & Kishimura, 2015) รวมทั้งไฮโดรไลเสทที่ได้จากเจลาตินหนังปลาและผลพลอยได้จากซูริมิ (Ketnawa, Benjakul, Martínez-Alvarez, & Rawdkuen, 2017; Wiryaphan, Xiao, & Decker, 2015) แสดงค่า FRAP ต่ำกว่าค่า TEAC ซึ่งกลไกการวิเคราะห์กิจกรรมต้านออกซิเดชันด้วย ORAC เป็นการตรวจสอบกิจกรรมการกำจัดเปอร์ออกซิล (ROO<sup>•</sup>) ผ่านกลไกการถ่ายโอนอะตอมของไฮโดรเจน (HAT) (Apak, Özyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016) ส่วน FRAP และ ONOO<sup>-</sup> scavenging capacity เป็นการตรวจวิเคราะห์การกำจัดอนุมูลอิสระผ่านกลไกการถ่ายโอนอิเล็กตรอน (electron transfer (ET) mechanism) (Kooy, Royall, Ischiropoulos, & Beckma, 1994; Apak, Özyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016) TEAC เป็นการทดสอบแบบกลไกผสม

(ET/HAT) (Apak, Özyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016) ดังนั้นกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี TEAC และ ORAC ที่มีค่าสูงในไฮโดรไลเสทของปลานิลก่อนและหลังการย่อยในระบบการย่อยอาหาร แสดงให้เห็นว่า HAT อาจเป็นกลไกสำคัญต่อความสามารถของเพปไทด์ที่ได้จากโปรตีนของปลานิลในการกำจัดอนุมูลอิสระ กรดอะมิโนส่วนใหญ่จะถูกโปรตอนที่ pH3.6 (การทดสอบ FRAP) และ pH7.4 (การทดสอบ TEAC, ORAC และ  $\text{ONOO}^-$  scavenging capacity สารที่มีโปรตอนเหล่านี้มีศักยภาพในการให้อะตอมของไฮโดรเจนและถ่ายโอนอิเล็กตรอนมากเกินไป (Aluko, 2015) ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่า HAT มีส่วนในการกำจัดอนุมูลอิสระของเพปไทด์



รูปที่ 4.36 กิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมีของไฮโดรไลเสทก่อนและหลังย่อยในระบบย่อยอาหาร (A) TEAC, (B) ORAC, (C) FRAP, (D)  $\text{ONOO}^-$  scavenging capacity และ (E) FICC โปรตีนปลานิลต้ม

(P<sub>0</sub>) โปรตีนปลานิลในระบบย่อยอาหาร (PD), การย่อยในกระเพาะอาหาร (GD), การย่อยในลำไส้เล็ก (GID)

นอกจากนี้สารประกอบที่มี thiol เช่น Cys, GSH และ tripeptides ที่มี Cys เป็นสารที่มีประสิทธิภาพต้านออกซิเดชัน ONOO<sup>-</sup> scavenging capacity สูง (Balavoine & Geletii, 1999; Kooy, Royall, Ischiropoulos, & Beckman, 1994) แต่ tripeptides ที่มี His และ Tyr มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน ONOO<sup>-</sup> scavenging capacity ต่ำ (Saito, Jin, Ogawa, Muramoto, Hatakeyama, Yasuhara, & Nokihara, 2003) ซึ่งมีรายงานว่าโปรตีนของปลานิลมีปริมาณ Cys (0.95% หรือน้อยกว่า) ต่ำ (Adeyeye, 2009) ดังนั้นโปรตีนของปลานิลจึงมีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน ONOO<sup>-</sup> scavenging capacity ต่ำ (<30 μmol เทียบเท่า GSH/g โปรตีน) เนื่องจากมีปริมาณ Cys น้อย

โปรตีนไฮโดรไลเซสพปลานิลย่อยที่ 2 ชั่วโมง (H2) มีระดับการย่อยที่ 20.97% DH แสดงถึงกิจกรรมต้านออกซิเดชัน Fe<sup>2+</sup> + chelating capacity (FICC) เท่ากับ 106.77 μmol EDTA equivalents/g Digesta (รูปที่ 4.36E) มีรายงานสอดคล้องกันว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสพปลานิลที่มีค่า DH ตั้งแต่ 10% ถึง 40% ยังแสดงถึงกิจกรรมต้านออกซิเดชัน FICC ต่ำ (neglig 3 μmol EDTA equivalents / g solid) (Yarnpakdee, Benjakul, Kristinsson, & Kishimura, 2015) นอกจากนี้ไฮโดรไลเซสจากเจลาตินที่ได้จากผิวหนังปลาตุ๊กตาที่เลี้ยงในฟาร์ม (~ 10% DH) มีกิจกรรมต้านออกซิเดชัน FICC แสดงค่า EDTA เทียบเท่า 170 ไมโครโมลต่อกรัม (Ketrnawa, Martínez-Alvarez, Benjakul, & Rawdkuen, 2016) ไฮโดรไลเซสที่มีค่า DH สูงกว่าและเพปไทด์หลังการย่อยในระบบย่อยอาหารความสามารถในการคีเลตโลหะต่ำ เนื่องจากมีเพปไทด์ที่สั้นกว่าและมีกรดอะมิโนที่มีประจุลบเหลืออยู่น้อย ดังนั้นผลจึงบ่งชี้ว่า HAT อาจเป็นกลไกสำคัญของไฮโดรไลเซสและเพปไทด์หลังการย่อยในระบบย่อยอาหารซึ่งมีส่วนช่วยในการต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่กลไกการถ่ายเทอิเล็กตรอนและการทำคีเลตของโลหะมีความสำคัญน้อยกว่า วิธี TEAC และ ORAC สามารถใช้เป็นการตรวจสอบที่สำคัญในการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ได้จากโปรตีนของปลานิล

กิจกรรมต้านออกซิเดชัน TEAC และ ORAC ของไฮโดรไลเซสเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มเวลาในการย่อยสลาย (รูปที่ 4.36A, B) นอกจากนี้ยังเพิ่มขึ้นอย่างมากหลังจากการย่อยของแพนครีเอตินในลำไส้เล็ก (p < 0.05) เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่าจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่ดีกว่ามีรายงานผลการทดลองอื่น ๆ ที่คล้ายคลึงกัน (Nwachukwu & Aluko, 2009; Raghavan, Kristinsson,



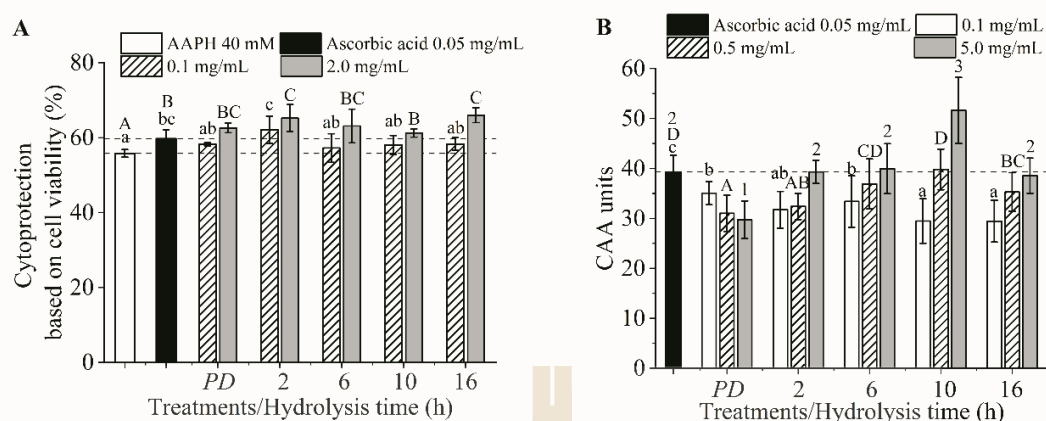
& Leeuwenburgh, 2008) เพปไทด์ที่สั้นกว่าจะทำปฏิกิริยากับอนุมูล ABTS<sup>•+</sup> และ ROO<sup>•</sup> ที่ละลายน้ำได้ซึ่งทำให้ได้กิจกรรมของ TEAC และ ORAC สูงขึ้นตามลำดับ (You, Zhao, Regenstein, & Ren, 2010) ดังนั้นกิจกรรมต้านออกซิเดชัน TEAC ของไฮโดรไลเซตจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและถึงระดับสูงสุดในไฮโดรไลเซตย่อย 16 ชั่วโมง (H16) และเพิ่มขึ้นอีกหลังจากการย่อย GI ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องมุ่งเน้นที่ไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุด แต่ควรพิจารณาการผลิตเพปไทด์ที่เหมาะสมโดยเพปไทด์หลังจากการย่อย GI ควรมีประสิทธิภาพต้านอนุมูลอิสระสูง นอกจากนี้การโปรตีนหลังย่อยใน GI ยังมีค่า TEAC และ ORAC ต่ำกว่าไฮโดรไลเซตหลังย่อยใน GI (รูปที่ 4.36A - B) อย่างไรก็ตามทั้งโปรตีนและไฮโดรไลเซตหลังย่อยใน GI มีขนาดของเพปไทด์ที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 4.30) แต่ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่างกันอาจเนื่องมาจากลำดับกรดอะมิโนในเพปไทด์ที่แตกต่างกัน

การวิเคราะห์สหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation analysis) พบว่ากิจกรรมต้านออกซิเดชัน TEAC และ ORAC ของไฮโดรไลเซตมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ DH ( $r = 0.95$  และ  $0.91$  ตามลำดับ) นอกจากนี้ TEAC และ ORAC ของเพปไทด์หลังการย่อยใน GI มีความสัมพันธ์น้อยกว่ากับค่าที่ได้จากไฮโดรไลเซต ( $r = 0.80 - 0.85$ ) ผลการวิจัยระบุว่าไม่สามารถใช้ผลกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทางเคมีของไฮโดรไลเซตเพื่อทำนายกิจกรรมต้านออกซิเดชันของเพปไทด์หลังการย่อยใน GI ได้ สาเหตุที่น่าจะเกิดจากความแตกต่างของขนาดและลำดับของกรดอะมิโนของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เลือกการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตย่อยที่เวลา 10 ชั่วโมง (H10) ที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันแทนการย่อยที่ 16 ชั่วโมง (H16) เนื่องจากพิจารณากิจกรรมต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซต (H10) หลังผ่านการย่อยใน GI จะสูงกว่า H16 ดังนั้นกิจกรรมต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหลังผ่านการย่อยใน GI ควรใช้เป็นเกณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไฮโดรไลเซตได้อย่างเหมาะสม

#### 4.6.4 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

ทุกตัวอย่างเพปไทด์หลังการย่อยใน GI ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งสามารถใช้ได้ในปริมาณสูงถึง 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และแสดงพฤติกรรมปกป้องกันเซลล์ (cytoprotection) ขึ้นกับขนาดและกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ ยกเว้นโปรตีนใน GI (PD) มีค่ากิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) ลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.37A - B) โดยที่ในทุกตัวอย่างเพปไทด์หลังการย่อยใน GI ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตรมีความสามารถในการปกป้องกันเซลล์ (cytoprotection) ที่เทียบได้กับกรดแอสคอร์บิก 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ( $p > 0.05$ ) ในขณะที่ไฮโดรไลเซตที่ย่อย 2 ชั่วโมงหลังการย่อยใน GI มีประสิทธิภาพสูงสุด ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.37A) อย่างไรก็ตามการปกป้องกันเซลล์

(cytoprotection) ไม่ต่างกันของทุกตัวอย่างเพปไทด์หลังการย่อยใน GI ความเข้มข้น 2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ( $p > 0.05$ ) เมื่อพิจารณาจากกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์พบว่าไฮโดรไลเซสที่ย่อย 10 ชั่วโมง หลังการย่อยใน GI (ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มีฤทธิ์สูงสุดที่เทียบได้กับกรดแอสคอร์บิก 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้ไฮโดรไลเซสที่ย่อย 10 ชั่วโมงหลังผ่านการย่อยใน GI ยังมีกิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) สูงสุดที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (รูปที่ 4.37B) มีข้อสังเกตว่าโปรตีนหลังการย่อยใน GI มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) ต่ำสุด ( $p < 0.05$ ) ผลบ่งชี้ว่าโปรตีนและไฮโดรไลเซสหลังการย่อยใน GI มีความสามารถในการป้องกันเซลล์ (cytoprotection) ที่ใกล้เคียงกัน แต่ไฮโดรไลเซสที่ย่อย 10 ชั่วโมงหลังการย่อยใน GI มีกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด จะเห็นได้ว่าผลของ cytoprotective ไม่สอดคล้องกับกิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ ซึ่งมีรายงานผลที่ไม่สอดคล้องกันนี้ด้วยเช่นกัน (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016) การทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์จะตรวจสอบความสามารถของสารประกอบในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ ในขณะที่การป้องกันเซลล์ (cytoprotection) จะวัดความมีชีวิตของเซลล์ซึ่งเกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากอนุมูลอิสระ ROS ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และความผิดปกติทางชีวโมเลกุลรวมทั้งความผิดปกติของไมโทคอนเดรียและ/หรือความเสียหายของดีเอ็นเอที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016) และอื่น ๆ ดังนั้นเพปไทด์เดียวกันอาจแสดงการตอบสนองต่อกิจกรรมการป้องกันเซลล์ (cytoprotection) และการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน โดยกิจกรรมกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ต่ำของโปรตีนหลังการย่อยใน GI จะมีผลสอดคล้องกับค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันทางเคมีด้วยวิธี TEAC และ ORAC ต่ำเช่นเดียวกัน (รูปที่ 4.42A - B) บ่งชี้ว่าโปรตีนหลังการย่อยใน GI ที่มีเพปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ต่ำกว่าไฮโดรไลเซสหลังการย่อยใน GI นอกจากนี้ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ที่แตกต่างกันน่าจะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเซลล์แตกต่างกัน ผลวิจัยแสดงให้เห็นว่าสามารถปรับปรุงการผลิตเพปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนปลาที่มีประสิทธิภาพได้ แต่การย่อยนานมากเกินไป (16 ชั่วโมง) ส่งผลให้กิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) ของไฮโดรไลเซสในระบบย่อย GI ลดลง



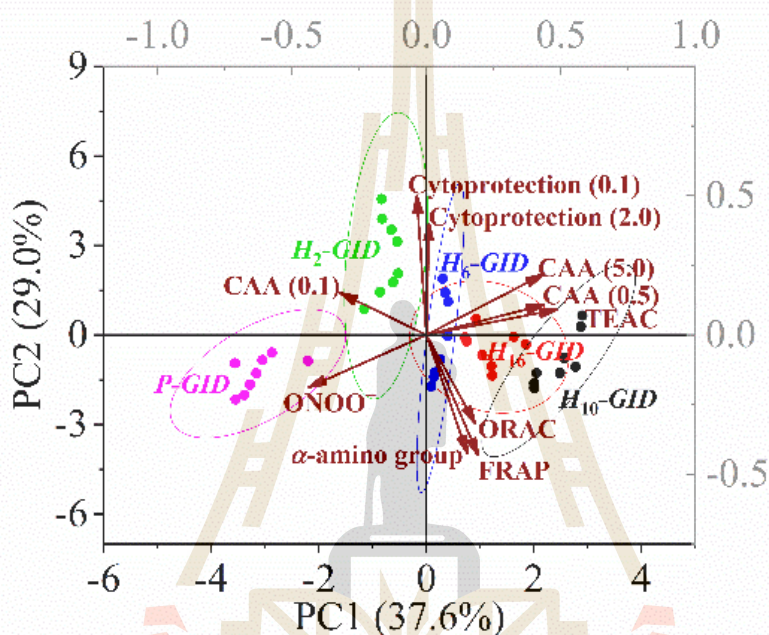
**รูปที่ 4.37** (A) กิจกรรมการป้องกันเซลล์ (cytoprotection) ที่ 0.1–2.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ (B) กิจกรรมการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่ 0.1–5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ของโปรตีนและไฮโดรไลเซทหลังการย่อยใน GI และ AAPH คือ 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) dihydrochloride

#### 4.6.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal component analysis; PCA) และการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation analysis)

จากกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทางเคมีและในระดับเซลล์ของโปรตีนและไฮโดรไลเซทหลังการย่อยใน GI ความแปรปรวนทั้งหมด 66% สามารถอธิบายได้ด้วย PC1 และ PC2 (รูปที่ 4.38) โดยสามารถแยกกลุ่มของโปรตีนหลังการย่อยใน GI ออกจากกลุ่มของไฮโดรไลเซทหลังการย่อยใน GI ซึ่งโปรตีนหลังการย่อยใน GI มีความสัมพันธ์สูงกับกิจกรรมต้านออกซิเดชัน ONOO<sup>-</sup> scavenging activity ไฮโดรไลเซทที่ย่อย 10 ชั่วโมงหลังผ่านการย่อยใน GI แสดงลักษณะเฉพาะของ TEAC และ CAA (ที่ 0.5 และ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) โปรตีนไฮโดรไลเซทของพลาโนลที่ย่อยโดย Alcalase เป็นเวลา 10 ชั่วโมงจะแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดหลังผ่านการย่อยใน GI

ค่า loadings ของตัวแปรพบว่า PC1 มีความสัมพันธ์ทางบวกกับ TEAC และ CAA (0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI ส่วน PC2 มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับการป้องกันเซลล์ (cytoprotection) (ที่ 0.1 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) แต่มีความสัมพันธ์ทางลบกับกลุ่ม ORAC, FRAP และ  $\alpha$ -amino ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI นอกจากนี้ความสัมพันธ์แบบเพียร์สันแสดงให้เห็นว่า TEAC ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ CAA ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยที่  $r = 0.70$  และ  $0.74$  ตามลำดับ มีข้อเสนอแนะว่า TEAC

สามารถใช้เพื่อทำนายความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI ในทางตรงกันข้าม TEAC ของ ไฮโดรไลเสทแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของเพปไทด์ที่ต่ำกว่ากับ CAA (0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI โดยที่  $r = 0.62$  และ  $0.70$  ตามลำดับ กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระทางเคมีของไฮโดรไลเสทยังแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ที่ต่ำกับ เพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 4.6.3



รูปที่ 4.38 PCA biplots (PC1 versus PC2) ของโปรตีนปลาชนิดและไฮโดรไลเสทหลังการย่อยใน GI ต่อปริมาณ  $\alpha$ -amino group และกิจกรรมต้านออกซิเดชันทางเคมีและระดับเซลล์ การป้องกันเซลล์ (cytoprotection) (ที่ 0.1 และ 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) และกิจกรรมต้านออกซิเดชันในเซลล์ (CAA) (ที่ 0.1, 0.5 และ 5.0 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ดังนั้นจึงสามารถใช้ TEAC ของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยใน GI แสดงความสัมพันธ์สูงสุดกับ CAA เพื่อคัดกรองเพปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาชนิด ปลาชนิดหลังการย่อยใน GI ถูกแบ่งอย่างชัดเจนจากไฮโดรไลเสทหลังการย่อยใน GI มีค่า TEAC และ CAA ต่ำกว่า ไฮโดรไลเสทที่ ย่อย 10 ชั่วโมงหลังผ่านการย่อยใน GI มีความสัมพันธ์กับ TEAC และ CAA สูง ดังนั้นการย่อยด้วย เอนไซม์ที่ใช้เวลานานเกินไป (16 ชั่วโมง) จะผลิตไฮโดรไลเสทที่แสดงศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูง แต่ไม่ได้ผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงหลังผ่านย่อยอาหาร GI เนื่องจากกิจกรรมของการย่อย

อาหาร GI มีความสัมพันธ์กับสุขภาพมากขึ้นควรใช้วิธีการจำลองการย่อยอาหาร GI แบบคงที่ในไฮโดรไลเซตเป็นเกณฑ์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

#### 4.6.5 สรุปผลการวิจัย

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่ผลิตได้จากโปรตีนเอสนำมาศึกษาเป็น standard INFOGEST ในการย่อยในระบบการย่อยอาหารจำลอง GI เพื่อประเมินกิจกรรมที่แท้จริงของการย่อยได้ดีขึ้น กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลเซตไม่ได้สะท้อนถึงกิจกรรมของเพปไทด์หลังการย่อยอาหาร GI นอกจากนี้ไฮโดรไลเซตย่อย 16 ชั่วโมงหลังผ่านการย่อยอาหาร GI มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าไฮโดรไลเซตย่อย 10 ชั่วโมงหลังผ่านการย่อยอาหาร GI ถึงแม้ว่าไฮโดรไลเซตก่อนย่อย GI มีกิจกรรมที่สูงกว่าก็ตาม โปรตีนหลังผ่านการย่อยอาหาร GI แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระน้อยที่สุด ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการย่อยเป็นเวลานานมากเกินไป (16 ชั่วโมง) อาจไม่จำเป็นต้องได้เพปไทด์ที่มีกิจกรรมสูงสุดหลังจากผ่านการย่อย GI ควรพิจารณาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลเซตหลังจากผ่านการย่อย GI เพื่อปรับปรุงการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระให้เหมาะสม

#### 4.7 คุณลักษณะของเพปไทด์จากปลาไหลและการย่อยในระบบทางเดินอาหารจำลองด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ต่อการต้านออกซิเดชันระดับเซลล์

##### 4.7.1 การทำบริสุทธิ์เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

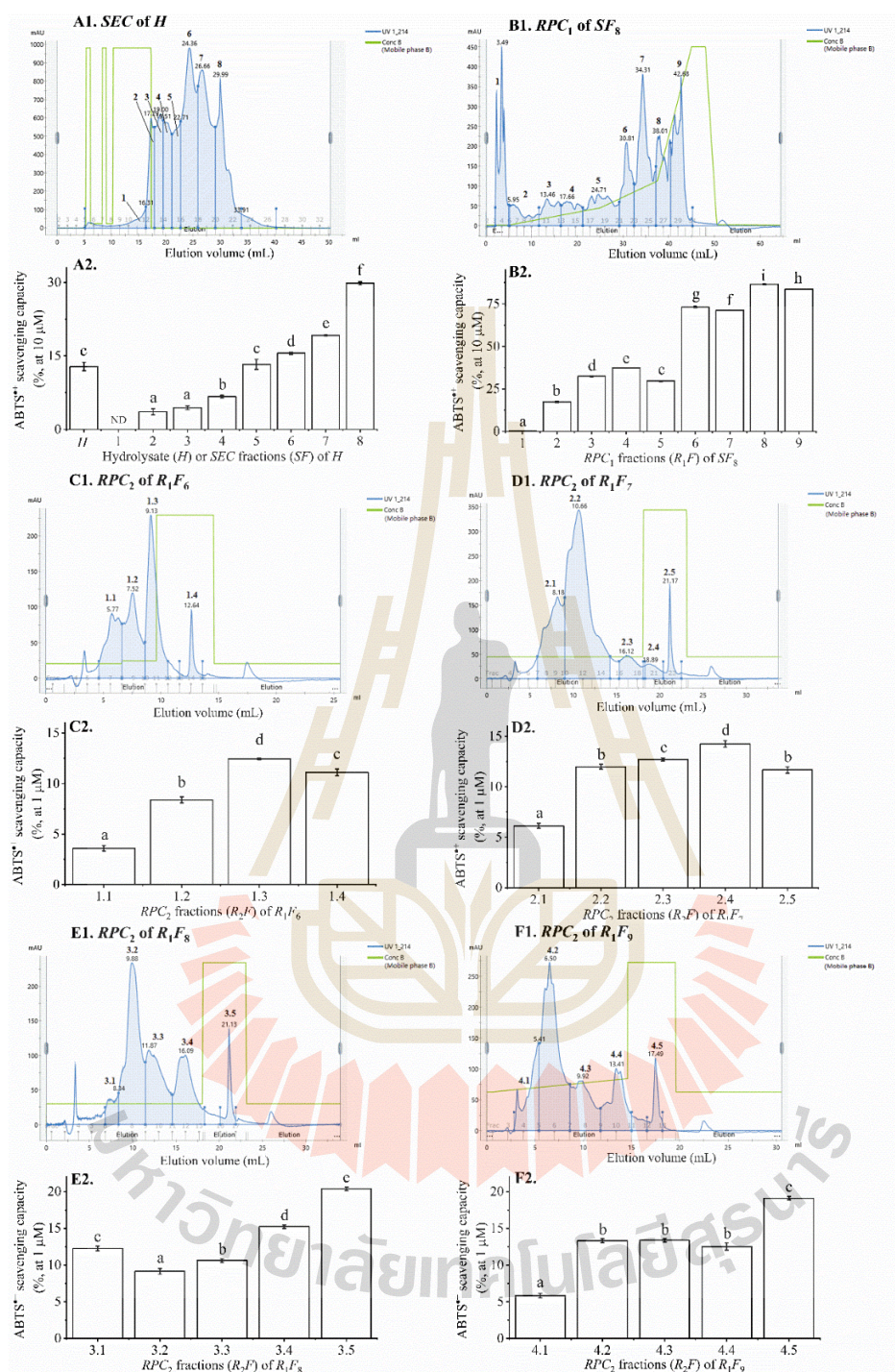
โปรตีนไฮโดรไลเซต (H) ที่มีระดับการย่อย (degree of hydrolysis, DH) 35% ผ่านการย่อยในระบบ GI มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทางเคมีและในเซลล์สูงสุด (Zhang, Noisa & Yongsawatdigul, 2020) เพปไทด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SEC คือ SF1, SF2, SF3, SF4, SF5, SF6, SF7, และ SF8 มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เพิ่มขึ้นตามเวลาในการชะ (elution time) ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.39A1-2) เมื่อใช้โปรแกรมแบบ stepwise gradient (รูปที่ 4.39A1 และตารางที่ 3.1) เพปไทด์ที่แยกออกในภายหลังภายใต้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่มีขั้วน้อยกว่าอาจสันนิษฐานได้ว่าเป็นเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการกั้นน้ำ (hydrophobicity) สูงที่มีขนาดเล็กกลึง จากการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กและเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนในกลุ่ม hydrophobic มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า (Nwachukwu & Aluko, 2019; Nimalaratne, Bandara, & Wu, 2015)

ผลการทดลองเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเสท (H) ที่ไม่ผ่าน SEC พบว่าเพปไทด์ SF8 จาก SEC มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า 2.3 เท่าโดยมีผลผลิตเพปไทด์ประมาณ 12.4% (ตารางที่ 4.32)

**ตารางที่ 4.32** ผลผลิตและกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์ระหว่างไฮโดรไลเสทโปรตีนปลานิล และ การทำบริสุทธิ์โดย SEC และ RPC<sup>1</sup>

| Fractions                                     | Peptide content ( $\mu\text{mol L-Leu}$ ) * | Peptide yield (%) # | Relative activity                |
|---|---|---------------------|----------------------------------|
| <i>H</i>                                      | 187.87 $\pm$ 6.55                           | 100.00 $\pm$ 3.49   | 1.00 $\pm$ 0.07 <sup>†, a</sup>  |
| <i>SF</i> <sub>8</sub>                        | 23.21 $\pm$ 0.98                            | 12.35 $\pm$ 0.52    | 2.32 $\pm$ 0.02 <sup>†, b</sup>  |
| <i>R</i> <sub>1</sub> <i>F</i> <sub>6</sub>   | 0.74 $\pm$ 0.028                            | 0.40 $\pm$ 0.015    | 5.69 $\pm$ 0.03 <sup>†, d</sup>  |
| <i>R</i> <sub>1</sub> <i>F</i> <sub>7</sub>   | 0.68 $\pm$ 0.012                            | 0.36 $\pm$ 0.007    | 5.55 $\pm$ 0.01 <sup>†, d</sup>  |
| <i>R</i> <sub>1</sub> <i>F</i> <sub>8</sub>   | 0.74 $\pm$ 0.005                            | 0.40 $\pm$ 0.002    | 6.73 $\pm$ 0.01 <sup>†, ef</sup> |
| <i>R</i> <sub>1</sub> <i>F</i> <sub>9</sub>   | 1.43 $\pm$ 0.052                            | 0.76 $\pm$ 0.027    | 6.51 $\pm$ 0.01 <sup>†, e</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>1.1</sub> | 0.24 $\pm$ 0.020                            | 0.13 $\pm$ 0.010    | 2.80 $\pm$ 0.21 <sup>†, b</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>1.2</sub> | 0.24 $\pm$ 0.011                            | 0.13 $\pm$ 0.006    | 6.52 $\pm$ 0.24 <sup>†, e</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>1.3</sub> | 0.18 $\pm$ 0.001                            | 0.01 $\pm$ 0.001    | 9.68 $\pm$ 0.07 <sup>†, j</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>1.4</sub> | 0.01 $\pm$ 0.000                            | 0.01 $\pm$ 0.000    | 8.64 $\pm$ 0.25 <sup>†, gh</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2.1</sub> | 0.22 $\pm$ 0.006                            | 0.12 $\pm$ 0.003    | 4.76 $\pm$ 0.18 <sup>†, c</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2.2</sub> | 0.29 $\pm$ 0.001                            | 0.16 $\pm$ 0.001    | 9.32 $\pm$ 0.18 <sup>†, ij</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2.3</sub> | 0.04 $\pm$ 0.003                            | 0.02 $\pm$ 0.002    | 9.88 $\pm$ 0.12 <sup>†, jk</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2.4</sub> | 0.01 $\pm$ 0.000                            | 0.004 $\pm$ 0.000   | 11.08 $\pm$ 0.24 <sup>†, l</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2.5</sub> | 0.01 $\pm$ 0.001                            | 0.004 $\pm$ 0.000   | 9.08 $\pm$ 0.25 <sup>†, hi</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3.1</sub> | 0.04 $\pm$ 0.003                            | 0.02 $\pm$ 0.002    | 9.54 $\pm$ 0.24 <sup>†, ij</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3.2</sub> | 0.50 $\pm$ 0.003                            | 0.27 $\pm$ 0.002    | 7.11 $\pm$ 0.30 <sup>†, f</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3.3</sub> | 0.14 $\pm$ 0.009                            | 0.08 $\pm$ 0.005    | 8.27 $\pm$ 0.18 <sup>†, g</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3.4</sub> | 0.06 $\pm$ 0.004                            | 0.03 $\pm$ 0.002    | 11.86 $\pm$ 0.18 <sup>†, m</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3.5</sub> | 0.01 $\pm$ 0.002                            | 0.01 $\pm$ 0.001    | 15.85 $\pm$ 0.18 <sup>†, o</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4.1</sub> | 0.28 $\pm$ 0.014                            | 0.15 $\pm$ 0.007    | 4.55 $\pm$ 0.25 <sup>†, c</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4.2</sub> | 0.58 $\pm$ 0.009                            | 0.31 $\pm$ 0.005    | 10.38 $\pm$ 0.21 <sup>†, k</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4.3</sub> | 0.21 $\pm$ 0.017                            | 0.11 $\pm$ 0.009    | 10.42 $\pm$ 0.18 <sup>†, k</sup> |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4.4</sub> | 0.08 $\pm$ 0.014                            | 0.05 $\pm$ 0.007    | 9.74 $\pm$ 0.39 <sup>†, j</sup>  |
| <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4.5</sub> | 0.01 $\pm$ 0.003                            | 0.004 $\pm$ 0.002   | 14.85 $\pm$ 0.18 <sup>†, n</sup> |

<sup>1</sup> For fractions possessing relatively high ABTS<sup>•+</sup> scavenging capacity. SEC, size exclusion chromatography; RPC, reversed-phase chromatography; *H*, original hydrolysate. \* Peptide content ( $\mu\text{mol L-Leu}$ ) was calculated back based on 1 mL original hydrolysate. # Yields were calculated, based on the peptide content relative to *H*. <sup>†</sup> and <sup>‡</sup> Relative activities were calculated relative to activity of *H* at 1 and 10  $\mu\text{M}$ , respectively. <sup>a-o</sup> The different lowercase letters indicated the differences in the mean values ( $p < 0.05$ ).



รูปที่ 4.39 โครมาโตแกรมของโปรตีนไฮโดรไลสของปลาชนิดโดย SEC (A1), RPC (B1, และ C1, D1, E1 และ F1) และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> จาก SEC (A2) และ RPC (B2 และ C2, D2, E2 และ F2) อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกิจกรรมต้านอนุมูล

อิสระ ABTS<sup>•+</sup> ( $p < 0.05$ ) SEC คือ size exclusion chromatography; RPC คือ reversed-phase chromatography

เพปไทด์ SF8 ได้รับเลือกสำหรับการทำให้บริสุทธิ์ RPC โดยใช้โปรแกรมการชะแบบ gradient (รูปที่ 4.39B1 และตารางที่ 3.1) พบว่าเพปไทด์ R1F1 ที่มีขั้วมากที่สุดมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เล็กน้อย (รูปที่ 4.39B1-2) กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามการลดขั้วของเพปไทด์ที่และเพปไทด์ที่มีขั้วน้อยกว่า (R1F6, R1F7, R1F8 และ R1F9) ซึ่งมีกิจกรรมที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซส (H) ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 5.6 - 6.7 เท่า ( $p < 0.05$  ตารางที่ 4.32) ผลบ่งชี้ให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากปลาไนล์มีแนวโน้มที่จะมีโมเลกุลที่มีขั้วน้อยกว่า

เพปไทด์ R1F6, R1F7, R1F8 และ R1F9 ทำบริสุทธิ์ด้วย RPC (รอบที่สอง) พบว่ามีแนวโน้มเช่นเดียวกันโดยเพปไทด์ที่มีขั้วน้อยกว่าจะมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงกว่า (รูปที่ 4.39C-F และตารางที่ 3.1) มีรายงานแนวโน้มที่คล้ายกันนี้โดยนักวิจัยท่านอื่น ๆ (Sangtitanu, Sangtanoo, Srimongkol, Saisavoey, Reamtong, & Karnchanatat, 2020; Wen, Zhang, Feng, Duan, Ma, & Zhang, 2020) มีรายงานว่าเพปไทด์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะมีกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วหรือไม่มีประจุเช่น C, Y, W, M, P และ H (Nimalaratne, Bandara, & Wu, 2015; Nwachukwu & Aluko, 2019; Samaranayaka & Li-Chan, 2011)

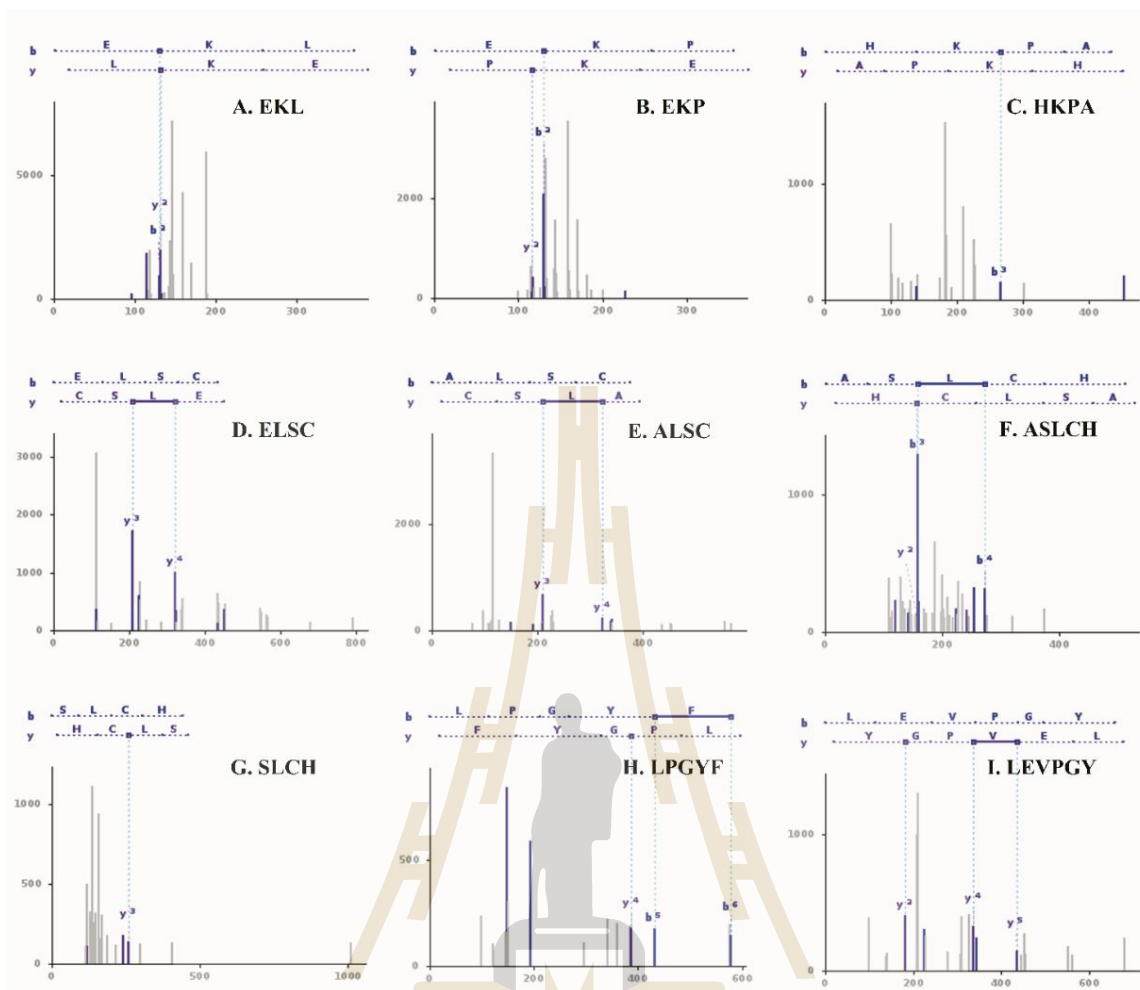
กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ (ตารางที่ 4.32) เพปไทด์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ได้แก่ R2F3.5 และ R2F4.5 มีกิจกรรมที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซส (H) ที่ไม่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ 15.9 และ 14.9 เท่าตามลำดับ โดยคัดเลือก 16 เพปไทด์ คือ R2F1.2-1.4, R2F2.2-2.5, R2F3.1-3.5 และ R2F4.2-4.5 ซึ่งมีกิจกรรมที่ค่อนข้างสูงสำหรับวิเคราะห์การระบุเพปไทด์ในลำดับถัดไป

#### 4.7.2. การระบุเพปไทด์และการจำลองการย่อยด้วยคอมพิวเตอร์ (*in silico* GI digestion)

เพปไทด์ทั้งหมด 9 ตัวจากโปรตีนไฮโดรไลเซสของปลาไนล์ (รูปที่ 4.40) มีกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่น K, P, H, C หรือ Y (Nimalaratne, Bandara, & Wu, 2015; Nwachukwu & Aluko, 2019; Samaranayaka & Li-Chan, 2011) ซึ่งเพปไทด์เหล่านี้ได้มาจากโปรตีนของปลาไนล์ รวมถึงไมโอซิน (myosin) แอกตินที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน (actin-related proteins) คอลลาเจน โปรตีนที่มีสังกะสี (zinc finger protein) เพล็กซ์ซิน (plexin) และ เอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) (ตารางที่ 4.33) โดยเพปไทด์ทั้งหมดเป็นเพปไทด์ตัวใหม่ที่ได้จากงานวิจัยนี้ จากจำลองการย่อยอาหารด้วยคอมพิวเตอร์



(*in silico* GI digestion) พบว่าเปปไทด์ทั้งหมดยกเว้น EKP ถูกย่อย โดยจากเปปไทด์เริ่มต้น 8 เปปไทด์ ผ่านการย่อยใน *in silico* GI จะได้ผลิตภัณฑ์หลังการย่อย 7 เปปไทด์ (ตารางที่ 4.33) ซึ่งเปปไทด์ที่ผ่านการย่อย *in silico* GI จะมีขนาดเล็กแบบ di-/tripeptides ทั้งหมดยกเว้น EVPGY โดย Escudero, Mora, & Toldrá (2014) รายงานว่า pentapeptides ได้แก่ IAGRP และ PTPVP สามารถต้านทานต่อการย่อย GI ในหลอดทดลอง (*in vitro*) เปปไทด์ขนาดเล็กเช่น HL, IY, TY, PW, YPQ, PHL, VPW, PIKK, SGGY และ AHSVGP ได้รับการระบุจากการย่อยโปรตีนหรือไฮโดรไลเซสในหลอดทดลอง (*in vitro* GI) หรือในสัตว์ (*ex vivo* GI) (Borawska, Darewicz, Pliszka, & Vegarud, 2016; Feng, Peng, Wang, Li, Lei, & Xu, 2019; Ren, Liang, Zhang, Hou, Li, & Ma, 2018) ส่วน AS เป็น dipeptide ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพต่ำที่สุด มีรายงานกรดอะมิโน A และ S ว่ามีศักยภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระน้อยกว่า (Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016) เปปไทด์ทั้งหมด 15 เปปไทด์ซึ่งรวมถึงเปปไทด์ที่ใช้เริ่มต้นก่อนย่อย 9 ตัว และเปปไทด์หลังย่อย 6 ตัวจะถูกสังเคราะห์ในลำดับถัดไป โดยเปปไทด์เหล่านี้แบ่งออกเป็นสามกลุ่มคือ 1) เปปไทด์ที่ประกอบด้วย K, EKL, EK, EKP, HKPA และ KPA, 2) เปปไทด์ที่มี C, ELSC, ALSC, SC, ASLCH, SLCH และ CH และ 3) เปปไทด์ที่มี Y, LPGYF, PGY, LEVPGY และ EVPGY



รูปที่ 4.40 สเปกตรัม MS/MS จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ด้วยวิธี *de novo* sequencing โดย EKL (A), EKP (B), HKPA (C), ELSC (D), ALSC (E), ASLCH (F), SLCH (G), LPGYF (H) และ LEVPGY (I)

ตารางที่ 4.33 ส่วนของเพปไทด์ (fraction) แหล่งโปรตีนของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเพปไทด์การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยคอมพิวเตอร์ (*in silico* GI digestion)<sup>1</sup>

| No. | Source<br>( fraction, MS<br>compound)  | Parent<br>peptides | <i>In silico</i> GI<br>digestion * | Target<br>peptides  | Protein<br>database | Accession sequence ID<br>(sequence range)                                     | Homologous protein  | Previously reported bioactive peptides<br>(from BIOPEP peptide database)                 |   |  |                  |
|-----|--|--------------------|------------------------------------|---|---------------------|---|---|--|---|--|------------------|
|     |  |                    |                                    |   |                     |   |   | Antioxidative  | ACE<br>inhibitor  | DPP-IV<br>inhibitor                                | PEP<br>inhibitor |
| 1   | <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>3,3</sub> , Cmpd 24  | EKL                | EK-L                               |   | UniProtKB           | I3KR57( 478- 480, 907-909)<br>I3K775(402-404)<br>I3J6R8(1720-1722, 1773-1775) | Myosin Via<br>Myosin IHa<br>Zinc finger protein 292a  |  | EK, LEK,<br>EKGP, IIAEK,<br>KL, LKLP, KP,                                       |  |                  |
| 2   | <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2,3</sub> , Cmpd 9   | EKP                | EKP                                | K-<br><b>containing peptides:</b><br>EKL, EK, EKP,<br>HKPA, KPA | UniProtKB           | I3KVR4(537-539)<br>I3J596(178-180)<br>I3KFA1(204-207),<br>I3K7A1(412-415)     | Myosin phosphatase Rho interacting protein<br>Actin- related protein 2/ 3 complex subunit<br>Zinc finger, MYM-type 2,<br>Zinc finger and BTB domain containing 12, tandem duplicate 1 | YAKPA and YAKP;<br>HK <sup>2</sup> ;<br>KS, KA, AKG, TKA,<br>VK, MK and IKG <sup>3</sup> | IKP, GKP,<br>LKP, MKP, EK, KP,<br>VIKP, YAKP,<br>YAKPA,<br>VLKP, VKP,<br>KPVAAP |  | KPPI,<br>KPPV    |
| 4   | <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2, 3</sub> , Cmpd 36, 41, 45,<br><i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>2,4</sub> , Cmpd 34 | ELSC               | E-L-SC                             | C-<br><b>containing peptides:</b><br>ELSC, ALSC,                | UniProtKB           | I3JST4(10211024, 1472-1475)<br>I3K427(528-531)                                | Obscurin, cytoskeletal calmodulin and titin- interacting RhoGEF<br>Tyrosine-protein kinase  | EL, ELLI, ISELGW,<br>GFGPEL, ALSAF,<br>VCSV and<br>CSQAPLA;                              |   | AL,<br>AEL, VIPEL, ALAV,<br>FAL, ALEP ALP,<br>RALP |                  |
| 5   | <i>R</i> <sub>2</sub> <i>F</i> <sub>4,2</sub> , Cmpd 13  | ALSC               | A-L-SC                             | SC  | UniProtKB           | I3JJE4(1358-1361)   | Zinc finger, SWIM- type containing 8  | CS <sup>2</sup>  |   |  |                  |

|   |                        |        |         |  | I3J8Q3(708-711) | Aminopeptidase  |   |  |  |       |                                      |                               |  |
|---|------------------------|--------|---------|--|-----------------|---|---|--|--|-------|--------------------------------------|-------------------------------|--|
| 6 | $R_2F_{1,2}$ , Cmpd 28 | ASLCH  | AS-L-CH | C-<br>containing<br>peptides:<br>ASLCH,      | NCBI<br>Blastp  | XP_019222017. 2( 116-120)<br>XP_019211841. 1( 249-253)<br>XP_025763933. 1( 434-437)     | zinc finger protein 318<br>RING finger protein 145 isoform X1<br>zinc finger protein 638      | CHI;<br>CG, CQ, CE, GC ASL<br>and PC <sup>2</sup>  |  |       |                                      | AS, SL                        |  |
| 7 | $R_2F_{1,3}$ , Cmpd 10 | SLCH   | S-L-CH  | SLCH, CH                                     |                 | XP_013129112.2(37-40)   | collagen alpha-5(IV) chain  |  |  |       |                                      |                               |  |
| 8 | $R_2F_{4,4}$ , Cmpd 39 | LPGYF  | L-PGY-F | Y-<br>containing<br>peptides:<br>LPGYF, PGY, | NCBI<br>Blastp  | XP_003450194. 1( 182-186)<br>XP_005451705. 1( 1393-1398)<br>XP_003445054. 1( 1354-1359) | mitochondrial ornithine transporter 1 isoform<br>plexin-A4 isoform X1<br>plexin-A4 isoform X2 | YG <sup>2</sup> ;<br>GY <sup>4</sup> ;<br>TY and SGGY <sup>5</sup> ;<br>YGS <sup>6</sup> ;<br>YPG <sup>7</sup> ; |  |       | PGL, LPG, GPAG,<br>PG, IAPG, APG, PG | PPG,<br>LAPPG,<br>GPAG,<br>PG |  |
| 9 | $R_2F_{4,3}$ , Cmpd 6  | LEVPGY | L-EVPGY | LEVPGY,<br>EVPGY                             | NCBI<br>Blastp  | XP_005449468. 1( 512-517)   | lon protease homolog 2, peroxisomal   | YGP <sup>8</sup> ;<br>GFGPGL and<br>GPGGFI   |  | KVLPG | PPG,<br>GPGE, PG                     |                               |  |

<sup>1</sup> Excepted for the peptides was noted by the references, the previously reported near antioxidant, angiotensin I-converting enzyme (ACE), dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV), and prolyl endopeptidase (PEP) inhibitory peptide sequences, which were searched by BIOPEP database on June 6<sup>th</sup>, 2019.

<sup>2</sup>Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao (2016) <sup>3</sup>Yang, Zhang, Ding, Chi, Wang, & Huo (2019)

<sup>4</sup>Liang et al. (2020) <sup>5</sup>Feng, Peng, Wang, Li, Lei, & Xu (2019) <sup>6</sup>Zheng, Su, Ren, Gu, You, & Zhao (2012)

<sup>7</sup>Ren, Liang, Zhang, Hou, Li, & Ma (2018) <sup>8</sup>Ohata, Uchida, Zhou, & Arihara (2016)

\* the '-' among the peptide sequences indicated the cleavable sites upon in silico GI digestion.

#### 4.7.3. กิจกรรมต้านออกซิเดชันของเพปไทด์

##### 4.7.3.1. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup>

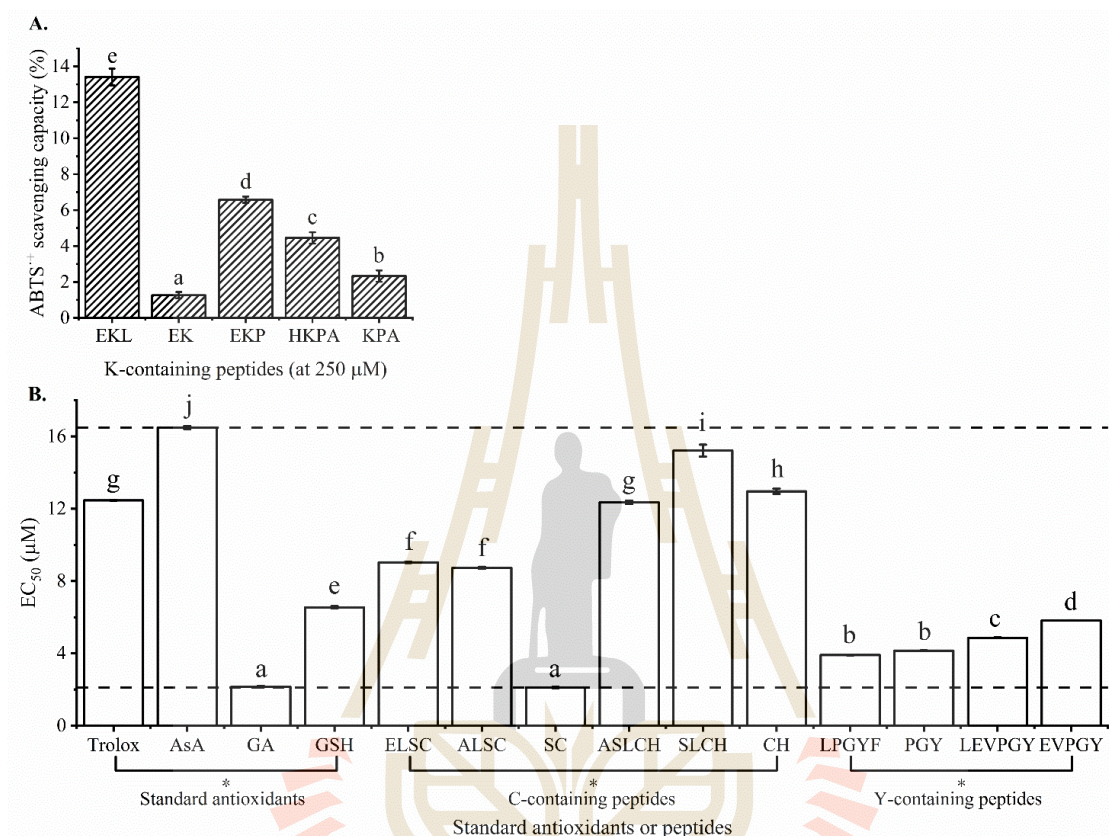
เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน K มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C- และ Y (รูปที่ 4.41A-B) โดยค่า EC<sub>50</sub> ของเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C- และ Y อยู่ในช่วง 2 ถึง 17 ไมโครโมลาร์ ซึ่งมีศักยภาพมากกว่ากรดแอสคอร์บิก ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.41B) นอกจากนี้ยังสามารถเทียบเคียงกับสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ เช่น Trolox, glutathione (GSH) หรือ กรดแกลลิก (gallic acid) รายงานก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน Y หรือ C, YG, YS, YQ, CG, CS, CQ และ PC มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ในช่วง 0.50 - 5.00  $\mu\text{mol}$  Trolox เทียบเท่า/  $\mu\text{mol}$  ของเพปไทด์ (Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016) เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C และ Y, VECYGPNRPFQF ยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> สูงด้วย EC<sub>50</sub> ที่  $9.8 \pm 0.5$  ไมโครโมลาร์ (Sheih, Wu, & Fang, 2009) อย่างไรก็ตามเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K ได้แก่ HK, VELLVPK AGNQVLNLQADLPK, SVPQPK และ EVPKA ไม่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> (Hernández-Ledesma, Quirós, Amigo, & Recio, 2007; Wiryaphan, Chitsomboon, Roytrakul, & Yongsawadigul, 2013; Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016) ค่า EC<sub>50</sub> ของเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K อื่น ๆ รวมทั้ง KS, KA, AKG, TKA, VK, MK และ IKG อยู่ในช่วง 1 ถึง 30 มิลลิโมลาร์ (Yang, Zhang, Ding, Chi, Wang, & Huo, 2019) ดังนั้นเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C หรือ Y จึงมีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> มากกว่าเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K

นอกจากนี้เพปไทด์ EKL, HKPA, LEVPGY และ ASLCH มีแนวโน้มที่จะถูกย่อยภายใต้การจำลองการย่อยในกระเพาะอาหารด้วยคอมพิวเตอร์ (*in silico* GI digestion) (ตารางที่ 4.33) และเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์น้อยกว่าจะได้ผลิตภัณฑ์ดังนี้ EK, KPA, EVPGY และ CH (รูปที่ 4.47A-B,  $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตามกิจกรรมของ LPGYF เทียบได้กับ PGY ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลังการย่อย *in silico* GI ( $p > 0.05$ ) เพปไทด์ ELSC, ALSC และ SLCH ถูกย่อยให้เป็น SC และ CH ตามลำดับ ซึ่งมีกิจกรรมที่สูงกว่าเพปไทด์ตัวเริ่มต้น ( $p < 0.05$ ) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ปลานิลแสดงรูปแบบต่างๆหลังจากการย่อย *in silico* GI เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อกรดอะมิโน L, P, H, F, A, V, S หรือ E ถูกแยกออกจาก C- หรือ N-terminus ของเพปไทด์ตัวเริ่มต้น กิจกรรมของเพปไทด์หลังย่อย *in silico* GI ไม่ได้เปลี่ยนแปลงมาก ส่วนเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K หลังย่อย *in silico* GI (EK และ KPA) มีความสามารถความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> น้อยกว่า 4% ที่ 250 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.41A) เพปไทด์หลังย่อย *in*

*silico* GI ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน C- และ Y ได้แก่ SC, CH, PGY และ EVPGY ยังคงมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงที่ค่า  $EC_{50}$  น้อยกว่า 14 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.41B) Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao (2016) รายงานว่ากรดอะมิโนอิสระ ได้แก่ Y และ C พบว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ  $ABTS^{+}$  เป็น 1 - 6  $\mu\text{mol Trolox}$  เทียบเท่า/  $\mu\text{mol}$  ของกรดอะมิโน ส่วน dipeptides ที่มี Y และ C ยังแสดงกิจกรรมที่โดดเด่นตั้งแต่ 0.5 - 5  $\mu\text{mol Trolox}$  เทียบเท่า/  $\mu\text{mol}$  ของเพปไทด์ ในขณะที่ dipeptides ที่มี H-, P- และ/หรือ K ยังคงแสดงให้เห็นกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่ต่ำ Yang, Cai, Yan, Tian, Du, & Wan (2020) ยืนยันว่ากรดอะมิโน Y ใน tetrapeptide ได้แก่ ATVY มีส่วนสำคัญต่อการต้านอนุมูลอิสระ  $ABTS^{+}$  ผลการวิจัยเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าความต้องการของความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระที่สูงของเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่น C และ Y ดังนั้นโปรตีนจากอาหารที่อุดมไปด้วยกรดอะมิโน C และ Y อาจเป็นแหล่งสำคัญสำหรับเพปไทด์ที่มีสารต้านอนุมูลอิสระสูง

ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ  $ABTS^{+}$  ของเพปไทด์ EKP สูงกว่า KPA 2 เท่า (รูปที่ 4.41A) อาจเป็นเพราะกรดอะมิโน E ซึ่งสามารถบริจาคอิเล็กตรอนได้ง่าย (Nwachukwu & Aluko, 2019) กรดอะมิโน H ได้รับการยกย่องว่าเป็นเครื่องกำจัดอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพเนื่องจากแหวน imidazole สามารถมีส่วนร่วมในอะตอมของไฮโดรเจนหรือการถ่ายเทอิเล็กตรอน (hydrogen atom transport, HAT / electron transport, ET) (Nwachukwu & Aluko, 2019) อย่างไรก็ตามกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ CH ต่ำกว่า SC ประมาณ 5 เท่า (รูปที่ 4.41B) มีรายงานว่าการสร้างพันธะไฮโดรเจน imidazole-imidazole ระหว่างโซ่ด้านข้างทั้งสองของกรดอะมิโน H ที่ pH 7.8 (Movellan, Wegstroth, Overkamp, Leonov, Becker, & Andreas, 2020) ภายใต้การทดสอบที่ pH 7.4 ของวิธีกำจัดอนุมูลอิสระด้วย  $ABTS^{+}$  assay โซ่ด้านข้างของ imidazole จะถูกโปรตอนบางส่วน ดังนั้นจึงสามารถสันนิษฐานการก่อตัวของพันธะไฮโดรเจนภายในโมเลกุลที่แข็งแกร่งระหว่างวงแหวน imidazole กับกลุ่มซัลไฟด์ (SH) ของกรดอะมิโน C ซึ่งส่งผลให้ความสามารถในการให้อะตอมของไฮโดรเจนต่ำ เมื่อเพปไทด์ CH ที่มีกรดอะมิโน A, S หรือ/และ L อยู่ที่ N-terminus ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ  $ABTS^{+}$  ลดลง 20% ของ CH (รูปที่ 4.41B) ส่วนเพปไทด์ PGY ที่มีกรดอะมิโน L, F, E และ/หรือ V อยู่ที่ N-terminus จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการเพิ่มกรดอะมิโน P หรือ L ลงใน C-terminus ของเพปไทด์ EK จะเพิ่มขึ้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ  $ABTS^{+}$  ในระดับหนึ่ง (รูปที่ 4.41A) การเพิ่ม EL หรือ AL เข้ากับ N-terminus ของเพปไทด์ SC ทำให้กิจกรรมลดลงประมาณ 3 เท่า (รูปที่ 4.41B) กิจกรรมของเพปไทด์

SC และ K มีความแตกต่างกันโดยมีกรดอะมิโนที่ N-terminus ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการมีกรดอะมิโน A, L, P, F และ H ในเพปไทด์ไม่จำเป็นต้องมีส่วนช่วยให้เกิดการถ่ายเทอิเล็กตรอน (electron transport, ET) มีความสามารถสูงตามที่ยรายงานโดยทั่วไป (Nwachukwu & Aluko, 2019)



**รูปที่ 4.41** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของเพปไทด์สังเคราะห์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน K ที่ 250 ไมโครโมลาร์ (A) EC<sub>50</sub> ของสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (Trolox, AsA, GA, GSH), เพปไทด์สังเคราะห์ที่มีกรดอะมิโน C- และ Y (B) ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>+</sup> ของเพปไทด์สังเคราะห์หรือสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน (p < 0.05) AsA คือกรดแอสคอร์บิก GA คือกรดแกลลิก และ GSH คือกลูตาไธโอน

#### 4.7.3.2 การกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ในระดับเซลล์

เพปไทด์ทั้งหมดปลดสารพิษที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 ไมโครโมลาร์ เพปไทด์ทั้งหมดที่ทดสอบที่ 10 ไมโครโมลาร์ พบว่าเพปไทด์ LPGYF มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์สูงสุด (p < 0.05) ในขณะที่เพปไทด์ SLCH มีค่าต่ำสุด (p < 0.05, รูปที่ 4.42) อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C- และ Y ไม่ต่างกัน (p > 0.05) แต่มีกิจกรรมสูงกว่าเพปไทด์ที่มี

กรดอะมิโน K เล็กน้อย ( $p < 0.05$ ) เพปไทด์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ในเซลล์เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น ( $p < 0.05$ ) และเพิ่มกิจกรรมจนถึงที่ความเข้มข้นมากกว่า 50 ไมโครโมลาร์ (รูปที่ 4.42) เพปไทด์ SC, CH, LPGYF และ PGY ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์แสดงกิจกรรมที่สูงกว่ากรดแอสคอร์บิก 50 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่เพปไทด์อื่น ๆ แสดงฤทธิ์ที่เทียบเคียงได้ ยกเว้น EKL ที่แสดงกิจกรรมที่ต่ำกว่า ( $p < 0.05$ ) ดังนั้นเพปไทด์ SC, CH และ PGY ซึ่งได้มาจากการย่อยอาหารจำลอง *in silico* GI โดยมีเพปไทด์เริ่มต้นคือ LPGYF จึงเป็นเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระซึ่งช่วยลดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่มากเกินไปได้มีประสิทธิภาพ

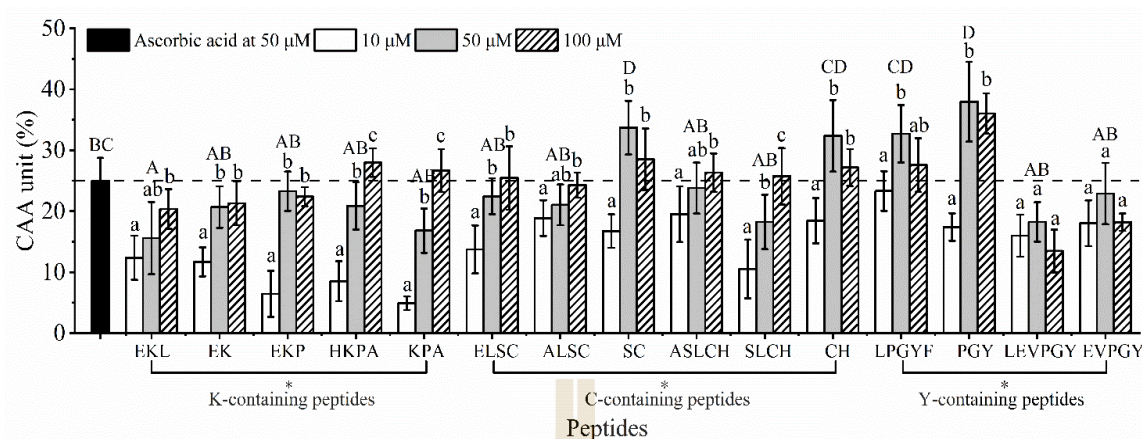
ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเพปไทด์มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ไม่จำเป็นต้องมีความสัมพันธ์กับการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ทางเคมี (รูปที่ 4.41 และรูปที่ 4.42) เนื่องจากกลไกที่แตกต่างกันในการวิเคราะห์ในแต่ละวิธี ซึ่งวิธีการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เป็นการตรวจสอบปฏิกิริยาของเพปไทด์ที่มีต่อ ABTS<sup>•+</sup> โดย HAT และ/หรือ ET (ApakÖzyürek, Güçlü, & Çapanoğlu, 2016) ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ของเพปไทด์ ALSC, ELSC, SC, LPGYF และ PGY มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ (รูปที่ 4.41B และรูปที่ 4.42) ความสัมพันธ์เชิงบวกนี้ได้รับการสังเกตในเพปไทด์อื่น ๆ เช่น NTPPAKSCQAQPTTM, FLKKISQRYQKF, ALPQYLKTVYQHQB และ IQPKTKVIPYVRYL (Tonolo et al., 2020) ในทางตรงกันข้ามเพปไทด์ LEVPGY และ EVPGY ที่มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ที่ดีเยี่ยม แต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ต่ำ (รูปที่ 4.41 และรูปที่ 4.42) นอกจากนี้เพปไทด์ GLVYIL และ YHNAPGLVYIL ยังแสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระทางเคมีที่สูงกว่า FNDRLRQGQLL และ DVNNANQLEPR แต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016)

นอกจากนี้เพปไทด์ CH ที่ผ่านการย่อยแล้วใน *in silico* GI แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่สูงกว่า ASLCH และ SLCH (เพปไทด์เริ่มต้นก่อนย่อย *in silico* GI) ถึงแม้จะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระทางเคมีในระดับปานกลาง (รูปที่ 4.41B และรูปที่ 4.42) เพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่าสามารถแทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีกว่า (Fernández-Musoles, Salom, Castelló-Ruiz, Contreras, Recio, & Manzanares, 2013; Wang, Ding, Xue, Ma, Du, Zhang, & Liu, 2018; Wang & Li, 2017) ซึ่งมีส่วนทำให้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์สูง อย่างไรก็ตามเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่กว่าเช่น DVNNANQLEPR แสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่คล้ายกันกับเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่าเช่น GLVYIL (Du,



Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016) ดังนั้นขนาดของเพปไทด์จึงไม่ได้เป็นปัจจัยเดียวที่ควบคุมความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์

องค์ประกอบของกรดอะมิโนจะส่งผลต่ออัตราการดูดซึมของเพปไทด์ในเซลล์อย่างมีนัยสำคัญตามแบบจำลองการขนส่งเซลล์เดี่ยวของ Caco2 ค่าสัมประสิทธิ์การซึมผ่านที่ชัดเจน (apparent permeability coefficient,  $P_{app}$ ) ของเพปไทด์ GLLPH คือ 2 เท่าของ YFCLT (Ding, Wang, Zhang, Yu, & Liu, 2018) เพปไทด์ RVPSL แสดงค่า  $P_{app}$  สูงกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่ามากเช่น WQ, RWQ, LKP และ IQW (Ding, Wang, Zhang, & Liu, 2015; Fernández-Musoles, Salom, Castelló-Ruiz, Contreras, Recio, & Manzanares, 2013; Xu, Fan, Yu, Hong, & Wu, 2014) นอกจากนี้เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C, Y หรือ W ดูเหมือนจะมีอัตราการดูดซึมต่ำกว่า (Ding, Wang, Zhang, & Liu, 2015; Ding, Wang, Zhang, Yu, & Liu, 2018; Ding, Zhang, Jiang, Wang, Liu, & Liu, 2014; Fernández-Musoles, Salom, Castelló-Ruiz, Contreras, Recio, & Manzanares, 2013; Xu, Fan, Yu, Hong, & Wu, 2017) เพปไทด์ได้แก่ DKTEIPTINTIASGEPT, EKDDTGTPITKIELVPSH QGPIVLNPWDQVQR, FNDRLRQGQLL, DVNNNANQLEPR และ RDPEER (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016; Tonolo et al., 2020; Wen, Zhang, Feng, Duan, Ma, & Zhang, 2020) ไม่มีกรดอะมิโนที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่น C, Y หรือ W (Zheng, Zhao, Dong, Su, & Zhao, 2016) มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระทางเคมีต่ำ แต่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ดี ซึ่งเป็นแนวโน้มที่คล้ายคลึงกับเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K ที่พบในการศึกษา นี้ อาจเป็นผลมาจากอัตราการดูดซึมของเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน K สูง ดังนั้นอัตราการดูดซึมเพปไทด์ในเซลล์เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ส่งผลต่อความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์



**รูปที่ 4.42** ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ (unit CAA) ของกรดแอสคอร์บิก และเปปไทด์สังเคราะห์ อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างในค่าเฉลี่ยของ CAA ของเปปไทด์แต่ละตัวที่ 10, 50, และ 100 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ ) อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ CAA ระหว่างกรดแอสคอร์บิกและเปปไทด์ทั้งหมดที่ 50 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ ) CAA คือฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระระดับเซลล์

นอกจากนี้ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ของเปปไทด์อาจแตกต่างกันไปตามกรดอะมิโนที่เทอร์มินัล โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) (Wong, Xiao, Wang, Ee, & Chai, 2020) การเกิดเมตาบอลิซึม (metabolism) ของเปปไทด์ในเซลล์ (Wong, Xiao, Wang, Ee, & Chai, 2020; Xu, Wang, Ju, Zhang, Yin, Shi, He, & Yuan, 2017) การกระจายของเปปไทด์ในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) หรือไมโทคอนเดรีย (mitochondria) (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018) และการแพร่กระจายของ ROS ภายในเซลล์ที่สร้างขึ้น (Parvez, Long, Poganik, & Aye, 2018) เปปไทด์ค้นพบใหม่ทั้งหมดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากโปรตีนไฮโดรไลเสทของปลาและเปปไทด์ที่เกิดขึ้นหลังการย่อยอาหารจำลอง *in silico* GI มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่มีประสิทธิภาพโดยไม่สัมพันธ์กับการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> เปปไทด์ SC CH และ PGY เกิดขึ้นหลังการย่อยอาหารจำลอง *in silico* GI มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์สูงสุดและมีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ที่ดีเยี่ยม

#### 4.7.4. การควบคุมการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

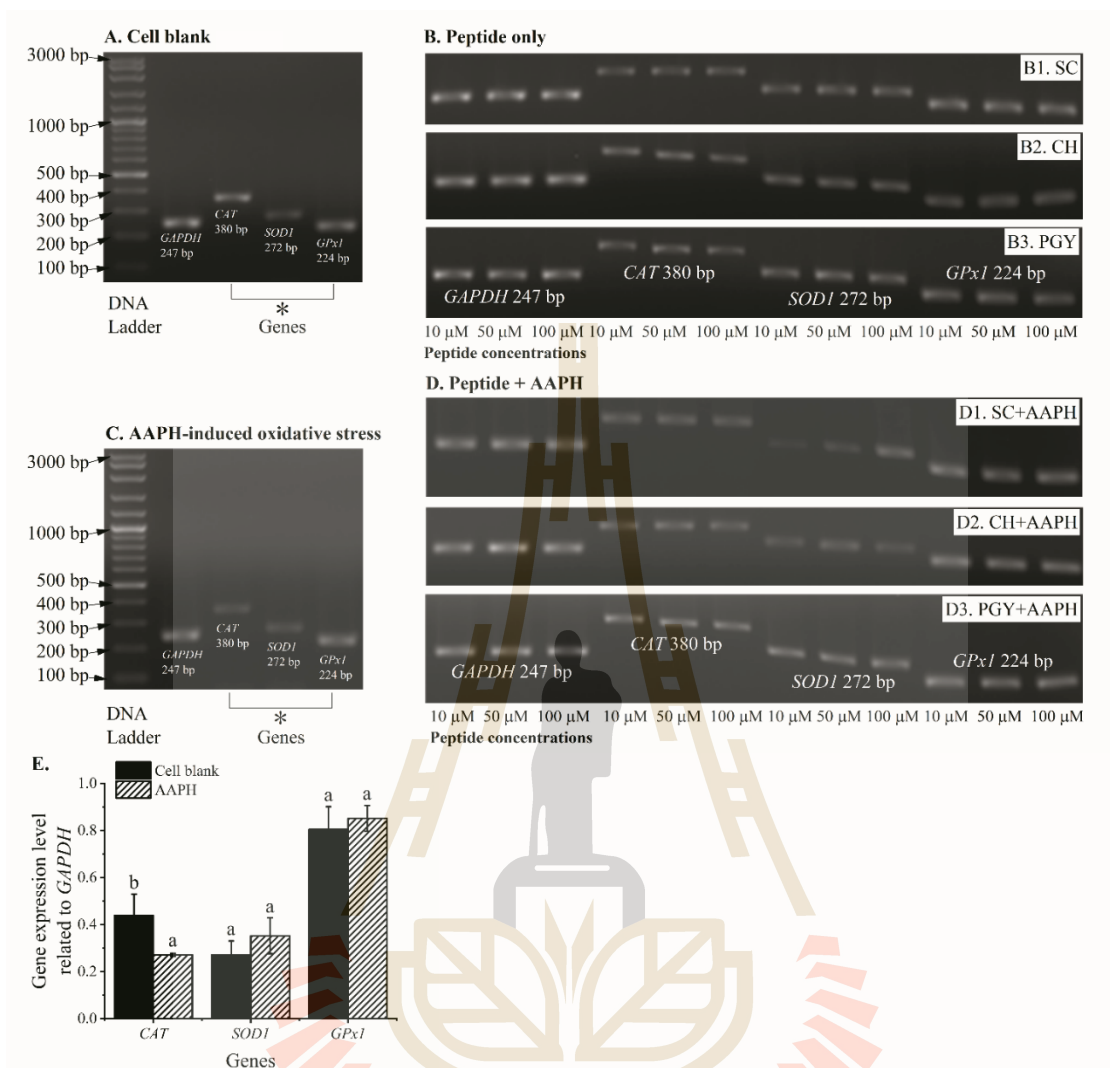
นอกจากความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์แล้วเปปไทด์อาจสามารถปรับการแสดงออกของยีนที่เข้ารหัสเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Wang, Ding, Xue, Ma, Du, Zhang, & Liu, 2018; Wu, Sun, Luo, Zhao, Zheng, Sun, Li, Sun, & Huang, 2018) เปปไทด์ที่เลือกไว้ 3

เพปไทด์คือ SC, CH และ PGY ยีนควบคุมการแสดงออกของคือ CAT, SOD1 และ GPx1 กลุ่มที่ทดสอบคือกลุ่มทดลองที่มีเพปไทด์อย่างเดียว และกลุ่มเพปไทด์ + AAPH (รูปที่ 4.43 และรูปที่ 4.44) พบว่าการแสดงควบคุมการออกของยีน CAT เพิ่มขึ้นและ SOD1 ลดลงที่ 100 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.44A-C) การแสดงออกของยีน GPx1 ถูกยับยั้งโดยเพปไทด์ทั้งหมด ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.44C) SOD เร่งปฏิกิริยา superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ซึ่งจะถูกลดสลายต่อไปเป็น  $H_2O$  โดยเอนไซม์ catalase (Mirończuk-Chodakowska, Witkowska, & Zujko, 2018)  $H_2O_2$  จะลดลงด้วย GSH ในปฏิกิริยาที่เร่งโดย GPx ดังนั้นทั้ง 3 เพปไทด์นี้จึงทำให้เกิดการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 ที่ช่วยเพิ่มการสลายตัวภายในเซลล์ของ  $O_2^{\cdot-}$  และ  $H_2O_2$  เพปไทด์ทั้งหมดไม่เพิ่มการกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ (CAA) ผ่านการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้นของ GPx1 เพปไทด์ที่ 100 ไมโครโมลาร์ ส่งผลต่อการควบคุมการแสดงออกยีนค่อนข้างต่ำใน CAT และ SOD1 ที่เพปไทด์ความเข้มข้นสูงนี้มีผลต่อการควบคุมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระน้อยลงซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่อธิบายความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่เทียบเคียงได้ระหว่าง 50 ถึง 100 ไมโครโมลาร์ ( $p > 0.05$ , รูปที่ 4.42)

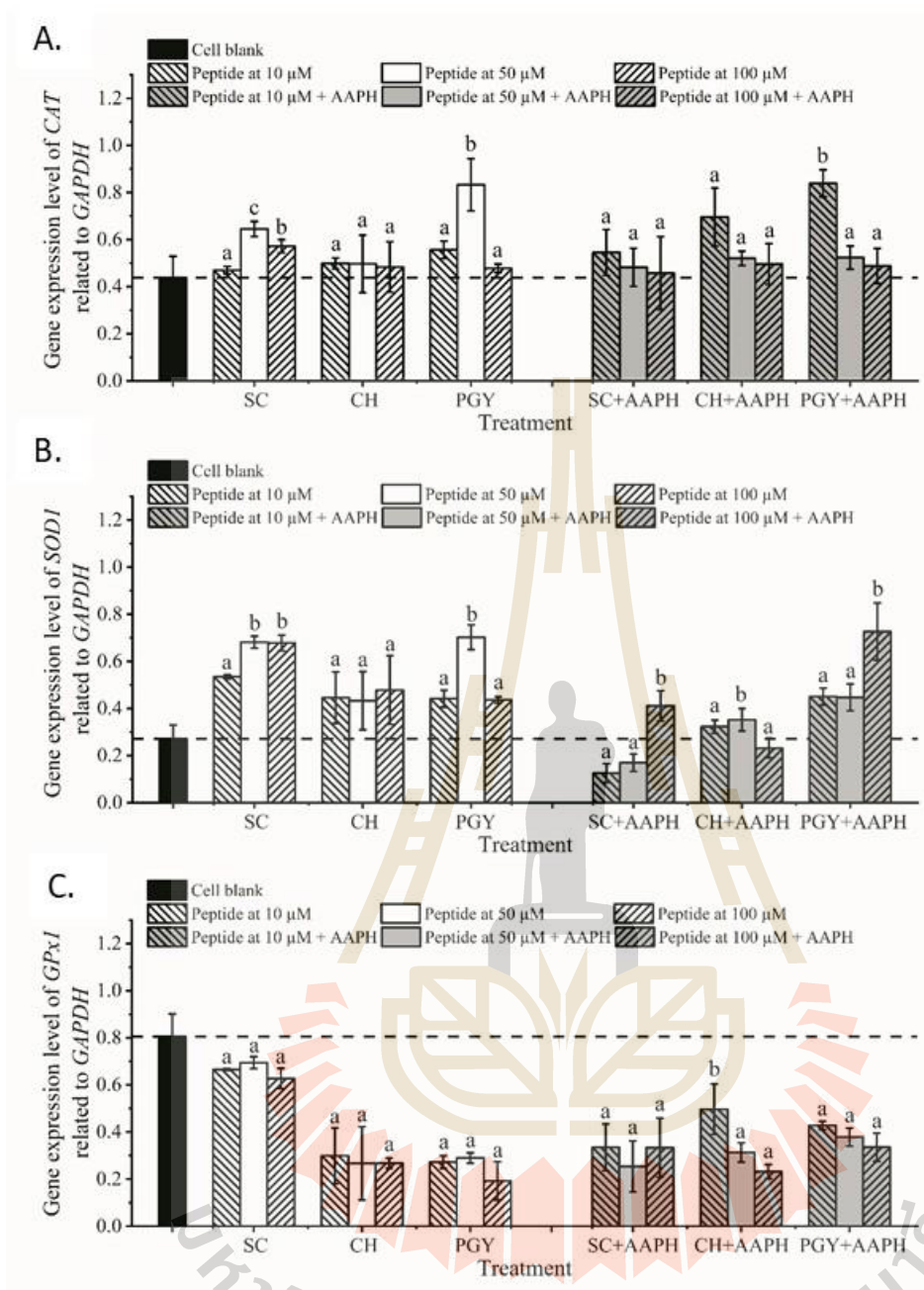
กลุ่มทดลองที่มีเพปไทด์อย่างเดียวแสดงให้เห็นถึงผลของเพปไทด์ที่ปรับเปลี่ยนการตอบสนองของสารต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ภายใต้เซลล์ปกติ การแสดงออกของยีน CAT ไม่เปลี่ยนแปลงตามเพปไทด์ CH ( $p > 0.05$ , รูปที่ 4.44A) การควบคุมการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้นโดยเพปไทด์ SC และ PGY ซึ่ง PGY ดีที่สุด ( $p < 0.05$ ) การแสดงออกของยีน SOD1 ถูกควบคุมเพิ่มขึ้นโดยทั้ง 3 เพปไทด์ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.44B) ซึ่งเพปไทด์ SC และ PGY มีประสิทธิภาพสูงสุด การแสดงออกของยีน GPx1 ถูกควบคุมลดลงโดยทั้ง 3 เพปไทด์ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.44C) ดังนั้น PGY จึงเป็นเพปไทด์ที่มีศักยภาพมากที่สุดที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 ซึ่งจะช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ catalase และ SOD ส่วนเพปไทด์ YLEELHRLNAGY เพิ่มการแสดงออกของยีนของ SOD และ catalase ของเซลล์ HepG2 อย่างมีนัยสำคัญ (Homayouni-Tabrizi, Asoodeh, & Soltani, 2017) เพปไทด์ NTPPAKSCQAQPTTM (ออกซีไดซ์ M), QGPVILNPWDQVQR และ APSFSDIPNPIGSENSE ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน GRS และ SOD1 ซึ่งจะถูกลดการแสดงออกเพิ่มขึ้น (Tonolo et al., 2020) ไฮโดรไลสจาก corn gluten (น้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1 kDa และ 1-3 kDa) จะลดการควบคุมการแสดงออกของยีน CAT แต่เพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีน GPx1 (Wang, Ding, Xue, Ma, Du, Zhang, & Liu, 2018)

การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ มีความแตกต่างกันในแต่ละเพปไทด์ ขึ้นอยู่กับกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้อง Kelch-like ECH Associated-protein 1 (Keap1)/นิวเคลียร์ factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/สารตอบสนองต่อสารต้านอนุมูลอิสระ (ARE) ส่งสัญญาณผ่าน pathway ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของเซลล์ต่อความเครียดออกซิเดชัน (De Freitas et al., 2018; Vriend & Reiter, 2015) ภายใต้เงื่อนไขปกติปัจจัยของการ transcription สำหรับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ Nrf2 ถูกแพร่หลายโดย E3 ubiquitin ligase complex, Keap1-Cul3-Rbx1 และย่อยสลายโดยโปรตีโอะโซม (proteasome) ในไซโตซอล (cytosol) เมื่อ electrophiles เช่น Chalcones และ peptides (De Freitas et al., 2018) ส่วน modified Keap1 และ Nrf2 จะแยกตัวออกจากไซโตซอล จากนั้น Nrf2 จะถูกฟอสโฟรีลและย้ายไปยังนิวเคลียส ส่วนนิวเคลียร์ของ Nrf2 กับ Maf (ตัวกระตุ้นสำหรับ Nrf-2) จะกระตุ้นการทำงานของ DNA โพรโมเตอร์ (ARE) ซึ่งนำไปสู่ transcription ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพสที่ 2 ดังนั้นการแยกตัวของ Keap1/Nrf2 complex ใน cytosol ก่อนการย้ายตำแหน่งนิวเคลียร์ของ Nrf2 จึงมีความสำคัญต่อการกระตุ้นส่งการสัญญาณผ่าน pathway ของ Keap1/Nrf2/ARE สำหรับกรดอะมิโน C ใน Keap1 ถูกปรับแต่งโดยใช้ปฏิกิริยา Michael ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงตามรูปแบบและการปลดปล่อย Nrf2 (De Freitas et al., 2018) เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ NTVPAKSCQAQPTTM, QGPIVLNPWDQVQR และ APSFSDIPNPIGSENSE จะเชื่อมโยงกับ Keap1 และทำให้เกิดการปลดปล่อย Nrf2 เป็นอิสระ (Tonolo et al., 2020)

นอกเหนือจากการตัดแปลง Keap1 แล้วเมลาโทนิน (melatonin) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งโปรตีโอะโซม (proteasome inhibitor) ที่ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำสะสมของ Nrf2 ในนิวเคลียส เกิดการกระตุ้น transcription ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Vriend & Reiter, 2015) ซึ่งเพปไทด์ SC และ CH อาจเกี่ยวข้องกับการตัดแปลงของกรดอะมิโน C ใน Keap1 ผ่านการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดจาก ROS เพปไทด์ PGY อาจเป็นตัวยับยั้งโปรตีโอะโซม (proteasome inhibitor) เนื่องจากสามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิด angiotensin I-converting enzyme (ACE) และ dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) อ้างอิงจากฐานข้อมูล BIOPEP สิ่งนี้อาจอธิบายได้ว่าเหตุใดเพปไทด์ PGY จึงเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 นอกจากนี้เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน K จะเป็นตัวยับยั้ง ACE และ DPP-IV ที่มีประสิทธิภาพโดยอ้างอิงจากฐานข้อมูล BIOPEP ซึ่งอาจเป็นตัวยับยั้งโปรตีโอะโซมที่สามารถกระตุ้น transcription ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ นี่อาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่สามารถอธิบายได้ว่าทำไมเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน K จึงแสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระทางเคมีต่ำ แต่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ที่ดี



**รูปที่ 4.43** รูปแบบ 1.5% agarose gel electrophoresis ของ CAT, SOD1 และ GPx1 สำหรับเซลล์ที่เติบโตตามปกติ (A); เซลล์ที่มีเพปไทด์เพียงอย่างเดียว (B) ได้แก่ SC (B1), CH (B2), PGY (B3); เซลล์ที่มี AAPH (C); และเซลล์ที่มีเพปไทด์และ AAPH (D) ได้แก่ SC + AAPH (D1), CH + AAPH (D2), PGY + AAPH (D3) GAPDH คือ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ใช้เป็น housekeeping gene; CAT คือเอนไซม์ catalase; SOD1 คือ เอนไซม์ SOD; GPx1 คือเอนไซม์ GPx, ตัวเลขตามรหัสยีนของแอนติบอดีต้านอนุมูลอิสระ (A-D) ระบุขนาดผลิตภัณฑ์ของยีนใน RT-PCR SOD คือ superoxide dismutase; GPx คือกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase)



**รูปที่ 4.44** ระดับการแสดงออกของ CAT, SOD1 และ GPx1 สำหรับเซลล์ blank และกลุ่มเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดความเครียดออกซิเดชันด้วย AAPH; ระดับการแสดงออกของ CAT (A), SOD1 (B) และ GPx1 (C) สำหรับเซลล์ blank เพปไทด์เพียงอย่างเดียว และกลุ่มเพปไทด์ + AAPH ตามลำดับ GAPDH คือ glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase ใช้เป็น housekeeping gene; CAT คือรหัสนิย catalase; SOD1 คือ รหัสนิย SOD; GPx1 คือรหัสนิย GPx, อักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันระบุความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละการทดลองตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) SOD คือ superoxide dismutase; GPx คือกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase)

การแยกตัวของ Keap1/Nrf2 complex เกิดจากอนุมูลอิสระ ROS (Vriend & Reiter, 2015) ความเครียดออกซิเดชันแบบปรับตัวจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์เพื่อเพิ่มการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในโดยการเพิ่มขึ้นของการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Sies & Jones, 2020) อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระ ROS ที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดความเสียหายจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของเซลล์ซึ่งส่งผลให้การแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระลดลง จากผลการทดลองพบว่าในกลุ่มทดลองที่มีเพปไทด์ และ AAPH (ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ) จะลดการแสดงออกที่ควบคุมของยีน CAT เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.43E) แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน SOD1 และ GPx1 ( $p > 0.05$ ) การแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 ยังถูกควบคุมลดลงในเซลล์ HepG2 ที่เกิด  $H_2O_2$  แต่เพิ่มการควบคุมการแสดงออกของ GPx1 (Wang, Ding, Xue, Ma, Du, Zhang, & Liu, 2018)

เมื่อเซลล์ที่มีเพปไทด์ก่อนที่จะเติม AAPH การแสดงออกของยีน CAT จะถูกควบคุมเพิ่มขึ้นโดยเพปไทด์ PGY ที่ 10 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.43E และ 4.44A) ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของยีน SOD1 จะถูกควบคุมเพิ่มขึ้นสูงสุดโดยเพปไทด์ PGY ที่ 100 ไมโครโมลาร์ ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.44B) การแสดงออกของยีน GPx1 ยังคงถูกระงับในกลุ่ม peptide + AAPH (รูปที่ 4.44C) ดังนั้นทั้ง 3 เพปไทด์จึงควบคุมการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ catalase และ SOD เพื่อปรับปรุงความสามารถกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ (CAA) ภายในต่อความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก AAPH เพปไทด์สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ได้โดยตรงซึ่งจะลดระดับการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ (Sies & Jones, 2020) ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ภายใต้การปกป้องของเพปไทด์ยังควบคุมการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 อย่างไรก็ตามการแสดงออกของยีน CAT และ/หรือ SOD1 ลดลงที่ความเข้มข้นสูง (รูปที่ 4.44A-B) อาจเป็นเพราะการเกิดโปรออกซิเดชัน (pro-oxidation) ของเพปไทด์ที่ความเข้มข้นสูงซึ่งเมลาโท닌ที่มากกว่า 1 ไมโครโมลาร์เพิ่มระดับอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ (Bejarano, Espino, Barriga, Reiter, Pariente, & Rodriguez, 2011)

นอกจากนี้การกระตุ้นไคเนสฟอสโฟริเลต (kinases phosphorylate) Nrf2 ยังนำไปสู่การโยกย้ายนิวเคลียร์ของ Nrf2 จะเพิ่มการควบคุมการ transcription ของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Joo, Kim, Lee, Kim, Koo, & Kim, 2016; Minelli, Conte, Grottelli, Bellezza, Cacciatore, & Bolaños, 2009) cyclo (HP) ซึ่งเป็น dipeptide จะกระตุ้น p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ซึ่งนำไปสู่การเกิด Nrf2-mediated เพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ARE และเซลล์

ที่ได้รับการป้องกันจาก H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated apoptotic บนเซลล์ PC12 (Minelli, Conte, Grottelli, Bellezza, Cacciatore, & Bolaños, 2009) PHP ซึ่งเป็น tripeptide จะลดความสัมพันธ์ของ Nrf2 สำหรับ Keap1 บนความเครียดออกซิเดชันของเซลล์ HepG2 ที่เกิดจาก AAPH ส่งผลให้เกิดการโยกย้ายนิวเคลียร์ของ Nrf2 ดังนั้นจึงเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีน catalase, SOD และ GPx (Wu et al., 2018)

ผลการวิจัยของเราชี้ให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ SC CH และ PGY สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ช่วยเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยกระตุ้นการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 ภายใต้ความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจาก APPH เพปไทด์ยังปกป้องเซลล์ด้วยการเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 เพปไทด์ PGY เป็นเพปไทด์ที่ดีที่สุดจากทั้งสองกลุ่มทดสอบ และเพปไทด์ CH มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด กลไกที่เกี่ยวข้องกับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระระดับเซลล์ของเพปไทด์เหล่านี้ควรได้รับการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

#### 4.7.5 สรุปผลการวิจัย

เพปไทด์ของปลานิลที่มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> คือโมเลกุลที่มีขั้วน้อยกว่าที่มีกรดอะมิโนเช่น C และ Y เพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน C-, Y- และ K ทั้งหมดแสดงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่สัมพันธ์กับการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> ทางเคมี LPGYF เป็นเพปไทด์ต้นแบบ (เริ่มต้นก่อนย่อยใน *in silico* GI) ที่ดีที่สุดในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> และ ROS ภายในเซลล์ เพปไทด์ที่ย่อยแล้ว *in silico* GI ได้แก่ SC, CH และ PGY พบว่ามีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ABTS<sup>•+</sup> และมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์สูง นอกจากนี้เพปไทด์ยังมีผลต่อการเพิ่มการควบคุมการแสดงออกของยีน CAT และ SOD1 เพปไทด์ PGY เป็นเพปไทด์ที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระในเซลล์ ดังนั้นเพปไทด์จึงไม่เพียง แต่กำจัดอนุมูลอิสระ ROS ภายในเซลล์เท่านั้น แต่ยังกระตุ้นการแสดงออกของ CAT และ SOD1 เพื่อปรับปรุงความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากโปรตีนปลานิลอาจมีแนวโน้มในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ



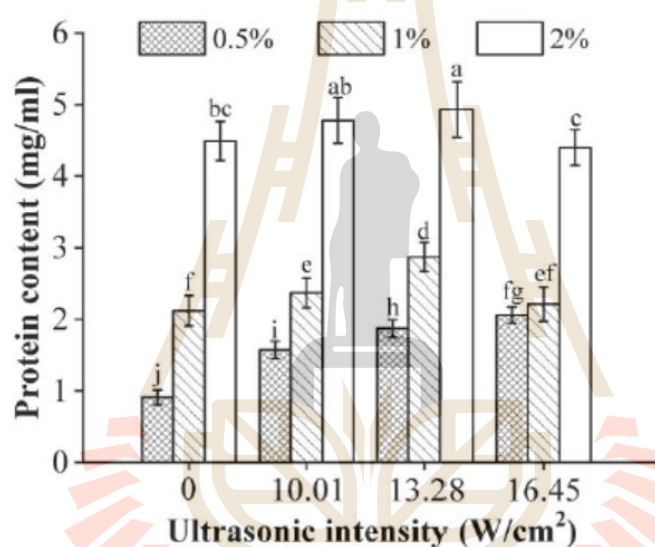
## 4.8 การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงเพื่อปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดงที่มีโซเดียมคลอไรด์ต่ำ

### 4.8.1 ผลการวิเคราะห์โปรตีนที่สกัดได้

ปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้ของเนื้อซูริมิที่มีเกลือเข้มข้น 0.5% เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องควบคู่ไปกับการเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์ (10.01 – 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) เมื่อเทียบกับกลุ่มตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.44 ไมโอไฟบริลลาร์โปรตีนที่สามารถละลายได้ในเกลือจำเป็นต้องใช้โซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้นมากกว่า 3 โมลาร์เพื่อให้สามารถละลายได้ดี ดังนั้น การละลายของโปรตีนที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำ (0.5%) ของตัวอย่างที่ไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์จึงมีข้อจำกัดซึ่งแสดงให้เห็นได้จากรูปที่ 4.45 โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์สามารถถูกทำลายได้โดยแรงกล ซึ่งได้แก่ พลังงานเฉือนระดับสูง (high shear energy) และการปั่นป่วน (turbulence) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน (sonication) เพื่อทำให้โปรตีนสกัดออกมาได้ดีขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) อาจจะถูกทำลายด้วยอัลตราซาวด์ได้ด้วย (Maity et al., 2012) ดังนั้น จึงทำให้โปรตีนละลายออกมาได้มากขึ้น นอกจากนี้ การเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้าง (spatial conformation) ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ยังเป็นผลมาจากแรงกลที่ถูกกระตุ้นโดยกระบวนการคาวิเทชัน (cavitation) ซึ่งมีผลทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น (Zou et al., 2018) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงมีผลทำให้โปรตีนถูกสกัดออกมาได้มากขึ้น (รูปที่ 4.45) ซึ่งอาจเนื่องมาจากพลังงานของอัลตราซาวด์ การศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนจากปลาเกล็ดเงิน (Liu et al., 2017) และ ไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่ (Zhang et al., 2017) เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูง

ที่สถานะของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2% พบว่า ปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์จาก 10.01 ถึง 13.28 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (รูปที่ 4.45) ในขณะที่ความเข้มข้นของอัลตราซาวด์สูง (16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) ทำให้โปรตีนที่สกัดได้ลดลง โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จะคลายตัว (unfold) ได้ดีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง (1 และ 2%) ทำให้มีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้น และอาจส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของโครงสร้างจุลภาคผ่านแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ มีผลทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนต่ำลง งานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Wang และคณะ (Wang et al., 2017) รายงานว่า ความสามารถในการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 3

และ 6 นาที แต่เมื่อให้คลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลา 9 – 15 นาที กลับพบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนลดลง เป็นที่น่าสังเกตว่า ปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% เพิ่มขึ้นมากถึง 126% หลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2% กลับพบว่าปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้เพียง 35 และ 10% ตามลำดับ (รูปที่ 4.45) จากผลการวิจัยของเราในครั้งนี้สามารถระบุได้ว่า คลื่นอัลตราซาวด์สามารถใช้ในการสกัดโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ได้ด้วยความเข้มข้นของเกลือต่ำ (0.5%) อย่างไรก็ตาม การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้มข้นสูง (16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) มีผลในการลดความสามารถในการสกัดโปรตีนที่สภาวะของการใช้โซเดียมคลอไรด์ปริมาณสูง (1 และ 2%)

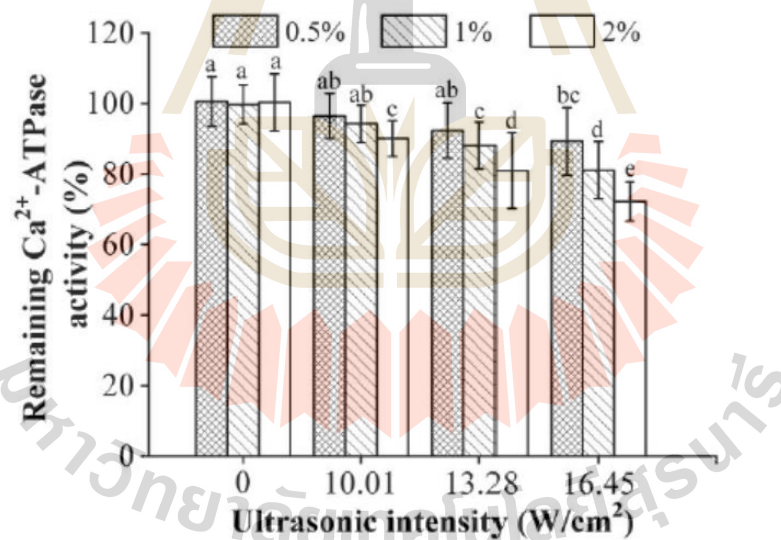


**รูปที่ 4.45** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อความสามารถในการสกัดโปรตีนจากซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.2 ผลการวิเคราะห์กิจกรรม $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือ

กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือของเนื้อซูริมิ (surimi paste) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1 และ 2% ลดลงควบคู่ไปกับการเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.46 การลดลงของกิจกรรม  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือนั้นบ่งชี้ได้ว่าคลื่นอัลตราซาวด์กระตุ้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของส่วนหัวของไมโอซิน (myosin globular head) ที่บริเวณ active site สำหรับ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase โดยสาเหตุหลักที่ทำให้กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ลดลง อาจเนื่องมาจากความดันสูงและการปั่นป่วนที่เกิดจากปรากฏการณ์ควิเทชัน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอซินอาจทำ

ให้เกิดการจัดเรียงโมเลกุลใหม่ของไมโอซินผ่านแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนกับโปรตีน (Benjakul & Bauer, 2000) ซึ่งอาจมีผลทำให้กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ลดลง การวิจัยก่อนหน้านี้มีรายงานว่า กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของไมโอซินจากปลาเกล็ดเงินลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลีนอัลตราซาวด์จาก 22.81 – 55.50 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร (Liu et al., 2017) กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% พบว่ามีค่าสูงสุด ในขณะที่ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% มีค่าต่ำสุด (ดังแสดงในรูปที่ 4.46) หลังจากให้คลีนอัลตราซาวด์กับตัวอย่างที่ความเข้ม 16.45  $\text{W/cm}^2$  พบว่า กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase คงเหลือของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5, 1, และ 2% มีค่าเท่ากับ 89, 81, และ 72% ตามลำดับ (รูปที่ 4.46) ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงมีผลทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวมากขึ้น ซึ่งทำให้บริเวณ active site เพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้นจึงทำให้ได้รับผลกระทบจากควิเทชั่นได้ง่าย ปรากฏการณ์นี้แสดงให้เห็นได้ว่าคลีนอัลตราซาวด์อาจจะมีส่วนในการทำลายส่วนหัวของไมโอซินในตัวอย่างที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง ซึ่งอาจทำให้เกิดผลเชิงลบต่อกระบวนการเกิดเจลของซูริมิได้

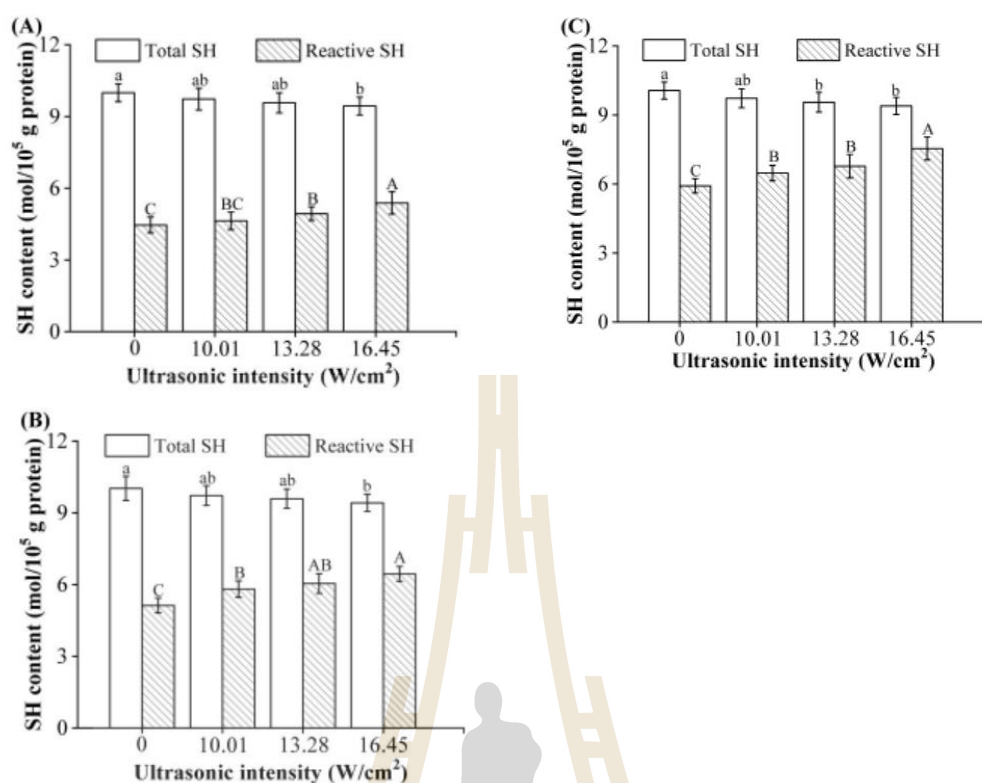


**รูปที่ 4.46** กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ที่คงเหลือของซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างๆ หลังจากได้รับการให้คลีนอัลตราซาวด์ที่ความเข้มต่างกัน โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (กิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase ของตัวอย่างที่ไม่ได้รับคลีนอัลตราซาวด์ในแต่ละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ คิดเป็น 100%)

### 4.8.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอนุมูลฟิโตรีลทั้งหมดและอนุมูลฟิโตรีลที่ทำปฏิกิริยา

ปริมาณอนุมูลฟิโตรีลทั้งหมดของทุกตัวอย่างค่อยๆลดลงควบคู่ไปกับการเพิ่มความเข้มข้นของคลีนอัลตราซาวนด์จาก 0 ถึง 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.47 ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า คลีนอัลตราซาวนด์อาจจะกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันของอนุมูลฟิโตรีล จำนวนของอนุมูลอิสระ (reactive radical) ได้แก่  $\cdot\text{H}$  และ  $\cdot\text{OH}$  ที่ได้จากโมเลกุลของน้ำนั้นสามารถเกิดการรวมกันกันขึ้นใหม่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Hu et al., 2013; Riesz & Kondo, 1992) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถแตกตัวเป็นออกซิเจนและน้ำได้อย่างรวดเร็ว ทำให้มีความเป็นไปได้ที่จะออกซิไดส์อนุมูลฟิโตรีลบางหมู่ให้เป็นพันธะไดซัลไฟด์ การวิจัยของ Liu และคณะ (Liu et al., 2017) มีรายงานว่า อนุมูลฟิโตรีลทั้งหมดของไมโอซินจากปลาเกล็ดเงินมีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลีนอัลตราซาวนด์จาก 22.81 ถึง 55.50  $\text{W}/\text{cm}^2$  รวมถึงปริมาณอนุมูลฟิโตรีลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่มาค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลีนอัลตราซาวนด์ (Zhang et al., 2017; Zou et al., 2018)

สำหรับปริมาณอนุมูลฟิโตรีลที่ทำปฏิกิริยาของทุกตัวอย่าง พบว่า มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลตราซาวนด์ (รูปที่ 4.47) จึงอาจบ่งชี้ได้ว่าปริมาณของอนุมูลฟิโตรีลที่อยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีนถูกเปิดอยู่บนบริเวณพื้นผิวเพิ่มมากขึ้นหลังจากได้รับคลีนอัลตราซาวนด์ เนื่องจากความดันสูงรวมถึงแรงเฉือนที่เกิดจากควิเทชันกระตุ้นให้โปรตีนคลายตัวมากขึ้น การวิจัยก่อนหน้าของ Zhang และคณะ (Zhang et al., 2017) พบว่า ปริมาณของอนุมูลฟิโตรีลที่ทำปฏิกิริยาของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่เพิ่มขึ้นจาก 3.67 เป็น 7.33  $\text{mol}/10^4 \text{ g protein}$  เมื่อใช้คลีนอัลตราซาวนด์ที่ความเข้มข้น 193 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร นอกจากนี้ ปริมาณของอนุมูลฟิโตรีลที่ทำปฏิกิริยาของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5, 1, 2% หลังการให้คลีนอัลตราซาวนด์เพิ่มขึ้น 21, 26, และ 27% ตามลำดับ จากผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า คลีนอัลตราซาวนด์มีผลในการกระตุ้นการคลายตัวของโปรตีน



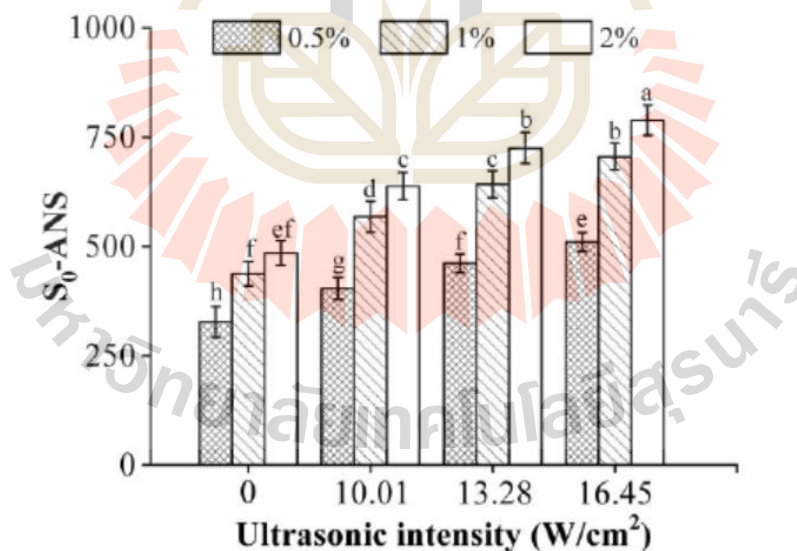
รูปที่ 4.47 ผลของการใช้คลิ่นอัลตราซาวด์ต่อปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลทั้งหมดและปริมาณหมู่ซัลไฟไฮดริลที่ทำปฏิกิริยาของซูริมิปลาทรายเงินที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 (A), 1 (B), และ 2% (C) โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.4 ผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity

จากการศึกษา พบว่า ค่า surface hydrophobicity ( $S_0$ -ANS) ของตัวอย่างทั้ง 3 กลุ่มเพิ่มขึ้น ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าหมู่ที่ไม่ชอบน้ำของเนื้อซูริมิเปิดออกเพิ่มขึ้นหลังจากตัวอย่างผ่านการให้คลิ่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.48 นอกจากนี้เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลิ่นอัลตราซาวด์ พบว่ามีผลทำให้ค่า surface hydrophobicity เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคลิ่นอัลตราซาวด์ช่วยกระตุ้นการเปิดตัวของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่ถูกฝังอยู่ภายในโครงสร้างของโปรตีน จากที่ได้กล่าวไปข้างต้นนั้น สาเหตุหลักๆ ที่ทำให้หมู่ที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มขึ้นนั้น เนื่องมาจากความดังสูงและแรงเฉือนที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการโซนิเคชัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนและคลายตัวของไมโอซิน การวิจัยก่อนหน้าของ Liu และคณะ (Liu et al., 2017) พบว่า ค่า surface hydrophobicity ของไมโอซินจากเนื้อปลาเกล็ดเงินเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลิ่นอัลตราซาวด์จนถึง 55.50 วัตต์ต่อ

ตารางเซนติเมตร นอกจากนี้การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ยังช่วยเพิ่ม surface hydrophobicity ของไมโอซินจากเนื้อไก่ด้วย (Wang et al., 2017; Zhang et al., 2017)

เนื้อซูริมีที่มีปริมาณของโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงโดยไม่ได้ให้คลื่นอัลตราซาวด์ พบว่ามีค่า surface hydrophobicity สูง ซึ่งสามารถแสดงให้เห็นได้ว่า ที่ความเข้มข้นของเกลือมากมีผลทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.48) นอกจากนี้ ผลการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่มีต่อการคลายตัวออกของโปรตีนที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ยังไม่เด่นชัด อาจเนื่องมาจากไมโอซินส่วนใหญ่อยู่ในรูปแบบของการรวมตัวกัน ทำให้การเปิดตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำมีอย่างจำกัด ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่มีพลังงานสูง ค่า surface hydrophobicity ของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5, 1, และ 2% หลังจากได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร เพิ่มขึ้นถึง 56, 61, และ 63% ตามลำดับ (รูปที่ 4.48) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลของกิจกรรมของ  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (รูปที่ 4.46) และปริมาณของหมู่ซัลฟิไฮดริลที่ทำปฏิกิริยา (รูปที่ 4.48) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงการคลายตัวออกของโปรตีนในสภาวะที่มีเกลือเข้มข้นสูง (1 และ 2%) นอกจากนี้โปรตีนที่คลายออกมาสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างส่วนที่ไม่ชอบน้ำเพื่อเกาะตัวให้มีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งสามารถตกตะกอนได้หลังจากการปั่นเหวี่ยง

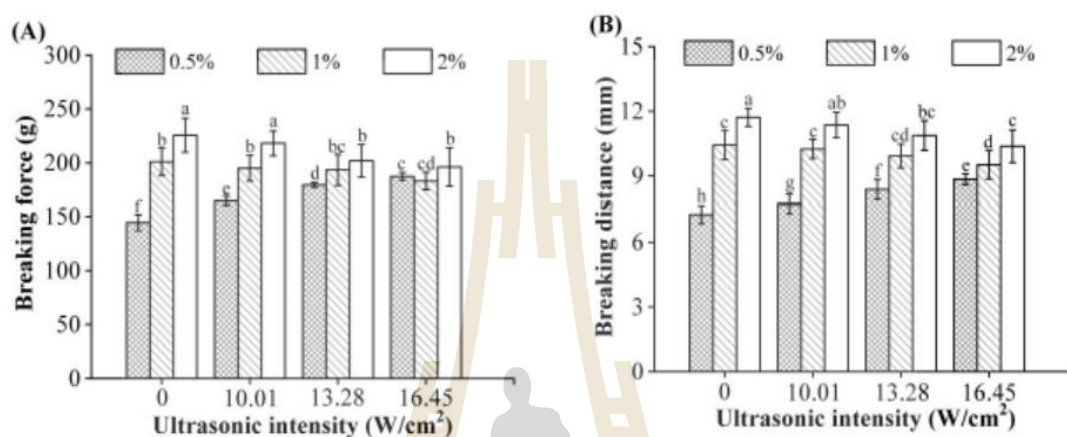


**รูปที่ 4.48** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่า surface hydrophobicity ของซูริมีจากปลาทรายแดง ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.5 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเนื้อสัมผัส

ตัวอย่างของเจลซูริมีที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% และไม่ได้รับการให้คลีนอัลตราซาวน์มีค่าแรงดึงที่จุดขาดและระยะทางที่ต่ำ ในขณะที่ค่าแรงดึงที่จุดขาดและระยะทางของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% มีค่าสูงดังแสดงในรูปที่ 4.49 การเกิดเจลของโปรตีนนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการสูญเสียภาพธรรมชาติบางส่วน (partial denaturation) ตามด้วยการรวมตัวของโปรตีนแบบไม่สามารถย้อนกลับได้ (irreversible aggregation) (Lanier et al., 2000) จากรูปที่ 4.49 พบว่าการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์มีค่าต่ำที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% ซึ่งเกิดจากการละลายที่จำกัดและการเกาะตัวกันของโปรตีน การเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่มีโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (รูปที่ 4.49) และระดับการคลายตัวของโปรตีน (รูปที่ 4.49) เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดโครงข่ายของเจล (gel network) การวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า ค่าแรงดึงที่จุดขาดและระยะทางของเจลซูริมีจากปลาอลาสก้าพอลลอค (Alaska pollock) ที่ใช้เกลือเข้มข้น 0.3% มีค่าต่ำกว่าซูริมีที่ใช้เกลือเข้มข้น 3% (Cando et al., 2015, 2016) ค่าแรงดึงที่จุดขาดและระยะทางของเจลซูริมีที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5% เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องควบคู่ไปกับการเพิ่มความเข้มข้นของคลีนอัลตราซาวน์ (รูปที่ 4.49) งานวิจัยในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการใช้คลีนอัลตราซาวน์มีส่วนช่วยในการปรับปรุงการเกิดเจลของซูริมีที่ความเข้มข้นของเกลือในปริมาณต่ำ เนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่สกัดได้ และการคลายตัวของโปรตีน การเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่ละลายได้อาจจะเป็นประโยชน์สำหรับการเกิดเจลโดยใช้ความร้อน นอกจากนี้การคลายตัวของโปรตีนยังช่วยเพิ่ม นอกจากนี้การคลายตัวของโปรตีนที่มากขึ้นส่งผลให้กลุ่มอื่นๆ เพิ่มขึ้น เช่นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งอาจจะมีส่วนช่วยในการเกิดพันธะโควาเลนต์ หรือพันธะอื่นๆ ระหว่างโมเลกุลส่งผลให้เกิดโครงข่ายของเจลดียิ่งขึ้น ในทางตรงกันข้าม การใช้คลีนอัลตราซาวน์มีผลทำให้คุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของซูริมีที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2% ต่ำลง (รูปที่ 4.49) ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของโปรตีนที่มากที่สุดตาม (รูปที่ 4.45) ดังนั้น กระบวนการเกิดเจลของซูริมีภายใต้สภาวะที่มีการให้คลีนอัลตราซาวน์นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรตีนที่ละลายได้ในเกลือเพียงอย่างเดียว การคลายตัวของโปรตีนที่มากเกินไปหลังการให้คลีนอัลตราซาวน์ในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2% เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอซิน และส่งผลทำให้เกิดโครงข่ายของเจลที่ไม่ดีไปกว่า การศึกษาของ Zhang และคณะ (Zhang et al., 2017) รายงานว่า โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์จากเนื้อไก่ที่ความเข้มข้นของโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลลาร์ถูกทำลายหลังจากได้รับคลีนอัลตราซาวน์ที่ความเข้ม 173 และ 193 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร

นาน 15 นาที ซึ่งมีผลทำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างจุลภาค (microstructure) และความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-holding capacity) ของเจลต่ำลง ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการเกิดเจลของซูริมิที่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวด์มีความสัมพันธ์กับปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเกลือ และโครงสร้างของโปรตีน



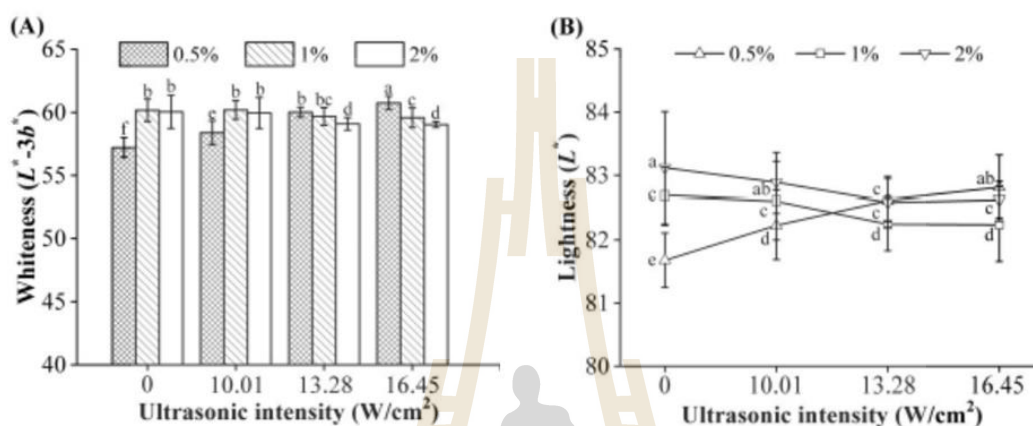
**รูปที่ 4.49** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.6 ผลการวิเคราะห์ค่าสี

ค่าความขาวของซูริมิอาจมีความสัมพันธ์กับการเกาะตัวของโปรตีนเพื่อเกิดเป็นโครงข่ายของเจล (Cando et al., 2015; Tadpitchayangkoon et al., 2012) ตัวอย่างเจลซูริมิที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% และไม่ได้ให้คลื่นอัลตราซาวด์ พบว่ามีลักษณะความขาวและความสว่างต่ำดังแสดงในรูปที่ 4.50A และ B ความเข้มข้นของเกลือสูงมีผลทำให้โปรตีนละลายออกมาได้มาก ซึ่งนำไปสู่การเกิดโครงข่ายของเจลในลำดับที่สูงและสะท้อนแสงได้มาก มีผลทำให้เจลมีความขาวมากกว่า การศึกษาของ Cando และคณะ (Cando et al., 2015) รายงานว่า ค่าความสว่างของเจลซูริมิจากเนื้อปลาอลาสก้าพอลลอกที่มีเกลือเข้มข้น 0.3% มีค่าต่ำกว่าเจลที่มีเกลือเข้มข้น 3% ค่าความขาวและความสว่างของเจลซูริมิที่มีเกลือเข้มข้น 0.5% เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของคลื่นอัลตราซาวด์เทียบกับตัวอย่างควบคุม (รูปที่ 4.50A และ B) จึงอาจบ่งชี้ได้ว่า คลื่นอัลตราซาวด์มีส่วนช่วยทำให้การเกาะตัวของโปรตีนที่ความเข้มข้นของเกลือ 0.5% สูงขึ้นรวมถึงทำให้เกิดโครงข่ายของเจลที่มากขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน (รูปที่ 4.45) และการคลายตัวของโปรตีน (รูปที่ 4.48) อย่างไรก็ตาม



การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ความเข้มสูงมีผลในการลดค่าความขาวของเจลซูริมีที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 และ 2% (รูปที่ 4.50A) เนื่องมาจากการคลายตัวที่มากเกินไปของโปรตีนซึ่งอาจทำให้อัตราการรวมตัวกันของโปรตีนเร็วกว่าการคลายตัว จึงส่งผลให้โครงข่ายของเจลมีความหยابและผิดปกติ ซึ่งทำให้เจลซูริมีมีค่าความส่องสว่างที่ต่ำ

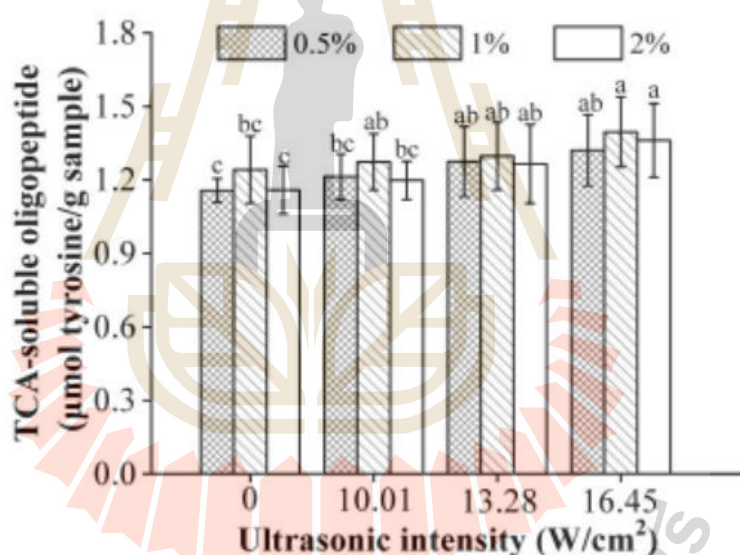


**รูปที่ 4.50** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อค่าความขาว (A) และค่าความสว่าง (B) ของเจลซูริมีจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.7 การสลายโมเลกุลของโปรตีนจากเอนไซม์ (Proteolysis)

ปริมาณของโพลิโกลเปปไทด์ที่ละลายใน TCA (TCA-soluble oligopeptides) สะท้อนให้เห็นถึงการสลายของโปรตีนที่เป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ (endogenous proteinase) (Tadpichayangkoon et al., 2012) จากการศึกษา พบว่า ปริมาณของโพลิโกลเปปไทด์ที่ละลายใน TCA ของเจลซูริมีค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มของคลื่นอัลตราซาวด์ดังแสดงในรูปที่ 4.51 ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า การสลายตัวของเจลซูริมีอาจเกิดจากการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ เอนไซม์ Serine proteinases เป็นเอนไซม์ที่พบว่ามีส่วนร่วมในการย่อยสลายโปรตีนของเนื้อปลาทรายแดง (Kinoshita et al., 1990) ผลกระทบที่เกิดจากกระบวนการควิเทชั่นมีส่วนในการกระตุ้นการคลายตัวของโปรตีน ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ catalytic sites ของเอนไซม์ นอกจากนี้ ยังพบว่าเอนไซม์สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเพื่อส่งเสริมให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาได้ด้วย การวิจัยของ Uluko และคณะ (Uluko et al., 2013) รายงานว่า การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ (800 วัตต์, 1 – 8 นาที) มีผลทำให้ระดับการย่อยของโปรตีนนมเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเพิ่มประสิทธิภาพของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และอะคาเลส (Alcalase) โดย

เบียผลมาจากการแยกตัวของโปรตีนและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นอัลตราซาวนด์ นอกจากนี้ การใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ (20 kHz, แอมพลิจูด 20 – 40%) มีผลทำให้เบต้าแลคโตโกลบูลิน ( $\beta$ -lactoglobulin) ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (pepsin) และ ทริปซิน (trypsin) ได้ง่ายขึ้น (Ma et al., 2018) เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณของโอลิโกเปปไทด์ที่ละลายใน TCA มีความเกี่ยวข้องน้อย นอกจากนี้การใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ไม่ส่งผลที่ชัดเจนต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไมโอซินสายหนัก (แสดงในรูปที่ 4.52) การศึกษาของ Saleem และ Ahmad (Saleem & Ahmad, 2016) รายงานว่าโปรตีนแอคโตไมโอซินของเนื้อไก่ยังคงไม่ถูกทำลายหลังจากผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวนด์ที่ 120 วัตต์ นาน 30 นาที รวมถึงไม่พบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวนด์ที่ 240 วัตต์ นาน 15 นาที (Wang et al., 2017) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์นั้นมีผลน้อยมากต่อการย่อยสลายโปรตีนของเจลซูริมิ

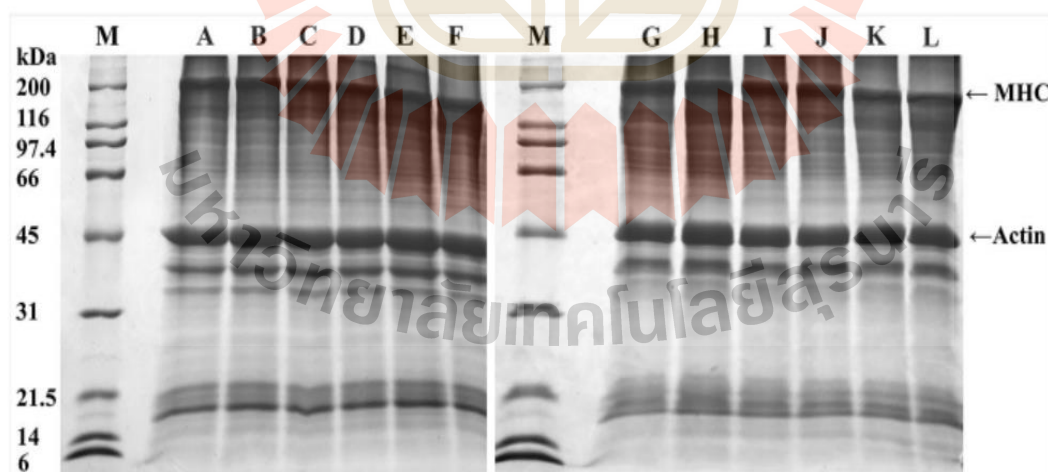


รูปที่ 4.51 ผลการใช้คลื่นอัลตราซาวนด์ต่อปริมาณของโอลิโกเปปไทด์ที่ละลายใน TCA ของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของเกลือต่างกัน โดยที่ความแตกต่างของตัวอักษรระบุถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

#### 4.8.8 ผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลำดับที่สอง (secondary structure) ของโปรตีน

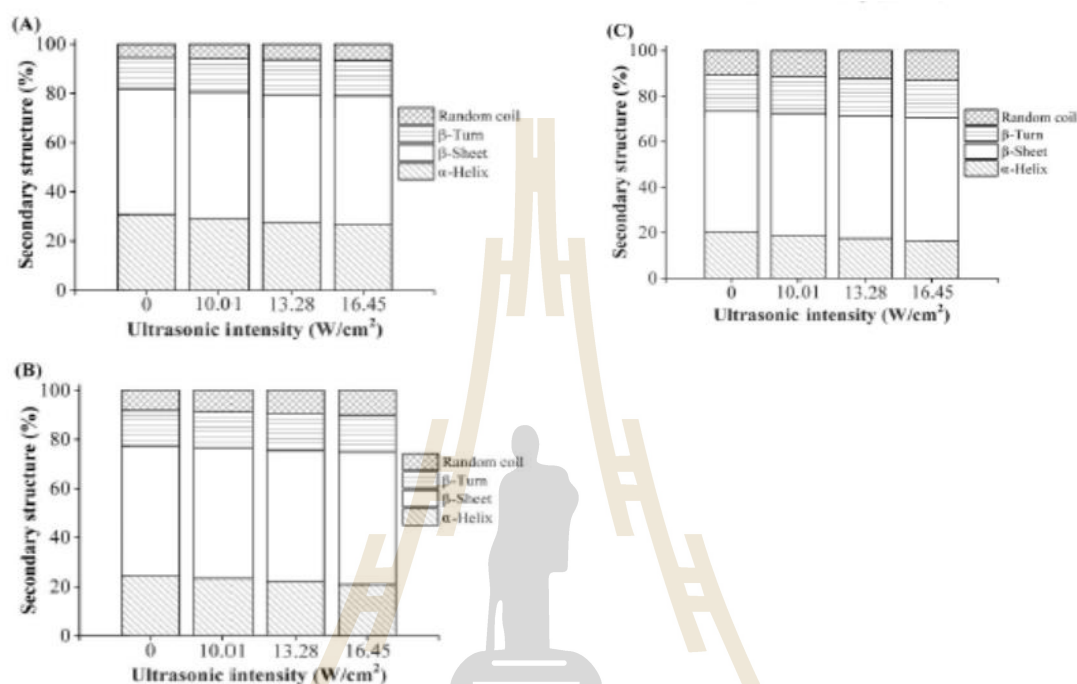
การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างลำดับที่ 2 วิเคราะห์จาก amide I region (1600 – 1700 cm<sup>-1</sup>) พบว่า เจลซูริมิที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงมีปริมาณของแอลฟาฮีลิกซ์ ( $\alpha$ -helix) ในระดับต่ำ แต่ปริมาณของเบต้าชีท ( $\beta$ -sheet), เบต้าเทิร์น ( $\beta$ -turn) และ random coils สูงโดยไม่คำนึงถึง

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.53 ซึ่งเป็นสิ่งที่ใช้ยืนยันว่าที่ปริมาณของเกลือสูงนั้นมีผลทำให้โปรตีนคลายตัวในระดับที่สูงขึ้น ปริมาณเบต้าซีทของเจลซูริมิจากเนื้อปลาอะลาสกาพอลลอกที่มีเกลือเข้มข้น 3% สูงกว่าตัวอย่างที่มีเกลือเข้มข้น 0.3% (Cando et al., 2015, 2016) การใช้คลื่นอัลตราซาวด์มีผลทำให้ปริมาณแอลฟาอีลิคซ์ในเจลซูริมิลดลงควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของเบต้าซีทแบบตัวเทิร์น และ random coil เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 4.53) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคลื่นอัลตราซาวด์มีส่วนช่วยในการคลายตัวของโปรตีน ตัวอย่างเจลซูริมิที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5 และ 2% พบว่ามีปริมาณของแอลฟาอีลิคซ์ลดลงประมาณ 13 และ 19% ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า คลื่นอัลตราซาวด์มีผลทำให้โปรตีนคลายตัวมากขึ้นในสถานะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง การศึกษาของ Jiang และคณะ (Jiang et al., 2014) รายงานว่า มีการลดลงของปริมาณแอลฟาอีลิคซ์และการเพิ่มขึ้นของเบต้าซีทของโปรตีนจากถั่วดำหลังจากที่ผ่านการให้คลื่นอัลตราซาวด์ (150 – 450 วัตต์, นาน 12 และ 24 นาที) นอกจากนี้ ปริมาณของ random coil ของตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% มีค่าเพิ่มขึ้น 18% หลังจากให้คลื่นอัลตราซาวด์ ในขณะที่ตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นสูงนั้นมีปริมาณของ random coil เพิ่มขึ้น 21 – 25% การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอลฟาอีลิคซ์และ random coil ที่ถูกกระตุ้นด้วยคลื่นอัลตราซาวด์มีสาเหตุมาจากการคลายตัวของโปรตีนที่มากเกินไป ดังนั้น การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการใช้คลื่นอัลตราซาวด์สามารถกระตุ้นการคลายตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ได้



รูปที่ 4.52 รูปแสดง SDS-PAGE ของเจลซูริมิจากปลาทรายแดงที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ โดยที่ A, B, C, D คือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% ที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 0, 10.01, 13.28, 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ E, F, G, H คือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น

1% ที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 0, 10.01, 13.28, 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ I, J, K, L คือตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% ที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 0, 10.01, 13.28, 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร ตามลำดับ

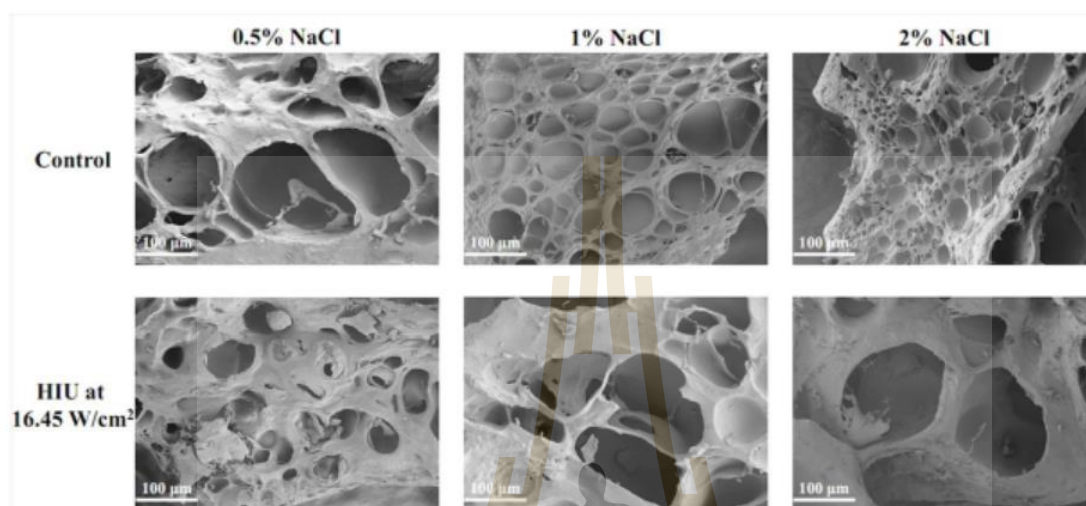


รูปที่ 4.53 ผลการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ต่อโครงสร้างลำดับที่ 2 ของโปรตีนจากเจลซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0.5 (A), 1 (B) และ 2% (C)

#### 4.8.9 การวิเคราะห์โครงสร้างทางจุลภาคของเจลซูริมิ

ตัวอย่างเจลซูริมิที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% และไม่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ มีโครงสร้างทางจุลภาคที่หยาบและมีรูกว้างอย่างผิดปกติดังแสดงในรูปที่ 4.54 โครงข่ายของเจลมีความหนาแน่นและความสม่ำเสมอของรูพรุนมากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 1 และ 2% รวมถึงการพบโครงสร้างที่ละเอียดขึ้นและมีรูพรุนที่เล็กลงในตัวอย่างที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.5% และได้รับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ ดังแสดงในรูปที่ 4.54 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้มีความสอดคล้องกับคุณลักษณะของเนื้อสัมผัส (รูปที่ 4.49) และสีของเจลซูริมิ (ภาพที่ 4.50) การเกิดลักษณะดังกล่าวอาจเนื่องมาจากการเปิดตัวของส่วนที่ไม่ชอบน้ำซึ่งมีผลทำให้เกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำและทำให้เกิดการสร้างโครงข่ายของเจล อย่างไรก็ตาม การใช้คลื่นอัลตราซาวด์นั้นีผลในการกระตุ้นการเกิดโครงข่ายของเจลที่มีความแตกต่างกันมาก โดยพบว่าที่ตัวอย่างของเจลซูริมิที่มีโซเดียมคลอไรด์

เข้มข้น 1 และ 2% นั้น มีขนาดของรูพรุนที่ใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับผลของลักษณะเนื้อสัมผัสที่ด้อยกว่า ดังนั้นการใช้คลื่นอัลตราซาวด์จึงมีผลต่อการเกิดโครงข่ายของเจลที่เนื่องมาจากการคลายตัวของโปรตีน



**รูปที่ 4.54** ผลของการใช้คลื่นอัลตราซาวด์ที่ความเข้ม 16.45 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร นาน 30 นาที ต่อโครงสร้างทางจุลภาคของเจลซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างกัน (กำลังขยาย 200 เท่า และ scale bar = 100 ไมโครเมตร)

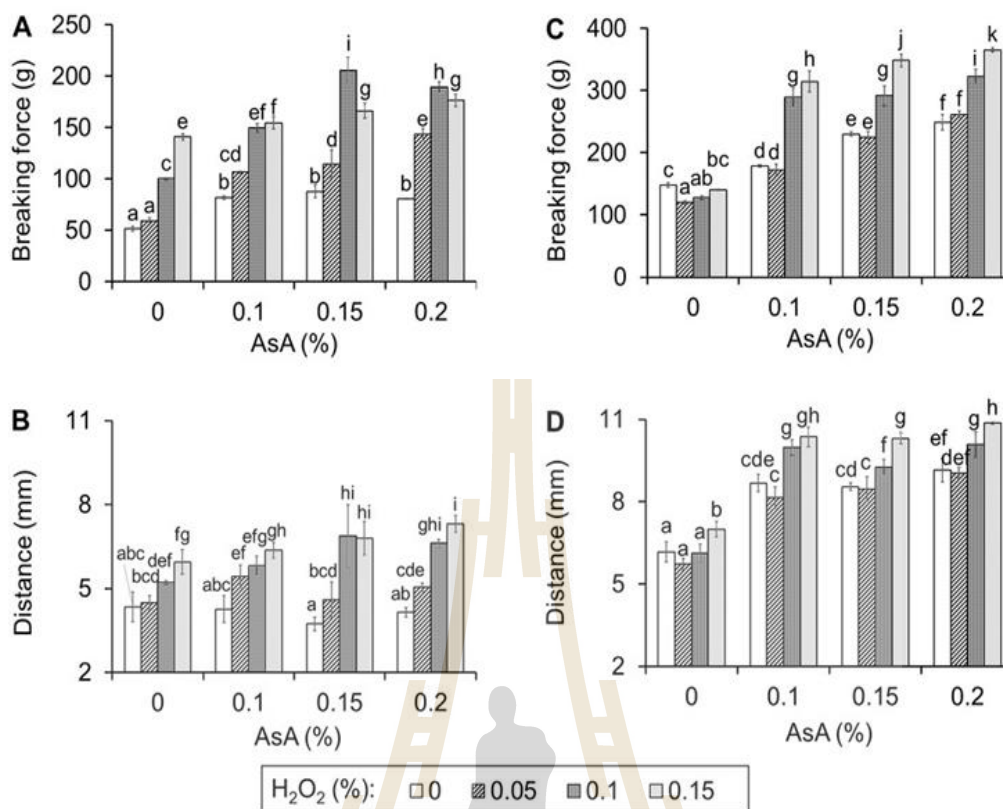
#### 4.8.10 สรุปผลการวิจัย

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์สามารถปรับปรุงคุณสมบัติของเจลซูริมิที่มีเกลือเข้มข้น 0.5% โดยเพิ่มปริมาณของโปรตีนที่สกัดได้ รวมถึงการคลายตัวของโปรตีน การคลายตัวของโปรตีนที่มากเกินไปในตัวอย่างที่มีเกลือเข้มข้น 1 และ 2% มีผลทำให้คุณลักษณะของเจลด้อยลง นอกจากนี้ การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ยังช่วยกระตุ้นการคลายตัวและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีนให้เพิ่มมากยิ่งขึ้นในตัวอย่างที่มีเกลือเข้มข้นสูง ยิ่งไปกว่านั้น การย่อยสลายของโปรตีนเจลซูริมิได้รับผลกระทบจากการใช้คลื่นอัลตราซาวด์อย่างมาก การวิจัยครั้งนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ระบุว่าการใช้เทคโนโลยีคลื่นอัลตราซาวด์สามารถปรับปรุงเจลซูริมิที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำได้ อย่างไรก็ตาม การใช้คลื่นอัลตราซาวด์กับเจลซูริมิที่มีความเข้มข้นของเกลือ 1 และ 2% นั้นยังคงไม่มีส่งผลที่ดีต่อเจลมากนัก

## 4.9 ผลกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการเกิดเจลและสเปกโทรสโกปีของการสั้นของซูริมิจากปลาเขตร้อน

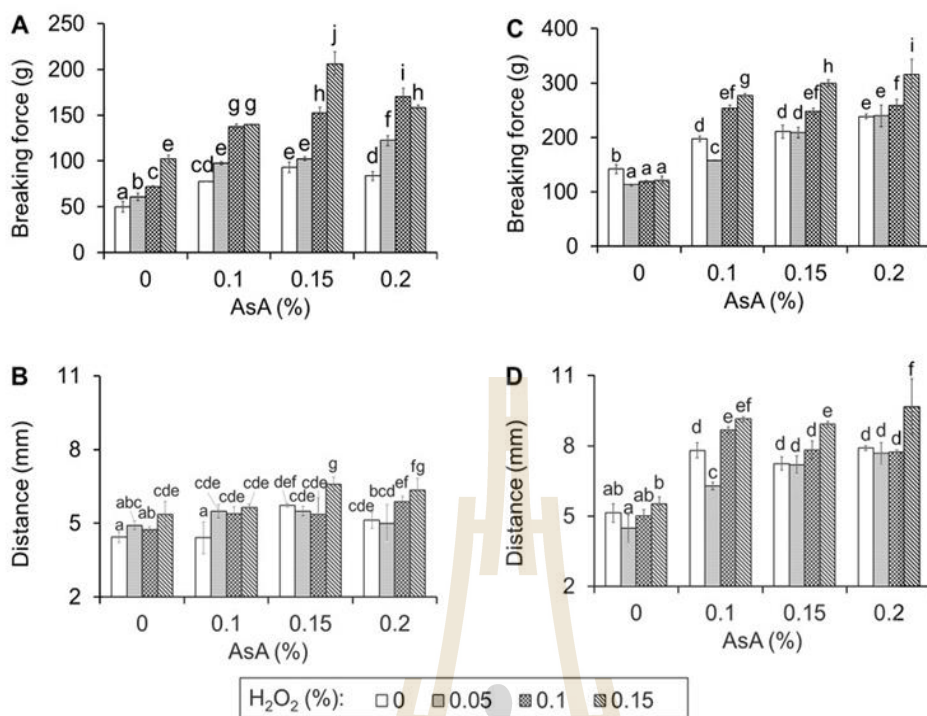
### 4.9.1 คุณสมบัติของเจล

การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% เพิ่มค่าแรงที่ใช้ในการเจาะ (breaking force) ของปลาปากคมเมื่อให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 180% แต่ปรับปรุงค่าระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุ (breaking distance) เพียงเล็กน้อย ( $\approx 30\%$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมของเจล (รูปที่ 4.55A และ 4.55B) ในทางตรงกันข้ามการเติมกรดแอสคอร์บิกส่งผลน้อย นอกจากนี้ผลร่วมกันระหว่างการเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.15% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.1% สามารถปรับปรุงทั้งค่าแรงที่ใช้ในการเจาะและระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุของเจลซูริมิจากปลาปากคมได้ดีกว่าการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียว โดยส่งผลให้เพิ่มประมาณ 300% และ 55% ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีผลปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิจากปลาทรายแดง แต่การเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% เพิ่มคุณภาพเนื้อสัมผัสของปลาทรายแดง (รูปที่ 4.55C และ D) ผลร่วมกันของการเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ส่งผลให้ปรับปรุงคุณภาพเจลซูริมิจากปลาทรายแดงได้สูงที่สุด โดยทำให้ค่าแรงที่ใช้ในการเจาะและระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุเพิ่มขึ้น 150% และ 90% ตามลำดับ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าผลร่วมกันของการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ช่วยปรับปรุงคุณภาพการเกิดเจลของซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดง แต่สถานะที่เหมาะสมนั้นจะขึ้นกับชนิดของปลา อย่างไรก็ตาม Benjakul, Thongkaew, และ Visessanguan (2005) รายงานว่าการเติมกรดแอสคอร์บิกในความเข้มข้น 0.05-0.2% ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลจากปลาปากคมและปลาทรายแดงเพียงเล็กน้อย นอกจากนี้การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในช่วงความเข้มข้น 0.01-0.04% พบว่าช่วยปรับปรุงความแข็งแรงของเจลและความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ของซูริมิจากปลานวลจันทร์ทะเล (milkfish surimi) (Chen, Chow, & Ochiai, 1999) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เป็นสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นในไมโอซินได้ ในขณะที่กรดแอสคอร์บิก เป็นสารรีดิวซ์ (reducing agent) ซึ่งส่งเสริมให้เกิดความไวต่อปฏิกิริยา (reactivity) ของหมู่ไทออล (SH groups) (Benjakul et al., 2005; Banlue et al., 2010) มีรายงานว่า สารเติมแต่งทั้ง 2 ชนิดนี้ ส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์เมื่อใช้แยกกันอีกด้วย



รูปที่ 4.55 ค่าแรงที่ใช้ในการเจาะ (breaking force) (A, C) และค่าระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุ (breaking distance) (B, D) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, B) และปลาทรายแดง (C, D) ที่เติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสเวลา 30 นาที<sup>a</sup> แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

การให้ความร้อนเพื่อเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ไม่มีผลปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัมผัสของ ซูริมิของทั้งสองตัวอย่าง และยังพบว่าคุณภาพเนื้อสัมผัสของเจลของซูริมิของทั้งสองตัวอย่างที่ได้จากการเติมสารเติมแต่ง แล้วให้ความร้อนเพื่อเซตตัวนั้น มีค่าต่ำกว่าเจลที่เกิดจากการได้รับความร้อนโดยตรง (รูปที่ 4.56) Nishimura และ Ohtsuru (1990) พบว่าเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก 0.05-0.5% จะปรับปรุงค่าความแข็งแรงของเจลซูริมิจาก Alaska pollock ในทั้งการให้ความร้อนเพื่อเซตตัวและการให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide เพิ่มขึ้นถึง 1.8-3.3 μmol tyrosine/กรัม หลังจากให้ความร้อนเพื่อเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (p < 0.05) แสดงให้เห็นว่าเกิดการสลายโมเลกุลของโปรตีนจากเอนไซม์โปรตีเอส (proteolysis) ระหว่างการเซตตัว ส่งผลให้ความสามารถในการเกิดเจลต่ำ

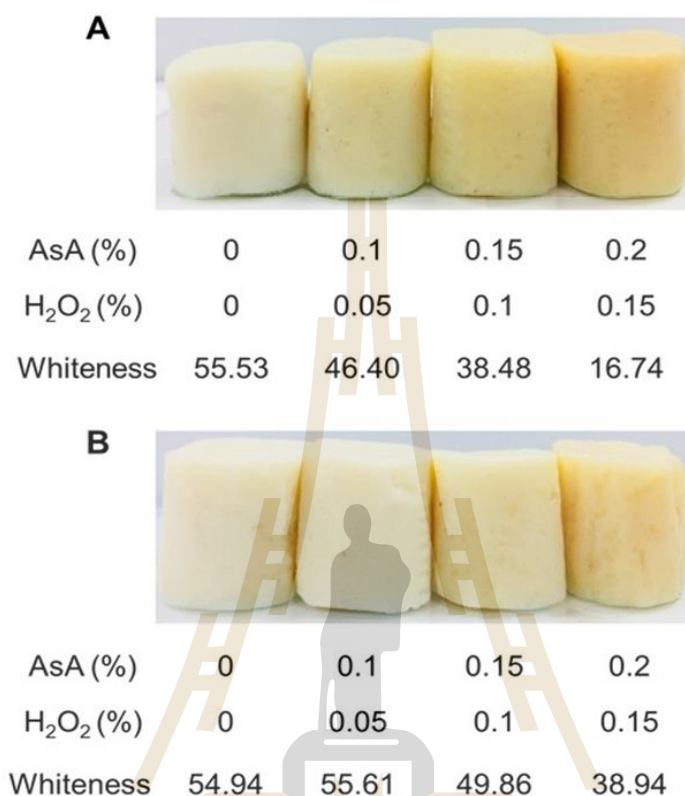


รูปที่ 4.56 ค่าแรงที่ใช้ในการเจาะ (breaking force) (A, C) และค่าระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุ (breaking distance) (B, D) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, B) และปลาทวายแดง (C, D) ที่เติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วให้ความร้อนเพื่อเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาทีด้วยที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที<sup>a</sup> แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05)

ค่าความขาวในเจลซูริมิทั้ง 2 ชนิด เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ทั้งนี้อาจเนื่องจากผลของการฟอกสีของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การเติมกรดแอสคอร์บิกไม่ส่งผลต่อค่าความขาวของเจลซูริมิทั้ง 2 ชนิด ปฏิบัติการเกิดสีน้ำตาลในเจลซูริมิ เมื่อเติมทั้งกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเพิ่มขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารเติมแต่งทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.57) เนื่องจากเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันจากกรดแอสคอร์บิก เมื่อมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์อยู่ด้วยกรดแอสคอร์บิกจะเกิดการออกซิเดชันเป็น DHA และ xylosone เกิดการทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดเป็นรงควัตถุสีน้ำตาล (brown pigments) (Corzo-Martinez et al., Corzo, Villamiel, & del Castillo, 2012) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ถึงแม้การเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด แต่จะทำให้คุณภาพด้านความขาวลดลง ดังนั้น



ผลิตภัณฑ์ซูริมินี้สามารถใช้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลได้ (surimi-based seafood products) เนื่องจากไม่ต้องการความขาวมากนัก เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารทอด (deep-fried products)



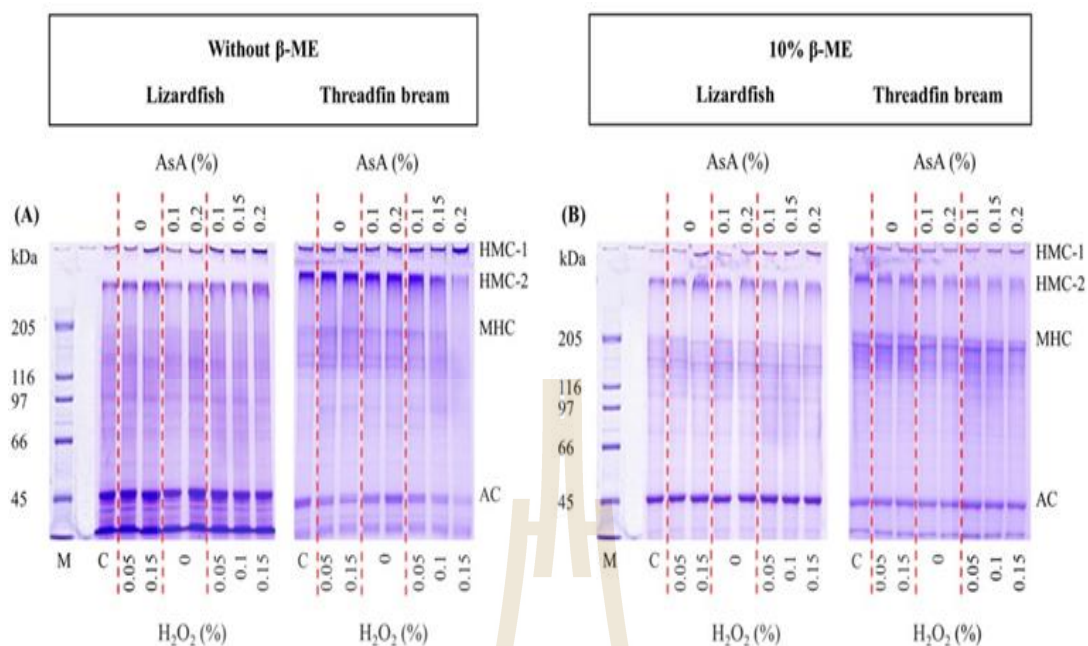
รูปที่ 4.57 ผลของกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ต่อค่าความขาวของเจลซูริมิจากปลาปากคม (A) และปลาทรายแดง (B) หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที

#### 4.9.2 การใช้ SDS-PAGE วิเคราะห์การเกิดพันธะข้ามในโครงสร้างโปรตีน (protein cross-linking)

ในสภาวะที่เติม  $\beta$ -ME นั้นไม่พบแบนของไมโอซินสายหนัก (MHC) ของเจลซูริมิจากปลาปากคมที่เติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์และให้ความร้อน (รูปที่ 4.58A) ในขณะที่เจลซูริมิจากปลาทรายแดงพบแบนของ MHC ค่อนข้างจางและหายไปเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เข้มข้น 0.15% (รูปที่ 4.58A) นอกจากนี้ ตัวอย่างที่เติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.1-0.15% และกรดแอสคอร์บิกที่ 0.15-0.2% พบแบนของ high molecular weight cross-links บริเวณด้านบนของ 7.5% running gel (HMC-2) ที่มีความเข้มข้น (รูปที่ 4.58A) ในขณะที่พบแบนของ high molecular weight proteins บริเวณด้านบนของ stacking gel (HMC-1)

สูงกว่า และพบแบนของ MHC ของเจลซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิดเมื่อใช้บัฟเฟอร์ที่มี 10%  $\beta$ -ME (รูปที่ 4.58B) แสดงให้เห็นว่าพันธะไดซัลไฟด์เกี่ยวข้องกับการรวมตัวกัน (polymerization) ของ MHC ซึ่งเหนี่ยวนำจากการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การเปลี่ยนแปลงของ MHC ของเจลที่ได้จากการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสนั้น แสดงรูปแบบเหมือนกันในปลาทั้ง 2 ชนิด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ผลการวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าพันธะข้ามใน MHC ที่เพิ่มขึ้น เกิดจากการเหนี่ยวนำของกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไม่ได้ขึ้นกับการแช่ตัว

การสกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีเพียง SDS พบแบนของ high molecular weight cross-links-1 (HMC-1) บน stacking gel และมีความเข้มเพิ่มขึ้นในซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ในขณะที่การเติมกรดแอสคอร์บิกหรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เพียงอย่างเดียวส่งผลให้มีความเข้มลดลง HMC-2 นั้นมีมวลโมเลกุลต่ำกว่า HMC-1 ซึ่งจะเคลื่อนที่ผ่าน 4% acrylamide gel เมื่อเติม 10%  $\beta$ -ME ในบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด พบว่าความเข้มของแบน HMC-2 ลดลงในทุกตัวอย่าง โดยเฉพาะปลาทรายแดงที่เติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% (รูปที่ 4.58B) ผลการวิจัยแสดงให้เห็นว่า MHC เกิดการรวมตัวกันเป็นโพลิเมอร์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยพบว่า HMC-1 และ HMC-2 นั้นเคลื่อนที่ได้อย่างจำกัดบน 4 และ 7.5% acrylamide gel การเกิดการรวมตัวกันนี้ สันนิษฐานว่าเกิดจากพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งได้จากการเร่งปฏิกิริยาของกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยเฉพาะในซูริมิจากปลาทรายแดงที่เติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% จากความเข้มของแบน HMC-1 และ HMC-2 นั้น สามารถบ่งชี้ได้ว่าการรวมตัวกันที่เพิ่มขึ้น จากการเหนี่ยวนำเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เกิดในปลาทรายแดงมากกว่าปลาปากคม จึงเป็นเหตุผลที่อธิบายว่าการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้นสามารถปรับปรุงคุณภาพเจลของซูริมิจากปลาทรายแดงได้ดีกว่าปลาปากคม (รูปที่ 4.55 และ 4.56)

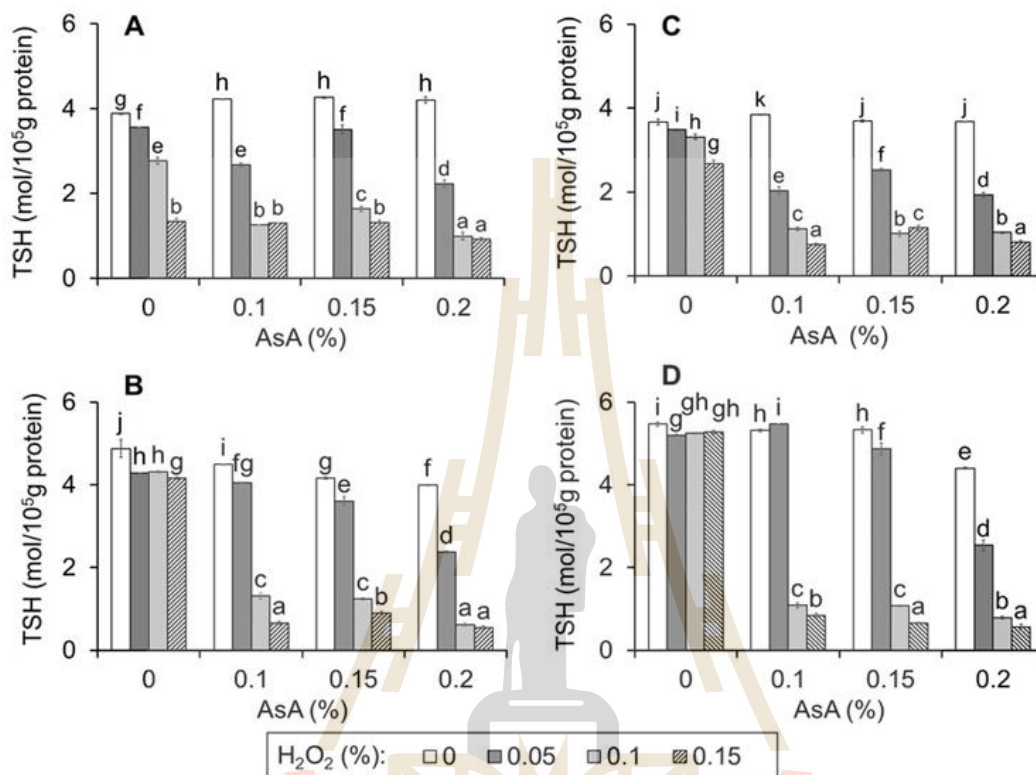


รูปที่ 4.58 รูปแบบของโปรตีนบน 7.5% polyacrylamide gel ของเจลซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดง ผ่านการให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) และสกัดโดยเติม (A) และไม่เติม (B) 10%  $\beta$ -mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) M = Standard makers; C=Control; HMC-1=high molecular weight cross-link-1; HMC-2= high molecular weight cross-link-2; HMC=myosin heavy chain; AC=actin

#### 4.9.3 ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด (TSH group content)

ที่สภาวะการให้ความร้อนทั้ง 2 แบบ ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมดของเจลซูริมิจากปลาปากคมลดลงเมื่อเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในปริมาณที่เพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.59A) Balange และ Benjakul (2009) รายงานว่าการลดลงของปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด บ่งชี้ถึงการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ผ่านการเกิดออกซิเดชันของหมู่ไทออล (SH group) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นสารออกซิไดซ์ที่แรง ทำให้หมู่ไทออลเกิดการออกซิเดชัน การลดลงของปริมาณ หมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมดของเจลซูริมิจากปลาทรายแดง เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกเกิดขึ้นมากกว่าการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (รูปที่ 4.59B) Nishimura และ Ohtsuru (1990) พบว่ากรดแอสคอร์บิกส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ การเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ส่งผลให้มีปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมดในเจลซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด มีค่าต่ำที่สุด บ่งชี้ถึงการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ที่สูงกว่า การเปลี่ยนแปลงของหมู่ไทออลของเจลที่ได้จากการให้ความร้อนเพื่อเซตตัวแสดงค่าที่มีแนวโน้มเหมือนกัน (รูปที่ 4.59C และ 4.59D) การ

เปลี่ยนแปลงปริมาณของหมู่ไทออลนั้น สอดคล้องกับคุณสมบัติเนื้อสัมผัส (textural properties) (รูปที่ 4.55 และ 4.56) จึงเป็นการยืนยันว่าการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ในเจลซูริมิ

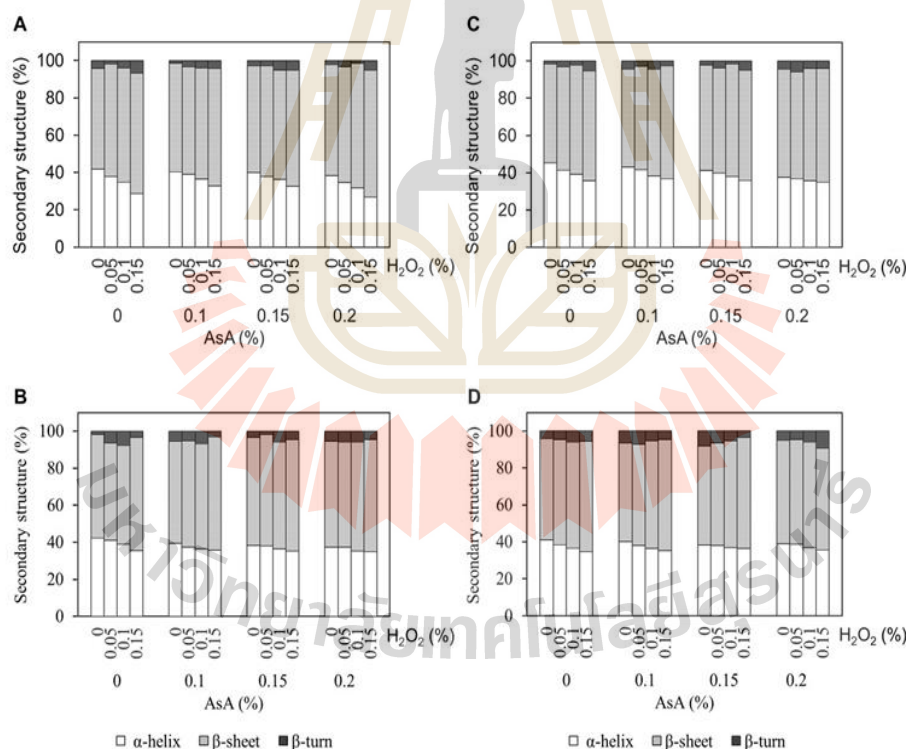


**รูปที่ 4.59** ปริมาณหมู่ซัลไฟด์ทั้งหมด (TSH) ของซูริมิจากปลาปากคม (A, C) และปลาทรายแดง (B, D) เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ที่ความเข้มข้นต่างกัน แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (A, B) และให้ความร้อนเพื่อเซตตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (C, D) <sup>a</sup> แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.9.3 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของโปรตีน

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนสามารถประมาณได้จากแบน amide I (1600-1700 cm<sup>-1</sup>) จาก FT-IR สเปกตรัม และยังพบแบนที่สำคัญซึ่งสัมพันธ์กับการสั่นแบบยืด (stretching) ของพันธะ C=O และ C-N การสั่นแบบงอ (bending) ของพันธะ C-C-N และ N-H (in-plane) ของหมู่เปปไทด์ (Herrero, 2008) โดยทั่วไปแบน amide I ให้ข้อมูลของโครงสร้างทุติยภูมิที่เลขคลื่น ดังนี้  $\alpha$ -helix (1650-1660 cm<sup>-1</sup>),  $\beta$ -sheet (1665-1680 cm<sup>-1</sup> และ 1614-1637 cm<sup>-1</sup>),  $\beta$ -

turn (1680-1690  $\text{cm}^{-1}$ ) และ random coil (1640-1642  $\text{cm}^{-1}$ ) (Cando, Herranz, Borderias, & Moreno, 2016; Liu et al., 2019) การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ลดปริมาณ  $\alpha$ -helix และเพิ่มปริมาณ  $\beta$ -sheet ของซูริมิเจลาจากปลาปากคมและปลาทรายแดง ที่ผลิตจากสภาวะการให้ความร้อนทั้ง 2 แบบ ในขณะที่การเติมกรดแอสคอร์บิกนั้นส่งผลน้อย ( $p < 0.05$ , รูปที่ 4.60) การเพิ่มปริมาณ  $\beta$ -sheet ในเจลาซูริมิ แสดงให้เห็นว่าเกิดพันธะไฮโดรเจนในเจลาซูริมิ (Kobayashi et al., 2017) ซึ่งสามารถใช้อธิบายถึงการเติมกรดแอสคอร์บิกที่ส่งผลเพียงเล็กน้อยต่อเนื้อสัมผัสของเจลา การเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ส่งผลทำให้โครงสร้าง  $\alpha$ -helix ลดลงอย่างชัดเจน ในตัวอย่างเจลาซูริมิทั้ง 2 ชนิด ( $p < 0.05$ ) ปริมาณ  $\beta$ -turn เพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อความเข้มข้นของสารเติมแต่งทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณ  $\alpha$ -helix และ  $\beta$ -sheet ของซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด หลังผ่านการให้ความร้อน มีค่าสูงกว่าเพสท (paste) ก่อนให้ความร้อน บ่งชี้ถึงการให้ความร้อนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิ



รูปที่ 4.60 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิซึ่งประมาณจาก FT-IR สเปกตรานของซูริมิจากปลาปากคม (A, C) และปลาทรายแดง (B, D) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (A, B) และให้ความร้อนเพื่อเซ็ดตัวที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ตามด้วยที่อุณหภูมิ 90

องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที (C, D) <sup>a</sup> แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.9.4 โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structures) ของโปรตีน

รามานสเปกตรัมที่  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  สัมพันธ์กับการสั่นแบบยืด (stretching) ของพันธะ C-H ได้แก่ การสั่นแบบไม่สมมาตร (asymmetric) ของ  $\text{CH}_2$  และการสั่นแบบสมมาตร (symmetric) ของ  $\text{CH}_3$  ที่อยู่ในโครงสร้างของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรง (aliphatic residues) ซึ่งให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเกิดแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions) ของ aliphatic residues (Li-Chan et al., 1994) การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.15% และ/หรือ กรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ส่งผลให้แบนของพันธะ C-H ที่  $2936\text{ cm}^{-1}$  ทั้งในเพสท (paste) ที่ยังไม่ผ่านความร้อนและเจลซูริมิของทุกตัวอย่างมีค่าลดลง ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.34 และ 4.35) บ่งชี้ให้เห็นว่าเกิด hydrophobic interactions เพิ่มขึ้น เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้แบนของการสั่นแบบยืดของพันธะ C-H แสดงที่  $2874$  และ  $2980\text{ cm}^{-1}$  ในปลาทั้งสองชนิดลดลง เมื่อเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ/หรือ กรดแอสคอร์บิก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ( $p < 0.05$ ) การลดลงของแบนที่เลขคลื่นใกล้กับ  $2878$ ,  $2936$  และ  $2980\text{ cm}^{-1}$  ที่สภาวะการให้ความร้อนทั้ง 2 แบบ บ่งชี้ถึงการเกิด hydrophobic interactions เช่นกัน เมื่อเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดแอสคอร์บิก

แบนของรามานที่  $1450\text{ cm}^{-1}$  บ่งชี้ถึงการสั่นแบบงอ (bending) ของพันธะ C-H การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.15% และ/หรือ กรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ส่งผลให้แบนของรามานที่  $1450\text{ cm}^{-1}$  ลดลง ทั้งในเพสทและเจลซูริมิของปลาทั้ง 2 ชนิด ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.34 และ 4.35) สามารถสันนิษฐานได้ว่าการเติมสารเติมแต่งนั้น ส่งเสริมให้โครงสร้างโปรตีนเปิดตัว Kobayashi และคณะ (2017) รายงานว่าการลดความเข้มของแบนที่  $1450\text{ cm}^{-1}$  บ่งชี้ถึงการเปิดตัวของโครงสร้างตติยภูมิของโปรตีน และการลดลงของพื้นที่แบนที่เลขคลื่น  $1450\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการเกิด hydrophobic interactions ที่เพิ่มขึ้นของ aliphatic residues จากผลของการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่า กรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่เพียงส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์เท่านั้น ยังทำให้เกิด hydrophobic interactions เพิ่มขึ้นอีกด้วย

นอกจากนี้ การเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ 0.15% และ/หรือ กรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ทำให้พื้นที่แบนของทริปโตเฟน (tryptophan, Trp) ที่  $757\text{ cm}^{-1}$  และไทโรซีน (tyrosine, Tyr) ที่  $1208\text{ cm}^{-1}$  ของซูริมิเพสทและเจลที่ได้รับการให้ความร้อนของปลาทั้ง 2 ชนิด ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

ควบคุม ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.34 และ 4.35) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า Tyr และ Phe ที่ถูกบดบัง (buried) อยู่ในโครงสร้างโปรตีน ถูกเปิดตัวออก (Li-Chan & Nakai, 1991) งานวิจัยนี้ยืนยันได้ว่า การเติมกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% ส่งเสริมให้โครงสร้างโปรตีนของซูริมิเปิดตัวออก

อัตราส่วนของ  $850/830 \text{ cm}^{-1}$  ของแบน Tyr (Tyr doublet ratio) เป็นตัวบ่งชี้ที่ตีถึงการเกิดพันธะไฮโดรเจนของ phenolic hydroxyl group ซึ่งติดตามได้จากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Tyr (Herrero, 2008) เมื่ออัตราส่วนนี้มีค่ามากกว่า 1.0 บ่งชี้ถึง Tyr เปิดตัวออก และทำหน้าที่เป็น hydrogen bond acceptor ในทางตรงกันข้ามเมื่ออัตราส่วนนี้มีค่าน้อยกว่า 1.0 บ่งชี้ถึง Tyr ถูกบดบัง (buried) ในโครงสร้างโปรตีน และทำหน้าที่เป็น hydrogen bond donor (Kobayashi et al., 2017) อัตราส่วนของแบน Tyr ของเจลจากปลาปากคมและปลาทรายแดง มีค่าน้อยกว่า 1.0 บ่งชี้ว่า Tyr residues ถูกบดบังภายใต้สภาวะที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic environment) เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 0.15% และกรดแอสคอร์บิกที่ 0.2% ส่งผลให้อัตราส่วนของแบน Tyr ในซูริมิเพศจากปลาทั้ง 2 ชนิด ลดลง ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.34 และ 4.35) นอกจากนี้ เจลที่ได้จากสภาวะการให้ความร้อนทั้ง 2 แบบ แสดงค่าอัตราส่วนของแบน Tyr ต่ำกว่าซูริมิเพศที่ยังไม่ผ่านความร้อน แต่พบว่าอัตราส่วนไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก และ/หรือ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า Tyr residues เกี่ยวข้องกับการเกิด hydrophobic interactions และ Tyr จะทำหน้าที่เป็น hydrogen bond donors ระหว่างกระบวนการเกิดเจล การเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ยังเป็นการส่งเสริมการเกิด hydrophobic interaction ของ Tyr ในเจลซูริมิ การเพิ่มของ hydrophobic interactions จากการเหนี่ยวนำของกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ยืนยันได้จากการลดลงของ integral area ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนทั้งหมดแบบสายตรง (total aliphatic residues) และแบบวง (total aromatic residues) ของซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 4.34 และ 4.35,  $p < 0.05$ ) งานวิจัยนี้จึงเป็นการรายงานผลครั้งแรก เกี่ยวกับการปรับปรุงคุณภาพเจลซูริมิจากปลาเขตร้อน โดยใช้กรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งส่งผลให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์และ hydrophobic interactions เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.34 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาปากคม ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA              |                     |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   |
| 2980                   | Paste   | 0.55 <sup>gh</sup>  | 0.44 <sup>cde</sup> | 0.30 <sup>b</sup>   | 0.18 <sup>a</sup>   | 0.53 <sup>fgh</sup> | 0.43 <sup>cde</sup> | 0.41 <sup>cde</sup> | 0.52 <sup>efg</sup> | 0.43 <sup>cde</sup> | 0.56 <sup>h</sup>   | 0.48 <sup>def</sup> | 0.46 <sup>cde</sup> | 0.35 <sup>ab</sup>  | 0.42 <sup>cde</sup> | 0.46 <sup>cde</sup> | 0.39 <sup>bcd</sup> |
|                        | DC gel  | 1.25 <sup>e</sup>   | 0.83 <sup>bcd</sup> | 0.86 <sup>bcd</sup> | 0.81 <sup>bcd</sup> | 0.98 <sup>d</sup>   | 1.82 <sup>bcd</sup> | 0.88 <sup>cd</sup>  | 0.71 <sup>ab</sup>  | 0.89 <sup>cd</sup>  | 0.84 <sup>bcd</sup> | 0.84 <sup>bcd</sup> | 0.65 <sup>a</sup>   | 0.81 <sup>bcd</sup> | 0.62 <sup>a</sup>   | 0.63 <sup>a</sup>   | 0.59 <sup>a</sup>   |
|                        | Set gel | 0.91 <sup>e</sup>   | 0.86 <sup>cde</sup> | 0.86 <sup>cde</sup> | 0.88 <sup>cde</sup> | 0.90 <sup>de</sup>  | 1.83 <sup>cde</sup> | 0.81 <sup>cde</sup> | 0.62 <sup>ab</sup>  | 0.75 <sup>c</sup>   | 0.78 <sup>cd</sup>  | 0.78 <sup>cd</sup>  | 0.58 <sup>a</sup>   | 0.57 <sup>a</sup>   | 0.74 <sup>cd</sup>  | 0.55 <sup>a</sup>   | 0.58 <sup>a</sup>   |
| 2936                   | Paste   | 3.00 <sup>e</sup>   | 2.85 <sup>de</sup>  | 2.96 <sup>e</sup>   | 2.71 <sup>bcd</sup> | 2.72 <sup>bcd</sup> | 2.45 <sup>ab</sup>  | 2.72 <sup>bcd</sup> | 2.57 <sup>abc</sup> | 2.77 <sup>cde</sup> | 2.74 <sup>bcd</sup> | 2.60 <sup>abc</sup> | 2.54 <sup>bcd</sup> | 2.61 <sup>abc</sup> | 2.47 <sup>ab</sup>  | 2.48 <sup>abc</sup> | 2.32 <sup>a</sup>   |
|                        | DC gel  | 3.45 <sup>e</sup>   | 3.42 <sup>de</sup>  | 3.39 <sup>cde</sup> | 3.33 <sup>bcd</sup> | 3.22 <sup>ab</sup>  | 3.34 <sup>bcd</sup> | 3.32 <sup>bcd</sup> | 3.27 <sup>bcd</sup> | 3.24 <sup>bcd</sup> | 3.34 <sup>bcd</sup> | 3.28 <sup>bcd</sup> | 3.34 <sup>bcd</sup> | 3.24 <sup>bc</sup>  | 3.39 <sup>cde</sup> | 3.21 <sup>ab</sup>  | 3.09 <sup>a</sup>   |
|                        | Set gel | 3.82 <sup>d</sup>   | 3.54 <sup>bcd</sup> | 3.41 <sup>abc</sup> | 3.62 <sup>cd</sup>  | 3.19 <sup>a</sup>   | 3.25 <sup>ab</sup>  | 3.28 <sup>bc</sup>  | 3.17 <sup>a</sup>   | 3.22 <sup>ab</sup>  | 3.16 <sup>a</sup>   | 3.06 <sup>a</sup>   | 3.07 <sup>a</sup>   | 3.26 <sup>bc</sup>  | 3.16 <sup>a</sup>   | 3.18 <sup>a</sup>   | 3.08 <sup>a</sup>   |
| 2874                   | Paste   | 0.97                | 0.74                | 0.76                | 0.80                | 0.73                | 0.67                | 0.77                | 0.78                | 0.78                | 0.76                | 0.69                | 0.75                | 0.69                | 0.84                | 0.70                | 0.74                |
|                        | DC gel  | 0.97 <sup>abc</sup> | 0.95 <sup>abc</sup> | 0.98 <sup>abc</sup> | 1.00 <sup>bcd</sup> | 1.07 <sup>cd</sup>  | 0.85 <sup>a</sup>   | 0.89 <sup>ab</sup>  | 0.94 <sup>abc</sup> | 1.02 <sup>bcd</sup> | 1.06 <sup>cd</sup>  | 1.10 <sup>d</sup>   | 0.89 <sup>ab</sup>  | 0.98 <sup>abc</sup> | 1.04 <sup>cd</sup>  | 1.07 <sup>cd</sup>  | 1.06 <sup>cd</sup>  |
|                        | Set gel | 1.13 <sup>bc</sup>  | 1.00 <sup>bc</sup>  | 1.00 <sup>bc</sup>  | 1.08 <sup>bc</sup>  | 1.04 <sup>bc</sup>  | 1.17 <sup>c</sup>   | 1.13 <sup>cd</sup>  | 1.13 <sup>cd</sup>  | 1.06 <sup>cd</sup>  | 0.79 <sup>b</sup>   | 0.96 <sup>c</sup>   | 1.02 <sup>cd</sup>  | 1.06 <sup>cd</sup>  | 1.03 <sup>cd</sup>  | 1.04 <sup>cd</sup>  | 0.96 <sup>c</sup>   |



ตารางที่ 4.34 (ต่อ) Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาปากคม ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA            |                    |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0%<br>$H_2O_2$    | 0.05%<br>$H_2O_2$  | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   |
| 1450                   | Paste   | 1.91 <sup>f</sup> | 1.78 <sup>ef</sup> | 1.72 <sup>def</sup> | 1.65 <sup>cde</sup> | 1.55 <sup>bcd</sup> | 1.48 <sup>abc</sup> | 1.48 <sup>abc</sup> | 1.40 <sup>abc</sup> | 1.41 <sup>abc</sup> | 1.47 <sup>abc</sup> | 1.34 <sup>ab</sup>  | 1.34 <sup>ab</sup>  | 1.24 <sup>a</sup>   | 1.43 <sup>abc</sup> | 1.35 <sup>ab</sup>  | 1.44 <sup>abc</sup> |
|                        | DC gel  | 2.04              | 2.05               | 2.04                | 2.09                | 1.84                | 2.00                | 1.96                | 1.82                | 1.89                | 1.91                | 1.95                | 1.81                | 1.87                | 1.81                | 2.05                | 1.96                |
|                        | Set gel | 2.00              | 1.93               | 1.92                | 1.92                | 1.72                | 1.60                | 1.77                | 1.78                | 1.85                | 1.93                | 1.88                | 1.78                | 1.72                | 1.78                | 1.95                | 1.85                |
| Total aliphatic        | Paste   | 7.29 <sup>f</sup> | 6.50 <sup>e</sup>  | 6.31 <sup>ef</sup>  | 5.67 <sup>abc</sup> | 6.13 <sup>cde</sup> | 5.77 <sup>abc</sup> | 5.95 <sup>abc</sup> | 5.89 <sup>abc</sup> | 5.89 <sup>abc</sup> | 6.06 <sup>bcd</sup> | 5.60 <sup>abc</sup> | 5.66 <sup>abc</sup> | 5.49 <sup>a</sup>   | 5.63 <sup>abc</sup> | 5.57 <sup>ab</sup>  | 5.51 <sup>ab</sup>  |
|                        | DC gel  | 8.68 <sup>f</sup> | 7.97 <sup>e</sup>  | 7.69 <sup>bcd</sup> | 7.98 <sup>e</sup>   | 7.84 <sup>cd</sup>  | 7.72 <sup>cde</sup> | 7.78 <sup>cde</sup> | 7.51 <sup>abc</sup> | 7.72 <sup>cde</sup> | 7.75 <sup>cde</sup> | 7.95 <sup>e</sup>   | 7.18 <sup>a</sup>   | 7.44 <sup>abc</sup> | 7.60 <sup>bcd</sup> | 7.63 <sup>bcd</sup> | 7.30 <sup>ab</sup>  |
|                        | Set gel | 8.64 <sup>e</sup> | 8.21 <sup>de</sup> | 8.03 <sup>cd</sup>  | 8.29 <sup>de</sup>  | 7.55 <sup>bc</sup>  | 7.63 <sup>bc</sup>  | 7.63 <sup>bc</sup>  | 7.45 <sup>bc</sup>  | 5.78 <sup>bc</sup>  | 5.34 <sup>ab</sup>  | 7.31 <sup>ab</sup>  | 6.84 <sup>a</sup>   | 7.29 <sup>ab</sup>  | 7.47 <sup>bc</sup>  | 7.45 <sup>bc</sup>  | 7.10 <sup>c</sup>   |

Total aliphatic คือ ผลรวมของ bands area ของรามานสเปกตราที่ 2980, 2936, 2874, และ 1450  $cm^{-1}$ , C = control sample, และ DC = directly cooked

<sup>a</sup>แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.34 (ต่อ) Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาปากคม ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA             |                     |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0% $H_2O_2$        | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      |
| 1208                   | Paste   | 0.21               | 0.17                | 0.19                | 0.07                | 0.13                | 0.17                | 0.25                | 0.19                | 0.18                | 0.17                | 0.10                | 0.13                | 0.21                | 0.14                | 0.20                | 0.16                |
|                        | DC gel  | 0.18               | 0.08                | 0.15                | 0.06                | 0.13                | 0.16                | 0.15                | 0.10                | 0.14                | 0.17                | 0.17                | 0.18                | 0.16                | 0.11                | 0.10                | 0.12                |
|                        | Set gel | 0.22               | 0.16                | 0.19                | 0.19                | 0.20                | 0.23                | 0.12                | 0.17                | 0.13                | 0.15                | 0.16                | 0.17                | 0.12                | 0.24                | 0.17                | 0.14                |
| 757                    | Paste   | 0.22 <sup>e</sup>  | 0.14 <sup>cde</sup> | 0.09 <sup>abc</sup> | 0.06 <sup>ab</sup>  | 0.08 <sup>abc</sup> | 0.10 <sup>abc</sup> | 0.11 <sup>abc</sup> | 0.06 <sup>ab</sup>  | 0.04 <sup>a</sup>   | 0.06 <sup>ab</sup>  | 0.11 <sup>abc</sup> | 0.08 <sup>abc</sup> | 0.06 <sup>ab</sup>  | 0.17 <sup>de</sup>  | 0.14 <sup>bcd</sup> | 0.11 <sup>abc</sup> |
|                        | DC gel  | 0.19               | 0.14                | 0.15                | 0.16                | 0.16                | 0.20                | 0.18                | 0.17                | 0.15                | 0.17                | 0.09                | 0.09                | 0.10                | 0.13                | 0.16                | 0.14                |
|                        | Set gel | 0.31 <sup>e</sup>  | 0.28 <sup>e</sup>   | 0.23 <sup>de</sup>  | 0.15 <sup>bcd</sup> | 0.23 <sup>de</sup>  | 0.24 <sup>de</sup>  | 0.28 <sup>e</sup>   | 0.18 <sup>bcd</sup> | 0.18 <sup>bcd</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.15 <sup>bcd</sup> | 0.12 <sup>b</sup>   | 0.14 <sup>ab</sup>  | 0.12 <sup>b</sup>   | 0.14 <sup>ab</sup>  | 0.12 <sup>a</sup>   |
| 850/830                | Paste   | 0.98 <sup>e</sup>  | 0.63 <sup>bcd</sup> | 0.94 <sup>de</sup>  | 0.41 <sup>abc</sup> | 0.33 <sup>abc</sup> | 0.48 <sup>abc</sup> | 0.53 <sup>abc</sup> | 0.42 <sup>abc</sup> | 0.56 <sup>abc</sup> | 0.27 <sup>a</sup>   | 0.43 <sup>abc</sup> | 0.66 <sup>cd</sup>  | 0.53 <sup>abc</sup> | 0.54 <sup>abc</sup> | 0.30 <sup>ab</sup>  | 0.54 <sup>abc</sup> |
|                        | DC gel  | 0.74 <sup>cd</sup> | 0.32 <sup>a</sup>   | 0.30 <sup>a</sup>   | 0.37 <sup>a</sup>   | 0.74 <sup>cd</sup>  | 0.80 <sup>d</sup>   | 0.35 <sup>a</sup>   | 0.39 <sup>a</sup>   | 0.61 <sup>ab</sup>  | 0.43 <sup>ab</sup>  | 0.64 <sup>cd</sup>  | 0.80 <sup>d</sup>   | 0.44 <sup>ab</sup>  | 0.66 <sup>cd</sup>  | 0.43 <sup>ab</sup>  | 0.43 <sup>ab</sup>  |
|                        | Set gel | 0.54               | 0.53                | 0.67                | 0.63                | 0.55                | 0.48                | 0.37                | 0.47                | 0.37                | 0.41                | 0.46                | 0.45                | 0.59                | 0.29                | 0.63                | 0.47                |

|                |         |                    |                    |                    |                   |                     |                   |                     |                   |                    |                     |                     |                   |                     |                     |                     |                    |
|----------------|---------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|
| Total aromatic | Paste   | 2.36               | 1.91               | 1.86               | 1.82              | 2.20                | 2.00              | 2.19                | 1.81              | 1.67               | 2.03                | 2.20                | 1.76              | 1.83                | 1.81                | 2.09                | 1.86               |
|                | DC gel  | 2.50 <sup>cd</sup> | 2.22 <sup>ab</sup> | 2.18 <sup>ab</sup> | 2.12 <sup>a</sup> | 2.34 <sup>abc</sup> | 2.87 <sup>e</sup> | 2.41 <sup>bcd</sup> | 2.88 <sup>e</sup> | 2.63 <sup>de</sup> | 2.46 <sup>bcd</sup> | 2.46 <sup>bcd</sup> | 2.14 <sup>a</sup> | 2.36 <sup>abc</sup> | 2.23 <sup>abc</sup> | 2.42 <sup>bcd</sup> | 2.20 <sup>ab</sup> |
|                | Set gel | 2.81               | 2.63               | 2.45               | 2.67              | 2.60                | 2.80              | 2.67                | 2.49              | 2.51               | 2.06                | 2.10                | 2.06              | 2.28                | 2.37                | 2.40                | 2.22               |

Total aromatic คือ ผลรวมของ bands area ของรามานสเปกตรัมที่ 1280, 757, 2874, อัตราส่วนของ 850 และ 830  $\text{cm}^{-1}$ , C = control sample, และ DC = directly cooked

<sup>a</sup>แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ตารางที่ 4.35 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาทรายแดงที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ )

ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA              |                     |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA           |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$     | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   |
| 2980                   | Paste   | 0.55 <sup>g</sup>   | 0.45 <sup>f</sup>   | 0.43 <sup>ef</sup>  | 0.41 <sup>def</sup> | 0.37 <sup>def</sup> | 0.36 <sup>cde</sup> | 0.36 <sup>cde</sup> | 0.20 <sup>a</sup>   | 0.34 <sup>abc</sup> | 0.37 <sup>def</sup> | 0.39 <sup>def</sup> | 0.33 <sup>bcd</sup> | 0.28 <sup>bc</sup> | 0.34 <sup>bcd</sup> | 0.35 <sup>bcd</sup> | 0.26 <sup>ab</sup>  |
|                        | DC gel  | 1.76 <sup>d</sup>   | 0.71 <sup>d</sup>   | 0.61 <sup>bc</sup>  | 0.61 <sup>bc</sup>  | 0.76 <sup>d</sup>   | 1.72 <sup>d</sup>   | 0.84 <sup>e</sup>   | 0.76 <sup>d</sup>   | 0.64 <sup>c</sup>   | 0.60 <sup>cd</sup>  | 0.56 <sup>ab</sup>  | 0.52 <sup>a</sup>   | 0.55 <sup>ab</sup> | 0.49 <sup>a</sup>   | 0.52 <sup>a</sup>   | 0.51 <sup>a</sup>   |
|                        | Set gel | 1.77 <sup>e</sup>   | 0.66 <sup>cde</sup> | 0.63 <sup>bcd</sup> | 0.57 <sup>ab</sup>  | 0.74 <sup>de</sup>  | 1.73 <sup>de</sup>  | 0.72 <sup>cde</sup> | 0.68 <sup>cde</sup> | 0.62 <sup>bcd</sup> | 0.63 <sup>bcd</sup> | 0.66 <sup>cde</sup> | 0.58 <sup>bc</sup>  | 0.58 <sup>ab</sup> | 0.57 <sup>ab</sup>  | 0.56 <sup>ab</sup>  | 0.49 <sup>a</sup>   |
| 2936                   | Paste   | 2.56 <sup>bcd</sup> | 2.32 <sup>bcd</sup> | 2.22 <sup>ab</sup>  | 2.18 <sup>a</sup>   | 2.55 <sup>cd</sup>  | 2.48 <sup>bcd</sup> | 2.47 <sup>bcd</sup> | 2.36 <sup>bcd</sup> | 2.62 <sup>cd</sup>  | 2.63 <sup>d</sup>   | 2.55 <sup>bcd</sup> | 2.47 <sup>bcd</sup> | 2.65 <sup>d</sup>  | 2.37 <sup>bcd</sup> | 2.30 <sup>bcd</sup> | 2.28 <sup>abc</sup> |
|                        | DC gel  | 3.03 <sup>c</sup>   | 2.96 <sup>bc</sup>  | 2.74 <sup>ab</sup>  | 2.61 <sup>a</sup>   | 3.04 <sup>c</sup>   | 2.91 <sup>bc</sup>  | 3.06 <sup>c</sup>   | 3.04 <sup>c</sup>   | 3.05 <sup>c</sup>   | 3.03 <sup>c</sup>   | 3.05 <sup>c</sup>   | 3.08 <sup>c</sup>   | 2.74 <sup>ab</sup> | 3.09 <sup>c</sup>   | 3.04 <sup>c</sup>   | 3.00 <sup>bc</sup>  |
|                        | Set gel | 3.23 <sup>d</sup>   | 2.93 <sup>ab</sup>  | 2.99 <sup>abc</sup> | 2.92 <sup>abc</sup> | 3.08 <sup>bc</sup>  | 3.02 <sup>abc</sup> | 3.05 <sup>bc</sup>  | 3.07 <sup>bc</sup>  | 3.06 <sup>bc</sup>  | 3.00 <sup>abc</sup> | 3.01 <sup>abc</sup> | 3.04 <sup>bc</sup>  | 3.05 <sup>bc</sup> | 2.87 <sup>a</sup>   | 3.03 <sup>bc</sup>  | 3.05 <sup>bc</sup>  |
| 2874                   | Paste   | 0.65 <sup>cd</sup>  | 0.60 <sup>bc</sup>  | 0.56 <sup>ab</sup>  | 0.53 <sup>a</sup>   | 0.62 <sup>bc</sup>  | 0.68 <sup>cd</sup>  | 0.72 <sup>d</sup>   | 0.67 <sup>cd</sup>  | 0.64 <sup>cd</sup>  | 0.63 <sup>bc</sup>  | 0.61 <sup>bc</sup>  | 0.65 <sup>cd</sup>  | 0.63 <sup>bc</sup> | 0.83 <sup>e</sup>   | 0.63 <sup>bc</sup>  | 0.65 <sup>cd</sup>  |
|                        | DC gel  | 0.95                | 0.89                | 0.83                | 0.84                | 0.83                | 0.74                | 0.89                | 0.70                | 0.83                | 0.83                | 0.86                | 0.76                | 0.83               | 0.79                | 0.84                | 0.85                |
|                        | Set gel | 1.06 <sup>c</sup>   | 0.84 <sup>ab</sup>  | 0.85 <sup>ab</sup>  | 0.78 <sup>a</sup>   | 0.85 <sup>ab</sup>  | 0.84 <sup>ab</sup>  | 0.87 <sup>ab</sup>  | 0.89 <sup>ab</sup>  | 0.83 <sup>ab</sup>  | 0.93 <sup>b</sup>   | 0.80 <sup>ab</sup>  | 0.78 <sup>a</sup>   | 0.81 <sup>ab</sup> | 0.81 <sup>ab</sup>  | 0.88 <sup>ab</sup>  | 0.87 <sup>ab</sup>  |

ตารางที่ 4.35 (ต่อ) Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาทรายแดงที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA             |                     |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0%<br>$H_2O_2$     | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   | 0%<br>$H_2O_2$      | 0.05%<br>$H_2O_2$   | 0.1%<br>$H_2O_2$    | 0.15%<br>$H_2O_2$   |
| 1450                   | Paste   | 1.66               | 1.63                | 1.63                | 1.64                | 1.64                | 1.79                | 1.85                | 1.80                | 1.80                | 1.60                | 1.66                | 1.70                | 1.78                | 1.79                | 1.70                | 1.63                |
|                        | DC gel  | 2.18 <sup>ef</sup> | 2.26 <sup>f</sup>   | 2.14 <sup>e</sup>   | 1.76 <sup>a</sup>   | 2.11 <sup>de</sup>  | 2.08 <sup>de</sup>  | 2.05 <sup>de</sup>  | 2.12 <sup>de</sup>  | 1.79 <sup>ab</sup>  | 1.74 <sup>a</sup>   | 1.69 <sup>a</sup>   | 1.99 <sup>cd</sup>  | 1.88 <sup>bc</sup>  | 2.11 <sup>de</sup>  | 2.10 <sup>de</sup>  | 2.05 <sup>de</sup>  |
|                        | Set gel | 2.30 <sup>e</sup>  | 2.02 <sup>bcd</sup> | 2.08 <sup>e</sup>   | 1.98 <sup>abc</sup> | 2.24 <sup>de</sup>  | 2.11 <sup>cde</sup> | 2.13 <sup>cde</sup> | 2.08 <sup>cde</sup> | 2.02 <sup>bcd</sup> | 1.96 <sup>abc</sup> | 2.04 <sup>bcd</sup> | 1.96 <sup>abc</sup> | 1.87 <sup>abc</sup> | 2.06 <sup>cde</sup> | 1.97 <sup>abc</sup> | 1.84 <sup>a</sup>   |
| Total aliphatic        | Paste   | 6.29 <sup>f</sup>  | 5.71 <sup>bcd</sup> | 5.58 <sup>abc</sup> | 5.49 <sup>ab</sup>  | 5.99 <sup>def</sup> | 5.92 <sup>def</sup> | 6.18 <sup>ef</sup>  | 5.73 <sup>bcd</sup> | 6.13 <sup>def</sup> | 5.80 <sup>cde</sup> | 5.78 <sup>cde</sup> | 5.77 <sup>cde</sup> | 5.90 <sup>def</sup> | 5.89 <sup>def</sup> | 5.58 <sup>abc</sup> | 5.26 <sup>a</sup>   |
|                        | DC gel  | 7.63 <sup>h</sup>  | 7.55 <sup>gh</sup>  | 7.05 <sup>def</sup> | 6.52 <sup>a</sup>   | 7.42 <sup>fgh</sup> | 7.21 <sup>def</sup> | 7.57 <sup>gh</sup>  | 7.31 <sup>fgh</sup> | 6.83 <sup>abc</sup> | 6.84 <sup>bcd</sup> | 6.80 <sup>bc</sup>  | 6.90 <sup>bcd</sup> | 6.64 <sup>ab</sup>  | 7.07 <sup>def</sup> | 7.12 <sup>def</sup> | 6.99 <sup>cde</sup> |
|                        | Set gel | 8.42 <sup>f</sup>  | 7.16 <sup>bcd</sup> | 7.28 <sup>bcd</sup> | 6.79 <sup>a</sup>   | 7.70 <sup>e</sup>   | 7.36 <sup>de</sup>  | 7.42 <sup>de</sup>  | 7.32 <sup>cd</sup>  | 7.20 <sup>bcd</sup> | 7.14 <sup>bcd</sup> | 7.15 <sup>bcd</sup> | 6.95 <sup>bde</sup> | 6.91 <sup>bc</sup>  | 7.10 <sup>bcd</sup> | 7.20 <sup>bcd</sup> | 6.95 <sup>abc</sup> |

Total aliphatic คือ ผลรวมของ bands area ของรามานสเปกตราที่ 2980, 2936, 2874, และ 1450  $cm^{-1}$ , C = control sample, และ DC = directly cooked

<sup>a</sup>แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ 4.35 (ต่อ) Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของรามานสเปกตราของซูริมิจากปลาทรายแดงที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |         | 0% AsA              |                     |                     |                     | 0.1% AsA            |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |
|------------------------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |         | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      |
| 1208                   | Paste   | 0.15                | 0.18                | 0.20                | 0.14                | 0.16                | 0.19                | 0.24                | 0.15                | 0.15                | 0.11                | 0.06                | 0.16                | 0.13                | 0.18                | 0.18                | 0.14                |
|                        | DC gel  | 0.21 <sup>cde</sup> | 0.26 <sup>e</sup>   | 0.23 <sup>de</sup>  | 0.18 <sup>bcd</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.15 <sup>abc</sup> | 0.10 <sup>a</sup>   | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.12 <sup>ab</sup>  | 0.10 <sup>a</sup>   | 0.17 <sup>bcd</sup> | 0.14 <sup>ab</sup>  | 0.18 <sup>bcd</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.12 <sup>ab</sup>  |
|                        | Set gel | 0.23 <sup>de</sup>  | 0.15 <sup>abc</sup> | 0.18 <sup>cde</sup> | 0.18 <sup>cde</sup> | 0.19 <sup>cde</sup> | 0.09 <sup>ab</sup>  | 0.15 <sup>abc</sup> | 0.15 <sup>abc</sup> | 0.10 <sup>ab</sup>  | 0.14 <sup>abc</sup> | 0.12 <sup>abc</sup> | 0.10 <sup>ab</sup>  | 0.13 <sup>abc</sup> | 0.15 <sup>abc</sup> | 0.25 <sup>e</sup>   | 0.19 <sup>cde</sup> |
| 757                    | Paste   | 0.10 <sup>cde</sup> | 0.10 <sup>cde</sup> | 0.6 <sup>abc</sup>  | 0.13 <sup>def</sup> | 0.14 <sup>ef</sup>  | 0.19 <sup>f</sup>   | 0.13 <sup>def</sup> | 0.13 <sup>def</sup> | 0.07 <sup>bcd</sup> | 0.02 <sup>a</sup>   | 0.12 <sup>cde</sup> | 0.10 <sup>cde</sup> | 0.05 <sup>ab</sup>  | 0.13 <sup>def</sup> | 0.12 <sup>de</sup>  | 0.10 <sup>cde</sup> |
|                        | DC gel  | 0.15                | 0.17                | 0.15                | 0.19                | 0.17                | 0.07                | 0.14                | 0.10                | 0.04                | 0.14                | 0.11                | 0.15                | 0.15                | 0.09                | 0.26                | 0.11                |
|                        | Set gel | 0.32 <sup>d</sup>   | 0.26 <sup>d</sup>   | 0.17 <sup>c</sup>   | 0.14 <sup>bc</sup>  | 0.17 <sup>c</sup>   | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.05 <sup>a</sup>   | 0.14 <sup>bc</sup>  | 0.09 <sup>ab</sup>  | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.15 <sup>bc</sup>  | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.15 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.15 <sup>bc</sup>  |
| 850/830                | Paste   | 0.80 <sup>d</sup>   | 0.38 <sup>ab</sup>  | 0.51 <sup>abc</sup> | 0.49 <sup>abc</sup> | 0.41 <sup>abc</sup> | 0.48 <sup>abc</sup> | 0.66 <sup>cd</sup>  | 0.46 <sup>abc</sup> | 0.40 <sup>abc</sup> | 0.60 <sup>bcd</sup> | 0.32 <sup>a</sup>   | 0.27 <sup>a</sup>   | 0.30 <sup>a</sup>   | 0.36 <sup>ab</sup>  | 0.62 <sup>bcd</sup> | 0.50 <sup>abc</sup> |
|                        | DC gel  | 0.37                | 0.41                | 0.29                | 0.31                | 0.46                | 0.49                | 0.31                | 0.32                | 0.36                | 0.38                | 0.42                | 0.37                | 0.57                | 0.39                | 0.41                | 0.24                |
|                        | Set gel | 0.55                | 0.32                | 0.64                | 0.46                | 0.48                | 0.39                | 0.29                | 0.42                | 0.49                | 0.41                | 0.37                | 0.32                | 0.42                | 0.44                | 0.43                | 0.43                |

|                |         |                   |                     |                    |                    |                    |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                    |                     |                     |                     |                     |
|----------------|---------|-------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| Total aromatic | Paste   | 1.97              | 1.64                | 1.73               | 1.73               | 1.99               | 2.30                | 2.23                | 1.85                | 1.90                | 1.53                | 1.75                | 1.77               | 1.79                | 1.95                | 2.16                | 2.00                |
|                | DC gel  | 2.81 <sup>d</sup> | 2.60 <sup>bcd</sup> | 2.71 <sup>d</sup>  | 2.35 <sup>ab</sup> | 2.64 <sup>cd</sup> | 2.43 <sup>abc</sup> | 2.25 <sup>a</sup>   | 2.32 <sup>a</sup>   | 2.28 <sup>a</sup>   | 2.23 <sup>a</sup>   | 2.32 <sup>a</sup>   | 2.37 <sup>ab</sup> | 2.64 <sup>cd</sup>  | 2.28 <sup>a</sup>   | 2.26 <sup>a</sup>   | 2.22 <sup>a</sup>   |
|                | Set gel | 3.26 <sup>f</sup> | 2.59 <sup>de</sup>  | 2.46 <sup>cd</sup> | 2.10 <sup>a</sup>  | 2.74 <sup>cd</sup> | 2.29 <sup>abc</sup> | 2.30 <sup>abc</sup> | 2.36 <sup>bcd</sup> | 2.38 <sup>bcd</sup> | 2.32 <sup>abc</sup> | 2.22 <sup>abc</sup> | 2.15 <sup>ab</sup> | 2.17 <sup>abc</sup> | 2.47 <sup>bcd</sup> | 2.32 <sup>abc</sup> | 2.24 <sup>abc</sup> |

Total aromatic คือ ผลรวมของ bands area ของรามานสเปกตรัมที่ 1280, 757, 2874, อัตราส่วนของ 850 และ 830  $\text{cm}^{-1}$ , C = control sample, และ DC = directly cooked

<sup>a</sup>แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



#### 4.9.5 พันธะไดซัลไฟด์

รามานสเปกตราก็เลขคลื่นเฉพาะบ่งชี้ถึงพันธะไดซัลไฟด์อยู่ในช่วง  $500-550\text{ cm}^{-1}$  ได้แก่  $g-g$ ,  $g-g-t$ , และ  $t-g-t$  ซึ่ง “ $g$ ” และ “ $t$ ” หมายถึง gauche และ trans ตามลำดับ (Li-Chan et al., 1994) แบนที่  $525$  และ  $540\text{ cm}^{-1}$  แสดงถึงการจัดเรียงตัว (conformation) ในรูป  $g-g-t$  และ  $t-g-t$  ตามลำดับ Xu, Han, Fei, และ Zhou (2011) รายงานว่า แบนที่ใกล้เคียง  $530\text{ cm}^{-1}$  เพิ่มขึ้น และ  $545\text{ cm}^{-1}$  ลดลงเมื่อโปรตีนในปลาเกิดการสูญเสียสภาพทางความร้อน (thermal denaturation) การสั่นแบบยืด (stretching) ของพันธะไดซัลไฟด์อยู่ที่ประมาณ  $525$  และ  $540\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งพบในซูริมิเฟสและเจลจากปลาทั้ง 2 ชนิด (ตารางที่ 4.36) อย่างไรก็ตาม แบนที่  $510\text{ cm}^{-1}$  ในทุกตัวอย่างนั้น หายไปหลังจากเติมสารเติมแต่ง (ไม่ได้แสดงข้อมูล) Zhang, Li, Wang, Xue, และ Xue (2016) รายงานว่าการลดลงของแบนใกล้เคียง  $508\text{ cm}^{-1}$  หลังจากกระบวนการเกิดเจล แต่ยังคงพบแบนนี้ในโปรตีนดั้งเดิมตามธรรมชาติก่อนให้ความร้อน (native protein) (Uddin & Okazaki, 2010) การหายไปของแบนนี้ บ่งชี้ว่าเกิดการเสถียรภาพของโปรตีน จากการเติมกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และจากกระบวนการเกิดเจล (gelation) การเติมกรดแอสคอร์บิกที่  $0.2\%$  และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่  $0.15\%$  ส่งผลให้พื้นที่แบนที่ประมาณ  $525\text{ cm}^{-1}$  ของซูริมิ ทุกตัวอย่าง มีค่าเพิ่มขึ้น ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ไม่มีผลต่อพื้นที่แบนที่  $540\text{ cm}^{-1}$  จากผลการวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่ากรดแอสคอร์บิก และ/หรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ในโครงร่างแบบ  $g-g-t$  นอกจากนี้ พันธะไดซัลไฟด์ทั้งหมดในซูริมิเฟส (surimi paste) จากปลาปากคมเพิ่มขึ้น เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $p < 0.05$ , ตารางที่ 4.36) แต่การเปลี่ยนแปลงพันธะไดซัลไฟด์ในเจลเกิดขึ้นเล็กน้อย ในทางตรงกันข้าม สารเติมแต่งทั้ง 2 ชนิด ส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ในซูริมิเฟสและเจลจากปลาทรายแดง ( $p < 0.05$ ) ผลงานวิจัยนี้ บ่งชี้ว่ากรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ส่งเสริมให้เกิดพันธะ ไดซัลไฟด์ในเจลจากปลาทรายแดง โดยเฉพาะเมื่อให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) ที่อุณหภูมิ  $90$  องศาเซลเซียส



ตารางที่ 4.36 Integral area ( $\times 10^{-3}$ ) ของพันธะไดซัลไฟด์ของซูริมิเพสทและเจลจากปลาปากคมและปลาทรายแดง ที่มีความเข้มข้นกรดแอสคอร์บิก (AsA) และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ต่างกัน

| เลขคลื่น ( $cm^{-1}$ ) |             | 0% AsA      |                     |                     |                     | 0.1% AsA          |                     |                     |                     | 0.15% AsA           |                     |                     |                     | 0.2% AsA            |                     |                     |                     |                     |
|------------------------|-------------|-------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                        |             | 0% $H_2O_2$ | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$       | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      | 0% $H_2O_2$         | 0.05% $H_2O_2$      | 0.1% $H_2O_2$       | 0.15% $H_2O_2$      |                     |
| LZ                     | 540 $\pm$ 5 | Paste       | 0.17                | 0.14                | 0.15                | 0.14              | 0.14                | 0.14                | 0.15                | 0.14                | 0.13                | 0.11                | 0.12                | 0.14                | 0.06                | 0.11                | 0.12                | 0.08                |
|                        |             | DC gel      | 0.13                | 0.06                | 0.08                | 0.08              | 0.10                | 0.13                | 0.12                | 0.10                | 0.10                | 0.09                | 0.09                | 0.11                | 0.09                | 0.09                | 0.10                | 0.09                |
|                        |             | Set gel     | 0.20                | 0.12                | 0.14                | 0.15              | 0.16                | 0.14                | 0.10                | 0.08                | 0.12                | 0.13                | 0.13                | 0.12                | 0.06                | 0.11                | 0.12                | 0.11                |
|                        | 525 $\pm$ 5 | Paste       | 0.19 <sup>abc</sup> | 0.25 <sup>cd</sup>  | 0.26 <sup>cd</sup>  | 0.29 <sup>d</sup> | 0.13 <sup>a</sup>   | 0.19 <sup>abc</sup> | 0.26 <sup>cd</sup>  | 0.24 <sup>bcd</sup> | 0.27 <sup>cd</sup>  | 0.24 <sup>bcd</sup> | 0.24 <sup>bcd</sup> | 0.15 <sup>a</sup>   | 0.14 <sup>a</sup>   | 0.17 <sup>ab</sup>  | 0.29 <sup>d</sup>   | 0.29 <sup>d</sup>   |
|                        |             | DC gel      | 0.16                | 0.17                | 0.24                | 0.24              | 0.15                | 0.21                | 0.19                | 0.22                | 0.18                | 0.22                | 0.21                | 0.22                | 0.23                | 0.17                | 0.17                | 0.24                |
|                        |             | Set gel     | 0.12 <sup>a</sup>   | 0.14 <sup>abc</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.24 <sup>f</sup> | 0.17 <sup>bcd</sup> | 0.14 <sup>abc</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.16 <sup>bcd</sup> | 0.17 <sup>abc</sup> | 0.22 <sup>def</sup> | 0.21 <sup>def</sup> | 0.19 <sup>def</sup> | 0.23 <sup>def</sup> | 0.19 <sup>def</sup> | 0.20 <sup>def</sup> | 0.23 <sup>ef</sup>  |
|                        | Total       | Paste       | 0.35 <sup>cde</sup> | 0.39 <sup>cde</sup> | 0.41 <sup>e</sup>   | 0.43 <sup>e</sup> | 0.27 <sup>ab</sup>  | 0.33 <sup>cde</sup> | 0.41 <sup>cde</sup> | 0.38 <sup>cde</sup> | 0.40 <sup>cde</sup> | 0.36 <sup>cde</sup> | 0.37 <sup>cde</sup> | 0.30 <sup>bcd</sup> | 0.20 <sup>a</sup>   | 0.28 <sup>abc</sup> | 0.41 <sup>de</sup>  | 0.38 <sup>cde</sup> |
|                        |             | DC gel      | 0.29                | 0.23                | 0.32                | 0.32              | 0.25                | 0.34                | 0.31                | 0.32                | 0.28                | 0.31                | 0.30                | 0.33                | 0.31                | 0.26                | 0.27                | 0.33                |
|                        |             | Set gel     | 0.32                | 0.27                | 0.31                | 0.38              | 0.32                | 0.27                | 0.26                | 0.25                | 0.30                | 0.35                | 0.34                | 0.31                | 0.29                | 0.30                | 0.32                | 0.34                |

|    |       |         |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|----|-------|---------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| TB | 540±5 | Paste   | 0.10                | 0.08                | 0.11                | 0.18                | 0.14                | 0.10                | 0.14                | 0.11                | 0.13                | 0.08                | 0.09                | 0.12                | 0.11                | 0.14                | 0.13                | 0.13                |                     |
|    |       | DC gel  | 0.20 <sup>d</sup>   | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.17 <sup>cd</sup>  | 0.17 <sup>cd</sup>  | 0.11 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.09 <sup>ab</sup>  | 0.04 <sup>a</sup>   | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.14 <sup>bcd</sup> | 0.12 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.11 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.13 <sup>bc</sup>  | 0.14 <sup>bcd</sup> |
|    |       | Set gel | 0.17                | 0.17                | 0.16                | 0.13                | 0.14                | 0.12                | 0.16                | 0.15                | 0.12                | 0.11                | 0.08                | 0.11                | 0.13                | 0.16                | 0.10                | 0.14                |                     |
|    | 525±5 | Paste   | 0.16 <sup>ab</sup>  | 0.14 <sup>a</sup>   | 0.26 <sup>efg</sup> | 0.29 <sup>fg</sup>  | 0.23 <sup>def</sup> | 0.22 <sup>cde</sup> | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.26 <sup>efg</sup> | 0.27 <sup>efg</sup> | 0.20 <sup>abc</sup> | 0.16 <sup>ab</sup>  | 0.21 <sup>bcd</sup> | 0.31 <sup>g</sup>   | 0.22 <sup>bcd</sup> | 0.27 <sup>efg</sup> | 0.26 <sup>efg</sup> |                     |
|    |       | DC gel  | 0.14 <sup>a</sup>   | 0.21 <sup>abc</sup> | 0.24 <sup>cde</sup> | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.18 <sup>abc</sup> | 0.15 <sup>a</sup>   | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.16 <sup>ab</sup>  | 0.23 <sup>cd</sup>  | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.25 <sup>efg</sup> | 0.30 <sup>efg</sup> | 0.31 <sup>fg</sup>  | 0.16 <sup>ab</sup>  | 0.32 <sup>g</sup>   |                     |
|    |       | Set gel | 0.16 <sup>abc</sup> | 0.13 <sup>a</sup>   | 0.19 <sup>cde</sup> | 0.20 <sup>cde</sup> | 0.24 <sup>def</sup> | 0.28 <sup>ef</sup>  | 0.19 <sup>cde</sup> | 0.31 <sup>f</sup>   | 0.15 <sup>ab</sup>  | 0.17 <sup>bcd</sup> | 0.23 <sup>def</sup> | 0.27 <sup>ef</sup>  | 0.25 <sup>def</sup> | 0.17 <sup>bcd</sup> | 0.24 <sup>def</sup> | 0.27 <sup>ef</sup>  |                     |
|    | Total | Paste   | 0.27 <sup>bcd</sup> | 0.22 <sup>a</sup>   | 0.37 <sup>def</sup> | 0.47 <sup>f</sup>   | 0.36 <sup>def</sup> | 0.32 <sup>cde</sup> | 0.39 <sup>def</sup> | 0.37 <sup>def</sup> | 0.40 <sup>ef</sup>  | 0.27 <sup>bcd</sup> | 0.25 <sup>ab</sup>  | 0.33 <sup>cde</sup> | 0.42 <sup>ef</sup>  | 0.36 <sup>def</sup> | 0.40 <sup>ef</sup>  | 0.39 <sup>def</sup> |                     |
|    |       | DC gel  | 0.34 <sup>cde</sup> | 0.33 <sup>bcd</sup> | 0.41 <sup>efg</sup> | 0.42 <sup>efg</sup> | 0.29 <sup>bc</sup>  | 0.28 <sup>b</sup>   | 0.34 <sup>cde</sup> | 0.20 <sup>a</sup>   | 0.35 <sup>def</sup> | 0.39 <sup>efg</sup> | 0.38 <sup>efg</sup> | 0.38 <sup>efg</sup> | 0.41 <sup>efg</sup> | 0.44 <sup>ef</sup>  | 0.29 <sup>bc</sup>  | 0.46 <sup>g</sup>   |                     |
|    |       | Set gel | 0.33                | 0.30                | 0.35                | 0.33                | 0.38                | 0.40                | 0.35                | 0.45                | 0.27                | 0.28                | 0.31                | 0.38                | 0.38                | 0.32                | 0.33                | 0.40                |                     |

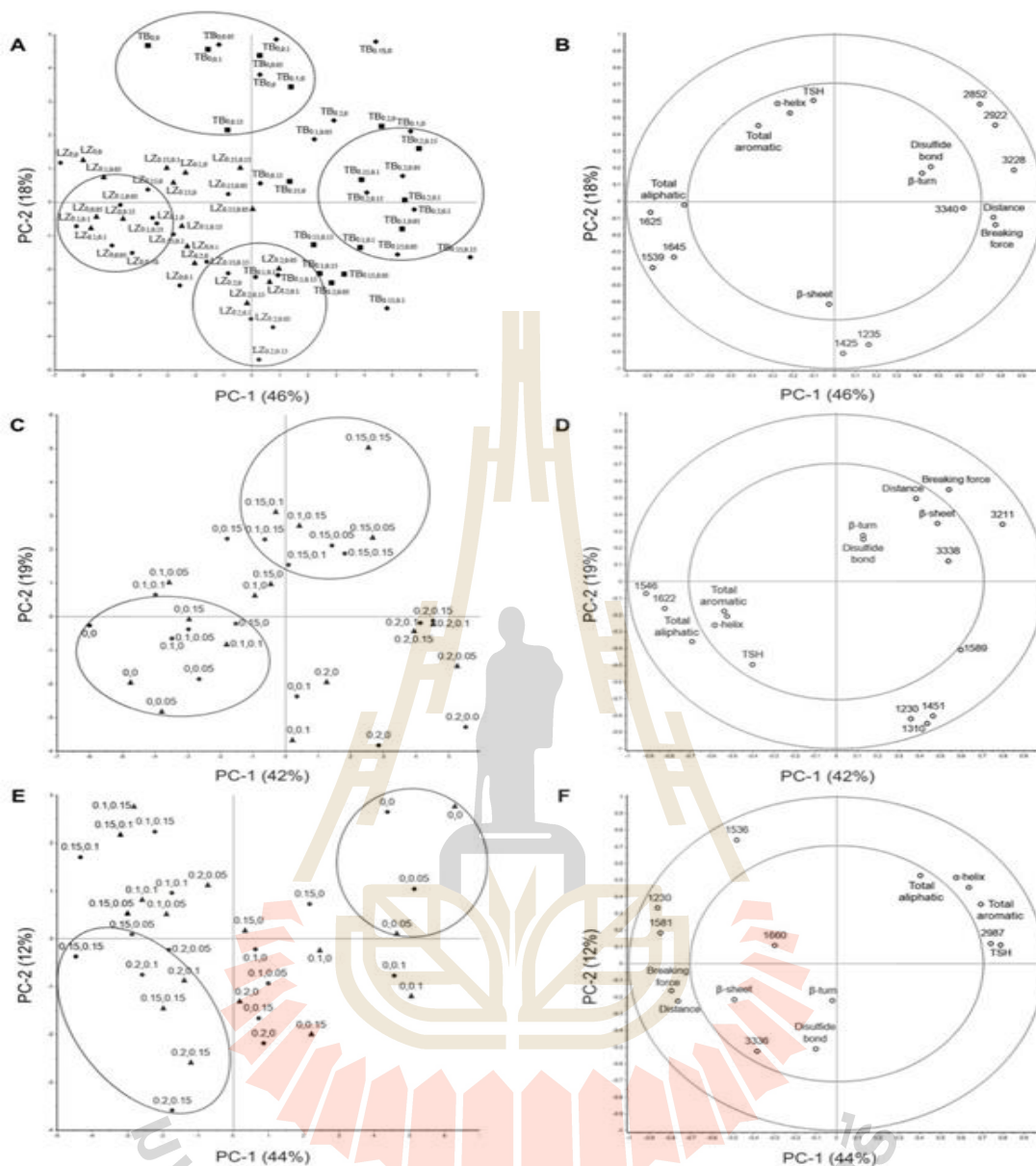
Total disulfide bond บ่งชี้ถึง ผลรวมของพันธะไดซัลไฟด์ที่ 540 และ 525  $\text{cm}^{-1}$ , C = control sample, และ DC = directly cooked

<sup>a</sup>แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าที่อยู่ในแถวเดียวกันที่มีตัวอักษรที่แตกต่างกันบ่งชี้ถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

#### 4.9.5 การวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA)

จากกราฟ score plot แสดงให้เห็นว่า PC-1 และ PC-2 อธิบายความแปรปรวนของข้อมูลทั้งหมด 46% และ 18% ตามลำดับ (รูปที่ 4.61A) เจลซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดงนั้น แยกความแตกต่างออกจากกันได้ชัดเจนด้วย PC-1 แสดงได้จากกราฟ score plot (รูปที่ 4.61A) และจากกราฟ score และ loading plots สำหรับ PC-1 ในซูริมิจากปลาทรายแดง เมื่อเติมกรดแอสคอร์บิก ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำให้มีค่าแรงที่ใช้ในการเจาะและระยะทางที่เข็มกดก่อนทะลุสูง ซึ่งสัมพันธ์เชิงบวกกับการสั่นแบบยืด (stretching) ของพันธะ O-H ที่ 3340 และ 3228  $\text{cm}^{-1}$  และพันธะ C-H ที่ 2922 และ 2852  $\text{cm}^{-1}$  (รูปที่ 4.61A และ 4.61B) อย่างไรก็ตาม การเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพียงอย่างเดียว ส่งผลให้เจลจากปลาปากคมมีแบนของ  $\beta$ -sheet (1645, 1625, และ 1539  $\text{cm}^{-1}$ ) จาก FT-IR และหมู่ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรงทั้งหมด (total aliphatic groups) จาก Raman เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับค่าคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสที่ต่ำ PC-2 แสดงให้เห็นว่า เจลจากปลาปากคม ที่เติมกรดแอสคอร์บิก ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ สัมพันธ์เชิงบวกกับแบนของ  $\beta$ -sheet ที่ 1235  $\text{cm}^{-1}$  ของ amide III และการสั่นแบบงอ (bending) ของพันธะ C-H ที่ 1425  $\text{cm}^{-1}$  และปริมาณ  $\beta$ -sheet

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของปลาแต่ละชนิด จาก loading plots แสดงให้เห็นว่าค่าแรงที่ใช้ในการเจาะทะลุและการเปลี่ยนรูปร่างของปลาทั้ง 2 ชนิด สัมพันธ์อย่างยิ่งกับปริมาณ  $\beta$ -sheet ที่วิเคราะห์จาก FT-IR (รูปที่ 4.61D และ 4.61F) เนื้อสัมผัสของเจลซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิด อยู่ตรงข้ามกับ TSH,  $\alpha$ -helix, total aliphatic, และ aromatic responses (รายละเอียดในตารางที่ 4.34 และ 4.35) การเติมกรดแอสคอร์บิก ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ส่งเสริมให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ ลดปริมาณหมู่ซัลไฟด์ริลทั้งหมด และยังส่งเสริมให้เกิด hydrophobic interactions ของสารประกอบไฮโดรคาร์บอนสายตรงและแบบวง นอกจากนี้คุณสมบัติของเนื้อสัมผัส (textural properties) ของเจลซูริมิจากปลาทั้ง 2 ชนิดนั้นยังเพิ่มขึ้นเมื่อเติมสารเติมแต่ง ซึ่งเกิดจากการลดลงของ  $\alpha$ -helix และการเพิ่มขึ้น  $\beta$ -sheet อย่างไรก็ตามผลของการให้ความร้อนที่สภาวะต่างกัน นั้นไม่สามารถแยกได้ชัดเจนโดยใช้ score plot (รูปที่ 4.61C และ 4.61E) PCA เปิดเผยให้เห็นว่าพันธะไดซัลไฟด์และ hydrophobic interactions เป็นแรงที่สำคัญในสร้างเสถียรภาพในโครงร่างเจล โดยสามารถส่งเสริมให้เกิดได้ด้วยการเติมกรดแอสคอร์บิก ร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์



รูปที่ 4.61 PCA score plot (A) และ loading plot (B) ของข้อมูลทั้งหมดของเจลซูริมิจากปลาปากคม (LZ) และปลาทรายแดง (TB), score plot และ loading plot ของซูริมิจากปลาปากคม (C, D) และซูริมิจากปลาทรายแดง (E, F); สัญลักษณ์ใน A: ● เจลซูริมิจาก LZ ที่ให้ความร้อนโดยตรง, ■ เจลซูริมิจาก LZ ที่ให้ความร้อนเพื่อแช่ตัว, ▲ เจลซูริมิจาก TB ที่ให้ความร้อนโดยตรง, ◆ เจลซูริมิจาก TB ที่ให้ความร้อนเพื่อแช่ตัว; สัญลักษณ์ใน C และ E: ● ให้ความร้อนโดยตรง, ▲ ให้ความร้อนเพื่อแช่ตัว; ตัวเลข x, y คือ ความเข้มข้นของ AsA และ  $H_2O_2$  ตามลำดับ; ตัวเลขใน loading plot คือ ค่าเลข

คลื่นจาก FT-IR; Total aliphatic และ Total aromatic คือ ผลรวมของช่วง aliphatic และ aromatic groups จาก Raman spectroscopy

#### 4.9.6 สรุปผลการวิจัย

คุณสมบัติเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดง ซึ่งเตรียมโดยการให้ความร้อนโดยตรง (direct heating) สามารถปรับปรุงได้ โดยการเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม ค่าความขาวของเจลนั้น จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเนื่องจากเกิดรงควัตถุสีน้ำตาลจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดแอสคอร์บิก การเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ช่วยส่งเสริมความสามารถในการเกิดเจล โดยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามของโปรตีนผ่านพันธะไดซัลไฟด์และการเกิด hydrophobic interactions การเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นั้นจะลดปริมาณ  $\alpha$ -helix และเพิ่ม  $\beta$ -sheet นอกจากนี้ PCA เปิดเผยให้เห็นว่า การปรับปรุงคุณสมบัติของเนื้อสัมผัสของ เจลซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดงเกิดขึ้นเมื่อเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ซึ่งสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณ  $\beta$ -sheet งานวิจัยนี้ชี้ให้เห็นว่าการเติมกรดแอสคอร์บิกร่วมกับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถใช้ปรับปรุงกระบวนการเกิดเจลของซูริมิจากปลาปากคมและปลาทรายแดงได้ผ่านการให้ความร้อนโดยตรง นอกจากนี้ทั้งกรดแอสคอร์บิกและไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ไม่เพียงส่งเสริมการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ ยังช่วยให้เกิด hydrophobic interactions อีกด้วย

## บรรณานุกรม

- กมลวรรณ แจ่มชัด. (2541). การแปรรูปอาหารโดยวิธีเอกซ์ทรูชัน. อุตสาหกรรมเกษตร. ปีที่ 9. ฉบับที่ 2. หน้า 4-8.
- กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2547). ข้าว. กรุงเทพมหานคร.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด และ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ. (2546). เทคโนโลยีของแป้ง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์: กรุงเทพมหานคร.
- คีนจันทร์ ณ นคร. (2560) ผลของโปรตีนและใยอาหารต่อการย่อยของข้าวช้ำนรูปจากกระบวนการเอกซ์ทรูชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- งามทิพย์ ภู่วโรตม. (2550). การบรรจุอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีการบรรจุและวัสดุ: กรุงเทพมหานคร.
- จิรนาถ บุญคง. (2553). Resistant Starch แป้งที่มีบทบาทต่อสุขภาพ. วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม. ปีที่ 6. ฉบับที่ 1. หน้า 1-8.
- นิธิยา รัตนานพนธ์. (2551). เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. โอเดียนสโตร์: กรุงเทพมหานคร.
- ประชา บุญญสิริกุล. (2537). บทบาทของเอกซ์ทรูเดอร์ที่มีต่ออุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย. อาหาร, ปีที่ 24. ฉบับที่ 1. หน้า 1-12.
- ธนกร ศิริสมุทร. (2558). คุณค่าทางโภชนาการและประโยชน์ทางการแพทย์ของเวย์โปรตีน. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ หน่วยข้อมูลยาและพิษวิทยา โรงพยาบาลศิริราช มหาวิทยาลัยมหิดล. ปีที่ 10. ฉบับที่ 2. หน้า 75-80.
- นุชนาฏ กิจเจริญ. (2549). อาหารสมุนไพรระบาย : ใยอาหาร. ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ. ปีที่ 1. ฉบับที่ 2. หน้า 153-158.
- ทักษิณา วรรัตน์. (2561). สถานการณ์สินค้าข้าวไทยในสหรัฐอเมริกา. กรมส่งเสริมการค้าระหว่างประเทศ กระทรวงพาณิชย์ สำนักงานส่งเสริมการค้าในต่างประเทศ ณ นครนิวยอร์ก. ([https://www.ditp.go.th/ditp\\_pdf.php?filename=contents\\_attach/241166/241166.pdf&title=241166](https://www.ditp.go.th/ditp_pdf.php?filename=contents_attach/241166/241166.pdf&title=241166)).
- วิไล รังสาดทอง. (2547). เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ: กรุงเทพมหานคร.

- อรรวรรณ ภูชัยวัฒนานนท์ และ สุรัสวดี สมนึก. (2556). มาทำความเข้าใจกับ เวย์โปรตีน. หน่วยโภชนา วิทยาลัยและชีวะเคมีทางการแพทย์ ภาควิชาอายุศาสตร์ รพ.รามธิบดี มหิดล วารสาร วิทยาศาสตร์การกีฬา. ปีที่ 13. ฉบับที่ 153. หน้า 1513-2867.
- อรอนงค์ นัยวิกุล. (2547). ข้าว: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน คณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร: กรุงเทพมหานคร.
- สุนทรี่ เจริญพร. (2555). ข้าวขึ้นรูปโดยกระบวนการเอกซ์ทรูชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- ศูนย์วิจัยกสิกรรมไทย. (2561). ผลิตภัณฑ์แปรรูปข้าว นวัตกรรมต่อยอดสู่การสร้างมูลค่าเพิ่มและโอกาส ทางการตลาด. KSME Analysis ธนาคารกสิกรรมไทย. หน้า 1-9.  
([https://www.kasikornbank.com/th/business/sme/KSMEKnowledge/article/KSME Analysis/Documents/Thai-Rice\\_Innovation\\_FullPage.pdf](https://www.kasikornbank.com/th/business/sme/KSMEKnowledge/article/KSME Analysis/Documents/Thai-Rice_Innovation_FullPage.pdf)).
- Abbasi, A., & Lutfullah, G. (2002). Molecular basis of bird respiration: Primary hemoglobin structure component from tufted duck (Aythya fuligula, Anseriformes)- Role of a99Arg in formation of a complex salt bridge network. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol 291. 176-184.
- Abdollahi, M., Rezaei, M., Jafarpour, A., & Undeland, I. (2018). Sequential extraction of gel-forming proteins, collagen and collagen hydrolysate from gutted silver carp (Hypophthalmichthys molitrix), a biorefinery approach. Food Chemistry. Vol 242. 568-578.
- Abdulhameed, A. A., Yang, A. T., & Abdulkarim, A. A. (2016). Kinetics of texture and colour changes in chicken sausage during superheated steam cooking. Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. Vol 66. 199-209.
- Aboul-Enein, Y., BUNACIU, A. A., & FLESCHEIN, S. (2014). Evaluation of the protein secondary structures using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. Gazi University Journal of Science. Vol 27. Issue 1. 637-644.

- Adeyeye, E.I. (2009). Amino acid composition of three species of Nigerian fish: *Clarias anguillaris*, *Oreochromis niloticus* and *Cynoglossus senegalensis*. Food Chemistry. Vol 113. 43-46.
- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 27. 1256-1262.
- Agyei, D., Tsopmo, A., & Udenigwe, C. C. (2018). Bioinformatics and peptidomics approaches to the discovery and analysis of food-derived bioactive peptides. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol 410. 3463-3472.
- Ahmed, M. M. F. (2003). Effect of electrical stunning on broilers carcasses quality. Master's Thesis. University of Khartoum, Khartoum, Sudan.
- Ahmed, R., Haq, M., & Chun, B.-S. (2019). Characterization of marine derived collagen extracted from the by-products of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). International Journal of Biological Macromolecules. Vol 135. 668-676.
- Ahn, U. D., & Maurer, J. A. (1989). Effects of sodium chloride, phosphate and dextrose on the heat stability of purified myoglobin, hemoglobin and cytochrome c. Poultry Science. Vol 68. 1218-1225.
- Aigner, T., & Stöve, J. (2003). Collagens—major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol 55. Issue 12. 1569-1593.
- Akram, A. N., & Zhang, C. (2020). Effect of ultrasonication on the yield, functional and physicochemical characteristics of collagen-II from chicken sternal cartilage. Food Chemistry. Vol 307. 125544.
- Alfonso, D. L., Collini, M., Cannone, F., Chirico, G., Campanini, B., Cottone, G., & Cordone, L. (2007). GFP-mut2 Proteins in Trehalose-water matrixes: Spatially heterogeneous protein-water-sugar structures. Biophysical Journal. Vol 93. 284-293.



- Ali, A. M. M., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2018). Extraction efficiency and characteristics of acid and pepsin soluble collagens from the skin of golden carp (*Probarbus jullieni*) as affected by ultrasonication. Process Biochemistry. Vol 66. 237-244.
- Ali, S. A., Lawson, A. M., Tauson, H. A., Jensen, F. J., & Chwalibog, A. (2007). Influence of electrical stunning voltages on bleed out and carcass quality in slaughtered broiler chickens. Archiv für Geflügelkunde. Vol 71. Issue 1. 35–40.
- Aluko, R. E. (2015). Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. In Handbook of Antioxidants for Food Preservation. Shahidi, F., Ed. Woodhead Publishing: Sawston, Cambridge, UK.
- Alvarado, C., & McKee, S. (2007). Marination to improve functional properties and safety of poultry meat. Journal of Applied Poultry Research. Vol 16. 113–120.
- American Association of Cereal Chemists (AAC). (2001). The Definition of Dietary Fiber. Report of the Dietary Fiber Definition Committee to the Board of Directors of the AAC. Vol 46. 112-126.
- Andersen, H. R., Andersen, J. H., & Bertram, C. H. (2007). Curing-induced water mobility and distribution within intra- and extra-myofibrillar spaces of three pork qualities. International Journal of Food Science and Technology. Vol 42. 1059–1066.
- Ao, J. & Li, B. (2013). Stability and antioxidative activities of casein peptide fractions during simulated gastrointestinal digestion *in vitro*: Charge properties of peptides affect digestive stability. Food Research International. Vol 52. 334-341.
- AOAC. (2010). Official methods of analysis. (18<sup>th</sup> ed). Washington DC: Association of Official Analytical Chemists.
- AOAC. (2016). Official methods of analysis of AOAC international. (20<sup>th</sup> ed). Rockville. Maryland.
- AOAC. (2000.). Official methods of analysis. (17<sup>th</sup> ed). Association of Official Chemists: Gaithersburg. MD. USA.
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K. & Çapanoğlu, E. (2016). Antioxidant activity/capacity measurement. 2. Hydrogen atom transfer (HAT)-based, mixed-mode (electron

- transfer (ET)/HAT), and lipid peroxidation assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 64. 1028-1045.
- Arihara, K. (2006). Strategies for designing novel functional meat products. Meat Science. Vol 74. 219–229.
- Ashokkumar, M. (2015). Applications of ultrasound in food and bioprocessing. Ultrasonics Sonochemistry. Vol 25. 17-23.
- Awuah, B. G., Ramaswamy, S. H., & Tang, J. (2015). Radio-frequency heating in food processing. New York: CRC Press.
- Bae, M. S., Cho, G. M., Hong, T. G., & Jeong, Y. J. (2018). Effect of NaCl concentration and cooking temperature on the color and pigment characteristics of pre salted ground chicken breasts. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. Vol 8. 417-430.
- Balange, A., & Benjakul, S. (2009). Enhancement of gel strength of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*) surimi using oxidized phenolic compounds. Food Chemistry. Vol 113. 61–70.
- Balavoine, G.G.A. & Geletii, Y.V. (1999). Peroxynitrite scavenging by different antioxidants Part I: Convenient assay. Nitric Oxide. Vol 3. 40-54.
- Banlue, K., Morioka, K., & Itoh, Y. (2010). Effect of inorganic oxidizing reagents on gel-forming properties of walleye pollack surimi through low temperature setting. Journal of Biological Sciences. Vol 10. Issue 1. 18-24.
- Barbantia, D., & Pasquini, M. (2005). Influence of cooking conditions on cooking loss and tenderness of raw and marinated chicken breast meat. Food Science and Technology. Vol 38. 895–901.
- Bejarano, I., Espino, J., Barriga, C., Reiter, R. J., Pariente, J. A., & Rodriguez, A. B. (2011). Pro-oxidant effect of melatonin in tumour leucocytes: relation with its cytotoxic and pro-apoptotic effects. Basic Clin Pharmacol Toxicol. Vol 108. 14-20.

- Benjakul, S., Thongkaew, C., & Visessanguan, W. (2005). Effect of reducing agents on physicochemical properties and gel-forming ability of surimi produced from frozen fish. European Food Research and Technology. Vol 220. 316–321.
- Benjakul, S. & Morrissey, M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 45. 3423-3430.
- Benjakul, S., & Bauer, F. (2000). Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze–thaw cycles. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 80. Issue 8. 1143-1150.
- Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T., & AN, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. Journal of Food Science. Vol 62. Issue 4. 729-733.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. Analytical Biochemistry. Vol 239. 70-76.
- Bertram, C. H., Kohler, A., Bocker, U., Ofstad, R., & Andersen, J. A. (2006). Heat- induced changes in myofibrillar protein structures and myowater of two pork qualities: A combined FT-IR spectroscopy and low-field NMR relaxometry study. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 54. 1740-1746.
- Blanco, M., G Sotelo, C., & I Pérez-Martín, R. (2019). New Strategy to Cope with Common Fishery Policy Landing Obligation: Collagen Extraction from Skins and Bones of Undersized Hake (*Merluccius merluccius*). Polymers. Vol 11. Issue 9. 1485.
- Borawska, J., Darewicz, M., Pliszka, M., & Vegarud, G. E. (2016). Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar* L.) protein fraction hydrolysates revealed following their *ex vivo* digestion and *in vitro* hydrolysis. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 96. 2764-2772.
- Bou, R., Guardiola, F., Padro, A., Pelfortb, E., & Codonya, R. (2004). Validation of mineralization procedures for the determination of selenium, zinc, iron and copper in chicken meat and feed samples by ICP-AES and ICP-MS. Journal of Analytical Atomic Spectrometry. Vol 19. 1361–1369.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. Vol 72. Issue 1-2. 248-254.
- Brown, E. M., Farrell, H. M., & Wildermuth, R. J. (2000). Influence of neutral salts on the hydrothermal stability of acid-soluble collagen. Journal of Protein Chemistry. Vol 19. Issue 2. 85-92.
- Calabrò, E., & Magazù, S. (2012). Comparison between conventional convective heating and microwave heating: An FTIR spectroscopy study of the effects of microwave oven cooking of bovine breast meat. Journal of Electromagnetic Analysis and Applications. Vol 4. 433-439.
- Cando, D., Herranz, B., Borderías, A. J., & Moreno, H. M. (2015). Effect of high pressure on reduced sodium chloride surimi gels. Food Hydrocolloids. Vol 51. 176-187.
- Cando, D., Herranz, B., Borderías, A. J., & Moreno, H. M. (2016). Different additives to enhance the gelation of surimi gel with reduced sodium content. Food Chemistry. Vol 196. 791-799.
- Cao, H., & Xu, S. Y. (2008). Purification and characterization of type II collagen from chick sternal cartilage. Food Chemistry. Vol 108. Issue 2. 439-445.
- Cao, H., Xu, S., Ge, H., & Xu, F. (2014). Molecular characterisation of type II collagen from chick sternal cartilage and its anti-rheumatoid arthritis activity. Food and Agricultural Immunology. Vol 25. Issue 1. 119-136.
- Carbonaro, M., & Nucara, A. (2010). Secondary structure of food proteins by Fourier transform spectroscopy in the mid-infrared region. Amino acids. Vol 38. Issue 3. 679-690.
- Cardiff, D. R., Miller, H. C., & Munn, J. R. (2014). Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections. Cold Spring Harbor protocols. Vol 6. 654-658.
- Carsote, C., & Badea, E. (2019). Micro differential scanning calorimetry and micro hot table method for quantifying deterioration of historical leather. Heritage Science. Vol 7. Issue 1. 48.

- Chan, J. K., Gill, T. A., Thompson, J. W. & Singer, D. S. (1995). Herring surimi during low temperature setting, physicochemical and textural properties. Journal of Food Science. Vol 60. Issue 6. 1248-1253.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. Ultrasonics Sonochemistry. Vol 19. Issue 5. 975-983.
- Chang, H. S., Hultin, H. O., & Dagher, S. M. (2001). Effect of MgCl<sub>2</sub>/sodium pyrophosphate on chicken breast muscle myosin solubilization and gelation. Journal of Food Biochemistry. Vol 25. Issue 5. 459-474.
- Chang, Y. K., & El-Dash, A. A. (2003). Effects of acid concentration and extrusion variables on some physical characteristics and energy requirements of cassava starch. Brazilian Journal of Chemical Engineering. Vol 20. 129-137.
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A.-G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A.-S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. Ultrasonics Sonochemistry. Vol 34. 540-560.
- Chen, J. C., Hsiang, C. Y., Lin, Y. C., & Ho, T. Y. (2014). Deer antler extract improves fatigue effect through altering the expression of genes related to muscle strength in skeletal muscle of mice. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Vol 2014.
- Chen, W. L., Chow, C. J., & Ochiai, Y. (1999). Effects of some food additives on the gel-forming ability and color of Milkfishmeat paste. Fisheries Science. Vol 65. Issue 5. 777-783.
- Cheng, X., Shao, Z., Li, C., Yu, L., Raja, M. A., & Liu, C. (2017). Isolation, characterization and evaluation of collagen from jellyfish *Rhopilema esculentum* Kishinouye for use in hemostatic applications. PLoS One. Vol 12. Issue 1. e0169731.
- Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. United States Food and Drug Administration (US FDA). (2004). Code of federal regulations. Title 21, Food and drugs. Chapter I, Food

- and drug administration. Part 184-direct food substances affirmed as generally recognized as safe. Section 184.1366 Hydrogen peroxide.
- Chinh, N. T., Manh, V. Q., Trung, V. Q., Lam, T. D., Huynh, M. D., Tung, N. Q., Trinh, N. D., & Hoang, T. (2019). Characterization of collagen derived from tropical freshwater carp fish scale wastes and its amino acid sequence. Natural Product Communications. Vol 14. Issue 7. 1934578X19866288.
- Chuaychan, S., Benjakul, S., & Kishimura, H. (2015). Characteristics of acid-and pepsin-soluble collagens from scale of seabass (*Lates calcarifer*). LWT-Food Science and Technology. Vol 63. Issue 1. 71-76.
- Chupaj, J., Malila, Y., Petracci, M., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2016). Effect of tumbling marination on marinade uptake of chicken carcass and parts quality. Brazilian Journal of Poultry Science. Vol 19. 061-068.
- Contreras, C. C., & Beraquet, J. N. (2001). Electrical stunning, hot boning, and quality of chicken. Poultry Science. Vol 80. 501-507.
- Cornforth, D., Calkins, C. R., & Faustman, C. (2001). Methods for identification and prevention of pink color in cooked meat. 44<sup>th</sup> Reciprocal Meat Conference Proceedings (pp. 53-58). Savoy, IL: American Meat Science Association.
- Corzo-Martinez, M., Corzo, N., Villamiel, M., & del Castillo, M. D. (2012). Browning Reactions. In B. K. Simpson (Ed.). Food biochemistry and food processing (2<sup>nd</sup> ed.) (pp. 56-83). USA: Wiley-Blackwell.
- Cumming, M. H., Hall, B., & Hofman, K. (2019). Isolation and Characterisation of Major and Minor Collagens from Hyaline Cartilage of Hoki (*Macrurus novaezelandiae*). Marine drugs. Vol 17. Issue 4. 223.
- Datta, K. A., & Rakesh, V. (2013). Principles of microwave combination heating. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol 12. 24-39.
- Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2004). Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC- fluorescein) assay. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 52. 48-54.

- Dave, L.A., Hayes, M., Mora, L., Montoya, C.A., Moughan, P.J., & Rutherford, S.M. (2016). Gastrointestinal endogenous protein-derived bioactive peptides: An *in vitro* study of their gut modulatory potential. International Journal of Molecular Sciences. Vol 17. 482.
- De Freitas Silva, M., Pruccoli, L., Morrioni, F., Sita, G., Seghetti, F., Viegas Jr, C., & Tarozzi, A. (2018). The Keap1/ Nrf2- ARE pathway as a pharmacological target for chalcones. Molecules. Vol 23. 1803.
- Decker, E.A. & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 38. 674-677.
- Dhanda, J. S., Pegg, R. B., & Shand, P. J. (2003). Tenderness and chemical composition of elk (*Cervus elaphus*) meat: Effects of muscle type, marinade composition, and cooking method. Journal of Food Science. Vol 68. 1882–1888.
- Ding, L., Wang, L., Zhang, T., Yu, Z., & Liu, J. (2018). Hydrolysis and transepithelial transport of two corn gluten derived bioactive peptides in human Caco-2 cell monolayers. Food Research International. Vol 106. 475-480.
- Ding, L., Wang, L., Zhang, Y., & Liu, J. (2015). Transport of antihypertensive peptide RVPSL, ovotransferrin 328–332, in human intestinal Caco-2 cell monolayers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 63. 8143-8150.
- Ding, L., Zhang, Y., Jiang, Y., Wang, L., Liu, B., & Liu, J. (2014). Transport of egg white ACE-inhibitory peptide, Gln- Ile- Gly- Leu- Phe, in human intestinal Caco- 2 cell monolayers with cytoprotective effect. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 62. 3177-3182.
- Domínguez, R., Gómez, M., Fonseca, S., & Lorenzo, M. J. (2014). Effect of different cooking methods on lipid oxidation and formation of volatile compounds in foal meat. Meat Science. Vol 97. 223–230.
- Drzewiecki, K. E., Grisham, D. R., Parmar, A. S., Nanda, V., & Shreiber, D. I. (2016). Circular dichroism spectroscopy of collagen fibrillogenesis: a new use for an old technique. Biophysical Journal. Vol 111. Issue 11. 2377-2386.

- Du, Y., Esfandi, R., Willmore, W.-G., & Tsopmo, A. (2016). Antioxidant activity of oat proteins derived peptides in stressed hepatic HepG2 cells. Antioxidants. Vol 5. 39.
- Elango, J., Lee, J. W., Wang, S., Henrotin, Y., De Val, J. E. M. S., M Regenstein, J., Lim, S. Y., Bao, B., & Wu, W. (2018). Evaluation of differentiated bone cells proliferation by blue shark skin collagen via biochemical for bone tissue engineering. Marine drugs. Vol 16. Issue 10. 350.
- Ellis, G., Santoro, G., Gómez, M. A., & Marco, C. (2010). Synchrotron IR microspectroscopy: Opportunities in polymer science. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering. Vol 14. 1-9.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Archives of biochemistry and biophysics. Vol 82. Issue 1. 70-77.
- Endoo, N., & Yongsawatdigul, J. (2014). Comparative study on chemical and gel-forming properties of surimi from freshwater and marine fish during frozen storage. Food and Applied Bioscience Journal. Vol 2. Issue 3. 192-202.
- Englyst, H. N., Kingman, S. M., & Cummings, J. H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. European journal of clinical nutrition. Vol 46. S33-50.
- Ergonul, B. (2017). Influence of different cooking methods on quality attributes of chicken breast meat. Celal Bayar University Journal of Science. Vol 13. 883-885.
- Escudero, E., Mora, L., & Toldrá, F. (2014). Stability of ACE inhibitory ham peptides against heat treatment and *in vitro* digestion. Food Chemistry. Vol 161. 305-311.
- Euresta. (1993). European Flair-concerted Action on Resistant Starch. In: Newsletter IV, In (pp. p. 2.). Human Nutrition Department, Wageningen Agriculture University, Wageningen, The Netherlands.
- Eyre, D. (2001). Articular cartilage and changes in arthritis: collagen of articular cartilage. Arthritis Research & Therapy. Vol 4. Issue 1. 30.



- Fan, J., He, J., Zhuang, Y., & Sun, L. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) frame protein. Molecules. Vol 17. 12836.
- Farahani, K., Saxton, E. R., Yoon, C. H., De Salles, A. F. A., Black, L. K., & Lufkin, B. R. (1999). MRI of thermally denatured blood: Methemoglobin formation and relaxation effects. Magnetic Resonance Imaging. Vol 17. Issue 10. 1489–1494.
- Feng, L., Peng, F., Wang, X., Li, M., Lei, H., & Xu, H. (2019). Identification and characterization of antioxidative peptides derived from simulated *in vitro* gastrointestinal digestion of walnut meal proteins. Food Research International. Vol 116. 518-526.
- Fernández-Musoles, R., Salom, J.-B., Castelló-Ruiz, M., Contreras, M.-D.-M., Recio, I., & Manzanares, P. (2013). Bioavailability of antihypertensive lactoferricin B-derived peptides: transepithelial transport and resistance to intestinal and plasma peptidases. International Dairy Journal. Vol 32. 169-174.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. Journal of biological chemistry. Vol 226. Issue 1. 497-509.
- Folk, J. E. (1983). Mechanism and basis for specificity of transglutaminase-catalyzed  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl)lysine bond formation. In A. Meister (Ed.), Advances in Enzymology (pp. 1-57). New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Fu, X., Hayat, K., Li, Z., Lin, Q., Xu, S., & Wang, S. (2012). Effect of microwave heating on the low-salt gel from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) surimi. Food Hydrocolloids. Vol 27. Issue 2. 301-308.
- Gallego, M., Mora, L., & Toldrá, F. (2018). Characterisation of the antioxidant peptide AEEEYPDL and its quantification in Spanish dry-cured ham. Food Chemistry. Vol 258. 8-15.

- Gamage, H. G. C. L., Mutucumarana, R. K., & Andrew, M. S. (2017). Effect of marination method and holding time on physicochemical and sensory characteristics of broiler meat. Journal of Agricultural Sciences. Vol 12. Issue 3. 172–184.
- Gao, L. L., Wang, Z. Y., Zheng, L., Zhang, C. X., & Zhang, D. Q. (2018). The characterization of acid and pepsin soluble collagen from ovine bones (Ujumujin sheep). Journal of Integrative Agriculture. Vol 17. Issue 3. 704-711.
- Gao, T., Li, J., Zhang, L., Jiang, Y., Ma, R., Song, L., Zhou, G. (2015). Effect of different tumbling marination treatments on the quality characteristics of prepared pork chops. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol 28. 260–267.
- Gauza-Włodarczyk, M., Kubisz, L., & Włodarczyk, D. (2017). Amino acid composition in determination of collagen origin and assessment of physical factors effects. International Journal of Biological Macromolecules. Vol 104. 987-991.
- Ge, B., Wang, H., Li, J., Liu, H., Yin, Y., Zhang, N., & Qin, S. (2020). Comprehensive Assessment of Nile Tilapia Skin (*Oreochromis niloticus*) Collagen Hydrogels for Wound Dressings. Marine drugs. Vol 18. Issue 4. 178.
- Geedipalli, S., Datta, K. A., & Rakesh, V. (2008). Heat transfer in a combination microwave–jet impingement oven. Food and Bioprocess Processing. Vol 86. 53-63.
- Goksoy, E. O., James, C., & James, S. J. (1999). Non-uniformity of surface temperatures after microwave heating of poultry meat. Journal of Microwave Power and Electromagnetic Energy. Vol 34. 149–160.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., & David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. Journal of Biological Chemistry. Vol 177. Issue 2. 751-766.
- Gowen, A., Abu-Ghannam, N., Frias, J., & Oliveira, J. (2006). Optimisation of dehydration and rehydration properties of cooked chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing microwave-hot air combination drying. Trends in Food Science & Technology. Vol 17. 177–183.

- Graiver, N., Pinotti, A., Califano, A., & Zaritzky, N. (2006). Diffusion of sodium chloride in pork tissue. *Journal of Food Engineering*, 77, 910–918.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nature Protocols*. Vol 1. Issue 6. 2876.
- Gregory, N. G., & Wilkins, L. J. (1989). Effect of stunning current on carcass quality in chickens. *Veterinary Record Open*. Vol 124. 530–532.
- Guenneugues, P., & Ianelli, J. (2014). Surimi resources and market. In J. W. Park (3rd ed.), *Surimi and surimi seafood* (pp. 25–52). Florida: Taylor & Francis Group, LLC.
- Guzzi Plepis, A. M. D., Goissis, G., & Das-Gupta, D. K. (1996). Dielectric and pyroelectric characterization of anionic and native collagen. *Polymer Engineering & Science*. Vol 36. Issue 24. 2932-2938.
- Harper, J.M. (1981). *Biotechnology and Food process engineering*. Institute of Food Technologists. International Union of Food Science and Technology
- Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*. Vol 18. Issue 2. 203-213.
- Hebbar, U. H., & Rastogi, K. N. (2012). *Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods*. London: Elsevier.
- Hernández-Ledesma, B., Quirós, A., Amigo, L., & Recio, I. (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*. Vol 17. 42-49.
- Herrero, A. M. (2008). Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Vol 48. 512–23.
- Holownia, K., Chinnan, M. S., & Reynolds, A. E. (2003). Pink color defect in poultry white meat as affected by endogenous conditions. *Journal of Food Science*. Vol 68. Issue 3. 742–747.

- Holownia, K., Chinnan, M. S., & Reynolds, A. E. (2004). Cooked chicken breast meat conditions related to simulated pink defect. Journal of Food Science. Vol 69. Issue 3. 194–199.
- Holownia, K., Chinnan, M. S., Reynolds, A. E., & Koehler, P. E. (2003). Evaluation of induced color changes in chicken breast meat during simulation of pink color defect. Poultry Science. Vol 82. 1049–1059.
- Homayouni-Tabrizi, M., Asoodeh, A., & Soltani, M. (2017). Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. Journal of Food and Drug Analysis. Vol 25. 567-575.
- Hong, H., Chaplot, S., Chalamaiah, M., Roy, B. C., Bruce, H. L., & Wu, J. (2017). Removing cross-linked telopeptides enhances the production of low-molecular-weight collagen peptides from spent hens. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 65. Issue 34. 7491-7499.
- Hormdok, R., & Noomhorm, A. (2007). Hydrothermal treatments of rice starch for improvement of rice noodle quality. LWT - Food Science and Technology. Vol 40. 1723-1731.
- Hu, H., Wu, J., Li-Chan, E. C., Zhu, L., Zhang, F., Xu, X., Fan, G., Wang, L., Huang, X., & Pan, S. (2013). Effects of ultrasound on structural and physical properties of soy protein isolate (SPI) dispersions. Food Hydrocolloids. Vol 30. Issue 2. 647-655.
- Huang, B. B., Lin, H. C., & Chang, Y. W. (2015). Analysis of proteins and potential bioactive peptides from tilapia (*Oreochromis spp.*) processing co-products using proteomic techniques coupled with BIOPEP database. Journal of Functional Foods. Vol 19. 629-640.
- Ishioroshi, M., Samejima, K., & Yasui, T. (1983). Heat-induced gelation of myosin filaments at a low salt concentration. Agricultural and Biological Chemistry. Vol 47. Issue 12. 2809-2816.

- Iswariya, S., Velswamy, P., & Uma, T. (2018). Isolation and characterization of biocompatible collagen from the skin of puffer fish (*Lagocephalus inermis*). Journal of Polymers and the Environment. Vol 26. Issue 5. 2086-2095.
- Jacobs, H., & Delcour, J. A. (1998). Hydrothermal Modifications of Granular Starch, with Retention of the Granular Structure: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 46. Issue 8.
- Jambrak, A. R., Lelas, V., Mason, T. J., Krešić, G., & Badanjak, M. (2009). Physical properties of ultrasound treated soy proteins. Journal of Food Engineering. Vol 93. Issue 4. 386-393.
- Jantaranikorn, M., & Yongsawatdigul, J. (2020). Effect of marinating ingredients on temperature-induced denaturation of hemoglobin and its relation to red blood spot formation in cooked chicken breast. Journal of Food Science. Vol 85. 2398-2405.
- Jayasena, D. D., Kim, H. S., Lee, J. H., Jung, S., Lee, H. J., Park, B. H., & Jo, C. (2014). Comparison of the amounts of taste-related compounds in raw and cooked meats from broilers and Korean native chickens. Poultry Science. Vol 93. 3163–3170.
- Jeevithan, E., Jingyi, Z., Wang, N., He, L., Bao, B., & Wu, W. (2015). Physico-chemical, antioxidant and intestinal absorption properties of whale shark type-II collagen based on its solubility with acid and pepsin. Process Biochemistry. Vol 50. Issue 3. 463-472.
- Jeong, J. Y. (2017). Effects of short term presalting and salt level on the development of pink color in cooked chicken breasts. Korean Journal for Food Science of Animal Resources. Vol 37. 98–104.
- Jeong, J. Y., Lee, E. S., Choi, J. H., Lee, J. Y., Kim, J. M., Min, S. G., Chae, Y. C., & Kim, C. J. (2007). Variability in temperature distribution and cooking properties of ground pork patties containing different fat level and with/without salt cooked by microwave energy. Meat Science. Vol 75. 415–422.

- Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B., & Zhang, M. (2014). Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. Food Research International. Vol 62. 595-601.
- Joo, M. S., Kim, W. D., Lee, K. Y., Kim, J. H., Koo, J. H., & Kim, S. G. (2016). AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. Molecular and Cellular Biology. Vol 36. 1931-1942.
- Joseph, I. O. (2017). Microwave heating in food processing. BAOJ Nutrition. Vol 3. 1-9.
- Jouquand, C., Frederic, J. T., Bernard, J., Marier, D., Woodward, K., Jacolot, P., Gadonna-Widehem, P., & Laguerre, C. J. (2015). Optimization of microwave cooking of beef burgundy in terms of nutritional and organoleptic properties. Food Science and Technology. Vol 60. 271-276.
- Ju, H., Liu, X., Zhang, G., Liu, D., & Yang, Y. (2020). Comparison of the Structural Characteristics of Native Collagen Fibrils Derived from Bovine Tendons Using Two Different Methods: Modified Acid-Solubilized and Pepsin-Aided Extraction. Materials. Vol 13. Issue 2. 358.
- Kangsanant, S., Thongraung, C., Jansakul, C., Murkovic, M., & Seechamnaturakit, V. (2015). Purification and characterisation of antioxidant and nitric oxide inhibitory peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. International Journal of Food Science & Technology. Vol 50. 660-665.
- Kellett, M.E. Greenspan, P., & Pegg, R.B. (2018). Modification of the cellular antioxidant activity (CAA) assay to study phenolic antioxidants in a Caco-2 cell line. Food Chemistry. Vol 244. 359-363.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O., & Rawdkuen, S. (2017). Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: Bioactivity and stability. Food Chemistry. Vol 215. 383-390.
- Ketnawa, S., Martínez-Alvarez, O., Benjakul, S., & Rawdkuen, S. (2016). Gelatin hydrolysates from farmed Giant catfish skin using alkaline proteases and its

- antioxidative function of simulated gastro-intestinal digestion. Food Chemistry. Vol 192. 34-42.
- Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., & Liceaga, A.M. (2018). Changes on antioxidant activity of microwave- treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. Food Chemistry. Vol 254. 36-46.
- Khan, I. M., Lee, J. H., Kim, J. H., Young, I. H., Lee, H., & Jo, C. (2016). Marination and physicochemical characteristics of vacuum- aged duck breast meat. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. Vol 29. Issue 11. 1639–1645.
- Khiari, Z., Omana, A. D., Pietrasik, Z., & Betti, M. (2013). Evaluation of poultry protein isolate as a food ingredient: Physicochemical properties and sensory characteristics of marinated chicken breasts. Journal of Food Science. Vol 78. Issue 7. S1069–S1075.
- Khong, N. M., Yusoff, F. M., Jamilah, B., Basri, M., Maznah, I., Chan, K. W., Armania, N., & Nishikawa, J. (2018). Improved collagen extraction from jellyfish (*Acromitus hardenbergi*) with increased physical-induced solubilization processes. Food Chemistry. Vol 251. 41-50.
- Kijowski, J. M., & Mast, M. G. (1988). Effect of sodium chloride and phosphates on the thermal properties of chicken meat proteins. Journal of Food Science. Vol 53. Issue 2. 367–387.
- Kilcast, D. and Subramaniam, P. (2000) The stability and shelf-life of food. Cambridge, England: Wood Head Publishing. 340 p.
- Kim, H. K., Kim, Y. H., Kim, Y. J., Park, H. J., & Lee, N. H. (2012). Effects of ultrasonic treatment on collagen extraction from skins of the sea bass *Lateolabrax japonicus*. Fisheries Science. Vol 78. Issue 2. 485-490.
- Kinoshita, M., Toyohara, H., & Shimizu, Y. (1990). Purification and properties of a novel latent proteinase showing myosin heavy chain-degrading activity from threadfin-bream muscle. The Journal of Biochemistry. Vol 107. Issue 4. 587-591.

- Kishimoto, Y., WAKABAYASHI, S., & TAKEDA, H. (1995). Hypocholesterolemic effect of dietary fiber: relation to intestinal fermentation and bile acid excretion. Journal of Nutritional Science and Vitaminology. Vol 41. Issue 1. 151-161.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2010). Isolation and characterization of collagen from the cartilages of brownbanded bamboo shark (*Chiloscyllium punctatum*) and blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*). LWT-Food Science and Technology. Vol 43. Issue 5. 792-800.
- Kloss, L., Meyer, J. D., Graeve, L., & Vetter, W. (2015). Sodium intake and its reduction by food reformulation in the European Union-A review. NFS Journal. Vol 1. 9-19.
- Kobayashi, Y., Mayer, S. G., & Park, J. W. (2017). FT-IR and Raman spectroscopies determine structural changes of tilapia fish protein isolate and surimi under different comminution conditions. Food Chemistry. Vol 226. 156-164.
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., & Beckman, J.S. (1994). Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. Free Radical Biology and Medicine. Vol 16. 149-156.
- Kosaka, Y. (2012). Microfloral and chemical changes during processing of heshiko produced by aging of salted mackerel with rice bran by means of conventional practice in Wakasa Bay area. Fish Sci. Fukui. Japan.
- Kranen, W. R., Kuppevelt, V. H. T., Goedhart, A. H., Veerkamp, H. C., Lambooy, E., & Veerkamp, H. J. (1999). Hemoglobin and myoglobin content in muscles of broiler chickens. Poultry Science. Vol 78. 467-476.
- Krilov, D., Balarin, M., Kosović, M., Gamulin, O., & Brnjas-Kraljević, J. (2009). FT-IR spectroscopy of lipoproteins—a comparative study. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. Vol 73. Issue 4. 701-706.
- Laakkonen, E., Wellington, G. H., & Sherbon, J. W. (1972). Low temperature, long-time heating of bovine muscle: Changes in tenderness, water-binding capacity, pH and amount of water-soluble components. Journal of Food Science. Vol 35. 175-177.



- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol 227. 680–685.
- Lanier, T. C., Carvajal, P., & Yongsawatdigul, J. (2000). Surimi gelation chemistry. Surimi and Surimi Seafood. Vol 2.
- Laycock, L., Piyasena, P., & Mittal, S. G. (2003). Radio frequency cooking of ground, comminuted and muscle meat products. Meat Science. Vol 65. 959-965.
- Lee, Y. S., Youm, G., Owens, C. M., & Meullenet, J. F. (2011). Optimization of consumer acceptability and sensory characteristics for marinated broiler breast meat. Journal of Food Science. Vol 76. Issue 8. 478–484.
- Lee, Y., Lim, S., & Lee, H. (2020). Chloride Resistance of Portland Cement-Based Mortar Incorporating High Aluminate Cement and Calcium Carbonate. Materials. Vol 13. Issue 2. 359.
- Li, D., Mu, C., Cai, S., & Lin, W. (2009). Ultrasonic irradiation in the enzymatic extraction of collagen. Ultrasonics Sonochemistry. Vol 16. Issue 5. 605-609.
- Li, P. H., Lu, W. C., Chan, Y. J., Ko, W. C., Jung, C. C., Le Huynh, D. T., & Ji, Y. X. (2020). Extraction and characterization of collagen from sea cucumber (*Holothuria cinerascens*) and its potential application in moisturizing cosmetics. Aquaculture. Vol 515. 734590.
- Li, R., Kerr, W. L., Toledo, R. T., & Carpenter, J. A. (2000). <sup>1</sup>H NMR studies of water in chicken breast marinated with different phosphates. Journal of Food Science. Vol 65. Issue 4. 575–580.
- Li, S., Tang, S., Yan, L., & Li, R. (2019). Effects of microwave heating on physicochemical properties, microstructure and volatile profiles of yak meat. Journal of Applied Animal Research. Vol 47. 262–272.
- Liang, L. L., Cai, S. Y., Gao, M., Chu, X. M. Pan, X. Y., Gong, K. K., Xiao, C. W., Chen, Y., Zhao, Y. Q., Wang, B., & Sun, K. L. (2020). Purification of antioxidant peptides of *Moringa oleifera* seeds and their protective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidative damaged Chang liver cells. Journal of Functional Foods. Vol 64. 103698.

- Liang, Q., Wang, L., Sun, W., Wang, Z., Xu, J., & Ma, H. (2014). Isolation and characterization of collagen from the cartilage of Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). Process Biochemistry. Vol 49. Issue 2. 318-323.
- Li-Chan, E. C. Y., Nakai, S., & Hirotsuka, M. (1994). Raman spectroscopy as a probe of protein structure in food system. In R. Y. Yada, R. L. Jackman, & J. L. Smith, (Eds.), Protein structure-function relationships in foods (pp. 163–197). Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall. London.
- Li-Chan, E., & Nakai, S. (1991). Raman spectroscopic study of thermally and/or dithiothreitol induced gelation of lysozyme. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 39. 1238- 1245
- Lin, Y. K., Lin, T. Y., & Su, H. P. (2011). Extraction and characterisation of telopeptide-poor collagen from porcine lung. Food Chemistry. Vol 124. Issue 4. 1583-1588.
- Lindman, S., Xue, W. F., Szczepankiewicz, O., Bauer, M. C., Nilsson, H., & Linse, S. (2006). Salting the charged surface: PH and salt dependence of protein G B1 stability. Biophysical Journal. Vol 90. 2911–2921.
- Liu, D., Wei, G., Li, T., Hu, J., Lu, N., Regenstein, J. M., & Zhou, P. (2015). Effects of alkaline pretreatments and acid extraction conditions on the acid-soluble collagen from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry. Vol 172. 836-843.
- Liu, R., Liu, Q., Xiong, S., Fu, Y., & Chen, L. (2017). Effects of high intensity ultrasound on structural and physicochemical properties of myosin from silver carp. Ultrasonics sonochemistry. Vol 37. 150-157.
- Lodhi, G., Kim, Y. S., Kim, E. K., Hwang, J. W., Won, H. S., Kim, W., Moon, S. H., Jeon, B. T., & Park, P. J. (2018). Isolation and characterisation of acid-and pepsin-soluble collagen from the skin of Cervus korean TEMMINCK var. mantchuricus Swinhoe. Animal Production Science. Vol 58. Issue 3. 585-594.
- López-Alarcón, C. & Denicola, A. (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assays. Analytica Chimica Acta. Vol 763. 1-10.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. Vol 193. 265-275.
- Lueangsakulthai, J., Jangpromma, N., Temsiripong, T., McKendrick, J. E., Khunkitti, W., Maddocks, S. E., & Klaynongsruang, S. (2017). A novel antibacterial peptide derived from *Crocodylus siamensis* haemoglobin hydrolysate induces membrane permeabilization causing iron dysregulation, oxidative stress and bacterial death. Journal of Applied Microbiology. Vol 123. 819–831.
- Luo, Q. B., Chi, C. F., Yang, F., Zhao, Y. Q., & Wang, B. (2018). Physicochemical properties of acid-and pepsin-soluble collagens from the cartilage of Siberian sturgeon. Environmental Science and Pollution Research. Vol 25. Issue 31. 31427-31438.
- Lyng, J. G., Zhang, L., & Brunton, N. P. (2005). A survey of the dielectric properties of meats and ingredients used in meat product manufacture. *Meat Science*. Vol 69. 589-602.
- Ma, S., Wang, C., & Guo, M. (2018). Changes in structure and antioxidant activity of  $\beta$ -lactoglobulin by ultrasound and enzymatic treatment. Ultrasonics sonochemistry. Vol 43. 227-236.
- Maity, I., Rasale, D. B., & Das, A. K. (2012). Sonication induced peptide-appended bola amphiphile hydrogels for in situ generation and catalytic activity of Pt nanoparticles. Soft Matter. Vol 8. Issue 19. 5301-5308.
- Mao, Y. J., Sheng, R. X., & Pan, M. X. (2007). The effects of NaCl concentration and pH on the stability of hyperthermophilic protein Ssh10b. BMC Biochemistry. Vol 28. 1–8.
- Margulis, M., & Margulis, I. (2003). Calorimetric method for measurement of acoustic power absorbed in a volume of a liquid. Ultrasonics Sonochemistry. Vol 10. Issue 6. 343-345.
- Martínez-Ortiz, M. A., Hernández-Fuentes, A. D., Pimentel-González, D. J., Campos-Montiel, R. G., Vargas-Torres, A., & Aguirre-Álvarez, G. (2015). Extraction and

- characterization of collagen from rabbit skin: partial characterization. CyTA- Journal of Food. Vol 13. Issue 2. 253-258.
- Mason, T., & Lorimer, J. (1990). A general introduction to sonochemistry. Sonochemistry: The Uses of Ultrasound in Chemistry. The Royal Society of Chemistry. Cambridge. UK. 1-8.
- Matsuo, T., Futsuhara, Y., Kikuchi, F. and Yamaguchi, H. (1997). Science of the Rice Plant. Vol 3:496. Nisan Gyoson Banka Kyokai (Nobunkyo). Tokyo.
- McDonnell, C., Lyng, J., & Allen, P. (2014). The use of power ultrasound for accelerating the curing of pork. Meat science. Vol 98. Issue 2. 142-149.
- McKenna, M. B., Lyng, J., Brunton, N., & Shirsat, N. (2006). Advances in radio frequency and ohmic heating of meats. Journal of Food Engineering. Vol 77. 215–229.
- Miller, L. M., Bourassa, M. W., & Smith, R. J. (2013). FTIR spectroscopic imaging of protein aggregation in living cells. Biochimica et Biophysica Acta. Vol 1828. 2339–2346.
- Milne, L., Stewart, I., & Bremner, D. H. (2013). Comparison of hydroxyl radical formation in aqueous solutions at different ultrasound frequencies and powers using the salicylic acid dosimeter. Ultrasonics sonochemistry. Vol 20. Issue 3. 984-989.
- Min, B., Cordray, C. J., & Ahn, U. D. (2010). Effect of NaCl, myoglobin, Fe(II), and Fe(III) on lipid oxidation of raw and cooked chicken breast and beef loin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 58. 600–605.
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., et al. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. Food & Function. Vol 5. 1113-1124
- Minelli, A., Conte, C., Grottelli, S., Bellezza, I., Cacciatore, I., & Bolaños, J. P. (2009). Cyclo(His-Pro) promotes cytoprotection by activating Nrf2-mediated up-regulation of antioxidant defence. Journal of Cellular and Molecular Medicine. Vol 13. 1149-1161.

- Minkiewicz, P., Iwaniak, A., & Darewicz, M. (2019). BIOPEP-UWM database of bioactive peptides: current opportunities. International Journal of Molecular Sciences. Vol 20. 5978.
- Mironczuk-Chodakowska, I., Witkowska, A.-M., & Zujko, M.-E. (2018). Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. Advances in Medical Sciences. Vol 63. 68-78.
- Miyamoto, Y., & Nishimura, K. (2006). Beneficial effects of ascorbic acid on heat-induced fish gel (kamaboko) from the superoxide anion radical. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol 70. Issue 2. 480-488.
- Moller, J., Schroer, M. A., Erkkamp, M., Grobelny, S., Paulus, M., Tiemeyer, S., Winter, R. (2012). The effect of ionic strength, temperature, and pressure on the interaction potential of dense protein solutions: From nonlinear pressure response to protein crystallization. Biophysical Journal. Vol 102. 2641–2648.
- Monahan, F. J., German, J. B., & Kinsella, J. E. (1995). Effect of pH and temperature on protein unfolding and thiol/disulfide interchange reactions during heat-induced gelation of whey proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 43. Issue 1. 46-52.
- Moura, L. I., Dias, A. M., Suesca, E., Casadiegos, S., Leal, E. C., Fontanilla, M. R., Carvalho, L., de Sousa, H. C., & Carvalho, E. (2014). Neurotensin-loaded collagen dressings reduce inflammation and improve wound healing in diabetic mice. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. Vol 1842. Issue 1. 32-43.
- Movellan, K. T., Wegstroth, M., Overkamp, K., Leonov, A., Becker, S., & Andreas, L. B. (2020). Imidazole–imidazole hydrogen bonding in the pH-sensing histidine side chains of influenza A M2. Journal of the American Chemical Society. Vol 142. 2704-2708.
- Munasinghe, K., & Schwarz, J. (2017). Rooster Collagen Extracts from Rooster By-Products. Journal of Nutritional Health & Food Engineering. Vol 7. Issue 3. 00239.

- Nikmaram, P., Yarmand, S. M., Emamjomeh, Z., & Darehabi, K. H. (2011). The effect of cooking methods on textural and microstructure properties of veal muscle (*Longissimus dorsi*). Global Veterinaria. Vol 6. 201-207.
- Nimalaratne, C., Bandara, N., & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. Food Chemistry. Vol 188. 467-472.
- Nishimura, K., & Ohtsuru, M. (1990). Mechanism of improvement effect of ascorbic acid on the thermal gelation of fish meat. Nippon Suisan Gakkaishi. Vol 56. Issue 6. 959-966.
- Nishimura, K., Goto, M., & Mano, J. (1996). Participation of the superoxide radical in the beneficial effect of ascorbic acid on heat-induced fish meat gel (Kamaboko). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. Vol 60. 1966-1970.
- Nishinari, K., Phillips, G. O., Guo, S., & Fang, Y. (2014). Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. Food hydrocolloids. Vol 39. 301-318.
- Nwachukwu, I. D. & Aluko, R. E. (2019). Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptide. Journal of Food Biochemistry. Vol 43. e12761.
- Ohata, M., Uchida, S., Zhou, L., & Arihara, K. (2016). Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. Food Chemistry. Vol 194. 1034-1039.
- Oropallo, A. R. (2019). Use of native type I collagen matrix plus polyhexamethylene biguanide for chronic wound treatment. Plastic and Reconstructive Surgery Global Open. Vol 7. Issue 1.
- Oshima, H., & Kinoshita, M. (2013). Effects of sugars on the thermal stability of a protein. The Journal of Chemical Physics. Vol 138. 1-12.

- Pérez-Juan, M., Kondjayan, A., Picouet, P., & Realini, E. C. (2012). Effect of marination and microwave heating on the quality of Semimembranosus and Semitendinosus muscles from Friesian mature cows. Meat Science. Vol 92. 107–114.
- Pallaske, F., Pallaske, A., Herklotz, K., & Boese-Landgraf, J. (2018). The significance of collagen dressings in wound management: a review. Journal of Wound Care. Vol 27. Issue 10. 692-702.
- Palumbo, P., Cinque, B., Miconi, G., La Torre, C., Zoccali, G., Vrentzos, N., Vitale, A., Leocata, P., Lombardi, D., & Lorenzo, C. (2011). Biological effects of low frequency high intensity ultrasound application on ex vivo human adipose tissue. International Journal of Immunopathology and Pharmacology. Vol 24. Issue 2. 411-422.
- Park, J. W. (1994). Functional protein additives in surimi gels. Journal of Food Science. Vol 59. Issue 3. 525-527.
- Park, J. W. (Ed.) (2005). Surimi and surimi seafood (2nd ed.). Boca Raton: CRC Press (Appendix).
- Parvez, S., Long, M. J. C., Poganik, J. R., & Aye, Y. (2018). Redox signaling by reactive electrophiles and oxidants. Chemical Reviews. Vol 118. 8798-8888.
- Pascolo, L., Bortot, B., Benseny-Cases, N., Gianoncelli, A., Tosi, G., Ruozi, B., Rizzardj, C., De Martino, E., Vandelli, M. A., & Severini, G. M. (2014). Detection of PLGA-based nanoparticles at a single-cell level by synchrotron radiation FTIR spectromicroscopy and correlation with X-ray fluorescence microscopy. International Journal of Nanomedicine. Vol 9. 2791-2801.
- Pathare, B. P., & Roskilly, P. A. (2016). Quality and energy evaluation in meat cooking. Food Engineering Review. Vol 8. 435–447.
- Perisic, N., Afseth, N. K., Ofstad, R., & Kohler, A. (2011). Monitoring protein structural changes and hydration in bovine meat tissue due to salt substitutes by Fourier transform infrared (FTIR) micro spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 59. 10052-10061

- Pérez-Juan, M., Kondjoyan, A., Picouet, P., & Realini, E. C. (2012). Effect of marination and microwave heating on the quality of *Semimembranosus* and *Semitendinosus* muscles from Friesian mature cows. Meat Science. Vol 92. 107-114.
- Petibois, C., Cestelli-Guidi, M., Piccinini, M., Moenner, M., & Marcelli, A. (2010). Synchrotron radiation FTIR imaging in minutes: a first step towards real-time cell imaging. Analytical and Bioanalytical Chemistry. Vol 397. 2123–2129.
- Piyasena, P., Dussault, C., Koutchma, T., Ramaswamy, S. H., & Awuah, B. G. (2003). Radio frequency heating of foods: principles, applications and related properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 43. 587-606.
- Raghavan, S., Kristinsson, H. G., & Leeuwenburgh, C. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 56. 10359-10367.
- Ran, X. G., & Wang, L. Y. (2014). Use of ultrasonic and pepsin treatment in tandem for collagen extraction from meat industry by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 94. Issue 3. 585-590.
- Rappu, P., Salo, A. M., Myllyharju, J., & Heino, J. (2019). Role of prolyl hydroxylation in the molecular interactions of collagens. Essays in Biochemistry. Vol 63. Issue 3. 325-335.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine. Vol 26. 1231-1237.
- Ren, X., Liang, Q., Zhang, X., Hou, T., Li, S., & Ma, H. (2018). Stability and antioxidant activities of corn protein hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. Cereal Chemistry. Vol 95. 760-769.
- Riesz, P., & Kondo, T. (1992). Free radical formation induced by ultrasound and its biological implications. Free Radical Biology and Medicine. Vol 13. Issue 3. 247-270.



- Rincon, M. A., Singh, K. R., & Stelzleni, M. A. (2015). Effects of endpoint temperature and thickness on quality of whole muscle non-intact steaks cooked in a radio frequency oven. Food Science and Technology. Vol 64. 1323-1328.
- Ruszczak, Z. (2003). Effect of collagen matrices on dermal wound healing. Advanced Drug Delivery Reviews. Vol 55. Issue 12. 1595-1611.
- Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 51. 3668-3674.
- Saleem, R., & Ahmad, R. (2016). Effect of low frequency ultrasonication on biochemical and structural properties of chicken actomyosin. Food Chemistry. Vol 205. 43-51.
- Saleem, R., Hasnain, A. U., & Ahmad, R. (2015). Solubilisation of muscle proteins from chicken breast muscle by ultrasonic radiations in physiological ionic medium. Cogent Food & Agriculture. Vol 1. Issue 1. 1046716.
- Salgin, S., Salgin, U., & Bahadir, S. (2012). Zeta potentials and isoelectric points of biomolecules: the effects of ion types and ionic strengths. International Journal of Electrochemical Science. Vol 7. Issue 12. 12404-12414.
- Samaranayaka, A. G. P. & Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: a review of their production, assessment, and potential applications. Journal of Functional Foods. Vol 3. 229-254.
- Samaranayaka, A.G.P., Kitts, D.D., & Li-Chan, E.C.Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 58. 1535-1542
- Sangtitanu, T., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, O., & Karnchanatat, A. (2020). Peptides obtained from edible mushrooms: hericium erinaceus offers

- the ability to scavenge free radicals and induce apoptosis in lung cancer cells in humans. Food & Function. Vol 11. 4927-4939.
- Sharma, A., Wongkham, C., Prasongwattana, V., Boonnate, P., Thanan, R., Reungjui, S., & Cha'on, U. (2014). Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to monosodium glutamate. PLoS One. Vol 9. Issue 12. e116233.
- Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology. Vol 100. 3419-3425.
- Shi, J., Roos, D. A., Schouten, O., Zheng, C., Vink, C., Vonk, B., Edens, L. (2015). Properties of hemoglobin decolorized with a histidine-specific protease. Journal of Food Science. Vol 80. Issue 6. 1202-1208.
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen structure and stability. Annual Review of Biochemistry. Vol 78. 929-958.
- Sies, H. & Jones, D. P. (2020). Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. Nature Reviews Molecular Cell Biology. Vol 21. 363-383.
- Silva, C. M. L., Spinelli, E., & Rodrigues, S. V. (2015). Fast and sensitive collagen quantification by alkaline hydrolysis/hydroxyproline assay. Food Chemistry. Vol 173. 619-623.
- Silva, J. o. C., Barros, A. A., Aroso, I. M., Fassini, D., Silva, T. H., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2016). Extraction of collagen/gelatin from the marine demosponge *Chondrosia reniformis* (Nardo, 1847) using water acidified with carbon dioxide—process optimization. Industrial & Engineering Chemistry Research. Vol 55. Issue 25. 6922-6930.
- Sinanoglou, J. V., Cavouras, D., Xenogiannopoulos, D., Proestos, C., & Zoumpoulakis, P. (2018). Quality assessment of pork and turkey hams using FT-IR spectroscopy, colorimetric, and image analysis. Foods. Vol 7. 1-16.

- Singh, N., Kaur, L., Sodhi, N. S., & Sekhon, K. S. (2005). Physicochemical, cooking and textural properties of milled rice from different Indian rice cultivars. Food Chemistry. Vol 89. Issue 2. 253-259.
- Singh, S., Ponnappan, N., Verma, A., & Mittal, A. (2019). Osmotic tolerance of avian erythrocytes to complete hemolysis in solute free water. Scientific Reports. Vol 9. 1-9.
- Smith, P. D., & Northcutt, K. J. (2003). Red discoloration of fully cooked chicken products. Journal of Applied Poultry Research. Vol 12. 515-521.
- Smith, P. D., & Young, L. L. (2007). Marination pressure and phosphate effects on broiler breast fillet yield, tenderness, and color. Poultry Science. Vol 86. 2666-2670.
- Song, K. M., Jung, S. K., Kim, Y. H., Kim, Y. E., & Lee, N. H. (2018). Development of industrial ultrasound system for mass production of collagen and biochemical characteristics of extracted collagen. Food and Bioprocess Processing. Vol 110. 96-103.
- Song, W. K., Liu, D., Sun, L. L., Li, B. F., & Hou, H. (2019). Physicochemical and biocompatibility properties of type I collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) for biomedical applications. Marine drugs. Vol 17. Issue 3. 137.
- Sopade, P. A., & Gidley, M. J. (2009). A Rapid In-vitro Digestibility Assay Based on Glucometry for Investigating Kinetics of Starch Digestion. Starch – Stärke. Vol 61. Issue 5. 245-255.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. Trends in food science & technology. Vol 21. Issue 7. 323-331.
- Sturkie, P. D. (2015). Avian Physiology. New York: Elsevier.
- Suman, P. S., Nair, M. N., Joseph, P., & Hunt, M. C. (2016). Factors influencing internal color of cooked meats. Meat Science. Vol 120. 133-144.

- Tadpitchayangkoon, P., Park, J. W., & Yongsawatdigul, J. (2012). Gelation characteristics of tropical surimi under water bath and ohmic heating. LWT-Food Science and Technology. Vol 46. Issue 1. 97-103.
- Taguchi, T., Ishizaka, H., Tanaka, M., Nagashima, Y., & Amano, K. (1987). Protein-protein interaction of fish myosin fragments. Journal of Food Science. Vol 52. Issue 4. 1103-1104.
- Tahergorabi, R., & Jaczynski, J. (2012). Physicochemical changes in surimi with salt substitute. Food Chemistry. Vol 132. Issue 3. 1281-1286.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Tsubaki, K., Hirata, M., Yamamoto, K., Biswas, A., Moriyama, T., & Kawamura, Y. (2018). Isolation and characterization of acid-soluble bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) skin collagen. Fisheries and Aquatic Sciences. Vol 21. Issue 1. 7.
- Tang, L., & Yongsawatdigul, J. (2020). Physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) actomyosin subjected to high intensity ultrasound in low NaCl concentrations. Ultrasonics sonochemistry. Vol 63. 104922.
- Tang, Y., Jin, S., Li, X., Li, X., Hu, X., Chen, Y., Huang, F., Yang, Z., Yu, F., & Ding, G. (2018). Physicochemical properties and biocompatibility evaluation of collagen from the skin of giant croaker (*Nibea japonica*). Marine Drugs. Vol 16. Issue 7. 222.
- The Central Islamic Council. (2016). The requirements for certification process of Halal products. Vol 1. 1-28.
- The Council of the European Union. (2009). Council Regulation (EC) No 1099/2009 on the protection of animals at the time of killing. Vol 303. 1-30.
- Tonolo, F., Fiorese, F., Moretto, L., Folda, A., Scalcon, V., Grinzato, A., Ferro, S., Arrigoni, G., Bindoli, A., Feller, E., Bellamio, M., Marin, O., & Rigobello, M. P. (2020). Identification of new peptides from fermented milk showing antioxidant properties: mechanism of action. Antioxidants. Vol 9. 117.

- Topping, D. L., & Clifton, P. M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. Physiological Reviews. Vol 81. Issue 3. 1031-1064.
- Uddin, M., & Okazaki, E. (2010). Applications of vibrational spectroscopy to the analysis of fish and other aquatic food products. In C. Y. Li-Chan, P. R. Griffiths, & J. M. Chalmers (Eds.), Application of vibrational spectroscopy in food science, volume II: Analysis of food, drink and related materials. (pp. 439-460).
- Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., Li, H., Cui, W., & Lv, J. (2013). Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of milk protein concentrate with different enzymes. International Journal of Food Science & Technology. Vol 48. Issue 11. 2250-2257.
- Uresti, R. o. M., Téllez-Luis, S. J., Ramirez, J. A., & Vázquez, M. (2004). Use of dairy proteins and microbial transglutaminase to obtain low-salt fish products from filleting waste from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry. Vol 86. Issue 2. 257-262.
- USDA Foreign Agricultural Service. (2019). Global agricultural information network. GAIN Report Number: TH9109.
- Usha, R., & Ramasami, T. (2005). Structure and conformation of intramolecularly cross-linked collagen. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. Vol 41. Issue 1. 21-24.
- Vadivambal, R., & Jayas, S. D. (2010). Non-uniform temperature distribution during microwave heating of food materials-A review. Food Bioprocess Technology. Vol 3. 161-171.
- Valentas, K.J., Singh, P.R., and Rotstein, E. (1997). Handbook of food engineering practice. Boca Raton. New York: CRC Press.
- Veerkamp, C. H. (1988). What is the right current to stun and kill broilers? Poultry Misset. Vol 4. 30-31.

- Veeruraj, A., Arumugam, M., & Balasubramanian, T. (2013). Isolation and characterization of thermostable collagen from the marine eel-fish (*Evenchelys macrura*). Process Biochemistry. Vol 48. Issue 10. 1592-1602.
- Venn, M., & Maroudas, A. (1977). Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition. Annals of The Rheumatic Diseases. Vol 36. Issue 2. 121-129.
- Vidal, A. R., Duarte, L. P., Schmidt, M. M., Cansian, R. L., Fernandes, I. A., de Oliveira Mello, R., Demiate, I. M., & Dornelles, R. C. P. (2020). Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-products. Waste management. Vol 102. 838-846.
- Vijayan, D. K., Sreerekha, P., Tejpal, C., Asha, K., Mathew, S., Ravishankar, C., & Anandan, R. (2018). Extraction and characterization of acid soluble collagen (ASC) from airbladder of striped cat fish (Pangasius hypophthalmus). ICAR-Central Institute of Fisheries Technology. New Delhi. India.
- Vittayanont, M., & Jaroenviriyapap, T. (2014). Production of crude chondroitin sulfate from duck trachea. International Food Research Journal. Vol 21. Issue 2. 791.
- Vriend, J. & Reiter, R.-J. (2015). The Keap1-Nrf2-antioxidant response element pathway: a review of its regulation by melatonin and the proteasome. Molecular and Cellular Endocrinology. Vol 401. 213-220.
- Wahab, N., Roman, M., Chakravarthy, D., & Luttrell, T. (2014). The use of a pure native collagen dressing for wound bed preparation prior to use of a living bi-layered skin substitute. Journal of the American College of Clinical Wound Specialists. Vol 6. Issue 1-2. 2-8.
- Wakabayashi, S. (1993). [The effects of indigestible dextrin on sugar tolerance: III. Improvement in sugar tolerance by indigestible dextrin on the impaired glucose tolerance model]. Nihon Naibunpi Gakkai Zasshi. Vol 69. Issue 6. 594-608.

- Wang, B. & Li, B. (2017). Effect of molecular weight on the transepithelial transport and peptidase degradation of casein-derived peptides by using Caco-2 cell model. Food Chemistry. Vol 218. 1-8.
- Wang, C., Li, B., Wang, B., & Xie, N. (2015). Degradation and antioxidant activities of peptides and zinc-peptide complexes during *in vitro* gastrointestinal digestion. Food Chemistry. Vol 173. 733-740.
- Wang, F., Huisman, J., Stevels, A., & Baldé, C. P. (2013). Enhancing e-waste estimates: Improving data quality by multivariate Input-Output Analysis. Waste management. Vol 33. Issue 11. 2397-2407.
- Wang, G., Liu, M., Cao, L., Yongsawatdigul, J., Xiong, S., & Liu, R. (2018). Effects of different NaCl concentrations on self-assembly of silver carp myosin. Food Bioscience. Vol 24. 1-8.
- Wang, J. Y., Yang, Y. L., Tang, X. Z., Ni, W. X., & Zhou, L. (2017). Effects of pulsed ultrasound on rheological and structural properties of chicken myofibrillar protein. Ultrasonics sonochemistry. Vol 38. 225-233.
- Wang, L., Ding, L., Xue, C., Ma, S., Du, Z., Zhang, T., & Liu, J. (2018). Corn gluten hydrolysate regulates the expressions of antioxidant defense and ROS metabolism relevant genes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced HepG2 cells. Journal of Functional Foods. Vol 42. 362-370.
- Wei, P., Zheng, H., Shi, Z., Li, D., & Xiang, Y. (2019). Isolation and Characterization of Acid-soluble Collagen and Pepsin-soluble Collagen from the Skin of Hybrid Sturgeon. Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed. Vol 34. Issue 4. 950-959.
- Wei, W., Hu, W., Zhang, X. Y., Zhang, F. P., Sun, S. Q., Liu, Y., & Xu, C. H. (2018). Analysis of protein structure changes and quality regulation of surimi during gelation based on infrared spectroscopy and microscopic imaging. Scientific Reports. Vol 8. Issue 1. 5566.

- Wen, C., Zhang, J., Feng, Y., Duan, Y., Ma, H., & Zhang, H. (2020). Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress. Food Chemistry. Vol 327. 127059.
- Whitcomb, D.C. & Lowe, M.E. (2007). Human pancreatic digestive enzymes. Digestive Diseases and Sciences. Vol 52. 1-17.
- Wiegand, C., Buhren, B., Bünemann, E., Schrumpf, H., Homey, B., Frykberg, R., Lurie, F., & Gerber, P. (2016). A novel native collagen dressing with advantageous properties to promote physiological wound healing. Journal of Wound Care. Vol 25. Issue 12. 713-720.
- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Roytrakul, S., & Yongsawadigul, J. (2013). Isolation and identification of antioxidative peptides from hydrolysate of threadfin bream surimi processing byproduct. Journal of Functional Foods. Vol 5. 1654-1664.
- Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E.A., & Yongsawatdigul, J. (2015). Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. Food Chemistry. Vol 167. 7-15.
- Wolfe, K.L. & Liu, R.H. (2007). Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 55. 8896-8907
- Wong, F. C., Xiao, J., Wang, S., Ee, K. Y., & Chai, T. T. (2020). Advances on the antioxidant peptides from edible plant sources. Trends in Food Science & Technology. Vol 99. 44-57.
- Wu, G., Mansy, S. S., Wu, S.-P., Surerus, K.K., Foster, M.W., & Cowan, J.A. (2002). Characterization of an iron- sulfur cluster assembly protein (ISU1) from *Schizosaccharomyces pombe*. Biochemistry. Vol 41. 5024-5032,
- Wu, J., Guo, X., Liu, H., & Chen, L. (2019). Isolation and Comparative Study on the Characterization of Guanidine Hydrochloride Soluble Collagen and Pepsin



- Soluble Collagen from the Body of Surf Clam Shell (*Coelomactra antiquata*). Foods. Vol 8. Issue 1. 11.
- Wu, J., Kong, L., Zhang, J., & Chen, W. (2019). Extraction and properties of acid-soluble collagen and pepsin-soluble collagen from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) scales: prerequisite information for fishery processing waste reuse. Polish Journal of Environmental Studies. Vol 28. Issue 4. 2923-2930.
- Wu, J., Sun, B., Luo, X., Zhao, M., Zheng, F., Sun, J., Li, H., Sun, X., & Huang, M. (2018). Cytoprotective effects of a tripeptide from Chinese Baijiu against AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signaling. RSC Advances. Vol 8. 10898-10906.
- Wu, L., Wu, T., Wu, J., Chang, R., Lan, X., Wei, K., & Jia, X. (2016). Effects of cations on the “salt in” of myofibrillar proteins. Food Hydrocolloids. Vol 58. 179-183.
- Xiong, X. L., & Kupski, D. R. (1999). Monitoring phosphate marinade penetration in tumbled chicken filets using a thin-slicing, dye tracing method. Poultry Science. Vol 78. 1048-1052.
- Xu, F., Wang, L., Ju, X., Zhang, J., Yin, S., Shi, J., He, R., & Yuan, Q. (2017). Transepithelial transport of YWDHNNPQIR and its metabolic fate with cytoprotection against oxidative stress in human intestinal Caco-2 cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 65. 2056-2065.
- Xu, Q., Fan, H., Yu, W., Hong, H., & Wu, J. (2017). Transport study of egg derived antihypertensive peptides (LKP and IQW) using Caco-2 and HT29 co-culture monolayers. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 65. 7406-7414.
- Xu, X. L., Han, M. Y., Fei, Y., & Zhou, G. H. (2011). Raman spectroscopic study of heat induced gelation of pork myofibrillar proteins and its relationship with textural characteristic. Meat Science. Vol 87. Issue 3. 159-164.
- Yang, Q., Cai, X., Yan, A., Tian, Y., Du, M., & Wang, S. (2020). A specific antioxidant peptide: its properties in controlling oxidation and possible action mechanism. Food Chemistry. Vol 327. 126984.

- Yang, S., Leong, K.-F., Du, Z., & Chua, C.-K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. Tissue Engineering. Vol 7. Issue 6. 679-689.
- Yang, X.-R., Zhang, L., Ding, D.-G., Chi, C.-F., Wang, B., & Huo, J.-C. (2019). Preparation, identification, and activity evaluation of eight antioxidant peptides from protein hydrolysate of hairtail (*Trichiurus japonicas*) muscle. Marine Drugs. Vol 17. 23.
- Yarmand, S. M., & Homayouni, A. (2011). Microwave processing of meat. Rijeka. Croatia.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Kristinsson, H.G., & Bakken, H.E. (2015). Preventive effect of Nile tilapia hydrolysate against oxidative damage of HepG2 cells and DNA mediated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and AAPH. Journal of Food Science and Technology. Vol 52. 6194-6205.
- 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. Journal of Food Science and Technology. Vol 52. 3336-3349.
- Yongsawatdigul, J., & Park, J. W. (1999). Thermal aggregation and dynamic rheological properties of Pacific whiting and cod myosins as affected by heating rate. Journal of Food Science. Vol 64. Issue 4. 679-683.
- Yongsawatdigul, J., & Park, J. W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chemistry. Vol 83. Issue 3. 409-416.
- Yongsawatdigul, J., & Piyadhamviboon, P. (2004). Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chemistry. Vol 87. Issue 3. 447-455.
- Yongsawatdigul, J., & Piyadhamviboon, P. (2005). Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 85. Issue 9. 1453-1460.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. Vol 120. 810-816.

- Yu, L., Ramaswamy, H. S., & Boye, J. (2013). Protein rich extruded products prepared from soy protein isolate-corn flour blends. LWT Food Science and Technology. Vol 50. Issue 1. 279-289.
- Yu, P. (2006). Synchrotron IR microspectroscopy for protein structure analysis: Potential and questions. Spectroscopy. Vol 20. 229–251.
- Yu, T. Y., Morton, J. D., Clerens, S., & Dyer, J. M. (2017). Cooking-induced protein modifications in meat. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. Vol 16. 141-159.
- Zeng, S., Yin, J., Yang, S., Zhang, C., Yang, P., & Wu, W. (2012). Structure and characteristics of acid and pepsin-solubilized collagens from the skin of cobia (*Rachycentron canadum*). Food Chemistry. Vol 135. Issue 3. 1975-1984.
- Zhang, T., Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., & Xue, C. (2016). Effects of konjac glucomannan on heat-induced changes of physicochemical and structural properties of surimi gels. Food Research International. Vol 83. 152–161.



- Zhang, X., Noisa, P., & Yongsawatdigul, J. (2020). Chemical and cellular antioxidant activities of *in vitro* digests of tilapia protein and its hydrolysates. Foods. Vol 9. 833.
- Zhang, X., Xu, S., Shen, L., & Li, G. (2020). Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of extraction, processing and modification. Journal of Leather Science and Engineering. Vol 2. Issue 1. 1-29.
- Zhang, Z., Regenstein, J. M., Zhou, P., & Yang, Y. (2017). Effects of high intensity ultrasound modification on physicochemical property and water in myofibrillar protein gel. Ultrasonics sonochemistry. Vol 34. 960-967.
- Zhang, Z., Zhang, X., Chen, W., & Zhou, P. (2018). Conformation stability, *in vitro* digestibility and allergenicity of tropomyosin from shrimp (*Exopalaemon modestus*) as affected by high intensity ultrasound. Food Chemistry. Vol 245. 997-1009.
- Zhao, Y., Wang, Z., Zhang, J., & Su, T. (2018). Extraction and characterization of collagen hydrolysates from the skin of *Rana chensinensis*. 3 Biotech. Vol 8. Issue 3. 181.
- Zheng, L., Su, G., Ren, J., Gu, L., You, L., & Zhao, M. (2012). Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 60. 5431-5437.
- Zheng, L., Zhao, M., Xiao, C., Zhao, Q., & Su, G. (2016). Practical problems when using ABTS assay to assess the radical-scavenging activity of peptides: importance of controlling reaction pH and time. Food Chemistry. Vol 192. 288-294.
- Zheng, L., Zhao, Y., Dong, H., Su, G., & Zhao, M. (2016). Structure–activity relationship of antioxidant dipeptides: dominant role of Tyr, Trp, Cys and Met residues. Journal of Functional Foods. Vol 21. 485-496.
- Zhou, C., Li, Y., Yu, X., Yang, H., Ma, H., Yagoub, A. E. A., Cheng, Y., Hu, J., & Otu, P. N. Y. (2016). Extraction and characterization of chicken feet soluble collagen. LWT. Vol 74. 145-153.

- Zhu, L., Xie, Y., Wen, B., Ye, M., Liu, Y., Imam, K. M. S. U., Cai, H., Zhang, C., Wang, F., & Xin, F. (2020). Porcine bone collagen peptides promote osteoblast proliferation and differentiation by activating the PI3K/Akt signaling pathway. Journal of Functional Foods. Vol 64. 103697.
- Zhuang, H., An, H., Chen, H., Xie, Z., Zhao, J., Xu, X., & Jin, Z. (2010). Effect of extrusion parameters on physicochemical properties of hybrid indica rice (type 9718) extrudates. Journal of Food Processing and Preservation. Vol 34. Issue 6. 1080-1102.
- Zou, Y., Xu, P., Li, P., Cai, P., Zhang, M., Sun, Z., Sun, C., Xu, W., & Wang, D. (2017). Effect of ultrasound pre-treatment on the characterization and properties of collagen extracted from soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*). LWT-Food Science and Technology. Vol 82. 72-81.
- Zou, Y., Xu, P., Wu, H., Zhang, M., Sun, Z., Sun, C., Wang, D., Cao, J., & Xu, W. (2018). Effects of different ultrasound power on physicochemical property and functional performance of chicken actomyosin. International Journal of Biological Macromolecules. Vol 113. 640-647.
- Zou, Y., Yang, H., Zhang, X., Xu, P., Jiang, D., Zhang, M., Xu, W., & Wang, D. (2020). Effect of ultrasound power on extraction kinetic model, and physicochemical and structural characteristics of collagen from chicken lung. Food Production, Processing and Nutrition. Vol 2. Issue 1. 3.

# ภาคผนวก



# ภาคผนวก ก.

การเผยแพร่ผลงานวิจัยสู่ผู้ใช้ประโยชน์



โครงการวิจัยมีการเผยแพร่สู่ผู้ใช้ประโยชน์ ดังนี้

| หัวหน้าโครงการวิจัย (รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล)   |   |   |
|--|---|---|
| กิจกรรม  | สถานที่   | จำนวนผู้ใช้ประโยชน์   |
| Surimi school Asia ครั้งที่ 12<br>(29 ต.ค. 2561 - 2 พ.ย. 2561)   | - โรงแรม อวานี เอเทรียม<br>กรุงเทพ ฯ                                    | - ผู้เข้าร่วม 50 คน   |
| บทบาทของ Enzyme ที่มีผลต่อการเกิดเจลของ surimi ทั้ง tropical fish และบทบาทของ ingredient การเกิดเจลใน surimi seafood product (27-28 มิ.ย. 2562)                            | - บริษัท ไทยรวมสินพัฒนาอุตสาหกรรม จำกัด<br>จ.สมุทรสาคร                  | - ผู้เข้าร่วม 50 คน   |
| การแปรรูปปลานิลเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร โครงการการพัฒนาฟาร์มเกษตรกร ไปสู่ระบบการเกษตรแบบแม่นยำ (Precision agriculture)/ ฟาร์มอัจฉริยะ (Smart farm) (13 ส.ค. 2563) | - มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี<br>อาคารเครื่องมือ 3 (F3)<br>จ.นครราชสีมา | - ผู้เข้าร่วม 24 คน   |
| ผู้ร่วมวิจัย (รองศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา)   |   |   |
| กิจกรรม  | สถานที่   | จำนวนผู้ใช้ประโยชน์   |
| ให้คำปรึกษาและวางแผนงานวิจัยต่อยอดเพื่อนำไปผลิตเชิงพาณิชย์   | - บริษัท AP Connect Co., Ltd.<br>กรุงเทพ ฯ                              | - คุณณัฐกาญจน์ เตชะ<br>ธนดิษฐ์<br>ตำแหน่ง Sale and<br>marketing manager |





รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “บทบาทของ Enzyme ที่มีผลต่อการเกิดเจลของ surimi ทั้ง tropical fish และบทบาทของ ingredient การเกิดเจลใน surimi seafood product” ณ บริษัท ไทยรวมสินพัฒนาอุตสาหกรรม จำกัด



รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล เป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง “การแปรรูปปลานิลเพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิตทางการเกษตร” ณ อาคารเครื่องมือ 3 (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

# ภาคผนวก ข.

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์วารสาร



ได้รับการตีพิมพ์และเผยแพร่ในระดับนานาชาติ ทั้งหมด 7 ฉบับ ดังนี้

- Jantaranikorn, M. and Yongsawatdigul, J. (2020). Effect of marinating ingredients on temperature-induced denaturation of hemoglobin and its relation to red blood spot formation in cooked chicken breast. Journal of Food Science. Vol 85. Issue 8. 2398-2405. (Q2/ Impact factor 2.90)
- Jantaranikorn, M. Thumanu, K., and Yongsawatdigul, J. (2023). Reduction of red blood spots in cooked marinated chicken breast meat by combined microwave heating and steaming. Poultry Science. Vol 102. Article ID: 102317. (Q1/ Impact factor 3.19)
- Pao, D., Thumanu, K., and Yongsawatdigul J. (2021). Gelation and vibrational spectroscopy of tropical surimi induced by ascorbic acid and hydrogen peroxide. Journal of Food Science. Vol 86. Issue 3. 881-891. (Q2/ Impact factor 2.90)
- Tang, L. and Yongsawatdigul, J. (2020). Physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) actomyosin subjected to high intensity ultrasound in low NaCl concentrations. Ultrasonic Sonochemistry. Vol 63. Article ID: 104922. (Q1/ Impact factor 7.35)
- Tang L. and Yongsawatdigul, J. (2021). High intensity ultrasound improves threadfin bream surimi gelation at low NaCl contents. Journal of Food Science. Vol 86. Issue 3. 842-851. (Q2/ Impact factor 3.69)
- Zhang, X., Noisa, P., and Yongsawatdigul J. (2020). Chemical and cellular antioxidant activities of *in vitro* digesta of tilapia protein and its hydrolysates. Foods. Vol 9. Article ID: 833. (Q1/ Impact factor 4.12)
- Zhang, X., Noisa, P., and Yongsawatdigul J. (2021). Identification and characterization of tilapia antioxidant peptides that protect AAPH-induced HepG2 cell oxidative stress. Journal of Functional Foods. Vol 86. Article ID 104662. (Q1/ Impact factor 5.27)



# Effect of marinating ingredients on temperature-induced denaturation of hemoglobin and its relation to red blood spot formation in cooked chicken breast

Matthanee Jantaraniorn and Jirawat Yongsawatdigul<sup>1</sup>

Food Chemistry

**Abstract:** Red blood spot (RBS) commonly found in cooked chicken breast has caused severe economic loss as it is perceived as a sign of undercooked product. The objectives of this study were to investigate the cause of RBS as related to common ingredients used in marination, based on both chicken breast and isolated chicken hemoglobin (Hb) models. The effect of sodium chloride (NaCl), sodium tripolyphosphate (STPP), and glucose on thermal denaturation of Hb was investigated along with the extent of RBS formation in cooked marinated chicken breast. After vacuum tumbling for 65 min and subsequent storage at 4 °C for 20 hr, STPP and glucose were not absorbed into the center of chicken breast. However, Na<sup>+</sup> was absorbed after 12 hr storage. The denaturation temperature ( $T_d$ ) of isolated chicken Hb decreased to 65.8 °C in the presence of 1.5 M NaCl, while that of the control was 69.4 °C. STPP at pH 9 decreased  $T_d$  of Hb to 61.4 °C. The alkaline pH induced by STPP destabilized the Hb structure. RBSs were observed at 100% incidence when cooked to core temperatures of 50 and 70 °C for 1 min. RBSs were completely eliminated at core temperature of 85 °C. The ingredients used during marination appeared to have a minimal effect on RBS formation due to their limited absorption into the chicken breast. The cooking temperature is a major factor governing RBSs, as it directly affects the denaturation of Hb.

**Keywords:** chicken breast meat, hemoglobin, red blood spot, thermal denaturation

## 1. INTRODUCTION

Cooked chicken breast meat is an important food product with significant nutritional value. It has been popular with health-conscious customers due to its lower fat content (USDA Foreign Agricultural Service, 2019). One of the issues that have caused significant economic loss in chicken meat industry is pink color of cooked chicken breast products. It is not acceptable to most consumers as the product is perceived to be undercooked and not safe for consumption (Suman, Nair, Joseph, & Hunt, 2016). Two common color defects found in cooked chicken meat include pink meat and red blood spot (RBS). Pink meat is typically found in wide area at both surface and interior of cooked meat, and myoglobin and cytochrome c are thought to be responsible for the defect (Holownia, Chinnan, & Reynolds, 2003). Formation and prevention of pink meat has been well characterized (Bae, Cho, Hong, & Jeong, 2018; Cornforth, Calkins, & Faustman, 2001; Holownia, Chinnan, & Reynolds, 2004; Holownia, Chinnan, Reynolds, & Koehler, 2003). In contrast, RBS is described as a red spot observed only inside cooked chicken breast meat after transverse cutting. This defect is likely related to blood remaining in blood vessels after slaughtering. Factors affecting RBS formation have been studied, including the slaughter process, bleeding time, and stunning methods (Ahmed, 2003; Ali, Lawson, Tauson, Jensen, & Chwalibog, 2007; Contreras & Beraquet, 2001; Gregory

& Wilkins, 1989; Veerkamp, 1988). Electrical stunning at 45 mA has been reported to minimize RBSs (Ahmed, 2003). This was because when low current levels are used during stunning, cardiac pumping activity is slowly reduced, resulting in continued bleeding after slaughtering (Gregory & Wilkins, 1989). However, this method cannot be commercially practiced due to animal welfare regulations. A minimum stunning current of 100 mA per bird and a frequency <200 Hz is required by EU regulations (The Council of the European Union, 2009). A high current level during stunning could induce sudden cardiac arrest, leading to more blood remaining in the vessels after death (Gregory & Wilkins, 1989). In addition, stunning is prohibited by Halal regulations (The Central Islamic Council, 2016). When complete bleeding is not achieved, blood is likely to remain in vessels, causing RBS when the heating process is insufficient to denature Hb.

Marination is an important step in which ingredients, such as NaCl, sodium tripolyphosphate (STPP) and glucose, are commonly applied during vacuum tumbling (Khiari, Omana, Pietrasik, & Betti, 2013). These ingredients are used to tenderize the meat, increase the water holding capacity, and enhance the flavor (Dhanda, Pegg, & Shand, 2003; Kijowski & Mast, 1988). Nevertheless, each ingredient has a different ability to diffuse into chicken breast meat, depending on its molecular size, water solubility, concentration, and other factors. Li, Kerr, Toledo, and Carpenter (2000) reported that different phosphates showed different penetration rates in chicken breast. Tripolyphosphate and pyrophosphate, with smaller molecular sizes, diffused faster, and subsequently, they presented higher concentrations than did hexametaphosphate (Xiong & Kupski, 1999). Thus far, the diffusibility of NaCl and glucose into chicken breast has not been well established. The ingredients used during marination could also affect

JFDS-2020-0115 Submitted 1/21/2020, Accepted 5/3/2020. Authors are with School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Sunanaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. Direct inquiries to author Tang Hongbo (E-mail: jirawat@sut.ac.th).

## Reduction of red blood spots in cooked marinated chicken breast meat by combined microwave heating and steaming

Matthanee Jantaranikorn,<sup>\*</sup> Kanjana Thumanu,<sup>†</sup> and Jirawat Yongsawatdigul <sup>\*,†</sup>

<sup>\*</sup>*School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand; and* <sup>†</sup>*Synchrotron Light Research Institute (Public Organisation), Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

**ABSTRACT** One of the defects commonly found in cooked marinated chicken breast products is a red blood spot (RBS), which is caused by undercooked blood in vessels. This problem was alleviated by microwave (MW) pre-heating for 6 to 7 min, followed by steaming. RBS formation decreased when samples were heated to a core temperature of 80°C and were completely eliminated at a core temperature of 82°C and 85°C when a MW pre-heating step was applied for 7 min. Based on synchrotron-based Fourier transform infrared spectroscopy (SR-FTIR), blood remaining in

the blood vessel had a lower  $\alpha$ -helical content when samples were cooked by the combination of MW heating and steaming as compared with those prepared by steaming alone ( $P < 0.05$ ). MW pre-heating decreased cooking time by 28 to 48% as compared with steaming alone. Heating regimes had no effect on cooking loss, pH, water-holding capacity, and shear force. MW pre-heating for 7 min followed by steaming to a core temperature of 82°C appeared to be an effective heating regime to reduce the occurrence of RBS, with acceptable cooking loss.

**Key words:** red blood spot, microwave heating, steaming, blood denaturation, synchrotron radiation Fourier transform infrared spectroscopy

2023 Poultry Science 102:102317  
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102317>

### INTRODUCTION

The blood circulatory system in the skeletal muscle plays a vital role in the efficient provision of oxygen and nutrients required for contraction. Blood vessels are closely intertwined with skeletal muscle tissues lying between the bundles of muscle fibers (Hoving-Bolink et al., 2000). A chicken is slaughtered by cutting the jugular veins and carotid arteries. Bleeding out takes place rapidly after slaughtering owing to the passive process of cardiac pumping (Lambooij et al., 1999). Blood loss gradually decreases with the incidence of cardiac arrest (Ali et al., 2007). Blood retained in the blood vessels results in the formation of red blood spots (RBS) upon cooking (Jantaranikorn and Yongsawatdigul, 2020). This incidence is problematic for cooked chicken breast products. Red spots observed after transverse cutting are due to the incomplete denaturation of blood residues. The presence of RBS in commercial cooked products is a

sporadic incidence, which is not acceptable by most consumers as they are deemed to be undercooked meat (Smith and Northcutt, 2003; Bae, et al., 2018).

Thermal processing applied to chicken meat in industry includes steaming, roasting, grilling, or frying. Heat is typically transferred from the heating medium or the heat source to the chicken breast meat by convection, radiation, and/or conduction (Rincon et al., 2015). Limited heat transfer may be a reason for the incomplete denaturation of blood residues in blood vessels, particularly those located in the middle of the breast muscle (Sturkie, 2015). Although high heating temperatures and/or prolonged heating time can induce the complete denaturation of blood in blood vessels, it causes overcooking and significantly reduces yield (Pathare and Roskilly, 2016). Therefore, thermal processes that can assure the denaturation of blood residues in breast muscle without a significant loss of yield must be identified.

Microwave (MW) heating generates heat internally by dipole rotation and ionic conduction. This induces molecular friction and generates heat within meat products in an alternating electromagnetic field (Hebbbar and Rastogi, 2012). For industrial, scientific, and medical heating applications, the frequency range used for MW heating is 915 to 2,450 MHz (Piyasena et al., 2003). MW heating has attracted much interest in food industry

© 2022 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received April 16, 2022.

Accepted November 1, 2022.

<sup>†</sup>Corresponding author: [jirawat@sut.ac.th](mailto:jirawat@sut.ac.th)



# Gelation and vibrational spectroscopy of tropical surimi induced by ascorbic acid and hydrogen peroxide

Danou Pao, Kanjana Thumanu, and Jirawat Yongsawatdigul

**Abstract:** The combined effect of ascorbic acid (AsA) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) on gel-forming ability and structural changes of lizardfish (LZ) and threadfin bream (TB) surimi were investigated. Addition of 0.15% AsA and 0.1%  $H_2O_2$  greatly increased breaking force and distance of LZ surimi by 300% and 55%, respectively. Combination of 0.2% AsA and 0.15%  $H_2O_2$  resulted in the maximum TB surimi gel improvement with 150% and 90% increase in breaking force and distance, respectively. Browning reaction obviously occurred when combined AsA and  $H_2O_2$  was added, due to ascorbic acid oxidation. Polymerization of myosin heavy chain via disulfide bonds was promoted, and the formation of disulfide bonds was involved through oxidation of sulfhydryl groups with increasing AsA and  $H_2O_2$ . Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy revealed a decrease in  $\alpha$ -helix and an increase in  $\beta$ -sheet content as AsA and  $H_2O_2$  increased in both species. A decrease of band area of aliphatic (2,800 to 3,000 and 1,450  $cm^{-1}$ ), aromatic (1,208, 757, and ratio 850/830  $cm^{-1}$ ), and change of disulfide bonds (525 and 540  $cm^{-1}$ ) suggested an increase in hydrophobic interactions and disulfide bonds with addition of these additives. Based on principal component analysis (PCA), textural characteristics were positively correlated with  $\beta$ -sheet content. Our study suggested that combination of AsA and  $H_2O_2$  greatly enhanced gelation of LZ and TB by increasing not only disulfide bonds but also hydrophobic interactions.

**Keywords:** additive, FT-IR, FT-Raman, gel, principle component analysis

**Practical Application:** The combined ascorbic acid and hydrogen peroxide can be used to improve gelation of two important tropical surimi species, namely threadfin bream and lizardfish surimi, without requirement of setting. The optimum concentration of each additive varied with fish species.

## 1. INTRODUCTION

Threadfin bream (*Nemipterus* spp.; TB) and lizardfish (*Saurida* spp.; LZ) are important species of tropical surimi production in Southeast Asia (Guenneugues & Ianelli, 2014). Gel quality of tropical surimi is generally lower than cold water surimi due to differences in postharvest handlings of raw material and intrinsic properties of fish. Thus, a means to improve gel quality of tropical surimi has been sought. Transglutaminase (TGase) has been known to enhance surimi gel through nondisulfide cross-linking of myosin heavy chain (MHC) during setting. This process requires a certain period of incubation time for catalyzing an acyl-transfer reaction between glutamine and lysine residues (Folk, 1983). Recently, egg white powder has been employed to minimize proteolysis and improve gel properties. But its limitation includes sulfurous odor and the allergen issue. An increase in disulfide bonds would be one of the promising approaches to improve surimi gelation. Ascorbic acid (AsA) was found to increase surimi gel strength due to the oxidation of sulfhydryl (SH) groups (Miyamoto & Nishimura, 2006). AsA can be auto-oxidized to monodehydro-L-ascorbic acid and spontaneously disproportionate to dehydro-L-ascorbic acid

(DHA). The generation of superoxide anion radicals leads to oxidation of SH groups and the formation of disulfide bonds among MHC molecules (Nishimura et al., 1996). Additionally, hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) is known as an oxidizing agent that can induce the oxidation of thiol groups to form a disulfide bond (Banlue et al., 2010). According to US FDA (2004),  $H_2O_2$  can be added to food products at 0.04% to 1.25%. The combination of  $H_2O_2$  and AsA would likely induce oxidation of SH groups. Thus far, the promotion of disulfide bridges through the addition of reducing and/or oxidizing agents has not been well systematically studied in surimi gelation.

During heat-induced gelation, fish proteins undergo denaturation and aggregation through the involvement of hydrophobic interactions, electrostatic interactions, and disulfide bonds. Vibrational spectroscopy is a useful technique to elucidate structural changes in proteins (Wei et al., 2018). Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy can be used to monitor secondary structural changes. In addition, Raman spectroscopy provided information on the tertiary structure of proteins, including disulfide conformation, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions (Li-Chan et al., 1994). Thus, FT-IR and Raman spectroscopies are complementary techniques that can be applied to elucidate both secondary and tertiary structural changes induced by AsA and  $H_2O_2$ .

The objective of this study was to investigate the effect of AsA and  $H_2O_2$  on the texture and color properties of lizardfish and threadfin bream surimi. Protein structural changes of surimi gels as affected by AsA and  $H_2O_2$  were systematically evaluated by FT-IR and Raman. Principal component analysis (PCA) was also

JFDS-2020-1730 Submitted 9/25/2020, Accepted 1/12/2021. Authors Pao and Yongsawatdigul are with School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. Author Thumanu is with Synchrotron Light Research Institute (Public Organization), Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. Direct inquiries to author Yongsawatdigul (E-mail: jirawat@sut.ac.th).



## Physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) actomyosin subjected to high intensity ultrasound in low NaCl concentrations

Ling Tang, Jirawat Yongsawatdigul\*

School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand



### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
NaCl  
Actomyosin  
High intensity ultrasound  
Physicochemical properties

### ABSTRACT

Effects of high intensity ultrasound (HIU) on physicochemical properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) actomyosin in low NaCl concentrations were investigated. The protein content extracted in low NaCl concentrations (0.1–0.3 M NaCl) increased with increasing HIU intensity up to 20.62 W/cm<sup>2</sup> ( $p < 0.05$ ). The effect of HIU on actomyosin extractability in high NaCl concentrations (0.6 and 1.2 M NaCl) was less obvious. Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity and total sulfhydryl (SH) group content decreased in both 0.2 and 0.6 M NaCl. HIU showed more pronounced effect on oxidation of the SH groups in 0.6 M NaCl, while the reactive SH content at 0.2 M NaCl increased after a prolonged exposure to HIU, suggesting conformational changes induced by HIU. Surface hydrophobicity of actomyosin in 0.6 M NaCl increased with increasing ultrasonic intensity and exposure time to a higher degree than that in 0.2 M NaCl. A greater absolute value of the zeta potential of actomyosin subjected to HIU were also observed. The HIU treatments decreased the turbidity of actomyosin incubated at 40 and 60 °C. A drastic increase in the solubility of myosin heavy chain (MHC) and actin with 0.2 M NaCl were evident when HIU treatments were applied, but degradation of MHC occurred in both 0.2 and 0.6 M NaCl. Based on particle size and microstructure, actomyosin in 0.6 M NaCl underwent more disruption by HIU than that in 0.2 M NaCl. HIU induced protein unfolding and protein dissociation, enabling better extraction in a lower NaCl concentration.

### 1. Introduction

Myofibrillar proteins are salt-soluble proteins requiring > 0.3 M NaCl concentrations for solubilization and gelation. Hence, sodium chloride plays a key role in the gelation of muscle foods. Currently, the reduction of sodium in foods has been driven by more consumers since excessive sodium intake can cause health problems, such as hypertension and cardiovascular diseases [1]. To meet consumer demand, the production of low-salt or reduced-salt muscle food gels has been developed based on various strategies. The partial substitution of NaCl with other salts, especially KCl, is commonly practiced, but has negative effects on flavor and texture [2]. The addition of various additives, such as sodium pyrophosphate [3], microbial transglutaminase [4] and amino acids (e.g., lysine, cysteine and histidine) [5], has also been studied to improve the gel properties of myofibrillar proteins at low-salt or reduced-salt levels. In addition, some alternative processing techniques such as microwave [6] and high pressure [7] processes have been applied.

Recently, applications of high intensity ultrasound (HIU) have been explored in food research, because HIU is regarded as a safe, nontoxic and environmentally friendly technology. HIU has a low frequency (16–100 kHz) and high power (typically 10–1,000 W/cm<sup>2</sup>) [8]. Cavitation, the formation of microstreaming and highly reactive free radicals ( $H_2O \rightarrow \cdot H + \cdot OH$ ), typically take place during sonication, leading to energy accumulation, high shear energy waves, and possible chemical reactions [8]. This would eventually affect the physicochemical properties of food components, especially myofibrillar proteins.

Based on HIU principle, it is possible to increase solubility of myofibrillar proteins at relatively low salt concentrations. This would, in turn, improve gel properties at low-salt or reduced-salt levels. It has been reported that HIU not only causes protein dissociation and improves the solubility of myofibrillar proteins at high ionic strength [9] but also induces the exposure, aggregation and/or oxidation of some functional groups of myofibrillar proteins (e.g., hydrophobic and sulfhydryl groups) [10]. Furthermore, HIU has been proven to accelerate the mass transfer of NaCl in meat tissues [11]. In addition, the potential

**Abbreviations:** HIU, high intensity ultrasound; MHC, myosin heavy chain; S<sub>0</sub>-ANS, surface hydrophobicity; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SH, sulfhydryl

\* Corresponding author.

E-mail address: [jirawat@sut.ac.th](mailto:jirawat@sut.ac.th) (J. Yongsawatdigul).

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104922>

Received 1 October 2019; Received in revised form 10 November 2019; Accepted 7 December 2019

Available online 09 December 2019

1350-4177/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.





# High-intensity ultrasound improves threadfin bream surimi gelation at low NaCl contents

Ling Tang and Jirawat Yongsawatdigul

**Abstract:** Effects of high-intensity ultrasound (HIU) treatments on gelation of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi at various NaCl contents (0.5, 1, and 2% NaCl) were investigated. Protein extractability at 0.5% NaCl was increased with the ultrasonic intensity ( $p < 0.05$ ). At all tested NaCl contents, reactive sulfhydryl group (SH) content and surface hydrophobicity of the surimi pastes were increased after HIU treatments and were accompanied by a decrease in the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and total SH content, indicating a greater extent of unfolding and conformational changes induced by HIU at higher NaCl contents. Textural properties and color of the surimi gels at 0.5% NaCl were improved concomitant to an increase in ultrasonic intensity ( $p < 0.05$ ), whereas HIU treatments resulted in inferior gels at 1 and 2% NaCl. Scanning electron microscopy (SEM) revealed that HIU resulted in a more orderly gel network at 0.5% NaCl. Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy indicated that the  $\alpha$ -helix content of the surimi gels was decreased as the ultrasonic intensity and NaCl content increased, confirming that structural changes induced by HIU were more profound at higher NaCl contents. The results suggested that HIU technology can be applied to improve only the 0.5% NaCl surimi gel.

**Keywords:** high-intensity ultrasound, low salt, protein conformation, surimi

**Practical Application:** High-intensity ultrasound (HIU) improved surimi gel containing 0.5% NaCl due to an increase in protein extractability and protein conformational changes. It is likely to lay a theoretical foundation for utilization of HIU technology in production of surimi-based products at low/reduced salt levels.

## 1. INTRODUCTION

Gelation is a critical parameter determining the quality of surimi because it governs the textural and sensory characteristics of the surimi-based products. Gelation of surimi is directly related to the myofibrillar proteins. Sodium chloride at 2% to 3% is typically required to facilitate solubilization of the myofibrillar proteins (Lanier et al., 2005). A decrease in NaCl content results in poor gel-forming ability of surimi because the protein is not adequately solubilized and is not properly unfolded (Lanier et al., 2005). This poses a challenge from a technological standpoint in production of reduced/low sodium surimi-based gels.

High-intensity ultrasound (HIU) is a green processing technology with low frequency (16 to 100 kHz) and high power (10 to 1,000 W/cm<sup>2</sup>) (Soria & Villamiel, 2010). During sonication, the formation and collapse of cavitation bubbles results in energy accumulation and strong microstreaming (Soria et al., 2010). Simultaneously, a quantity of highly reactive free radicals ( $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \bullet\text{H} + \bullet\text{OH}$ ) can be generated from the water molecules; the radicals may react with and modify other molecules/reactive groups (e.g., sulfhydryl groups of proteins) (Soria et al., 2010). HIU has been recently applied to modify physicochemical properties of the myofibrillar proteins such as solubility (Liu et al., 2017; Zhang et al., 2017). It has been reported that HIU induces unfolding of myofibrillar proteins, exposing additional hydrophobic and sulfhydryl

groups (Wang et al., 2017; Zou et al., 2018). Hence, an increase in the soluble myofibrillar proteins and the extent of protein unfolding are expected to lead to strong protein interactions and gel networks. In addition, our previous study suggested a potential use of HIU technology in extraction of actomyosin in low NaCl concentrations (Tang & Yongsawatdigul, 2020). Thus, it is assumed that HIU should positively contribute to the surimi gel under reduced salt concentration due to increased solubility of the myofibrillar proteins, which are thought to be the base element of gel formation. Nevertheless, myosin globular head might undergo severe conformational changes in high NaCl concentration (0.6 M NaCl) after subjected to HIU treatments (Tang et al., 2020), implying that HIU may not be good for typical surimi gel produced with 2% to 3% NaCl.


At present, only a few studies have focused on the application of HIU technology in surimi gelation; HIU can be a promising technology that can improve the surimi gel without the use of chemicals and/or enzymes. Our previous work illustrated HIU-induced physicochemical changes of fish actomyosin in different NaCl concentrations (Tang et al., 2020). However, how HIU treatment would affect gel properties of fish proteins at various NaCl contents has not yet been elucidated thus far. Therefore, the objectives of this study were: (1) to investigate the effects of HIU treatments on gel properties of threadfin bream surimi under low/reduced salt using 2% NaCl as a control; (2) to illustrate physicochemical changes in threadfin bream surimi as a function of NaCl contents and HIU. Understanding of gelation behavior of surimi under HIU is expected to provide the fundamental basis for utilization of the HIU technology in production of the surimi-based products at low/reduced salt levels.

JFDS-2020-1527 Submitted 8/28/2020, Accepted 1/12/2021. Authors are with School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand. Direct inquiries to author Yongsawatdigul (E-mail: jirawat@sut.ac.th).



Article

# Chemical and Cellular Antioxidant Activities of In Vitro Digesta of Tilapia Protein and Its Hydrolysates

Xiaogang Zhang <sup>1</sup> , Parinya Noisa <sup>2</sup> and Jirawat Yongsawatdigul <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Agricultural Technology, School of Food Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand; zxg-food@hotmail.com

<sup>2</sup> Institute of Agricultural Technology, School of Biotechnology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand; p.noisa@sut.ac.th

\* Correspondence: jirawat@sut.ac.th; Tel.: +66-4422-4359; Fax: +66-4422-4387

Received: 30 May 2020; Accepted: 22 June 2020; Published: 25 June 2020



**Abstract:** Production of protein hydrolysate as nutraceuticals is typically based on the activity of the hydrolysate, which might not yield the optimal activity under physiological condition due to structural modification of peptides upon gastrointestinal (GI) digestion. This study systematically compared the chemical and cellular antioxidant activities of the in vitro digesta of tilapia protein and its hydrolysates prepared with various degree of hydrolysis (DH) by Alcalase. The enzymes used in the in vitro GI digestion analysis significantly contributed to the peptide content, Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), and oxygen radical absorbance capacity (ORAC). Proteins and all hydrolysates were slightly digested by pepsin but hydrolyzed extensively by pancreatin. Both hydrolysate and digesta predominantly scavenged free radicals via hydrogen atom transfer (HAT). The antioxidant activities of the hydrolysates increased with the increasing DH up to 16 h of hydrolysis. However, the digesta of 10-h hydrolysate displayed the highest chemical and HepG2 cellular antioxidant activities, while the protein digesta displayed the lowest. Principal component analysis (PCA) showed that the TEAC of the digesta was positively correlated with the cellular antioxidant activity (CAA). Therefore, the production of protein hydrolysate should be optimized based on the activity of the hydrolysate digesta rather than that of hydrolysates.

**Keywords:** antioxidant activity; protein hydrolysate; in vitro GI digestion; oxidative stress

## 1. Introduction

Antioxidant peptides derived from food proteins have been widely elucidated and characterized in various food protein sources [1–4]. They have been considered as a natural antioxidant, which can retard oxidative deterioration of food during storage [4–6]. In addition, antioxidant peptides have been shown to protect biological systems from oxidative damages which can cause many pathophysiological processes such as aging, inflammation, diabetes, and cancer [4,7,8]. Inclusion of the protein hydrolysate containing antioxidant peptides in feeds has also ensured desirable rates of growth performance and feed efficiency in pigs, calves, poultry, and fish [9–11]. The underlying mechanisms are related to improvement in intrinsic total antioxidant capacity, immune response, among others. However, when protein hydrolysates are applied as functional foods or an ingredient in functional feed, the oral administration likely modifies their activities due to hydrolysis occurring during gastrointestinal (GI) digestion by proteases [12,13]. In vitro GI digestion increased the antioxidant activities of hydrolysates derived from fish muscle protein or skin [3,14,15]. Nevertheless, the antioxidant activities of the positively charged fraction of casein hydrolysate and synthesized peptide, ATSHH,



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jff](http://www.elsevier.com/locate/jff)

## Identification and characterization of tilapia antioxidant peptides that protect AAPH-induced HepG2 cell oxidative stress

Xiaogang Zhang<sup>a</sup>, Parinya Noisa<sup>b</sup>, Jirawat Yongsawatdigul<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

<sup>b</sup> School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Peptide  
Antioxidant  
*In silico* digestion  
Reactive oxygen species (ROS)  
Gene expression

### ABSTRACT

Nine novel peptides from tilapia hydrolysate were isolated and identified to be EKL, EKP, HKPA, ELSG, ALSG, ASLGH, SLGH, LPGYF, and LEVPGY. In addition, six fragments from *in silico* gastrointestinal digestion of the identified peptides, including EK, KPA, SC, CH, PGY, and EVPGY, were synthesized. The most effective parent and digested peptides showing ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity were LPGYF and SC, respectively. All C- and Y-containing peptides were more effective than ascorbic acid (AsA). In contrast, K-containing peptides exhibited less antioxidant activity. All 15 peptides showed potent intracellular reactive oxygen species scavengers in the AAPH-induced HepG2 cell oxidative stress model. In addition, the digested peptides SC, CH, and PGY up-regulated the expression of *CAT* and *SOD1* in HepG2 cells. The peptide PGY was the most effective cellular antioxidant. Thus, tilapia peptides could be potent nutraceutical products to reduce cellular oxidative stress.

### 1. Introduction

Oxidative stress is related to many pathophysiological processes, such as aging, inflammation, diabetes mellitus, and cancer (Nwachukwu & Aluko, 2019; Sies & Jones, 2020). Numerous antioxidant peptides have been identified from various sources (Fan, He, Zhuang, & Sun, 2012; Huang, Lin, & Chang, 2015; Kangsanant, Thongraung, Jansakul, Murkovic, & Seechamnanturakit, 2015; Nwachukwu & Aluko, 2019). Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) is one of the important freshwater aquacultured fish species (Fan et al., 2012). Development of tilapia antioxidant peptides would increase valorization of the species. However, it has been demonstrated that antioxidant peptides are likely modified in the gastrointestinal (GI) tract due to the action of digestive proteases (Gallego, Mora, & Toldrá, 2018; Ren et al., 2018; Zhang, Noisa, & Yongsawatdigul, 2020). The identification of digested peptides is more relevant to health as they are likely to be absorbed and reach target organs. However, peptides derived from *in vitro* GI digestion also contain a certain amount of pancreatin, which demonstrates significant antioxidant activity (Zhang et al., 2020). Thus, contamination of antioxidant peptides derived from digestive enzymes by the autolysis and/or hydrolysis of digestive enzymes poses challenges in the purification and identification of antioxidant peptides from hydrolysate digesta. Bioinformatics tools, such as BIOPEP (<http://www.uwm.edu.pl/biochemia/>

[index.php/en/biopep](http://index.php/en/biopep)) and PeptideCutter ([https://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](https://web.expasy.org/peptide_cutter/)) are usually applied to *in silico* GI digestion to predict the potential cleave sites of peptides in the GI tract (Agyei, Tsopmo, & Udenigwe, 2018; Gallego et al., 2018). This can avoid interference from the peptides derived from the digestive enzymes. Therefore, *in silico* GI digestion could be a means to obtain a predicted pooled of digested peptides of protein hydrolysate.

Besides synthetic free radicals, antioxidant peptides should be tested using cellular antioxidant activity (CAA) assays, which would be more biologically relevant (López-Alarcón & Denicola, 2013; Wolfe & Liu, 2007). The ABTS<sup>+</sup> scavenging capacity of peptides, namely, NTVPAKSCQAQPTTM, FLKKISQRYQKF, ALPQYLKTVYQHQQK and IQPKTKVIPYVRYL, is positively correlated to their intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity (Tonolo et al., 2020). However, the peptides FNDRLRQGQLL and DVNNNANQLEPR show lower ROO<sup>•</sup> scavenging capacity than that of GLVYIL and YHNAPGLVYIL, but they display similar intracellular ROS scavenging capacity (Du, Esfandi, Willmore, & Tsopmo, 2016). The free radical scavenging ability of peptides is not always consistent with their CAA. In addition, it has been reported that antioxidant peptides modulate the expression of the genes encoding antioxidant enzymes. The peptide NTVPAKSCQAQPTTM induces the expression of the superoxide dismutase (*SOD*) gene (Tonolo et al., 2020). YLEELHRLNAGY induces the expression of the *SOD* and

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [zxg2012@zmu.edu.cn](mailto:zxg2012@zmu.edu.cn) (X. Zhang), [p.noisa@sut.ac.th](mailto:p.noisa@sut.ac.th) (P. Noisa), [jirawat@sut.ac.th](mailto:jirawat@sut.ac.th) (J. Yongsawatdigul).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104662>

Received 6 April 2021; Received in revised form 23 July 2021; Accepted 28 July 2021

Available online 11 August 2021

1756-4646/© 2021 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

# ภาคผนวก ค.

การเผยแพร่ผลงานวิจัยทางวิชาการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

➤ ค1. ได้รับรางวัล ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้



1<sup>st</sup> winner award for poster presentation

Mr. Zhang Xiaogang (Ph.D. student)

The 20<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018)  
"Creative Food for Future and Sustainability" at Bangkok, Thailand

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



## Changes of antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion

Xiaogang Zhang, Jirawat Yongsawatdigul\*

School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, 111 University Avenue, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

### Abstract:

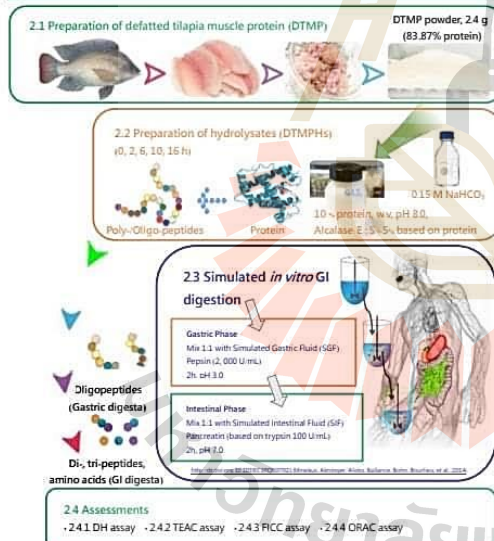
Antioxidant activities of protein hydrolysate would likely be modified after digestion. Therefore, antioxidant activity of protein hydrolysates might not truly represent activity under physiological condition. Understandings of changes of antioxidant activities after *in vitro* gastrointestinal (GI) digestion would shed light on development of protein hydrolysates with high efficacy under physiological condition. In this study, tilapia muscle protein was hydrolyzed by Alcalase with different times ranging from 0 to 16 h. Subsequently, hydrolysates were further digested by simulated *in vitro* GI digestion, and the chemical antioxidant activities were assessed. Degree of hydrolysis (DH) increased with hydrolysis time. Antioxidant activities of hydrolysates by various modes of action, namely Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC), were increased with DH, but ferrous ion chelating capacity (FICC) declined. The *in vitro* pepsin digestion slightly affected DH and antioxidant activities. In contrast, GI digesta obtained after pancreatin digestion, higher amount of  $\alpha$ -amino group displayed in digesta after hydrolysis by 6 M HCl when compared with before hydrolysis, which demonstrated the existent peptides in digesta. GI Digesta showed an increase in DH, TEAC, and ORAC when compared with the original hydrolysates. All gastric and GI digesta of hydrolysates exhibited lower FICC. Digesta of hydrolysates with higher DH displayed higher TEAC and ORAC values than samples with lower DH. Digesta of sample hydrolyzed for 10 h exerted the highest antioxidant activities, suggesting that 10 h hydrolysis would be optimum for production of tilapia antioxidant peptides. These results revealed that the antioxidant capacity of protein hydrolysate is modified after GI digestion, and should be considered as one of criteria for optimizing the production process of protein hydrolysate with antioxidant activity.

**Keywords:** Protein hydrolysate, Chemical antioxidant activity, Gastrointestinal (GI) digestion, Digesta, Modification

### 1. Introduction

The excessive oxidative stress is one of the main factors inducing a myriad of chronic diseases. Natural antioxidant is regarded as one of the effective routes to diminish the oxidative stress. Antioxidant peptide derived from food protein is a natural antioxidant. Until now, the most common strategy is to develop a protein hydrolysate using proteinases that result in the highest antioxidant activity. Nevertheless, antioxidant activity of protein hydrolysates might be modified under physiological conditions due to the probable degradation of peptides by the inherent enzymes present in the digestive tract and circulation system. Therefore, this study aimed at understanding the modification of antioxidant activities of protein hydrolysates as affected by *in vitro* gastrointestinal (GI) digestion.

### 2. Methodology



### 3. Results

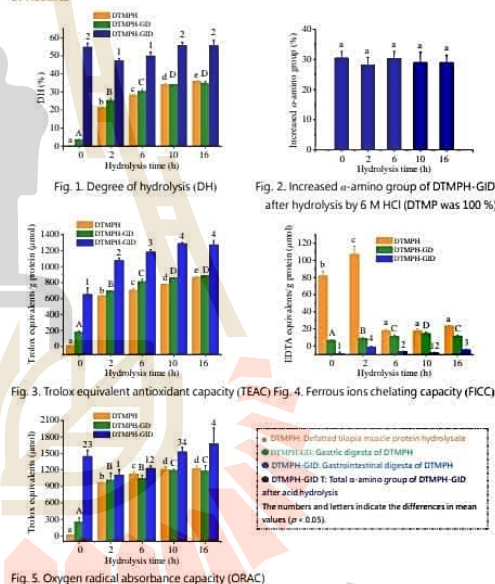


Fig. 5. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

### 4. Conclusions

- DH, TEAC and ORAC of protein hydrolysate were increased after GI digestion, but lower FICC was found. Peptides are also presented in digesta.
- After GI digestion, antioxidant activities of digesta were not significant different among the protein hydrolysates with hydrolysis time above 10 h. 10 h hydrolysis would be the optimum for production of tilapia antioxidant peptides.
- GI digestion should be considered as one of the criteria for optimizing the production of protein hydrolysate with antioxidant activity.

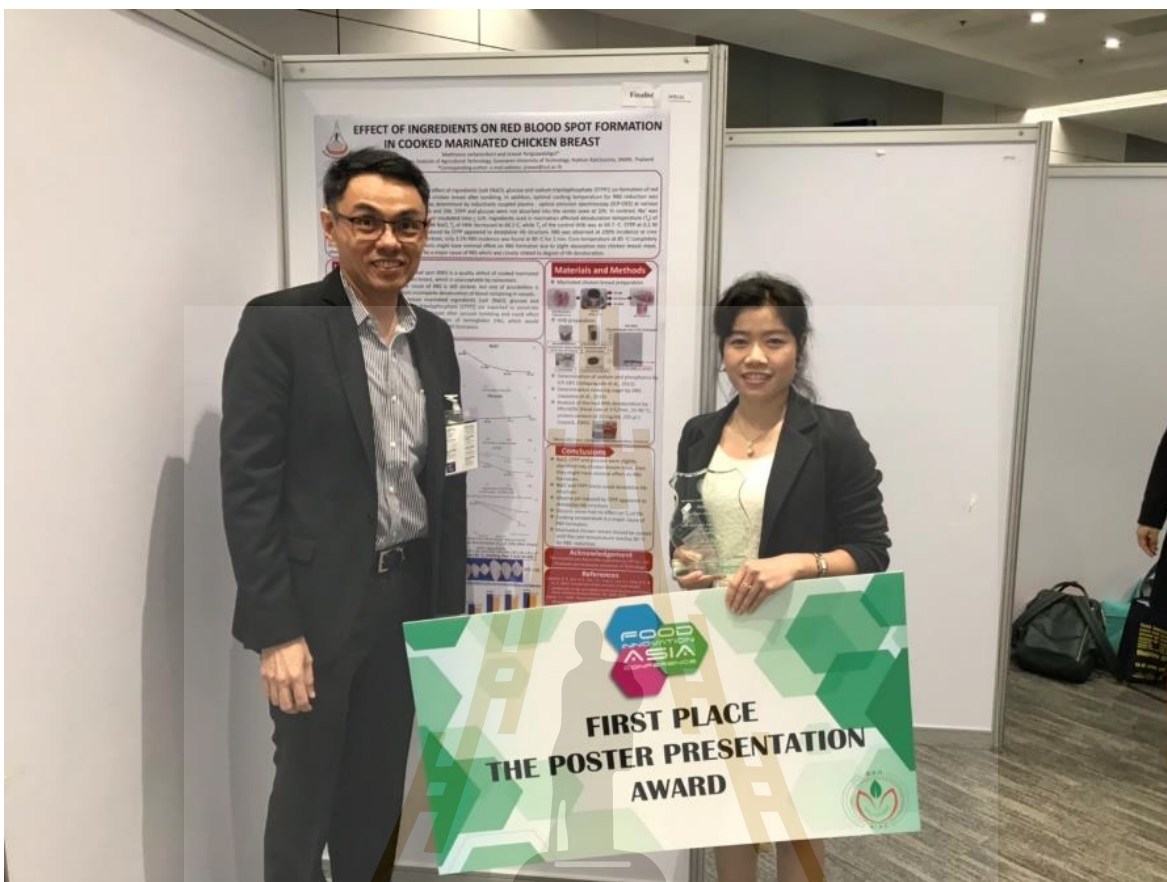
### 5. References

- Adler-Nissen, I. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1254-1262.
- Minikou, M., Alminger, M., Alvim, P., Balance, S., Bohn, T., Bouvriens, C., Carrère, F., Boutouk, R., Corredig, M., Dupont, D., Dubois, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Feunneun, S. L., Lemes, U., Macintzenka, A., Mackie, A., Marze, S., McClements, D. J., Menard, O., Reico, I., Santos, C. N., Singh, R. P., G. E. Vegrud, y., Wickham, M. S. J., Wentstehen, W., & Brooktorf, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. *Food & Function*, 5(6), 1113-1124.
- Huang, D., Ou, B., Hampsh, Woodrill, M., Ranagan, J. A., & Piroo, R. L. (2002). High Throughput Assay of Oxygen-Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(15), 4427-4444.

### Acknowledgements

This research was financially supported by Food Innovation for safety and value creation of Nakhonchaiyaburin, Suranaree University of Technology, One Research One Grant (OROG) Scholarship from Suranaree University of Technology is also appreciated.

\* Corresponding author: Tel.: +6644224359; Fax: +6644224387 E-mail address: jirawat@sut.ac.th (J. Yongsawatdigul)



1<sup>st</sup> winner award for *poster presentation*

Miss. Matthanee Jantaraniorn (Ph.D. student)

The 21<sup>st</sup> Food Innovation Asia Conference 2019 (FIAC 2019)

"Future Food Innovation for Better Health and Wellness" at Bangkok, Thailand

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



# EFFECT OF INGREDIENTS ON RED BLOOD SPOT FORMATION IN COOKED MARINATED CHICKEN BREAST

Matthanee Jantarankorn and Jirawat Yongsawatdigul\*  
 School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand  
 \*Corresponding author: e-mail address: jirawat@sut.ac.th

## Abstract

The objectives of this study were to investigate effect of ingredients [salt (NaCl), glucose and sodium triphosphate (STPP)] on formation of red blood spots (RBS) at the center of marinated chicken breast after tumbling. In addition, optimal cooking temperature for RBS reduction was determined. Absorption of each ingredient was determined by inductively coupled plasma - optical emission spectroscopy (ICP-OES) at various interval times after tumbling of 0, 2, 6, 12, 16 and 20h. STPP and glucose were not absorbed into the center even at 20h. In contrast, Na<sup>+</sup> was absorbed into the center of chicken breast when incubated time ≥ 12h. Ingredients used in marination affected denaturation temperature (T<sub>d</sub>) of hemolyzed chicken hemoglobin (HHb). At 1.5 M NaCl, T<sub>d</sub> of HHb decreased to 66.1°C, while T<sub>d</sub> of the control HHb was at 69.7 °C. STPP at 0.1 M (pH9) decreased T<sub>d</sub> to 61.4 °C. Alkaline pH induced by STPP appeared to destabilize Hb structure. RBS was observed at 100% incidence at core temperatures of 50 and 70 °C for 1 min. In contrast, only 3.3% RBS incidence was found at 80 °C for 1 min. Core temperature at 85 °C completely eliminated RBS problem. Marinated ingredients might have minimal effect on RBS formation due to slight absorption into chicken breast meat, whereas cooking temperature appeared to be a major cause of RBS which was closely related to degree of Hb denaturation.

## Introduction

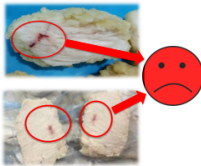


Fig.1 Red blood spots in cooked marinated chicken breast meat

- ❖ Red blood spot (RBS) is a quality defect of cooked marinated chicken breast, which is unacceptable by consumers.
- ❖ The cause of RBS is still unclear, but one of possibilities is from incomplete denaturation of blood remaining in vessels.
- ❖ Common marinated ingredients [salt (NaCl), glucose and sodium triphosphate (STPP)] are expected to penetrate into chicken breast after vacuum tumbling and could affect thermal denaturation of hemoglobin (Hb), which would consequently affect RBS formation.

## Materials and Methods

- ❖ Marinated chicken breast preparation

- ❖ HHb preparation

- ❖ Determination of sodium and phosphorus by ICP-OES (Vallapragada et al., 2011).
- ❖ Determination reducing sugar by DNS (Jayasena et al., 2014)
- ❖ Analysis of thermal HHb denaturation by MicroDSC (Heat rate of 1°C/min, 20-90 °C, protein content of 20 mg/ml, 255 µl) (Lepock, 2005)

Micro DSC 700, (Setaram Instrumentation, France)

## Results

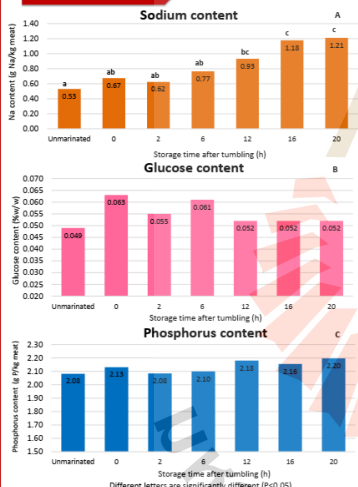


Fig.2 Absorption of sodium (A), glucose (B) and phosphorus (C) at center of chicken breast meat after tumbling

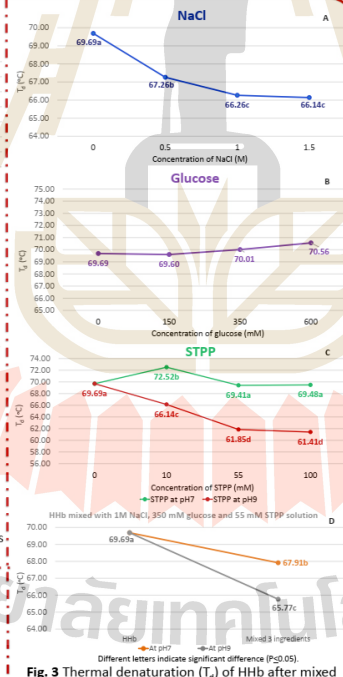


Fig. 3 Thermal denaturation (T<sub>d</sub>) of HHb after mixed with ingredients

Core temperature 50 °C, Holding time 1 min (n=60)



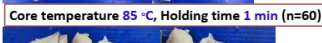
Core temperature 70 °C, Holding time 1 min (n=60)



Core temperature 80 °C, Holding time 1 min (n=60)



Core temperature 85 °C, Holding time 1 min (n=60)



Core temperature 85 °C, Holding time 5 min (n=60)

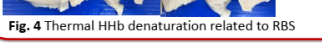


Fig. 4 Thermal HHb denaturation related to RBS



Effect of marination ingredients and core temperatures on cooking loss

## Conclusions

- ❖ NaCl, STPP and glucose were slightly absorbed into chicken breast meat, then they might have minimal effect on RBS formation.
- ❖ NaCl and STPP alone could destabilize Hb structure.
- ❖ Alkaline pH induced by STPP appeared to destabilize Hb structure.
- ❖ Glucose alone had no effect on T<sub>d</sub> of Hb.
- ❖ Cooking temperature is a major cause of RBS formation.
- ❖ Marinated chicken breast should be cooked until the core temperature reaches 85 °C for RBS reduction.

## Acknowledgement

This research was financially supported by CPF Co., Ltd. (Thailand) and Suranaree University of Technology.

## References

Jayasena, D. D., Kim, H. S., Lee, J. H., Jung, S., Lee, H. J., Park, B. H., & Jo, C. (2014). Comparison of the amounts of taste-related compounds in raw and cooked meats from broilers and Korean native chickens. *Poultry Science*, 93, 3163–3170.

Lepock, R. J. (2005). Measurement of protein stability and protein denaturation in cells using differential scanning calorimetry. *Methods*, 35, 117-125.

Vallapragada, V. V., Int'l, G., & Ramulu, S. J. (2011). A Validated Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) Method to Estimate Free Calcium and Phosphorus in In Vitro Phosphate Binding Study of Eliphos ablets. *American Journal of Analytical Chemistry*, 2, 718-725.



➤ ค.2 ได้รับคัดเลือก ในการประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ดังนี้



Mr. Danou Pao (Master student)

*poster presentation*

The 20<sup>th</sup> Food Innovation Asia Conference 2018 (FIAC 2018)

"Creative food for Future and Sustainability" at Bangkok, Thailand



# Effect of Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide on Gel-Forming Ability of Tropical Surimi

Danou Pao<sup>1</sup>, and Jirawat Yongsawatdigul<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

\* Corresponding author: E-mail: jirawat@st.ac.th

## Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of ascorbic acid (AsA) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus* spp.; TB) and lizardfish (*Saurida* spp.; LZ) surimi. pH of surimi paste decreased with an increase in AsA addition with pH 6.7 at 0.2% AsA. Addition of 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone increased breaking force and distance of LZ surimi gel by 180% and 30%, respectively; while AsA showed lesser effect. Combination of 0.15% AsA and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> greatly increased breaking force and distance of LZ surimi by 300% and 55%, respectively. Addition of 0.2% AsA and 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resulted in the maximum gel improvement with 150% and 90% increase, respectively, in TB surimi. Setting at 40°C for 30 min had no effect on gel improvement of both species. Soluble protein content of cooked gels added AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> increased with the extraction buffer containing β-mercaptoethanol (BME). The whiteness of surimi gels also increased with addition of either AsA or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone but decreased when combined AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was added. Browning reaction obviously occurred at 0.2% AsA and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for both species. Myosin heavy chain (MHC) was not observed in the cooked gels added 0.15% AsA and 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, when extraction was made by the buffer without BME, but MHC was recovered when buffer containing BME was applied. These results suggested the involvement of disulfide bonds in gel added both AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. TSH groups slightly decreased with increasing either AsA or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and drastically reduced in the presence of combined AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; especially, at 0.2% AsA and 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. AsA or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone or their combination enhanced gel formation of TB and LZ surimi, but the optimum use of each additive varied with fish species.

## Introduction

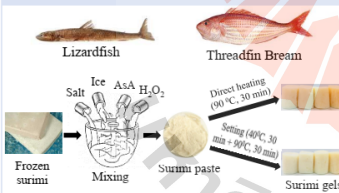
Threadfin bream (TB) and Lizardfish (LZ) are important species of tropical surimi production. Due to post-harvest handlings, gel quality of tropical surimi is generally lower than cold water surimi like Alaska Pollock. Thus, method for gel improvement of tropical surimi should be sought. An increase in disulfide bonds would be one of a promising approach to improve surimi gelation. Ascorbic acid (AsA) is auto-oxidized in presence of transition metals (iron) to Monodehydro-L-ascorbic acid, and spontaneously disproportionate to AsA and Dehydro-L-ascorbic acid; the superoxide anion radical is generated and removes hydrogen radical from sulfhydryl (SH) groups on myosin heavy chain (MHC), generating thyl radicals (S<sup>•</sup>). Two S form a disulfide (SS) bond between MHC. Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) is known as an oxidizing agent that can induce the oxidation of thiol group.

## Objective

The objective of this study was to investigate the effect of AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on textural improvement and color of tropical surimi, namely threadfin bream and lizardfish.

## Materials and Methods

### 1. Surimi gels preparation



### 2. Surimi gel measurement

- Texture of surimi gels: Punch Test (Park, 2005)
- Color: Colorimeter (*L*<sup>\*</sup>, *a*<sup>\*</sup> and *b*<sup>\*</sup>) (Park, 2005)
- Protein patterns: SDS-PAGE (Laemmli, 1970)
- Total SH group content: Ellman method (Ellman, 1959)
- S-S bonds: A colorimetric reaction method by using NTSB reagent (Thamhauser et al., 1987).

## Results

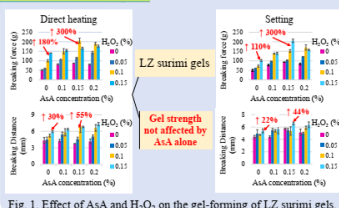


Fig. 1. Effect of AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the gel-forming of LZ surimi gels.

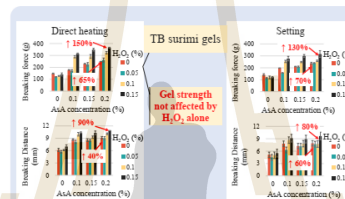


Fig. 2. Effect of AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the gel-forming of TB surimi gels.

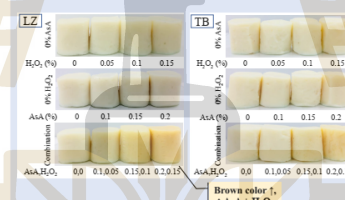


Fig. 3. Whiteness of surimi gels effected by AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Fig. 4. Effect of AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on surimi gels during Direct heating.

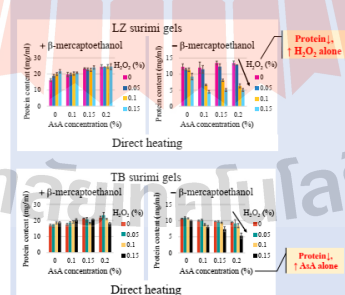


Fig. 5. Effect of BME on solubility of surimi gels added AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

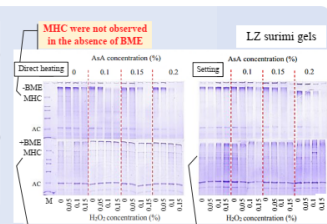


Fig. 6. Effect of AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on SDS-PAGE of LZ surimi gels. M: standard maker, MHC: Myosin Heavy Chain and AC: Actin.

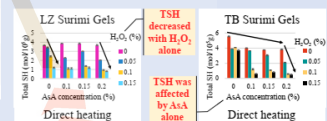


Fig. 7. Total of sulfhydryl groups (TSH) content of surimi gels.

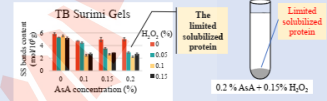


Fig. 8. Disulfide bonds content of surimi gels add AsA and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

## Conclusions

- LZ: 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone → 180% increase in breaking force and 30% increase in breaking distance.
- LZ: 0.15% AsA + 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 300% breaking force and 55% breaking distance improvement.
- TB: 0.2% AsA → 65% breaking force and 40% breaking distance increased.
- TB: 0.2% AsA + 0.15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> → 150% breaking force and 90% breaking distance development.
- Whiteness of surimi gels increased by addition of AsA or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone.
- Whiteness of surimi gels decreased with increasing of AsA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Whiteness of LZ surimi gels: not higher than 0.15% AsA + 0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Whiteness of TB surimi gels: not higher than 0.15% AsA + 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- The determination of SS bonds content method should be developed in term of surimi gel analysis.

## References

- Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys., 52: 70-77.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
- Park, J.W. (Ed). (2005). Surimi and surimi seafood (2<sup>nd</sup> ed.). Boca Raton: CRC Press.
- Thamhauser, T.W., Konishi, Y. and Scheraga, H.A. (1987). Analysis for disulfide bonds in peptides and proteins. Methods in enzymology, 143: 115-119.

## Acknowledgements

This research was financially supported by Food Innovation for safety and value creation of Nakhonchaiburi, Suranaree University of Technology. One Research One Grant (OROG) Scholarship from Suranaree University of Technology is also appreciated.



## CERTIFICATE OF POSTER PRESENTATION

Effect of Ascorbic Acid and Hydrogen Peroxide on Gel-Forming  
Ability of Tropical Surimi  
in

FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2018

“Creative Food for Future and Sustainability”

JUNE 14-16, 2018

BITEC, BANGKOK, THAILAND

presented to

Mr. Danou Pao

*Anadi Nitithamyong*

(Asst. Prof. Dr. Anadi Nitithamyong)

President of

Food Science and Technology Association of Thailand





Mr. Kitsanapong Kaewbangkerd (Master student)  
*poster presentation*

The 5<sup>th</sup> International Conference on Food and Applied Bioscience (FAB 2020)

"Insights for Research and Industry 4.0" at Chiang Mai, Thailand

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



# FOOD AND APPLIED BIOSCIENCE

INSIGHTS FOR RESEARCH AND INDUSTRY 4.0

FEBRUARY 6-7, Chiangmai Grandview Hotel & Convention Center



## Extraction and Characterization of Collagen from Broiler Chicken Trachea

Kitsanapong Kaewbangkerd<sup>1</sup> and Jirawat Yongsawatdigul<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand.

\*Corresponding author E-mail: jirawat@sut.ac.th

### Abstract

Broiler chicken trachea (CT) is a co-product from a chicken slaughterhouse and is usually turned into low value animal feed despite its high collagen. The aims of this study were to determine proximate composition and to compare biochemical characteristics of acid-soluble collagen (ASC) and pepsin-soluble collagen (PSC) from CT. ASC was extracted with 0.5 M acetic acid, while PSC was extracted with 0.5 M acetic acid containing pepsin (50 units/g residue). Both extraction process was carried out for 48 h. CT contained high protein of 68.0% and 37.6% collagen. Yield recovery of collagen obtained from ASC and PSC were 1.3 and 3.9% (dry basis), respectively. The purity of collagen extracted from ASC and PSC were 74.0 and 82.8%, respectively. ASC and PSC contained glycine (Gly) as a major amino acid of 301 and 310 residues/1,000 residues. Micro-differential scanning calorimetry (μDSC) revealed that denaturation temperature ( $T_d$ ) of ASC and PSC in deionized (DI) water was 34.8 and 45.8°C, respectively. Based on sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), both collagens comprised of two  $\alpha$ -chains with a molecular weight of  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  of approximately 135 and 116 kDa, respectively, confirming type I characteristic. Fourier transform infrared (FT-IR) and circular dichroism (CD) spectroscopy revealed that both collagens existed in the triple helix structure of collagen. These results suggested that CT is a good source of type I collagen. Higher yield and recovery were found in pepsin-aided extraction, but a more efficient extraction method should be developed. Moreover, PSC showed higher stability, which was related to more highly ordered and compact structure.

### 1. Introduction

- ❑ Collagen is a biopolymer in animal connective tissue. It is a major component, approximately 25-30% of total protein in vertebrates body. It's a part of connective tissues, such as vessel, basement membrane, gingiva, desmin, tendon, bone and including cartilage.
- ❑ Broiler chicken trachea (CT) is a part of cartilage in the respiratory organ. It generates about 3,000 MT per year in Thailand. It is usually turned into animal feed despite high collagen content.
- ❑ Collagen extraction
  - Acid-soluble collagen (ASC)
    - Acids can increase electrostatic repulsion between  $\alpha$ -helix chains.
    - Raw material with high intermolecular cross-linkages via covalent bonds >>> low yield.
  - Pepsin-soluble collagen (PSC)
    - Pepsin cleaves specific peptide bonds at telopeptide region >>> yield improvement without damaging their triple helix structure
- ❑ Yield and characteristics of collagen have not been characterized.

### 2. Methodology

1. Proximate composition
  - Moisture, protein, and ash by AOAC method [1]
  - Total lipid by Folch et al. [2]
2. Collagen purity: Hydroxyproline (Hyp) assay by alkaline hydrolysis
3. Extraction process [3]
  - 3.1 Acid soluble collagen: 0.5 M acetic acid



- 3.2 Pepsin soluble collagen: 0.5 M acetic acid containing pepsin (50 units/g residue)

#### 4. Characterization

- 4.1 Amino acid (AA) content: amino acid analyzer (Biochrom 30 plus)
  - 6.0 M HCl at 115°C for 24 h
- 4.2 Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
  - Solubilization: 10% SDS (12  $\mu$ g protein loading)
- 4.3 Fourier transform - infrared (FT-IR) spectroscopy [4]
  - ATR mode: wavenumber of 4000-900  $\text{cm}^{-1}$ , 64 scans at a resolution of 4  $\text{cm}^{-1}$
- 4.4 Circular dichroism (CD) spectroscopy [5]
  - Wavelength of 260-190 nm at a speed scan 50 nm/min
- 4.5 Micro-differential scanning calorimetry ( $\mu$ DSC)
  - Heating rate of 1°C/min from 20-60°C



### Acknowledgements

This research was supported by the Food Innovation for Safety and Value Creation of Nakhonchaiyaburi, Suranaree University of Technology (SUT-305-61-12-06). One Research One Graduate (OROG) scholarship from Suranaree University of Technology (SUT) are also appreciated.

### 3. Results

Table 1. Proximate composition of CT.

| Parameters                  | Content (%) |
|-----------------------------|-------------|
| Moisture <sup>I</sup>       | 82.6 ± 0.05 |
| Ash <sup>II</sup>           | 3.3 ± 0.01  |
| Total lipid <sup>II</sup>   | 14.4 ± 0.42 |
| Crude protein <sup>II</sup> | 68.0 ± 0.84 |
| Hyp <sup>II</sup>           | 4.7 ± 0.05  |

I and II indicate values in wet and dry basis, respectively.

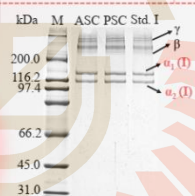


Figure 1. SDS-PAGE of trachea ASC and PSC on 7.5% polyacrylamide gel.

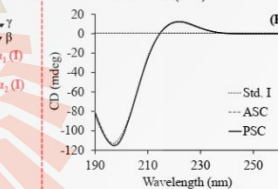
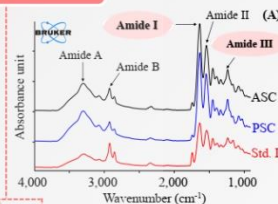


Figure 2. FT-IR (A) and CD spectra (B) of trachea ASC and PSC.

Table 2. Yield, AA content and thermal stability of trachea ASC and PSC.

| Parameters   | ASC                      | PSC                      |
|--|--------------------------|--------------------------|
| <b>Extraction yield (%)</b>                            |                          |                          |
| Weight yield   | 0.7 <sup>a</sup> ± 0.03  | 3.1 <sup>b</sup> ± 0.06  |
| Collagen recovery                                      | 1.3 <sup>a</sup> ± 0.05  | 6.9 <sup>b</sup> ± 0.13  |
| Collagen purity  | 74.0 <sup>a</sup> ± 1.79 | 82.8 <sup>b</sup> ± 1.50 |
| <b>AA content (residue/1,000 residue)</b>              |                          |                          |
| Glycine (Gly)  | 301 ± 3.23               | 310 ± 2.26               |
| Pro (Pro)  | 112 ± 3.75               | 115 ± 4.10               |
| Hydroxyproline (Hyp)                                   | 76 <sup>a</sup> ± 1.03   | 105 <sup>b</sup> ± 0.88  |
| Immo acid (Pro-Hyp)                                    | 188 <sup>a</sup> ± 3.26  | 220 <sup>b</sup> ± 4.89  |
| <b>Denaturation temperature: <math>T_d</math> (°C)</b> |                          |                          |
| Deionized water  | 34.8 <sup>a</sup> ± 0.48 | 45.8 <sup>b</sup> ± 0.17 |
| 0.5 M acetic acid                                      | 32.6 <sup>a</sup> ± 0.32 | 42.1 <sup>b</sup> ± 0.11 |

Different superscripts indicate significant difference ( $p < 0.05$ ) between ASC and PSC

### 4. Conclusions

- ❖ Collagen from CT extracted by acetic acid and pepsin revealed type I characteristic.
- ❖ Higher yield and recovery were found in pepsin-aided extraction.
- ❖ PSC showed higher stability, which was related to more highly ordered and compact structure.
- ❖ FT-IR and CD suggested triple helix conformation of both collagens.
- ❖ Therefore, trachea is another promising raw material for collagen extraction.

### 5. References

- [1] AOAC. Association of Official Analytical Chemists, Washington D.C., 2016.
- [2] Folch J, Lees M, Sloane S G H. The Journal of Biological Chemistry 1957, 226, 497-509.
- [3] Luo Q, Chu C, Yang F, Zhao Y, Wang B. Environmental Science and Pollution Research 2018, 25, 31427-31438.
- [4] Sundaraman, S., Benjakul, S., Kishimura, H. Food Chemistry 2013, 138, 2435-2441.
- [5] Ali, A.M.M., Benjakul, S., Prodpran, T., Kishimura, H. Waste and Biomass Valorization 2018, 9, 783-791.



**The International Conference on Food and Applied Bioscience 2020  
“Insights for Research and Industry 4.0”**

**Certificate of Appreciation**

**Mr. Kitsanapong Kaewbangkerd**

**For participating in Poster Presentation**

**Extraction and characterization of collagen from broiler chicken trachea**

**February 6-7, 2020**

**Chiangmai Grandview Hotel & Convention Center, Chiang Mai, Thailand**

*Pichaya Poonlarp.*

**Associate Professor Dr. Pichaya Poonlarp  
Chairman of the Organizing Committee FAB 2020**

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



# ภาคผนวก ง.

การผลิตบุคลากร/นักวิจัยรุ่นใหม่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยนี้ เป็นส่วนหนึ่งของทุนสนับสนุนแก่บัณฑิตศึกษา จำนวน 7 คน ดังนี้

#### นักศึกษาระดับปริญญาเอก (Ph.D. student)

##### 1. Miss. Matthanee Jantaranikorn

Thesis title: Reduction of red blood spots in cooked marinated chicken breast meat by combination of microwave heating and steaming



##### 2. Mrs. Tang Ling

Thesis title: Gelation of tropical fish surimi under high intensity ultrasound



##### 3. Mr. Zhang Xiaogang

Thesis title: Antioxidant activities of glycated tilapia muscle protein hydrolysates and their glycated product after simulated *in vitro* gastrointestinal digestion



##### 4. Mr. Tian Fu

Thesis title: Production and characterization of antimicrobial peptides (AMPs) from chicken plasma protein hydrolysate





**นักศึกษาระดับปริญญาโท (Master student)****5. Mr. Danou Pao**

Thesis title: Effect of ascorbic acid and hydrogen peroxide on gel-forming ability of tropical surimi

**6. Mr. Kitsanapong Kaewbangkerd**

Thesis title: Ultrasound-assisted extraction of collagen from broiler chicken trachea and its biochemical characterization

**7. Miss. Astri Suryani Prawulanari**

Thesis title: Effect of pre-treatment methods on antioxidant activity of egg white hydrolysate



# ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

## 1. หัวหน้าโครงการวิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

(Assoc. Prof. Dr. Jirawat Yongsawatdigul)

### ➤ หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-22-4387

E-mail: jirawat@sut.ac.th

### ➤ ประวัติการศึกษา

| ปีที่จบ | ระดับปริญญา<br>(สาขาวิชา)           | สถาบันศึกษา                     | ประเทศ  |
|---------|-------------------------------------|---------------------------------|---------|
| 2539    | Ph.D. (Food Science and Technology) | Oregon State University         | อเมริกา |
| 2535    | M.S. (Food Science)                 | University of Wisconsin-Madison | อเมริกา |
| 2532    | วท.บ. (เทคโนโลยีอาหาร)              | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย           | ไทย     |

### ➤ สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- โปรตีน เพปไทด์ และเอนไซม์สำหรับเทคโนโลยีการอาหาร
- การใช้ประโยชน์จากวัสดุชีวภาพเหลือทิ้งจากฟาร์ม-อุตสาหกรรม
- การใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักโปรตีน
- วิทยาศาสตร์ทางด้านโปรตีนหลังการเก็บเกี่ยวในระดับโมเลกุล
- กระบวนการแปรรูปและคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากโปรตีนปลา

### ➤ ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

1. หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน มากกว่า 50 โครงการ

2. สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียน: จำนวน 1 สิทธิบัตร

3. ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  
วารสารระดับชาติ 2 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ 108 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ  
ระดับนานาชาติมากกว่า 80 เรื่อง

## 2. ผู้ร่วมวิจัย

### 2.1 รองศาสตราจารย์ ดร. สุนันทา ทองทา

(Assoc. Prof. Dr. Sunanta Tongta)

#### 2.1.1 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทร 044-22-4266 โทรสาร 044-22-4387

E-mail: s-tongta@sut.ac.th

#### 2.1.2 ประวัติการศึกษา:

| ปีที่จบ | วุฒิการศึกษา<br>(สาขาวิชา)  | สถาบันการศึกษา                             | ประเทศ  |
|---------|-----------------------------|--|---------|
| 2541    | Ph.D. (Food Science)        | University of Illinois at Urbana-Champaign | อเมริกา |
| 2533    | วท.ม. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์                     | ไทย     |
| 2529    | วท.บ. (พัฒนาผลิตภัณฑ์)      | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์                     | ไทย     |

#### 2.1.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- คาร์โบไฮเดรตในอาหาร (Food carbohydrate)
- การแปรรูปทางเคมีและผลิตภัณฑ์แป้ง ธัญพืช (โดยเฉพาะข้าว) และพืชตระกูลถั่ว
- การแปรรูปอาหารด้วยกระบวนการอัด/พอง (Food extrusion)
- การแปรรูปอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น เนื้อเทียม แป้งทนย่อย แป้งดัดแปร
- กระบวนการ/วิทยาการหลังเก็บเกี่ยว (post-harvest) ของธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว
- เทคโนโลยีขนมอบ (Bakery technology)

#### 2.1.4 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.1.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน มากกว่า 30 โครงการ

2.1.4.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียน: จำนวน 3 อนุสิทธิบัตร

2.1.4.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  
วารสารระดับนานาชาติ 37 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ  
ระดับนานาชาติ 51 เรื่อง

## 2.2 รองศาสตราจารย์ ดร. สุรินทร์ บุญอุนันธนสาร

(Assoc. Prof. Dr. Surintorn Boonanuntasarn)

### 2.2.1 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาเทคโนโลยีและนวัตกรรมทางสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทร 044-22-4279 โทรสาร 044-22-4150

E-mail: surinton@sut.ac.th

### 2.2.2 ประวัติการศึกษา:

| ปีที่ยจบ | วุฒิการศึกษา<br>(สาขาวิชา)  | สถาบันการศึกษา                | ประเทศ  |
|----------|-----------------------------|-------------------------------|---------|
| 2547     | Ph.D. (Aquatic Biosciences) | Tokyo University of Fisheries | ญี่ปุ่น |
| 2538     | วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)     | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย         | ไทย     |
| 2534     | วท.บ. (วาริชศาสตร์)         | มหาวิทยาลัยบูรพา              | ไทย     |

### 2.2.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- อนุพันธุศาสตร์ในสัตว์น้ำ
- เทคโนโลยีการปลูกถ่ายเซลล์สืบพันธุ์/ การเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ
- การศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของสัตว์น้ำโดยวิธี Expressed sequence tags analysis
- การจัดการโภชนาการของสัตว์น้ำ (โดยเฉพาะปลาน้ำจืด)
- เทคโนโลยีการเกษตรและวิศวกรรมทางด้านสัตวศาสตร์ (สัตว์น้ำ)
- การจัดการฟาร์มแบบอัจฉริยะ (Smart farm) ประเภทปลานิลและกุ้งคอนโด

### 2.2.4 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.2.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน มากกว่า 30 โครงการ

2.2.4.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียน: จำนวน - สิทธิบัตร

2.2.4.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  
วารสารระดับนานาชาติ 33 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ  
ระดับนานาชาติ มากกว่า 50 เรื่อง

## 2.3 ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรียลักษณ์ รอดทอง

(Asst. Prof. Dr. Sureelak Rodtong)

### 2.3.1 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ 044-22-4297, 044-22-4673 โทรสาร 044-22-4185

E-mail: sureelak@sut.ac.th, sureelakr@gmail.com

### 2.3.2 ประวัติการศึกษา:

| ปีที่จบ | วุฒิการศึกษา<br>(สาขาวิชา)             | สถาบันการศึกษา         | ประเทศ     |
|---------|--|------------------------|------------|
| 2536    | Ph.D. (Microbiology)                   | University of Otago    | นิวซีแลนด์ |
| 2533    | PGDip.Sci. (Biotechnology) with Credit | University of Otago    | นิวซีแลนด์ |
| 2527    | วท.ม. (จุลชีววิทยา)                    | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ไทย        |
| 2524    | วท.บ. (ชีววิทยา เลือุกจุลชีววิทยา)     | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ | ไทย        |

### 2.3.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- พันธุศาสตร์และสรีรวิทยาของจุลินทรีย์
- การหมักของจุลินทรีย์ (แบคทีเรียและเชื้อรา)
- ความหลากหลายของชนิดและการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกและเชื้อรา เพื่อผลิตผลิตภัณฑ์อาหาร พลาสติกชีวภาพ พอลิเมอร์ชีวภาพ และพลังงาน

### 2.3.4 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.3.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน 61 โครงการ

2.3.4.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียนในประเทศไทย: จำนวน 6 คำขอ

2.3.4.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ  
วารสารระดับชาติ 22 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ 51 เรื่อง
- ผลงานที่เผยแพร่ในการประชุมวิชาการ  
ระดับชาติ 107 เรื่อง และระดับนานาชาติ 101 เรื่อง

## 2.4 รองศาสตราจารย์ ดร. ชชาญ ทองโสภ

(Assoc. Prof. Dr. Chanchai Thongsopa)

### 2.4.1 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาวิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์

สำนักวิชาวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

โทร 044-22-4397 โทรสาร 044-22-4392

E-mail: chan@sut.ac.th

### 2.4.2 ประวัติการศึกษา:

| ปีที่จบ | วุฒิการศึกษา<br>(สาขาวิชา)     | สถาบันการศึกษา                                 | ประเทศ |
|---------|--------------------------------|--|--------|
| 2545    | วศ.ด. (วิศวกรรมไฟฟ้า)          | สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง | ไทย    |
| 2539    | วศ.ม. (วิศวกรรมไฟฟ้า)          | มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์                         | ไทย    |
| 2535    | วศ.บ. (วิศวกรรมอิเล็กทรอนิกส์) | สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง | ไทย    |

### 2.4.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

งานออกแบบและนวัตกรรมทางด้านคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า ได้แก่

- Radio frequency
- Microwave circuit design
- Active antenna
- Heating application
- Network Design

### 2.4.4 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.2.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: มากกว่า 5 โครงการ

2.2.4.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียน: จำนวน 9 สิทธิบัตร

2.2.4.3 รางวัลเกียรติคุณ: 9 รางวัล (พ.ศ. 2533-2560)

2.2.4.4 รางวัลสิ่งประดิษฐ์: 6 รางวัล (พ.ศ. 2550-2556)

2.2.4.5 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

วารสารระดับนานาชาติ 105 เรื่อง