ผลของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนและคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

EFFECTS OF COLLAGENOLYTIC ENZYMES FROM *BACILLUS SUBTILIS* B13 AND *BACILLUS SIAMENSIS* S6 ON PROTEIN DEGRADATION AND GOAT MEAT QUALITY DURING AGING

วิวัฒน์ สัมฤทธิ์ผล

WIWAT SAMRITPHOL

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-AG-M-031-341

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

EFFECTS OF COLLAGENOLYTIC ENZYMES FROM *BACILLUS SUBTILIS* B13 AND *BACILLUS SIAMENSIS* S6 ON PROTEIN DEGRADATION AND GOAT MEAT QUALITY DURING AGING

WIWAT SAMRITPHOL

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2021

KMITL-2021-AG-M-031-341

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2021

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนและคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม
นักศึกษา	นายวิวัฒน์ สัมฤทธิ์ผล
รหัสประจำตัว	61604035
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สุภลักษณ์ สรภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเนื้อแพะของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากสายพันธุ์บาซิลลัสและปรับปรุงคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ซึ่งทำการตรวจสอบประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 โดยใช้โปรตีนที่สกัดได้จากเนื้อแพะส่วนกล้ามเนื้อไหล่ (Infraspinatus muscle) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เป็นซับสเตรท เปรียบเทียบกับเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช (ปาเปนและโบรมิเลน) และคอลลาจีเนสจาก *Clostridium histolyticum* โดยปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนที่สกัดจากเนื้อแพะและการวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยสลายโปรตีนแสดงให้เห็นการย่อยโปรตีนเนื้อสัตว์ ผลการศึกษาพบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ S6 สามารถย่อยสลายโปรตีนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้มากกว่าโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* แล้วพบว่ามีประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่น้อยกว่า ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ S6 มีศักยภาพที่ดีในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ

การปรับปรุงความนุ่มของเนื้อทำโดยการฉีดเอนไซม์จากภายนอก (5 U/ml of Collagenolytic activity) ได้แก่ เอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ S6 ลงในเนื้อแพะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากนั้นตัวอย่างเนื้อแพะถูกบรรจุแบบสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน โดยศึกษาคุณภาพด้านจุลินทรีย์และคุณภาพทางด้านเคมีกายภาพดังนี้ ปริมาณเปปไทด์ที่ถูกย่อยในเนื้อสัตว์, การออกซิเดชันของไขมัน,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ, การวิเคราะห์เค้าโครงเนื้อสัมผัส, ค่าการสูญเสียน้ำในระหว่างการบ่ม, ค่าการสูญเสียน้ำในระหว่างการปรุงสุก และค่าสี ผลการศึกษาพบว่า จำนวนจุลินทรีย์เพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้น ($P<0.05$) การออกซิเดชันของไขมันพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของปริมาณมาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) ในวันที่ 7 ของการบ่ม ($P<0.05$) ในกลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ S6 มีค่าความแข็ง (hardness), ความเหนียว (gumminess) และความยากในการเคี้ยว (chewiness) ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ($P<0.05$) รวมทั้งค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลงสอดคล้องกับผลการย่อยสลายของปริมาณเปปไทด์ในเนื้อสัตว์ที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) นอกจากนี้กลุ่มที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ S6 มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มและค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) เมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 21 วัน ตัวอย่างเนื้อแพะมีค่าความสว่างและค่าสีแดงลดลง ($P<0.05$) ในขณะที่ค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีแนวโน้มที่จะใช้เป็นสารเพิ่มความนุ่มเนื้อ โดยจะช่วยปรับปรุงคุณภาพในด้านความนุ่มของเนื้อแพะ อีกทั้งยังเป็นการช่วยลดระยะเวลาในการบ่มให้สั้นลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effects of Collagenolytic Enzymes from *Bacillus subtilis* B13 and *Bacillus siamensis* S6 on Protein Degradation and Goat Meat Quality during Aging
Student	Mr. Wiwat Samritphol
Student ID.	61604035
Degree	Master of Science
Program	Animal Science
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Supaluk Sorapukdee
Thesis Co-Advisor	Assoc. Prof. Dr. Pussadee Tungwatcharin

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the ability to hydrolyze proteins present both goat meat myofibril extracts and connective tissue of Collagenolytic enzymes from *Bacillus* strain and improve goat meat quality during post mortem aging. The hydrolytic activity of Collagenolytic enzymes from *Bacillus subtilis* B13 and *Bacillus siamensis* S6 were examined using goat meat protein extracts from Infraspinatus muscle and connective tissue compared to commercial papain, bromelain, and collagenase from *Clostridium histolyticum*. Trichloroacetic acid-soluble peptide and SDS-PAGE revealed meat protein hydrolysis. The Collagenolytic enzymes B13 and S6 were able to degrade connective tissue protein over myofibrillar protein compared to commercial papain and bromelain observed by peptide content and electrophoretic patterns. Furthermore, the little degradation of myofibrillar protein by these enzyme as compare with collagenase from *C. histolyticum*. The results generated in this study demonstrated that these Collagenolytic enzymes B13 and S6 have good potential for use in meat tenderization application.

Meat tenderization was injected by exogenous proteases (5 U/ml of Collagenolytic activity), bromelain, Collagenolytic enzymes B13, and S6 into the chevon cut meat compared with control. The muscle was vacuum-packaged and stored at 4°C for 0, 3, 5, 7, 14, and 21 days. Changes in the following Bacterial count and physicochemical characteristics of meat have been observed: quantity of soluble peptide, lipid oxidation, Warner-Bratzler shear force (WBSF), instrumental texture, water loss, cooking loss, and color. Bacterial counts generally increased with increasing

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

aging time ($p<0.05$). Significant differences were observed in malondialdehyde (MDA) content at day 7 of post mortem ($p<0.05$). A marked decrease in hardness, gumminess, and chewiness, by texture measurements, was observed in the meats with bromelain, Collagenolytic enzymes B13, and S6 ($p<0.05$). Lower WBSF and increased soluble peptide in supernatant by Trichloroacetic acid-soluble peptides were observed in the meats with enzymes than in the control ($p<0.05$). In addition, Collagenolytic protease-treated samples also have reduced water loss and cooking loss compared to control samples in aging time ($p<0.05$). Samples aged for 21 days had lower lightness and redness ($p<0.05$) while higher yellowness ($p<0.05$). These results suggested that Collagenolytic enzymes from *B. subtilis* B13 and *B. siamensis* S6 may be promising for use as a meat tenderizer. It also improved the quality of chevon meat in terms of tenderness. Moreover, this enzyme can increase meat tenderness with reduced aging time.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้แนวทางและควบคุมการออกแบบกระบวนการวิจัยทั้งก่อนและระหว่างการทดลอง ตลอดจนช่วยแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ รวมทั้งให้คำแนะนำและตรวจทานการเขียนงานวิจัยมาโดยตลอด และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ผุสดี ตังวัชรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ ดูแลการทำปฏิบัติการจุลินทรีย์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างถูกต้องและสำเร็จลุล่วงตามเป้าหมายที่วางไว้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.ศิริพร เรียบร้อย คิม, ผศ.ดร.อัจฉรา ลักขณานุกูล และรศ.ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาวสุภาพรรณ ศฤงฆาร และนางสาวจันทร์เพ็ญ เอื้อสกุลรุ่งเรือง ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ พี่และเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ที่คอยให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือระหว่างการทำวิจัยจนทำวิทยานิพนธ์สำเร็จได้เป็นอย่างดี

สุดท้ายข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี ที่สนับสนุนทุนการศึกษา และขอขอบคุณพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจให้คำปรึกษา รวมถึงสนับสนุนทางด้านต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบแด่บิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ และประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ทุกท่านที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

วิวัฒน์ สัมฤทธิ์ผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... III

กิตติกรรมประกาศ..... V

สารบัญ..... VI

สารบัญตาราง..... IX

สารบัญภาพ..... X

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 2

1.3 สมมติฐานของการศึกษา..... 3

1.4 ขอบเขตการศึกษา..... 3

1.5 ขั้นตอนการศึกษา..... 3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

2.1 เนื้อแพะ..... 4

2.1.1 คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อแพะ..... 4

2.1.2 การจัดชั้นคุณภาพเนื้อแพะ..... 5

2.1.3 ชิ้นส่วนของเนื้อแพะ..... 5

2.2 โครงสร้างกล้ามเนื้อ (muscle structure)..... 7

2.3 โปรตีนเนื้อสัตว์ (meat protein)..... 9

2.3.1 โปรตีนกล้ามเนื้อจัดกลุ่มตามหน้าที่ (muscle proteins divided by function)..... 9

2.3.2 โปรตีนกล้ามเนื้อจัดกลุ่มตามความสามารถในการละลาย (muscle proteins divided by solubility)..... 11

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อแพะ..... 13

2.5 กระบวนการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการบ่มเนื้อ (tenderization process of meat aging)..... 15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6 เทคนิคการปรับปรุงความนุ่มเนื้อ 23

2.7 การใช้เอนไซม์ภายนอกเพื่อปรับปรุงความนุ่มเนื้อ (exogenous protease) 24

2.7.1 โปรติเอส (Protease) 24

2.7.2 การจำแนกประเภทของโปรติเอส 26

2.7.3 แหล่งที่มาของเอนไซม์ 28

2.7.4 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (Collagenolytic enzyme) 29

2.7.5 ความแตกต่างของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์กับเอนไซม์คอลลาจีเนส 31

2.8 มาตรฐานเนื้อแพะ 32

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 33

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 33

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 34

3.3 วิธีการทดลอง 36

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหลอดทดลอง 36

3.3.2 การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม 40

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 45

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะในหลอดทดลอง 45

4.1.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง 45

4.1.2 การทดสอบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะ 45

4.1.3 การทดสอบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะ 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม 63
4.2.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม 63
4.2.2 คุณภาพทางเคมีกายภาพของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม 65

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 82
5.1 สรุปผลการทดลอง 82
5.2 ข้อเสนอแนะ 83

บรรณานุกรม 84

ภาคผนวก 96

ประวัติผู้เขียน 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 กิจกรรมและโปรตีนเป้าหมายของคาลเปนและคาเทปซิน..... 16

2.2 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส..... 25

4.1 กิจกรรมการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง..... 46

4.2 กิจกรรมการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ก่อนนำมาประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะร่วมกับการบ่ม..... 63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 การตัดแต่งแพะเป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่และชิ้นส่วนย่อย..... 6
2.2 โครงสร้างของกล้ามเนื้อ ได้แก่ โครงสร้างกล้ามเนื้อทั่วไป (A), ส่วนตัดตามยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อแสดงการจัดเรียงของไมโอไฟบริล (B), การจัดเรียงของซาร์โคเมียร์(C)..... 8
2.3 โครงสร้างจุลภาคของเส้นใยกล้ามเนื้อ..... 9
2.4 โครงสร้างและองค์ประกอบของคอลลาเจน..... 12
2.5 โครงสร้างและองค์ประกอบโปรตีนของคอสตาเมียร์ในกล้ามเนื้อลาย..... 19
2.6 การแลกเปลี่ยนรูปแบบไมโอโกลบิลที่ส่งผลต่อการแสดงสีของเนื้อสัตว์..... 22
4.1 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 49
4.2 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 50
4.3 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 51
4.4 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.5 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 53

4.6 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 57

4.7 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 วัน (ข)..... 58

4.8 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก C. histolyticum ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 59

4.9 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 60

4.10 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)..... 61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.11 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม..... 65
4.12 ค่าการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) ในเนื้อแพะระหว่างการบ่ม..... 66
4.13 ค่าการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม..... 68
4.14 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม..... 70
4.15 เค้าโครงเนื้อสัมผัสของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ได้แก่ hardness (ก) gumminess (ข) chewiness (ค) springiness (ง) และ cohesiveness (จ)..... 74-75
4.16 ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม..... 77
4.17 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกของเนื้อแพะ..... 78
4.18 ค่าสีของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ได้แก่ lightness (ก) redness (ข) yellowness (ค)..... 81

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แพะเป็นหนึ่งในสัตว์เศรษฐกิจที่ให้เนื้อและน้ำนมที่เกษตรกรให้ความสนใจและนิยมเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นทุกภูมิภาคในประเทศไทย แหล่งเลี้ยงแพะที่ใหญ่ที่สุดอยู่ในภาคใต้ และเป็นแหล่งบริโภคแพะแหล่งใหญ่ของประเทศ โดยเนื้อแพะเป็นเนื้อที่มีโปรตีนที่ย่อยได้ในระดับสูง รวมถึงมีไขมันในระดับต่ำกว่าเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ จึงจัดว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูงเหมาะสำหรับผู้ที่สนใจดูแลสุขภาพเป็นอย่างดี อย่างไรก็ตามปัจจัยที่แสดงถึงคุณภาพเนื้อไม่ได้มีเพียงแค่คุณค่าทางโภชนาการแต่ยังรวมถึงลักษณะทางประสาทสัมผัส เช่น ความนุ่ม เป็นลักษณะสำคัญที่บ่งบอกถึงคุณภาพของเนื้อ ซึ่งมีผลอย่างมากต่อความพึงพอใจของผู้บริโภคและการตัดสินใจซื้อหรือบริโภคซ้ำอีกครั้ง โดยผู้บริโภคยินดีจะจ่ายเงินมากขึ้นเพื่อซื้อเนื้อแพะที่มีความนุ่ม จากการศึกษาหลายงานวิจัยระบุว่าเนื้อแพะนั้นมีความนุ่มน้อยกว่าเนื้อแกะ Heinze *et al*. (1986) รายงานว่ากล้ามเนื้อของลูกแพะเพศผู้พันธุ์บอร์ (Boer) มีปริมาณคอลลาเจนที่สูงกว่าแกะเพศผู้ 4 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Schonfeldt (1989) พบว่าเนื้อแกะมีความนุ่ม เนื่องจากมีเส้นใยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่น้อยกว่าเนื้อแพะ โดยทั่วไปคุณสมบัติโครงสร้างหลักสองประการของกล้ามเนื้อที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อคือความสมบูรณ์ของโครงสร้างโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่มุ่งความสนใจไปที่การทำความเข้าใจบทบาทของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ พบว่าโครงสร้างของคอลลาเจนและอีลาสตินเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์ (Takagi *et al*. 1992) การบ่มเป็นวิธีทางกายภาพซึ่งเป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในการเพิ่มความนุ่มให้เนื้อสัตว์ (Bekhit *et al*. 2014) โดยปกติเนื้อที่นุ่มเป็นผลมาจากการอ่อนตัวของโครงสร้างที่เป็นระเบียบของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนที่สำคัญภายหลังสัตว์ตายโดยเอนไซม์คาลเปน (calpain) และเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) (Lomiwes *et al*. 2014) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็ไม่ได้ผลดีนักหากใช้ในส่วนที่มีความเหนียวมาก เช่น ส่วนสะโพก (Koohmaraie. 1994) จึงมีการใช้วิธีการทางเอนไซม์ร่วมด้วยเพื่อปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ ซึ่งการนำเอนไซม์จากภายนอก (exogenous enzyme) มาใช้เป็นหนึ่งในวิธีการที่นิยม โดยเอนไซม์ที่ใช้มีที่มาจากหลากหลายแหล่ง เช่น พืช แบคทีเรีย และฟังไจ ซึ่งเอนไซม์จากภายนอกเหล่านี้มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหรือความสมบูรณ์ของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ปัจจุบันเอนไซม์จากภายนอกที่ช่วยปรับปรุงความนุ่มเนื้อที่ได้รับการยอมรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) โดย USDA's Food Safety Inspection Service (FSIS) มีจำนวน 5 เอนไซม์และเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากพืช

เอนไซม์จากพืชที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์ คือ เอนไซม์ปาเปน (papain) จากมะละกอ, โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด และฟิซิน (ficin) จากมะเดื่อ โดยงานวิจัยของ Bekhit *et al.* (2014) ทำการทดลองใช้เอนไซม์จากภายนอกที่ได้จากพืชเพื่อปรับปรุงความนุ่มของเนื้อพบว่า เอนไซม์ปาเปน (papain) เอนไซม์ฟิซิน (ficin) และเอนไซม์โบรมิเลน (bromelain) มีความสามารถในการย่อยจำเพาะต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) มาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sullivan and Calkins (2010) ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันโดยการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากภายนอก (exogenous enzyme) ในเนื้อโคที่มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงและต่ำพบว่า เอนไซม์ปาเปน (papain) มีความสามารถในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อมากที่สุด นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์จากพืชอีกหลายชนิดที่มีส่วนในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ เช่น เอนไซม์แอคทินิดิน (actinidin) จากกีวี (Lewis and Luh. 1988)

อย่างไรก็ตามเอนไซม์จากพืชอาจมีข้อจำกัดด้านความจำเพาะต่อการย่อยคอลลาเจนในเนื้อสัตว์ อีกทั้งอาจทำให้เนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์นุ่มและจนเกินไป ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้มุ่งที่จะศึกษาคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแหล่งทางเลือกใหม่ของเอนไซม์ที่ช่วยปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแทนเอนไซม์ที่ได้จากพืช จากงานวิจัยของ Sorapukdee *et al.* (2020) พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 สามารถผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีผลจำเพาะกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน งานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาต่อโดยการนำเอนไซม์จากแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ข้างต้นมาทดสอบหาประสิทธิภาพต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะในหลอดทดลอง และนำคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ได้มาใช้ในเนื้อแพะเพื่อลดระยะเวลาในการบ่มเนื้อและพัฒนาความนุ่มของเนื้อแพะ ซึ่งการวิจัยเกี่ยวกับเนื้อแพะยังมีอยู่ค่อนข้างน้อย จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวข้องกับคุณภาพทางด้านความนุ่มของเนื้อแพะ เพื่อรองรับความต้องการของตลาดที่คาดว่าจะเพิ่มสูงขึ้น

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะในหลอดทดลอง

1.2.2 เพื่อศึกษาระยะเวลาในการบ่มเนื้อและพัฒนาความนุ่มของเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1.3.1 ทราบถึงประสิทธิภาพของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะ

1.3.2 ทราบถึงศักยภาพการใช้ประโยชน์คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 เพื่อปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแพะ

1.3.3 ผลที่ได้จากการวิจัยสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อการวิจัยเกี่ยวกับการนำคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์

1.4 ทฤษฎีหรือแนวความคิดที่ใช้ในการวิจัย

การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายคอลลาเจน อีลาสติน และโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อสัตว์ โดยคอลลาเจนหรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีผลต่อความเหนียวของเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดังกล่าวมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย ส่งผลให้เนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์ไม่นุ่มและจนเกินไป ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารช่วยเพิ่มความนุ่มของเนื้อและปรับปรุงคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

1.5 ขอบเขตการศึกษา

ขอบเขตการวิจัยเริ่มจากการศึกษาประสิทธิภาพของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะในหลอดทดลอง โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช การทดลองต่อไปจึงดำเนินการนำคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 มาประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะ เพื่อศึกษาคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมีกายภาพของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

1.6 ขั้นตอนการศึกษา

1.6.1 ศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของแพะในหลอดทดลอง

1.6.2 ประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และ *Bacillus siamensis* S6 ในเนื้อแพะร่วมกับวิธีการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เนื้อแพะ

แพะ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Capra hircus* เป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีขนาดเล็ก ให้ผลผลิตทั้งน้ำนม เนื้อ ขน และหนัง แพะเข้ามามีบทบาททางเศรษฐกิจและจัดเป็นสัตว์เศรษฐกิจของประเทศชนิดหนึ่ง โดยรัฐบาลได้จัดเรื่องการเลี้ยงแพะเข้ามาเป็นยุทธศาสตร์หนึ่งในการพัฒนาประเทศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเลี้ยงแพะในเขต 3 จังหวัดชายแดนภาคใต้ซึ่งรัฐบาลได้ให้การส่งเสริมสนับสนุนการเลี้ยงเป็นอย่างยิ่ง อย่างไรก็ตามไม่เฉพาะแต่จังหวัดในภาคใต้เท่านั้นที่เลี้ยงแพะ ยังพบการเลี้ยงแพะมากในจังหวัดทางภาคเหนือตอนบน ภาคกลาง รวมถึงในเขตพื้นที่กรุงเทพมหานคร และปริมณฑลใกล้เคียงด้วย ผู้ทำการเลี้ยงแพะมีทั้งชาวไทยพุทธและไทยอิสลาม รวมถึงไทยภูเขา เนื่องจากแพะเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย สามารถกินอาหารได้ทุกชนิดและทนต่อสภาพแวดล้อมได้หลากหลาย

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2549) ให้ความหมายของเนื้อแพะ (goat meat) หมายถึง เนื้อที่ได้จากแพะสุขภาพดีและไม่มีโรคที่ผ่านกระบวนการฆ่าแบบไม่ทรมานเพื่อใช้เป็นอาหารมนุษย์ โดยนำเลือด หนัง หัว หาง ข้อเท้าหน้า ข้อเท้าหลัง รวมทั้งอวัยวะภายในออก แล้วตัดแต่ง (cutting) เป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่ โดยผ่านการตรวจสอบแล้วว่าสามารถบริโภคเป็นอาหารได้ และมีกล้ามเนื้อโครงร่าง (skeletal muscle) เป็นส่วนใหญ่

2.1.1 คุณค่าทางโภชนาการของเนื้อแพะ

เนื้อแพะมีปริมาณน้ำร้อยละ 74.2-76.0 โปรตีนร้อยละ 20.6-22.3 ไขมันร้อยละ 0.6-2.6 และเถ้าร้อยละ 1.1 ส่วนแคลเซียมและฟอสฟอรัสมีความผันแปรเมื่อเปรียบเทียบจากแหล่งที่แตกต่างกัน ปริมาณไขมันและองค์ประกอบของกรดไขมันอิ่มตัวของเนื้อแพะมีน้อยกว่าเนื้อสัตว์ประเภทอื่น (USDA. 1998) โดยแพะเป็นสัตว์ที่มีเปอร์เซ็นต์ซากและเปอร์เซ็นต์ไขมันในซากต่ำ โดยความหนาของชั้นไขมันใต้ผิวหนังของซากแพะมีค่าน้อยกว่า 4 มิลลิเมตร ทำให้เมื่อนำซากแพะหลังการฆ่าไปแช่ในห้องเย็นทำให้เนื้อแพะเหนียว โดยแพะสะสมไขมันไว้รอบๆ อวัยวะภายใน เช่น ซากแพะบอร์มีไขมันใต้ผิวหนังแค่ร้อยละ 6-7 ของไขมันในซากทั้งหมด ดังนั้นการที่แพะสะสมไขมันส่วนใหญ่ไว้รอบๆ อวัยวะภายในแทนที่จะสะสมไว้ใต้ผิวหนัง ทำให้ซากแพะมีเนื้อแดงมากและไขมันน้อย ซึ่งโดยทั่วไปซากแพะมีเนื้อแดงมากกว่าร้อยละ 60 และมีไขมันร้อยละ 5-14 นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อแพะมีส่วนประกอบของคอลลาเจนและมัดไมโอไฟบริล (myofibril) ใหญ่และหนาทำให้เนื้อแพะเหนียว (สุรศักดิ์ คชภักดี. 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 การจัดชั้นคุณภาพเนื้อแพะ

มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ แบ่งกลุ่มชั้นคุณภาพ ดังต่อไปนี้

2.1.2.1 ชั้นคุณภาพดีมาก (excellent) เป็นเนื้อที่ได้จากแพะอายุน้อยกว่า 1 ปี โดยดูที่ส่วนกระดูกซี่โครงจะมีรูปร่างค่อนข้างกลม ร่างแพะมีหลังกว้างและหนา กล้ามเนื้ออวบแน่นมาก ขาหลังเต็ม ไหล่หนาและเต็ม เนื้อบริเวณสีข้างเต็มและแน่น เนื้อมีสีแดงอิฐสด (brick red)

2.1.2.2 ชั้นคุณภาพดี (select) เป็นเนื้อที่ได้จากแพะอายุระหว่าง 1-2 ปี โดยดูที่ส่วนกระดูกซี่โครงมีรูปร่างโค้งปานกลางค่อนข้างแบน ร่างแพะมีหลังกว้างและหนา กล้ามเนื้อค่อนข้างอวบแน่น ขาหลังเต็ม ไหล่ค่อนข้างหนาและเต็ม เนื้อบริเวณสีข้างค่อนข้างเต็ม และมีสีแดง (red)

2.1.2.3 ชั้นคุณภาพทั่วไป (general commercial) เป็นเนื้อที่ได้จากแพะเต็มวัย อายุมากกว่า 2 ปี โดยดูที่กระดูกซี่โครงมีรูปร่างกว้างแบน ลำตัวค่อนข้างแคบเมื่อเทียบกับความยาว ขาหลังค่อนข้างเรียวบาง หลังและไหล่ค่อนข้างแคบและหนา เนื้อมีสีแดงเข้ม (dark red)

2.1.3 ชิ้นส่วนของเนื้อแพะ

เนื้อแพะตามมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ แบ่งเป็น 8 ประเภท (ภาพที่ 2.1) ดังนี้

2.1.3.1 สันสะเอว (loins) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดผ่านกระดูกสันหลัง ตรงกระดูกซี่โครงซี่ที่ 12 และ 13 จนถึงกระดูกสันหลังข้อสุดท้ายที่ต่อกับส่วนสะโพก (chump)

2.1.3.2 ขาหลัง (hind leg) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดขวาง ตั้งฉากกับแนวยาวของกระดูกขาหลังตรงกระดูกใต้กระเบนเหน็บ (sacrum) ต่อกระดูกหาง โดยมีส่วนหัวกระดูกขาหลัง (femur) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ประมาณ 2.5 cm ติดอยู่ด้วย

2.1.3.3 สะโพก (chump) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดผ่านกระดูกสันหลังส่วนเอวข้อสุดท้าย

2.1.3.4 สันซี่โครง (rack) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดตามยาวผ่านกระดูกสันหลังระหว่างซี่โครงซี่ที่ 3 และ 4 ถึงซี่โครงซี่ที่ 12 โดยตัดแยกส่วนออก

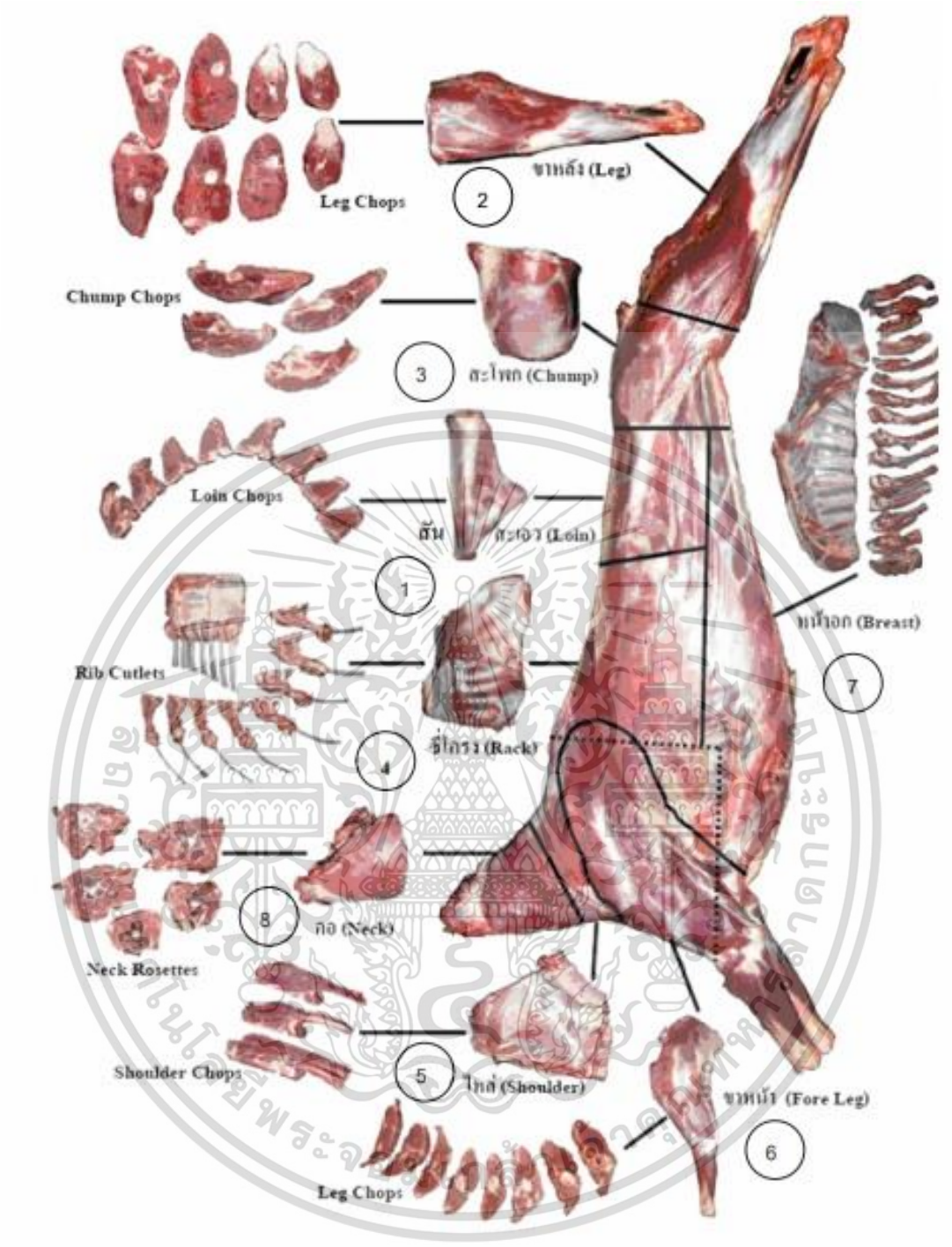
2.1.3.5 ไหล่ (shoulder) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดตามยาวจากบริเวณส่วนคอต่อกับกระดูกสันหลังถึงกระดูกซี่โครงซี่ที่ 3

2.1.3.6 ขาหน้า (fore leg) เป็นชิ้นส่วนซึ่งได้จากการตัดขาหน้าที่ติดกระดูกใบพายแยกจากส่วนไหล่

2.1.3.7 อก (breast) เป็นชิ้นส่วนของเนื้อส่วนพื้นท้องซึ่งได้จากการตัดตามขวางกระดูกซี่โครงให้ขนานกับกระดูกสันหลัง กว้างประมาณ 1 ใน 3

2.1.3.8 คอ (neck) เป็นชิ้นส่วนของของเนื้อซึ่งได้จากการตัดผ่านกระดูกส่วนคอต่อกับกระดูกสันหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 การตัดแต่งแพะเป็นชิ้นส่วนขนาดใหญ่และชิ้นส่วนย่อย

ที่มา : สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 โครงสร้างกล้ามเนื้อ (muscle structure)

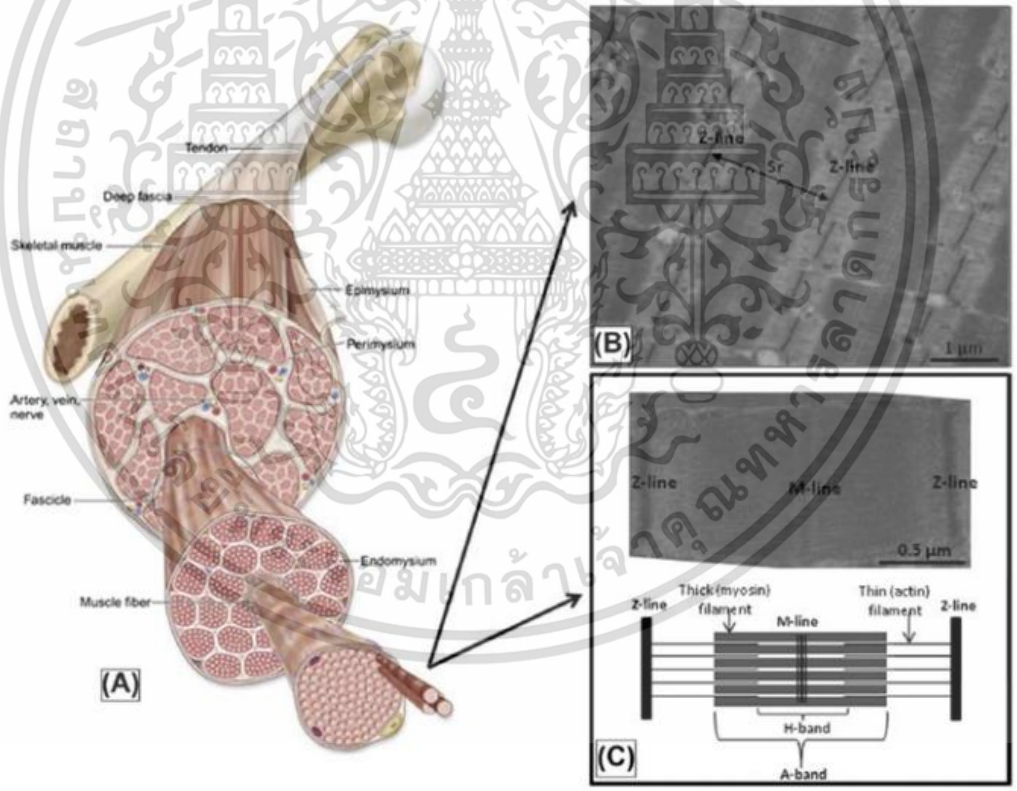
ความนุ่มของเนื้อสัตว์เป็นลักษณะที่คาดเดาไม่ได้มากที่สุด แต่ก็เป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญที่สุดของคุณภาพเนื้อสัตว์ที่มีผลต่อการเลือกของผู้บริโภค ขึ้นอยู่กับความง่ายในการเคี้ยวและลักษณะเส้นใยของกล้ามเนื้อมีส่วนช่วยในการต้านทานการเคี้ยวเนื้อ (Gerrard and Grant. 2003) ความนุ่มของเนื้อส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับ 2 ส่วนประกอบของโครงสร้างเนื้อสัตว์ คือ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เรียกกันทั่วไปว่า "พื้นหลังความเหนียว" ส่วนใหญ่เกิดจากปริมาณและชนิดของคอลลาเจนที่ให้การสนับสนุนสำหรับกล้ามเนื้อในลำดับชั้นที่แตกต่างกัน และโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งรวมถึงโครงร่างเซลล์ โดยเนื้อที่นุ่มพบว่ามีปริมาณคอลลาเจนต่ำกว่าในเนื้อที่เหนียว (Keith *et al.* 1985)

กล้ามเนื้อโครงร่างประกอบไปด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) หลายๆ เซลล์รวมกัน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 90 ของปริมาณกล้ามเนื้อทั้งหมด เส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละเซลล์ถูกล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า เอนโดไมเซียม (endomysium) และหลายๆ เซลล์เส้นใยกล้ามเนื้อถูกปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกชั้นหนึ่งที่เรียกว่า เพอริไมเซียม (perimysium) เพื่อรวมเป็นมัดของกล้ามเนื้อ (fascicle) และมัดกล้ามเนื้อหลายๆ มัดจะถูกปกคลุมด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอีกชั้น เรียกว่า อิพิไมเซียม (epimysium) (Astruc. 2014) ไมโอไฟบริลหรือเส้นใยย่อย (myofibrils) มีโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นเส้นใยเล็กๆ เรียงตัวขนานกันไปตามความยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2.2) ไมโอไฟบริลแต่ละเส้นจะประกอบขึ้นด้วยมัดของเส้นใยกล้ามเนื้อขนาดเล็กจำนวนมากที่เรียกว่า ไมโอฟิลาเมนท์ (myofilament) ซึ่งมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ฟิลาเมนท์ชนิดหนา (thick filament) และฟิลาเมนท์ชนิดบาง (thin filament) โดยเส้นใยทั้ง 2 ชนิด จะวางตัวอยู่ในแนวขนานตามยาวกับไมโอไฟบริล ทำให้เห็นกล้ามเนื้อมีลักษณะลายและมีบางส่วนซ้อนกัน ทำให้เกิดแถบมืดและแถบสว่าง แถบมืดจะมีส่วนที่ถูกทับซ้อนเพียงเล็กน้อยอยู่ตรงกลาง เรียกว่า H band ซึ่งจะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า M line ส่วนแถบสว่างก็จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กันด้วยเส้นทึบที่เรียกว่า Z-line ซึ่งโครงสร้างของไมโอไฟบริลจาก Z-line หนึ่งไปยังอีก Z-line หนึ่ง เรียกว่า ซาร์โคเมียร์ (sarcomere) (สัญชัย จตุรสิทธา. 2547) เส้นเขตพื้นที่ของซาร์โคเมียร์ (ภาพที่ 2.3) จะพบแถบทึบแสงอยู่บริเวณส่วนกลาง เรียกว่า A-band ซึ่งมาจากคำว่า Anisotrope ส่วนแถบโปร่งแสงมีพื้นที่อยู่ข้างละครึ่งของ Z-line เรียกว่า I-band ที่มาจากคำว่า Isotrope (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529) บริเวณแถบมืดซาร์โคเมียร์จะมีไมโอฟิลาเมนท์ชนิดหนา และในแถบสว่างจะมีฟิลาเมนท์ชนิดบาง โดยบริเวณที่มืดหรือทึบมากที่สุดของ A-band จะเห็นไมโอฟิลาเมนท์ทั้ง 2 ชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วางซ้อนกันอยู่และบริเวณที่มีความทึบน้อยของ A-band จะพบว่ามีเฉพาะไมโอฟิลาเมนท์ชนิหนาอยู่เท่านั้น เรียกบริเวณนี้ว่า H-zone (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539)

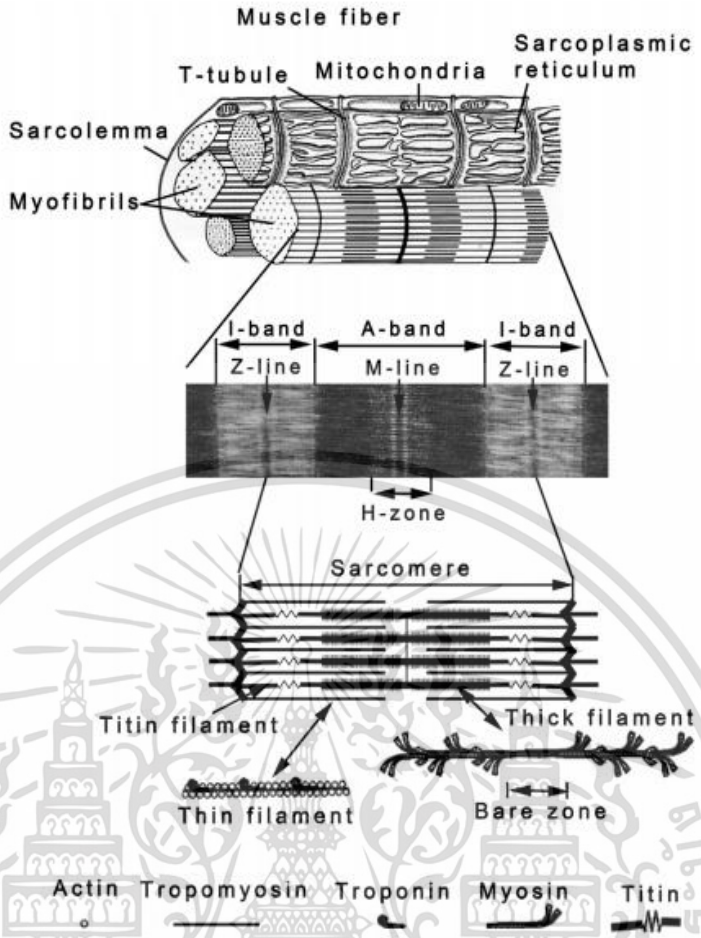
เนื้อเยื่อเกี่ยวพันคิดเป็นร้อยละ 1.5-10 ของน้ำหนักแห้งของกล้ามเนื้อ (ขึ้นอยู่กับการทำงานของกล้ามเนื้อ) ทำหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่กล้ามเนื้อ การวิจัยก่อนหน้านี้ของ Bailey and Light (1989) และ Purslow (2005) แสดงให้เห็นว่าจำนวนและองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณสมบัติทางเทคนิคและทางประสาทสัมผัสของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-holding capacity) และลักษณะเนื้อสัมผัส (meat texture) โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบถึงร้อยละ 90 นั่นหมายความว่าเนื้อที่นุ่มขึ้นอยู่กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งส่วนใหญ่ระบุถึงเส้นใยคอลลาเจน (Dinh. 2006 ; Lantto *et al.* 2009) โดยคอลลาเจนชนิดที่ 3 ในสัดส่วนที่สูงอาจนำไปสู่ความเหนียวที่มากขึ้นและขอบเขตของการเชื่อมโยงข้ามภายในคอลลาเจนประเภทต่างๆก็มีความสำคัญเช่นกัน



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างของกล้ามเนื้อ ได้แก่ โครงสร้างกล้ามเนื้อทั่วไป (A), ส่วนตัดตามยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อแสดงการจัดเรียงของไมโอไฟบริล (B), การจัดเรียงของซาร์โคเมียร์ (C)

ที่มา : Astruc (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างจุลภาคของเส้นใยกล้ามเนื้อ

ที่มา : Guo and Greaser (2007)

2.3 โปรตีนเนื้อสัตว์ (meat protein)

2.3.1 โปรตีนกล้ามเนื้อจัดกลุ่มตามหน้าที่ (muscle proteins divided by function) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.3.1.1 โปรตีนยืดหดกล้ามเนื้อ (contractile protein) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ ได้แก่

(1) ไมโอซิน (myosin) เป็นองค์ประกอบของไมโอฟิลาเมนท์ชนิดหนา มีอยู่ประมาณร้อยละ 50-55 ของโปรตีนเส้นใยย่อย (myofibril protein) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-16 นาโนเมตร และยาวประมาณ 1.5 ไมครอน ใน A-band มีลักษณะเป็นรูปกลมยาวโดยที่ปลายหนึ่งเป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นก้อนหนากว่าที่อื่นๆ บริเวณนี้จึงเป็นส่วนหัว (head region) และส่วนหาง (tail region) ที่เป็นแท่งกลมยาวออกมา โดยมีส่วนคอ (neck) เชื่อมระหว่างหัวกับหาง ส่วนหัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังกล่าวจะเป็นคู่และยื่นกางออกมาจากแนวยาวของเส้นใยฝอย โดยมีลักษณะเฉพาะคือ มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic) และเป็นด่าง (basic) ในปริมาณสูง จึงทำให้เป็นประเภทโมเลกุลที่มีขั้วสูง (highly charged molecule) ตัวที่ทำหน้าที่ในการเกิดการยืดและหดตัวของกล้ามเนื้อโดยจะไปจับกับเส้นใยฝอยแอคตินคือ ส่วนหัวที่ยื่นกางออกของไมโอซินโมเลกุล และสร้าง crossbridge ขึ้นมาก่อนที่จะปล่อยไปอีกตามจังหวะของการยืดหดตัว การเกิดขึ้นของ crossbridge ทำให้เกิดส่วนผสมทางเคมี เรียกว่า แอคโตไมโอซิน (actomyosin) ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการเกร็งและแข็งตัวของกล้ามเนื้อ แอคโตไมโอซินจะพบปริมาณสูงในกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตายโดยทั่วๆ ไป และเป็นสาเหตุของอาการแข็งที่ของซากสัตว์ แต่ในขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่นั้น สภาวะของ crossbridge จะเปลี่ยนแปลง คือ หมดสภาพเมื่อเกิดการคลายตัว (relaxation) ขึ้นในวงจรของการยืดหดตัว

(2) แอคติน (actin) เป็นองค์ประกอบของไมโอฟิลาเมนท์ชนิดบาง (thin filament) มีลักษณะเป็นทรงกลม (globular protein) เรียกว่า G-protien มีประมาณร้อยละ 20-25 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนเส้นใยย่อย ความยาวประมาณ 1.0 ไมครอน และเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 นาโนเมตร โปรตีนแอคตินโมเลกุลเดี่ยวหลายๆ โมเลกุลเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างแบบ double helical structure เรียกว่า fibrous actin หรือ F-actin น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42-48 กิโล-ดาลตัน (kDa) แอคตินมีบริเวณ myosin binding site เป็นบริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงกับไมโอซิน ซึ่งที่หัวของไมโอซินมีบริเวณของ actin binding site เช่นกัน ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้แอคตินยังมีร่องสำหรับโปรตีนโทรโปนิน (troponin) และ โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) ไปยึดเกาะ

2.3.1.2 โปรตีนควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ (regulatory protein) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของกล้ามเนื้อ โปรตีนที่พบในกลุ่มนี้คือ

(1) โทรโปนิน (troponin) มีลักษณะเป็นแท่งกลมสั้นๆ ซึ่งสร้างตัวขึ้นมาจาก globular protein และโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 8-10 ของโปรตีนเส้นใยย่อย โปรตีนนี้จะอยู่ใต้เส้นโทรโปไมโอซิน โดยจะพบว่ามีโมเลกุลโทรโปนิน 1 โมเลกุลในทุกๆ 7-8 โมเลกุล G-actin ของเส้นใยย่อยชนิดบาง โปรตีนโทรโปนินทำหน้าที่เกี่ยวกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ในการเกิด actomyosin-tropomyosin complex (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529)

(2) โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) มีจำนวนประมาณร้อยละ 8-10 ของโปรตีนเส้นใยย่อย โปรตีนชนิดนี้จะพันอยู่โดยรอบเส้นใยเส้นใยฝอยแอคติน โดยวางตัวไปตามลักษณะเกลียวเชือก และอยู่ในร่องของเส้นใยฝอยแอคติน โดยแต่ละโมเลกุลของ โทรโปไมโอซินจะยาวประมาณ 7 G-actin โมเลกุล โดยเป็นโปรตีนที่มีประจุไฟฟ้าสูงเหมือนไมโอซินคือ มีกรดอะมิโนที่เป็นกรดและด่างในปริมาณที่ค่อนข้างสูง และเนื่องจากเป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน proline ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1.3 โปรตีนโครงสร้าง (cytoskeletal protein) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้กับกล้ามเนื้อ ได้แก่

(1) ไททิน (titin) เป็นโปรตีนส่วนใหญ่ในกลุ่มโปรตีนโครงร่าง พบประมาณร้อยละ 10 ของโปรตีนเส้นใยย่อย ไททินยาวครึ่งหนึ่งของซาร์โครเมียร์ ทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง Z-line กับ M-line ที่อยู่ตรงกลางของ A-band ช่วยให้โครงสร้างของโปรตีนเส้นใยย่อยคงสภาพอยู่ได้

(2) เนบูลิน (nebulin) พบประมาณร้อยละ 4 ของโปรตีนเส้นใยย่อย จะอยู่คู่ขนานกับเส้นใยย่อยชนิดบางจาก A-band ถึง Z-line ทำหน้าที่คล้ายแผ่นแม่แบบ (template) เพื่อความมั่นคงให้แก่โครงสร้างของเส้นใยย่อยชนิดบาง

2.3.2 โปรตีนกล้ามเนื้อจัดกลุ่มตามความสามารถในการละลาย (muscle proteins divided by solubility) แบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

2.3.2.1 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein) เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มรอบเส้นใยย่อยซึ่งละลายอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำและสารละลายน้ำเกลืออ่อนๆ โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบด้วย ไมโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน ไซโตโครม และเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับ glycolytic cycle เป็นต้น

2.3.2.2 โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุด ทำหน้าที่ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ เนื่องจากไมโอไฟบริลเป็นเส้นใยย่อย ซึ่งอาจเรียกว่าโปรตีนเส้นใยย่อย สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ โปรตีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มนี้คือ ไมโอซิน (myosin) แอคติน (actin) โทรโปนิน (troponin) และโทรโปไมโอซิน (tropomyosin)

2.3.2.3 โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein or stromal protein) เป็นโปรตีนที่มีองค์ประกอบเหมือนกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โปรตีนเหล่านี้ละลายบ้างในสารละลายเข้มข้นของกรดและเบส โปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่

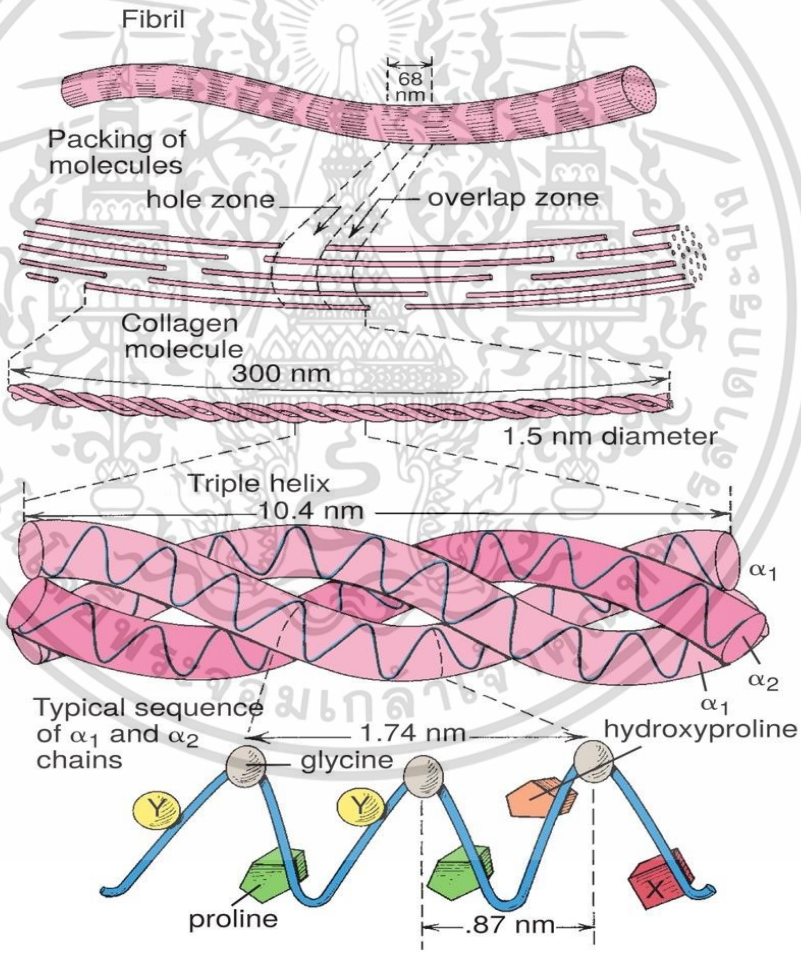
(1) คอลลาเจน (Collagen) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีอยู่ในร่างกายสัตว์สูงที่สุด มีลักษณะที่สังเกตได้ คือ เป็นเส้นเล็กๆ ยาวและหยิกหยอง (wavy) ซึ่งจะอยู่เป็นเส้นเดี่ยวหรืออยู่รวมกันหลายเส้นเป็น bundle ตัวอย่างของการอยู่รวมกันของคอลลาเจนที่พบง่ายสุดก็คือ tendon ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมกล้ามเนื้อเข้าด้วยกันกับกระดูก คอลลาเจนมีสีขาวและมีความยืดหยุ่นต่ำ ส่วนประกอบสำคัญของคอลลาเจน คือ ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) ซึ่งมีน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสปนอยู่ด้วยเล็กน้อย กรดอะมิโนไกลซีน (glycine) พบว่ามีอยู่ในคอลลาเจนมากที่สุด คือประมาณหนึ่งในสามของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจน (ภาพที่ 2.4) โดยเมื่อคอลลาเจนถูกความร้อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งความร้อนชื้น (moist heat) จะแปรสภาพเป็นเจลาติน (gelatin)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ง่าย เนื่องจากเกิดการ hydrolysis คอลลาเจน ในแง่ของคุณภาพของคอลลาเจนนั้นมีความสัมพันธ์กับความนุ่มเหนียวของเนื้อสัตว์

(2) อิลาสติน (Elastin) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีอยู่ในปริมาณต่ำกว่าคอลลาเจนมาก มีการเรียงตัวสานเป็นร่างแหอิสระ ไม่รวมกันเป็นมัดของเส้นใย พบมากในเอ็น ผนังของเส้นเลือด และภายในกล้ามเนื้อด้วย โดยอิลาสตินไม่สลายตัวหรือแปรสภาพไปเป็นเจลาตินเหมือนคอลลาเจน

(3) เรติคิวลิน (Reticulin) ประกอบด้วยเส้นใย (fiber) เล็กๆ สร้างเป็นโครงข่ายอยู่รอบๆ เซลล์เส้นเลือดระบบประสาท และโดยเฉพาะอย่างยิ่งจะทำหน้าที่เชื่อมระหว่างเอนโดไมเซียม (endomysium) กับซาร์โคเลมมา (sarcolemma) ที่อยู่รอบๆ เซลล์กล้ามเนื้อนั่นเอง



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างและองค์ประกอบของคอลลาเจน

ที่มา : Ross and Pawlina (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อแพะ

ความนุ่มของเนื้อแพะ (Tenderness of goat meat) ขึ้นอยู่กับปัจจัย ดังต่อไปนี้

2.4.1 ปัจจัยก่อนสัตว์ตาย ได้แก่ ระดับการสะสมไขมัน ปริมาณและความสามารถในการละลายของคอลลาเจน

2.4.1.1 สายพันธุ์

เป็นปัจจัยสำคัญของคุณภาพซากซึ่งมีความสำคัญต่อคุณภาพเนื้อ ผลกระทบทางสายพันธุ์ต่อคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อส่วนใหญ่เชื่อมโยงกับปริมาณและตำแหน่งของการสะสมไขมัน โดย Dhanda *et al.* (2003) เห็นด้วยกับแนวคิดที่ว่าแพะเนื้อ เช่น สายพันธุ์บอร์และสายพันธุ์ผสมมีแนวโน้มที่จะมีการสะสมไขมันใต้ผิวหนังและไขมันแทรก ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เนื้อแพะจากสายพันธุ์ดังกล่าวมีคุณภาพในการบริโภคมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ นอกจากนี้สายพันธุ์ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการตอบสนองความเครียด โดยแพะมีความอ่อนไหวต่อความเครียดอย่างมาก ซึ่งอาจเกิดจากลักษณะที่ตื่นเต้นง่ายของนิสัยตัวแพะ ซึ่งความเครียดจะเป็นตัวกำหนดความเป็นกรดด่างของเนื้อสัตว์ในระหว่างการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อเป็นเนื้อสัตว์ หากแพะมีความเครียดมาก ส่งผลให้เนื้อแพะมีค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น มีสีคล้ำ และมีความนุ่มที่น้อยแม้ผ่านการบ่ม

2.4.1.2 อายุ

ปัจจัยด้านอายุเมื่อฆ่าชำแหละมีความสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อแพะ โดยแพะที่มีอายุอยู่ในวัยหนุ่มสาวจะเป็นช่วงที่เนื้อมีคุณภาพดีและมีความนุ่ม ทั้งนี้เพราะว่าแพะวัยนี้จะมีการสร้างกล้ามเนื้อจนเกือบเต็มที่แล้วแต่มีปริมาณของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ในระดับต่ำ มีผลทำให้เนื้อมีแรงต้านทานต่อแรงกัดและแรงบดของฟันมนุษย์ขณะเคี้ยวเนื้อต่ำด้วย จึงเป็นสาเหตุทำให้มีความรู้สึกว่าเนื้อนุ่มไม่เหนียวเหมือนในแพะที่มีอายุมาก โดยปัจจัยด้านอายุต่อความนุ่มของเนื้อเป็นผลมาจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อที่เรียกว่า เอนโดไมเซียม (endomysium) ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจน โดยจะมีการสะสมมากขึ้นเมื่อแพะมีอายุมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ เนื่องจากเป็นหนึ่งในเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนกหรือเกรดคุณภาพซาก

2.4.2 ปัจจัยหลังสัตว์ตาย ได้แก่ ความยาวซาร์โคเมียร์ (sarcomere length) และการย่อยสลายของเส้นใยกล้ามเนื้อ (proteolysis)

2.4.2.1 การลดอุณหภูมิซาก

ซากแพะที่ถูกฆ่าจะถูกแช่เย็นอย่างรวดเร็วที่ 0-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการแพร่กระจายของจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามซากแพะมีขนาดเล็กและไม่ติดมันมาก ลักษณะเหล่านี้จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วยความเย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(cold shortening) ในระหว่างการแช่เย็นซากส่งผลให้เนื้อสัตว์มีความเหนียวมาก ซึ่งเป็นปัญหาใหญ่สำหรับสัตว์ที่มีไขมันหุ้มซากน้อย

2.4.2.2 การกระตุ้นซากด้วยไฟฟ้า

การกระตุ้นด้วยไฟฟ้าเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์เพื่อเร่งอัตราการลดลงของ pH โดยมีผลดีต่อคุณภาพของเนื้อสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งความนุ่ม งานวิจัยหลายชิ้นยืนยันประสิทธิภาพของการกระตุ้นซากด้วยไฟฟ้าในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อแพะ กระบวนการกระตุ้นซากด้วยไฟฟ้าจะช่วยป้องกันการเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อด้วยความเย็นได้ โดยการกระตุ้นการใช้ ATP ในกล้ามเนื้อให้หมดลง เร่งการสลายไกลโคเจน เร่งการเกิด rigor mortis ลดระยะเวลาในการบ่มซาก ซึ่งกระบวนการนี้มีประโยชน์ต่อการปรับปรุงคุณภาพการบริโภคเนื้อแพะ

2.4.2.3 การแขวนซาก

อีกวิธีหนึ่งในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ คือ วิธีการแขวนซากแบบทางเลือกที่ยับยั้งกล้ามเนื้อไม่ให้หดสั้นลงในระหว่างกระบวนการแช่เย็น การวิจัยในแพะดำเนินการโดย Basinger *et al.* (2019) แสดงให้เห็นว่า tender-stretch สามารถลดการหดตัวของซาร์โคเมียร์ได้อย่างมีประสิทธิภาพและปรับปรุงความนุ่มของเนื้อเมื่อเทียบกับการแขวนในแนวตั้งแบบดั้งเดิมโดยเส้นเอ็นร้อยหวาย (Achilles tendon)

2.4.2.4 การบ่มซาก

การบ่มเนื้อเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ โดยเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเมทาบอลิซึมในเนื้อหลังจากการฆ่า โดยเอนไซม์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อ ได้แก่ เอนไซม์คาลเปนจะย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งนอกจากจะเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแล้ว ยังทำให้รสชาติของเนื้อดีขึ้นด้วย นอกจากนี้การแตกตัวของเส้นใยเอนโดไมเซียมและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเปลี่ยนแปลงไปอย่างช้าๆ ระหว่างที่บ่ม และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีการแตกหักมากขึ้นหรือเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) จึงทำให้เนื้อมีความนุ่มขึ้น โดย Simela *et al.* (2004) พบว่า ช่วงระยะเวลาบ่ม 96 ชั่วโมงช่วยเพิ่มความนุ่มของเนื้อแพะได้ประมาณร้อยละ 12 นอกจากนี้ Kadim *et al.* (2004) รายงานว่า ความนุ่มของกล้ามเนื้อ *longissimus dorsi, biceps femoris, semitendinosus* และ *semimembranosus* ของแพะสายพันธุ์โอมานสามตัวเพิ่มขึ้นร้อยละ 15–37 ในช่วงระยะเวลาบ่ม 6 วัน แม้ว่าการบ่มจะช่วยเพิ่มความนุ่มของเนื้อแพะ แต่ก็อาจมีความสำคัญต่อลักษณะที่ปรากฏของเนื้อสัตว์ นักวิจัยรายงานแนวโน้มที่เนื้อแพะจะเปลี่ยนสีภายใน 4-8 วันหลังการเก็บรักษา ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเนื่องจากผู้บริโภคชอบเนื้อแดงสด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 กระบวนการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการบ่มเนื้อ (tenderization process of meat aging)

อีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์ คือ การหดตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อเริ่มเปลี่ยนเป็นเนื้อสัตว์เมื่อสัตว์ตาย โครงสร้างของกล้ามเนื้อส่วนใหญ่ประกอบด้วยโครงสร้างเส้นใย ซึ่งให้ฟังก์ชันการยึดหดตัวกล้ามเนื้อ การยึดหดตัวของกล้ามเนื้อขณะสัตว์มีชีวิตมีการทำงานด้วยเอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่ร่วมกันและได้รับการสนับสนุนโดยพลังงานที่ได้จากการย่อยสลาย ATP เมื่อสัตว์ตายกระบวนการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อยังคงทำงานในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อรักษาพลังงานจาก ATP จะมีการย่อยสลายไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ ซึ่งกระบวนการไกลโคไลซิสเกิดขึ้น นำไปสู่การผลิตกรดแลคติกและการลดลงของค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อ โดยค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของกล้ามเนื้อลดลงจากปกติ 7.2 เป็นประมาณ 5.5 ภายหลังสัตว์ตาย 24 ชั่วโมง การลดลงของค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิส่งผลให้กระบวนการไกลโคไลซิสลดลง ในที่สุด ATP ก็จะหมดลงทำให้เกิดแอคโตไมโอซิน (actomyosin) ซึ่งปกติจะถูกแยกออกจากกันได้โดย ATP ในกล้ามเนื้อสัตว์ขณะที่มีชีวิต การเกิดแอคโตไมโอซินทำให้เนื้อแข็ง เรียกว่า “การเกร็งตัวของกล้ามเนื้ออย่างเข้มงวด (rigor mortis)” (Lantto *et al.* 2009) การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างทำให้การทำงานของเอนไซม์เมตาบอลิซึมหยุดลง และเข้าสู่การย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ส่งผลให้เนื้อมีความนุ่มมากขึ้น

หลังจากเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้ออย่างเข้มงวด เนื้อสัตว์จะเริ่มนุ่มขึ้นในช่วงต่อมา เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสภายในกล้ามเนื้อ เช่น คาลเปน (calpains) และคาเทปซิน (cathepsins) เอนไซม์เหล่านี้ทำงานเหมาะสมที่ค่าความเป็นกรดด่างภายหลังสัตว์ตายและย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (Astruc. 2014 ; Dinh. 2006 ; Lawrie. 1985) โดยคาเทปซินทำงานได้ที่ค่าความเป็นกรดด่างต่ำ ซึ่งมักมีบทบาทสำคัญในเนื้อ PSE ในขณะที่คาลเปนทำงานได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างที่สูงขึ้น หมายความว่าเอนไซม์คาลเปนมีบทบาทสำคัญมากกว่าคาเทปซินในเนื้อแดง (pH ประมาณ 5.5) หรือเนื้อสัตว์ปีก กิจกรรมและโปรตีนเป้าหมายของเอนไซม์คาลเปนและคาเทป-ซินแสดงในตารางที่ 2.1

กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสที่สำคัญในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย คือ เอนไซม์คาลเปน (Huff-Lonergan *et al.* 2010 ; Koohmariaie and Geesink. 2006) อย่างไรก็ตาม เอนไซม์คาลปาสเตติน (calpastatin) เป็นเอนไซม์ภายในเนื้อที่เฉพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์คาลเปน โดยมีงานวิจัยพบว่าปริมาณของเอนไซม์คาลปาสเตตินจะค่อยๆ ลดลงในช่วงระยะเวลาบ่ม ทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น (Boehm *et al.* 1998 ; Huang *et al.* 2014 ; Shackelford *et al.* 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 กิจกรรมและโปรตีนเป้าหมายของคาลเปนและคาเทปซิน

Category	Endogenous Protease	Activity and Target Proteins
Sarcoplasmic	Calpain I	Releasing α-actinin, Z-nin
	Calpain II	Degrading desmin, filamin, nebulin, troponins, tropomyosin, C- and M-proteins
Lysosomal	Cathepsin B	Degrading myosin, actin, troponin T and collagen
	Cathepsin L	Degrading myosin, actin, troponins, tropomyosin, αactinin and collagen
	Cathepsin D	Degrading myosin, actin, α-actinin, troponins, tropomyosin and collagen

ที่มา : Varnam & Sutherland (1996)

2.5.1 วิธีการบ่มเนื้อสัตว์

การบ่มเนื้อสัตว์ (meat aging) คือ การเก็บเนื้อสัตว์หลังการฆ่าในห้องเย็นที่อุณหภูมิประมาณ 1-4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-4 สัปดาห์ก่อนการบริโภคเพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อสัตว์ โดยเอนไซม์โปรติเอส (protease) ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์จะย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน มีผลให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา เนื้อที่ผ่านกระบวนการบ่มนอกจากจะมีความนุ่มแล้วยังมีกลิ่นรสที่ดี ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อก็ดีขึ้น ซึ่งในขณะที่เกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) นั้นความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อจะต่ำที่สุด (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2540 ; Warren and Kastner. 1992 ; Ahnström *et al.* 2006) โดยเอนไซม์คาลเปน (calpain) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนในเนื้อ เนื่องจากมีบทบาทในการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณ Z-line (Koohmaraie. 1994) โดยการบ่มเนื้อสัตว์สามารถแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

2.5.1.1 การบ่มแบบดั้งเดิม (dry aging) โดยการแขวนซากสัตว์หรือวางชิ้นเนื้อไว้ในห้องเย็น (cold storage) ที่สะอาด ออกแบบอย่างถูกสุขลักษณะ มีการควบคุมอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์เพื่อป้องกันการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของเนื้อสัตว์ การบ่มเนื้อเฉพาะชิ้นส่วนใหญ่แบบติดกระดูกสามารถบ่มได้นานถึง 14 สัปดาห์ ในระหว่างการบ่มเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์จะย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน มีผลให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา การบ่มแบบนี้เป็นวิธีที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าใช้จ่ายสูงและใช้เวลานานกว่าการบ่มแบบเปียก เนื่องจากใช้พื้นที่ในการบ่มซากมาก และทำให้เกิดการสูญเสียความชื้นจากบริเวณผิวหน้า จะทำให้เกิดเปลือกแข็งรอบซากสัตว์ ซึ่งต้องตัดแต่งออกทิ้งไป แต่เมื่อนำมาปรุงอาหารเนื้อสัตว์ที่ผ่านการบ่มแบบดั้งเดิมจะมีกลิ่นรสเฉพาะตัว

2.5.1.2 การบ่มแบบบรรจุถุงสุญญากาศหรือการบ่มแบบเปียก (vacuum aging or wet aging) ทำโดยการบรรจุเนื้อสัตว์หรือซากสัตว์ในบรรจุภัณฑ์สุญญากาศ (vacuum packaging) หรือในกล่องที่ใช้เพื่อการขนส่งหรือจัดจำหน่าย โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างการเก็บรักษา เพื่อให้เกิดการบ่มภายในบรรจุภัณฑ์ การบ่มวิธีนี้จะช่วยการป้องกันการสูญเสียความชื้นออกจากชิ้นเนื้อ รักษาความฉ่ำของเนื้อ ทำให้เนื้อนุ่มเพิ่มขึ้นและลดการปนเปื้อน ทำให้มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น

2.5.2 อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่ม

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มซาก แบ่งออกเป็น 2 ระดับ คือ cold temperature aging หมายถึง การเก็บซากไว้ในห้องเย็น (cold room) ที่อุณหภูมิประมาณ 0-5 องศาเซลเซียสและ high temperature aging หมายถึง การเก็บซากไว้ที่อุณหภูมิของห้องเก็บซาก (chilling room) ที่สูงกว่า 5 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาซากไว้ที่อุณหภูมิสูงก็จะใช้ระยะเวลาในการบ่มซากสั้นกว่าที่อุณหภูมิต่ำ แต่ทั้งนี้ก็ต้องระมัดระวังเรื่องการเน่าเสียของเนื้อ แม้ว่าการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิสูงจะเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อทำงานได้ดีขึ้น แต่อาจเกิดปัญหาในการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นได้ เนื่องจากจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นที่ต้องการจะเข้าทำลายโปรตีนในเนื้อ (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2540 ; Pearson and Young. 1989)

Hwang *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิในการบ่มเนื้อที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อ โดยใช้เนื้อสันนอก (*m. longissimus*) และเนื้อต้นขาหลัง (*m. semitendinosus*) ของโคพันธุ์ Hanwoo เพศผู้ตอน โดยบ่มเนื้อไว้ที่อุณหภูมิ 5, 15 และ 36 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิบ่มเนื้อที่สูงขึ้นทำให้ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อลดลง ($P<0.05$) โดยเนื้อสันนอกที่บ่มอุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส มีค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อเท่ากับ 41.2 นิวตัน ต่ำกว่าเนื้อที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 5 และ 15 องศาเซลเซียส มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ เท่ากับ 51.9 และ 91.2 นิวตัน ตามลำดับ และเนื้อสะโพกที่บ่มอุณหภูมิ 36 องสาเซลเซียส มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการบ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ($P<0.05$)

ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มซากสัตว์แต่ละชนิดจะไม่เท่ากัน เช่น ในไก่จะใช้เวลาสั้นกว่าสุกร และในสุกรจะสั้นกว่าในโค การบ่มซากที่อุณหภูมิ 10-15 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาเพียง 2-3 วัน แต่ถ้าเก็บซากไว้อุณหภูมิของห้องเย็น 1-2 องศาเซลเซียส จะใช้เวลานานถึง 8-14 วัน ในด้านความคุ้มทางเศรษฐกิจแล้วระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุด หากใช้เวลาการบ่มซากแบบปกติธรรมดาไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ควรใช้เวลานานเกิน 9 วัน สำหรับซากสุกรการเก็บซากไว้ที่อุณหภูมิห้องเย็น 1-2 องศาเซลเซียส เพียง 1 วันก็เพียงพอแล้ว ทั้งนี้เพราะเนื้อสุกรส่วนใหญ่เป็นเนื้อที่มาจากสุกรขุนมีอายุไม่เกิน 7 เดือน ซึ่งเนื้อของสัตว์ที่อายุน้อยจะไม่เหนียวมากต่างกับเนื้อโคซึ่งได้มาจากโคขุนที่มีอายุ 2-3 ปี จำเป็นต้องใช้ระยะเวลาการบ่มซากให้นานขึ้น (จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2540)

Acker and Cunningham (1991) กล่าวว่า การใช้ระยะเวลาในการบ่มซาก 7 วัน จะทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการบ่มซากนาน 14 หรือ 21 วัน ความนุ่มจะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดย Boem *et al.* (1998) กล่าวว่า เป็นผลมาจากกการลดลงของเอนไซม์คาลเปนที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในเนื้อระหว่างการบ่ม และพบว่าปริมาณเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในเนื้อ เอนไซม์มิลลิคาลเปน (m-calpain) จะค่อยๆ ลดลงประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการบ่มเนื้อและเอนไซม์ไมโครคาลเปน (μ-calpain) จะมีปริมาณลดลง 20 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 24 ชั่วโมงและหลังจากนั้นอีก 7 วัน จะมีปริมาณเหลืออยู่ไม่เกิน 4 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณตั้งต้น ในขณะที่เอนไซม์คาลปาสเตตินที่ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเปนจะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตายและจะลดลงอีก 30 เปอร์เซ็นต์ภายหลังสัตว์ตาย 7 วัน

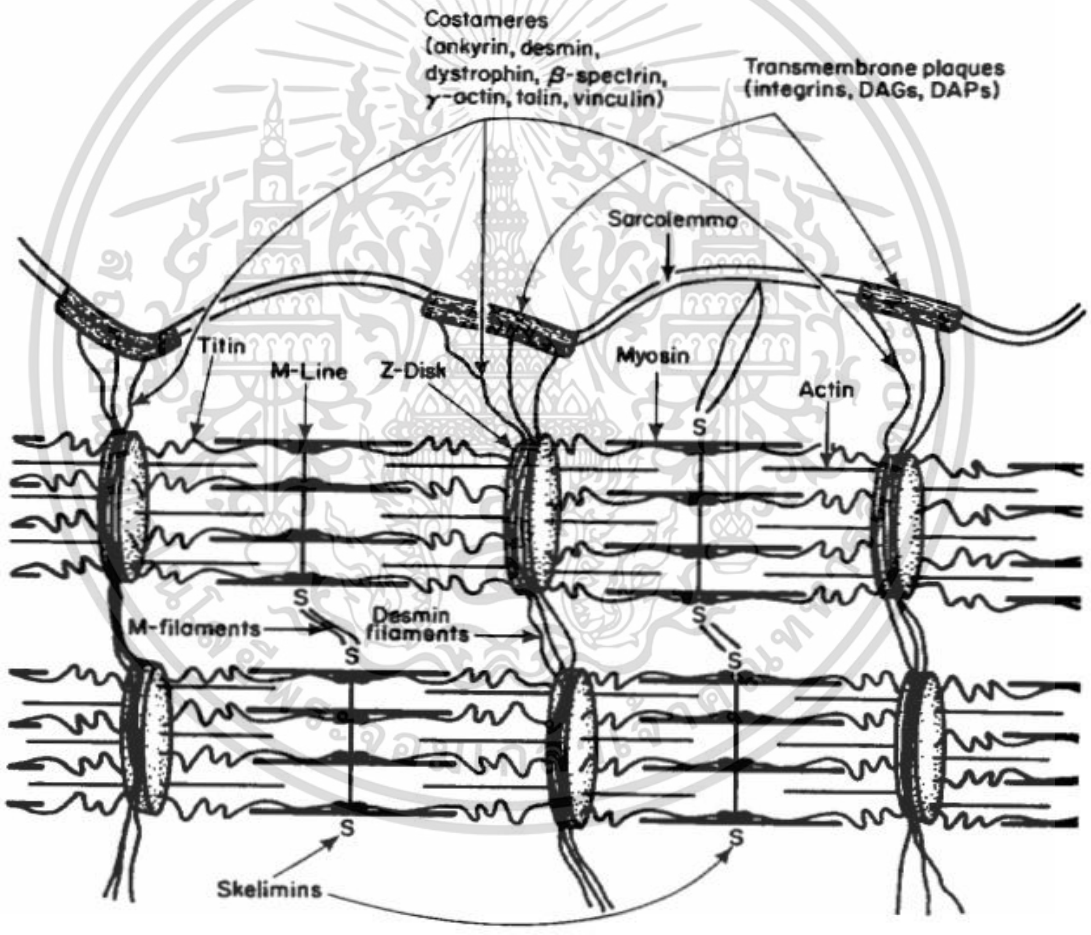
Jirajaroenrat *et al.* (1997) ทำการศึกษาค่าแรงตัดผ่านกล้ามเนื้อสันนอกของโคพันธุ์กำแพงแสน โดยบ่มเนื้อในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 5, 7, 14 และ 21 วัน พบว่าเมื่อระยะเวลาการบ่มเนื้อเพิ่มขึ้นค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง โดยมีค่าเท่ากับ 7.39, 5.99, 4.99, 4.45 และ 3.82 KgF ตามลำดับ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าระยะเวลาที่บ่มเนื้อนานขึ้นจะทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Sabow *et al.* (2016) พบว่าระยะเวลาการบ่มเนื้อนานขึ้น มีผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถเจริญได้มากขึ้น โดยเนื้อที่บ่มในถุงสุญญากาศเกือบเน่าเสียเมื่อบ่มไว้นาน 14 วัน (จำนวนจุลินทรีย์รวม 6.02 โคโลนี/กรัม) โดยใช้กล้ามเนื้อต้นขาหลัง (*Semitendinosus*) จากแพะในการทดลอง

2.5.3 ผลของการบ่มต่อโครงสร้างกล้ามเนื้อ

ในระหว่างการบ่มโครงสร้างของกล้ามเนื้อจะเกิดการแตกหัก เนื่องมาจากโครงร่าง (cytoskeleton) และโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) จะถูกย่อยสลาย การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้เกิดเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ (Koohmaraie. 1996) โดย James and James (2002) พบว่าเนื้อมีความนุ่มที่เพิ่มมากขึ้นเป็นผลมาจากโปรติโอไลติกซ์เอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อ โดยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งการสลายโปรตีนกล้ามเนื้อบางส่วน ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อแตกหักมากขึ้นและแยกออกจากกันได้ง่ายขึ้น โดยเอนไซม์ 2 ชนิดที่มีบทบาท ได้แก่ เอนไซม์คาลเปน (calpain) ซึ่งจะมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทในช่วงแรกภายหลังการฆ่า โดยทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นกลางและเอนไซม์คาเทปซิน (cathepsin) ทำงานที่สภาวะเป็นกรดหลังเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor) (Offer. 1989) โดยเอนไซม์คาลเปนไม่ได้ย่อยสลายแอคตินและไมโอซิน (koohmaraie. 1994) แต่จะย่อยสลายโปรตีนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบของคอสตาเมียร์ (costamere) ได้แก่ ไททิน (titin) เนบูลิน (nebulin) และโทรโปนิน-ที (Tropomim-T) รวมทั้งวินคูลิน (vinculin) เดสมิน (desmin) และดิสโทรฟิน (dystrophin) (Beohm *et al.* 1998) ซึ่งไททินและเนบูลินเป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีความสำคัญต่อโครงสร้างกล้ามเนื้อ โดยยึดอยู่ที่กรดอะมิโนปลายเอน (N-terminal) และกรดอะมิโนปลายซี (C-terminal) ใน Z-line ยาวขนานไปถึงตรงกลางของซาร์โคเมียร์ (ภาพที่ 2.5)



ภาพที่ 2.5 โครงสร้างและองค์ประกอบโปรตีนของคอสตาเมียร์ในกล้ามเนื้อลาย
ที่มา : Taylor *et al.* (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson and Parrish (1989) ได้ศึกษาการย่อยสลายของไททินและเนบูลินของสเต็กเนื้อโคภายหลังสัตว์ตายโดยการใช้ SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนของไททินและเนบูลินบนเจลจากสเต็กเนื้อโคที่มีความนุ่มจะมีความเข้มข้นน้อยกว่าสเต็กเนื้อโคที่มีความนุ่มน้อยกว่า ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไททินและเนบูลินจะมีการย่อยสลายได้รวดเร็วในเนื้อที่มีความนุ่ม และสรุปว่าความนุ่มของเนื้ออาจขึ้นอยู่กับการย่อยสลายของไททินและเนบูลินภายหลังสัตว์ตาย นอกจากนี้ Huff-Lonergan *et al.* (1995) พบว่าการย่อยสลายไททินเกิดอย่างสมบูรณ์ใน 14 วันภายหลังสัตว์ตายและเนบูลินใน 7 วัน และ Hergenreder (2011) พบว่าเนื้อนุ่มมากขึ้นหลังจากเกิดการย่อยสลายไททินใน 7 วันหลังสัตว์ตายและเนบูลินใน 3 วันหลังสัตว์ตาย โดยการย่อยสลายของโปรตีนเหล่านี้ ส่งผลให้เกิดการแตกหักมากขึ้นของไมโอไฟบริลมากขึ้นที่บริเวณ Z-line (Huff and Parrish. 1993; Koohmaraie. 1994 ; Taylor *et al.* 1995) นอกจากนี้ Goll *et al.* (1992) รายงานว่า ในช่วง 7-10 วันแรกของการเก็บรักษา 90 เปอร์เซ็นหรือมากกว่าของเนื้อที่นุ่มขึ้นเป็นผลมาจากเอนไซม์คาลเปน

2.5.4 ผลของการบ่มต่อคุณภาพเนื้อ

2.5.4.1 ผลของการบ่มต่อความชื้น

(1) การสูญเสียน้ำ (drip loss)

เป็นผลมาจากน้ำภายในเซลล์จากการเสียสภาพของไมโอซิน ซึ่งสูญเสียไปจากเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ถูกขับออกโดยค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และการหดตัวที่เกิดจากแคลเซียมของเส้นใยกล้ามเนื้อในระหว่างการพัฒนาเข้าสู่ช่วงเริ่มต้นการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (Bertram *et al.* 2004) ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการหดตัวของซาร์โคเมียร์ โดยมีสาเหตุหลักมาจากประการแรกเมื่อกล้ามเนื้อเข้าสู่ช่วงการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ ส่งผลให้ลดช่องว่างสำหรับน้ำที่อยู่ในเส้นใยกล้ามเนื้อลดน้อยลง (Huff-Lonergan *et al.* 2002) จากงานวิจัยของ Honikel *et al.* (1986) พบว่าการสูญเสียน้ำเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความยาวซาร์โคเมียร์หดสั้นลงในเซลล์กล้ามเนื้อ ประการที่สองเมื่อกล้ามเนื้อเข้าสู่สภาวะการเกร็งตัว ค่า pH ของเนื้อเยื่อจะอยู่ใกล้จุดไอโซอิเล็กทริคของโปรตีนหลักหลายชนิด โดยเฉพาะโปรตีนไมโอซินส่งผลต่อปริมาณน้ำที่ดูดซึมเข้าสู่โครงสร้างโปรตีนในไมโอไฟบริล (Huff-Lonergan *et al.* 2002) การรวมกันของปัจจัยเหล่านี้สามารถเพิ่มการสูญเสียน้ำได้

การสูญเสียน้ำและความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity : WHC) มีความเชื่อมโยงกันอย่างมาก (Zhang *et al.* 2006) จากงานวิจัยของ Abdelhadi *et al.* (2013) ได้เก็บรักษาเนื้ออูฐที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 5, 7 วัน พบว่า ค่าการสูญเสียน้ำเพิ่มขึ้นและความสามารถในการอุ้มน้ำลดน้อยลงเมื่อระยะการเก็บรักษานานขึ้น นอกจากนี้ยังมีบางปัจจัยที่มีอิทธิพลโดยตรงต่อการกักเก็บน้ำ ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ความแข็งแรงของไอโอนิก (ionic strength), ค่าออกซิเดชัน(oxidation) ซึ่งมีผลต่อการทำงานของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเซลล์กล้ามเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(2) การสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (cooking loss)

การสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดด่างสุดท้าย (ultimate pH) ความยาวของซาร์โคเมียร์และสภาวะในการปรุงอาหาร โดยกระบวนการบ่มจะช่วยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อส่งผลให้มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกลดลงอย่างมีนัยสำคัญสำหรับเนื้อสเต็กที่ผ่านการบ่มเมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อสเต็กที่ไม่ผ่านการบ่ม (Bouton *et al.* 1972) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kannan *et al.* (2001) รายงานว่า เนื้อสันนอกแพะมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกลดลงในระหว่างการบ่ม

2.5.4.2 ผลการบ่มต่อสีเนื้อ

การบ่มมีผลดีต่อสีของเนื้อโดยเนื้อสเต็กที่ผ่านการบ่มจะมีความสว่างและมีสีแดงที่เข้มกว่าเนื้อสเต็กที่ไม่ผ่านการบ่ม (Boakye and Mittal. 1996) ปริมาณไมโอโกลบินเป็นปัจจัยที่มีผลต่อสีของเนื้อ (Seideman and Durland. 1984) สีของเนื้อถูกกำหนดโดยปริมาณไมโกลบิน (myoglobin) ในรูปแบบต่างๆ (ภาพที่ 2.6) ได้แก่

(1) ดีออกซีไมโอโกลบิน (Deoxymyoglobin) เป็นรูปแบบรีดิวซ์ของไมโอโกลบินในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ส่งผลให้เนื้อมีสีม่วง (purple)

(2) ออกซีไมโอโกลบิน (Oxymyoglobin) เป็นรูปแบบของไมโอโกลบินในสภาวะที่มีออกซิเจน ส่งผลให้สีเนื้อมีสีแดงสดใส (bright red)

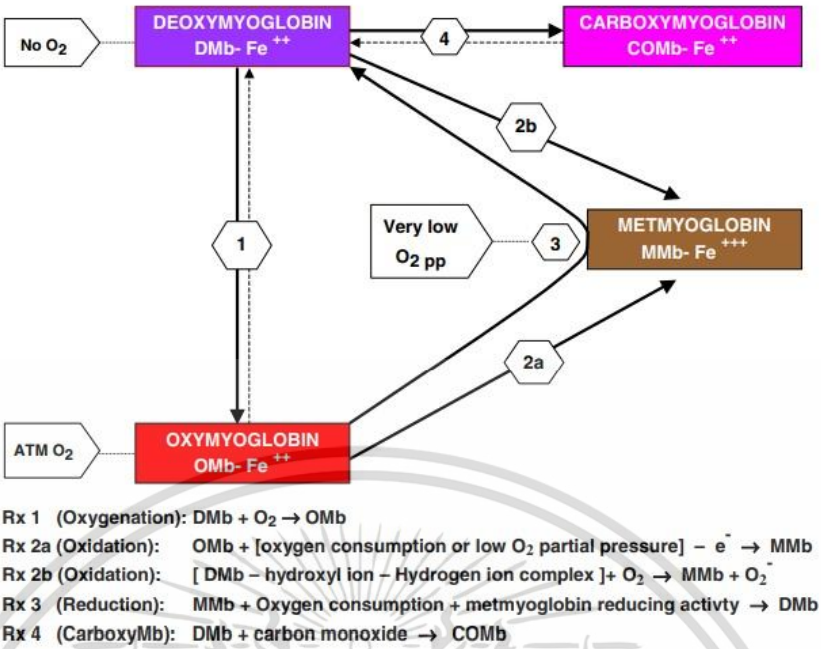
(3) เมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) เป็นรูปแบบออกซิไดซ์ของไมโอโกลบิน ส่งผลให้สีเนื้อมีสีน้ำตาล (brown)

การเกิดเมทไมโอโกลบินขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง และกิจกรรมรีดิวซ์ของเนื้อ ในบางกรณีการเจริญของจุลินทรีย์ก็มีอิทธิพลต่อสีเนื้อเช่นกัน (Mancini and Hunt. 2005 ; Bekhit *et al.* 2007)

2.5.4.3 ผลของการบ่มต่อกลิ่นรส

ในระหว่างการบ่มเอนไซม์โปรติโอไลติกซ์ (proteolytic) และไลโปไลติกซ์ (lipolytic) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบ เช่น เปปไทด์ กรดอะมิโนอิสระ และกรดไขมัน ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรสชาติ การผลิตสารประกอบเหล่านี้อาจได้รับอิทธิพลจากผลของการบ่มและวิธีการปรุงสุก ซึ่งเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ไมโครคาลเปนและมิลลิคาลเปนที่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัมผัส นอกจากนี้ยังมีอิทธิพลต่อรสชาติโดยการผลิตเปปไทด์ที่เกี่ยวข้องกับรสชาติในช่วงระหว่างการบ่ม (Kerth *et al.* 1995) เอนไซม์ทั้งสองนี้อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของกลิ่นหืน (rancid) เปรี้ยว (sour) และเค็ม (salty) (Toldrá and Flores. 2000) ระยะเวลาบ่มที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มความเข้มข้นรสชาติของเนื้อวัวแต่เมื่อมีการย่อยสลายสารประกอบมากๆ โดยมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณคาร์บอนิลที่ได้จากการออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการบ่ม อาจจะส่งผลถึงการเกิดกลิ่นหืนหรือกลิ่นรสที่ผิดปกติ (off-flavor) เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.6 การแลกเปลี่ยนรูปแบบไมโอโกลบิลที่ส่งผลต่อการแสดงสีของเนื้อสัตว์
ที่มา : Mancini and Hunt (2005)

2.5.4.4 ผลของการบ่มต่อความฉ่ำน้ำ

ความฉ่ำน้ำขึ้นอยู่กับปริมาณความชื้นที่สะสมอยู่ในเนื้อสัตว์ปรุงสุกและปริมาณไขมันแทรก โดยการบ่มสามารถเพิ่มความสามารถในการกักเก็บน้ำได้ ซึ่งส่งผลให้เกิดการปรับปรุงในด้านความฉ่ำน้ำ โดยทั่วไปความฉ่ำน้ำและความนุ่มมีความสัมพันธ์กัน นั่นคือเนื้อยิ่งมีความนุ่มมากก็จะมีความฉ่ำน้ำที่หลั่งออกมาในระหว่างการเคี้ยวมาก

2.5.4.5 ผลของการบ่มต่อความนุ่ม

ความนุ่มเป็นความสะดวกในการเคี้ยว กล่าวคือเมื่อฟันมีการผ่านชิ้นเนื้อทำให้เนื้อแยกออกจากกันเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อยได้ง่ายและมีเศษหลงเหลือภายหลังการเคี้ยว คุณลักษณะทางประสามสัมผัสในด้านของความนุ่มเนื้อ, ความฉ่ำน้ำ และกลิ่นรสเป็นตัวกำหนดความน่ารับประทานของเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามผู้บริโภคถือว่าความนุ่มเป็นองค์ประกอบสำคัญอย่างหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพเนื้อสัตว์ แนวคิดเรื่องความนุ่มของเนื้อสัตว์มีความซับซ้อนมาก เนื่องจากขึ้นอยู่กับปริมาณคอลลาเจน ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนทั้งหมด สถานะพลังงานของกล้ามเนื้อ ซึ่งมีผลต่อการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ การสูญเสียความชื้น และความสมบูรณ์ขององค์ประกอบเส้นใยกล้ามเนื้อของเนื้อสัตว์

การทดลองของ Marino *et al.* (2015) ได้ทำการศึกษาผลของระยะเวลาการบ่มต่อความนุ่ม โดยนำกล้ามเนื้อโค 3 ส่วน คือ *Longissimus dorsi* (LD), *Psoas major* (PM) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Semitendinosus (SM) มาบ่มที่ระยะเวลา 0, 7, 14 และ 21 วัน ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส พบว่ากล้ามเนื้อแต่ละส่วนมีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) ที่แตกต่างกัน โดยกล้ามเนื้อส่วน LD ที่ระยะการบ่ม 21 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด คือ 3.45 kg/cm^3 มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการบ่ม ($p<0.05$) กล้ามเนื้อส่วน PM มีความนุ่มแตกต่างจากวันแรกที่ทำการบ่มในวันที่ 7 ($p<0.05$) โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 3.91 kg/cm^3 และกล้ามเนื้อ *Semitendinosus* มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อ 6.41 kg/cm^3 ในวันที่ 14 ของการบ่ม ซึ่งนุ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกของการบ่ม ($p<0.05$) โดยเนื้อที่นุ่มขึ้นเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ภายในเนื้อสัตว์ที่ย่อยสลายโปรตีนโครงสร้างของกล้ามเนื้อในระหว่างการบ่ม

2.6 เทคนิคการปรับปรุงความนุ่มเนื้อ

ในอุตสาหกรรมภายหลังจากกระบวนการฆ่า เนื้อสัตว์ที่ได้จะถูกเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่าจุดเยือกแข็งในระยะเวลาที่แตกต่างกัน เพื่อพัฒนารสชาติและเนื้อสัมผัส ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า “การบ่ม (ageing or conditioning)” โดยเทคนิคดั้งเดิมหรือเทคนิคใหม่ที่ช่วยในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ สามารถแบ่งได้ออกเป็น 3 วิธี คือ กระบวนการทางกายภาพ เคมี และเอนไซม์

2.6.1 กระบวนการทางกายภาพ (physical processing)

ประกอบด้วย การบ่ม การกระตุ้นซากด้วยกระแสไฟฟ้า (Hwang *et al*. 2003) การใช้คลื่นอัลตร้าซาวน์กำลังสูง (Jayasooriya *et al*. 2007) การแช่แข็ง/ละลาย (Leygonie *et al*. 2012) การใช้คลื่นช็อกเวฟ (Bolumar *et al*. 2013) การใช้น้ำแรงดันสูง (Jung *et al*. 2000) และวิธีการทางกล เช่น การสไลด์ การหั่นและการบด เพื่อทำให้เนื้อมีความนุ่ม

2.6.2 กระบวนการทางเคมี (chemical processing)

วิธีการทางเคมีมีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงความนุ่มเนื้อในกระบวนการอุตสาหกรรมที่ผ่านมา (Bekhit *et al*. 2014) วิธีการเหล่านี้มักจะหมายถึงการหมัก การฉีดและการแช่ด้วยสารละลายเคมี เช่น เกลือแคลเซียม เกลือโซเดียม และเกลือฟอสเฟต หรือสารละลายหมักในเชิงพาณิชย์ เช่น มอลโตเด็กซ์ตริน และแป้ง โดยแคลเซียมสามารถไปกระตุ้นเอนไซม์ภายในเนื้อ (endogenous enzyme) เช่น คาลเปน นอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์ยังช่วยเพิ่มการละลายโปรตีน รวมไปถึงฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ช่วยเพิ่มการอุ้มน้ำของเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามสำหรับกล้ามเนื้อบางส่วนที่มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันความหนาแน่นสูงจากสัตว์ที่มีอายุมาก ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ภายในอาจไม่เพียงพอ (Veiseth *et al*. 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 กระบวนการทางเอนไซม์ (enzymatic processing)

เอนไซม์บางตัวมีความสามารถในการย่อยโปรตีนในเนื้อสัตว์ที่มีบทบาทสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อ จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากภายนอกที่ได้จากพืช แบคทีเรีย และสัตว์โดยกระบวนการหมัก ฉีด หรือแช่ โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ได้จากพืช ได้แก่ ปาเปนจากมะละกอ โบรมิเลนจากสับปะรด ฟีซินจากมะเดื่อ แอคตินิดินจากกีวี

โดยปกติแล้วค่าใช้จ่ายในกระบวนการทางกายภาพจะค่อนข้างสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับเทคนิคใหม่บางอย่าง วิธีการทางกายภาพแบบดั้งเดิมโดยเฉพาะกระบวนการบ่มอาจต้องใช้เวลานาน หรือส่งผลให้สูญเสียรสชาติ (Leak *et al*. 1987) ส่วนกระบวนการทางเคมีอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างและสี (Killefer. 2004) รวมถึงเพิ่มรสชาติความเค็มซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพ และลดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Robbins *et al*. 2002) การนำเอนไซม์จากภายนอกมาใช้จะสามารถเกิดความจำเพาะต่อการย่อยโปรตีนเนื้อสัตว์ที่แตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้มาจากหลากหลายแหล่งทำให้มีความสามารถในการย่อยที่แตกต่างกัน

2.7 การใช้เอนไซม์ภายนอกเพื่อปรับปรุงความนุ่มเนื้อ (exogenous protease)

2.7.1 โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสารประกอบโปรตีน เรียกว่า โปรติโอไลติกเอนไซม์ (Proteolytic enzyme) หรือโปรติเนส (Proteinase) ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้นๆ เอนไซม์ที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ ได้แก่ เปปซิน (Pepsin) ทริปซิน (Trypsin) โบรมิเลน (Bromelain) ปาเปน (Papain) อัลคาเลส (Alcalase) นิวเทรส (Neutrase) เป็นต้น แหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่สำคัญ คือ พืชและสัตว์ เช่น เอนไซม์ปาเปน โบรมิเลน และฟีซิน เป็นเอนไซม์จากพืช และเอนไซม์เรนนิน (rennin) สกัดได้จากกระเพาะลูกวัว ไคโมทริปซินเอ (chymotrypsin A) ได้จากตับอ่อนของหมู

เอนไซม์โปรติเอส ตัวอย่างเช่น เปปซิน ทริปซิน คาร์บอกซีเปปทิเดส และอะมิโนเปปทิเดส เอนไซม์เหล่านี้ล้วนเป็นเอนไซม์ที่สำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนไปเป็นกรดอะมิโนในระบบย่อยอาหารของคน เอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในไฟโกไซติกซ์เซลล์ (phygocytic cell) ของเลือดยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนจากภายนอก นอกจากนี้ยังมีไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์ที่มีปริมาณเอนไซม์โปรติเอสจำนวนมาก ได้แก่ คาเทปซิน ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนระดับเซลล์ โดยเป็นเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ในตัวเซลล์ (intracellular proteolytic enzyme) ที่พบในเนื้อเยื่อสัตว์ทั่วไป เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารเป็นอย่างมาก โดยในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมเนยแข็ง อุตสาหกรรมเบียร์ อุตสาหกรรมเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมธัญพืช อุตสาหกรรมซุป สารปรุงรส โปรตีนไฮโดรไลเสท และอุสาหกรรมอาหารสัตว์ (ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535) และการใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.2 การใช้ประโยชน์ของเอนไซม์โปรติเอส

ชนิดของอุตสาหกรรม	ตัวอย่างการนำไปใช้
การซักล้าง/ทำความสะอาด	สารเติมแต่งในการผลิตสารซักฟอก
การฟอกหนัง	การทำให้ขนน้อยลง
การย่อยสลาย	ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากถั่วเหลือง เนื้อหรือปลา ทำให้เนื้อนุ่ม ซึ่งใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ป่วย
การสังเคราะห์สารอินทรีย์	ใช้สังเคราะห์แอสปาร์เทม (aspartame)
การผลิตเครื่องดื่ม	การทำให้ไวน์และเบียร์มีความใสเมื่อเย็น
การทำโรงสี	ใช้สังเคราะห์กลูเต็น (gluten)
ด้านเภสัชกรรม	ใช้ผลิตยาช่วยย่อยอาหาร การบำบัดรักษาแผลไฟไหม้ แผลเป็นหนอง
การถ่ายรูป	การเตรียมสารเงิน (Ag) จากอิมัลชันของการล้างฟิล์ม
การผลิตผลิตภัณฑ์นม	ใช้เพื่อทำความสะอาดระบบกรองในกระบวนการผลิต

ที่มา : กัลป์ยกร วงศ์กาฬสินธุ์ (2540)

ในอดีตมนุษย์ทราบเพียงว่าสามารถเตรียมเอนไซม์ย่อยโปรตีนขึ้นมาได้จากแหล่งที่เป็นพืชและสัตว์ เช่น ในสับปะรดมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนคือโบรมิเลน ยางมะละกอมีเอนไซม์ปาเปน กระเพาะลูกวัวมีเอนไซม์เรนนิน ซึ่งจะเตรียมได้ปริมาณน้อยส่งผลให้กระบวนการแยกและทำให้บริสุทธิ์ค่อนข้างยุ่งยากและจำเป็นต้องใช้แรงงานมาก ต่อมาหลังจากมีความพยายามค้นหาแหล่งผลิตเอนไซม์ทดแทนพืชและสัตว์จึงพบว่าจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะการผลิตด้วยกระบวนการหมัก (fermentation) เนื่องจากการเพาะเลี้ยงและการควบคุมทำได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและสะดวกกว่า อีกทั้งให้ผลผลิตสูงและสม่ำเสมอ จุลินทรีย์จำพวกเชื้อราและแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้ (กัลป์ยกร วงศ์กาฬสินธุ์. 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 การจำแนกประเภทของโปรติเอส

โปรติเอสสามารถจำแนกตามลักษณะหลักๆ ได้ 2 ประเภท คือ

2.7.2.1 จำแนกตามลักษณะของสับสเตทมี 2 ชนิด คือ

(1) โปรติเนส (protenase) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นเพปไทด์สายสั้นๆ (Dalling. 1972)

(2) เพปติเดส (peptidase) ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์สายสั้นให้มีขนาดเล็กลงหรือเป็นอะมิโน (Dalling. 1972)

2.7.2.2 จำแนกตามตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยามี 2 ชนิด คือ

(1) เอ็กโซเพปติเดส (exopeptidase) คือ เอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านอะมิโนหรือปลายด้านคาร์บอกซีของสับสเตท จากตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยาที่ปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ทำให้สามารถแบ่งเอกโซเพปติเดสได้เป็นอะมิโนเพปติเดสและคาร์บอกซีเพปติเดส (Reo *et al.* 1998)

- อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) จะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายอะมิโนอิสระ (N-terminal) ของสายโพลีเปปไทด์ ได้กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยว ไดเปปไทด์และไตรเพปไทด์ อะมิโนเพปติเดสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและรา โดยทั่วไปอะมิโนเพปติเดสจะเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ (intracellular enzyme)

- คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidase) จะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของสายโพลีเปปไทด์ แล้วให้กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวหรือไดเพปไทด์ คาร์บอกซีเพปติเดสสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ ตามลักษณะของกรดอะมิโนบริเวณแร่งของเอนไซม์ คือ ซีรีนคาร์บอกซีเพปติเดส (serine carboxypeptidase) เมทิลโลคาร์บอกซีเพปติเดส (metallo carboxypeptidase) และซีสเตอีนคาร์บอกซีเพปติเดส (cysteine carboxypeptidase)

(2) เอนโดเพปติเดส (endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของโพลีเพปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโนและคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนโดเพปติเดสสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะการเร่งปฏิกิริยา คือ ซีรีนโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอส (serine protease or alkaline protease) แอสปาร์ติกโปรติเอสหรือแอซิดโปรติเอส (aspartic protease or acid protease) ซีสเตอีนโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส (cysteine protease or thiol protease) และเมทิลโลโปรติเอส (metalloprotease) (Rao *et al.* 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ซีรีนโปรติเอส (serine protease) หรืออัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) จะมีซีรีนเรสซิดิวส์ (serine residue) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สามารถยับยั้งการทำงานด้วยการเติมสาร di-isopropyl fluorophosphates (DFP) และ phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) แต่จะทนต่อภาวะที่มี ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) (Priest. 1977) โดย Sloma *et al.* (1988) พบว่า PMSF เข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอมไซม์โปรติเอสได้ แคลเซียมอิออนช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้มีความเสถียรสูงสุดใช่ช่วง pH 5.0-9.0 พบได้ทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ มักพบอัลคาไลน์โปรติเอสในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ อัลคาไลน์โปรติเอสเป็นที่รู้จักกันเป็นอย่างดีและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสาร ซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด

- เมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) หรือนิวทรัลโปรติเอส (Nutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะสังกะสี (zinc) อยู่ภายใต้โครงสร้าง สามารถถูกยับยั้งการทำงานโดยการเติมสารจำพวก chelating agent เช่น EDTA (Ward. 1983) และ Sloma *et al.* (1988) พบว่า EDTA เข้มข้นเพียง 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ มีความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่ pH ประมาณ 7.0 แต่จะเสถียรในช่วง pH 5.0-10.0 และจะเสถียรมากขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออน เมทัลโลโปรติเอสจะรวมถึงเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ เช่น คอลลจีเนส (collagenase) จากสิ่งมีชีวิตขั้นสูง สารพิษฮีโมราจิก (hemorrhagic toxins) จากงูพิษและเทอร์โมไลซิน (thermolysin) จากแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเสถียรน้อยกว่าแอลคาไลน์โปรติเอสจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่ก็พบว่ามีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร พบมากทั้งในราและแบคทีเรีย เช่น *B. amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. subtilis* (Priest. 1985)

- แอสปาร์ติกโปรติเอส (aspatic protease) หรือแอซิดโปรติเอส (acid protease) จะทำปฏิกิริยาจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (side chain) เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน ทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานีน เป็นต้น ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวกไดอะโซคีโตน (diazoketone) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP เอนไซม์ทำงานได้ดีช่วง pH 3.0-4.0 มีค่า Isoelectric point ต่ำ และโครงสร้างคล้ายกับเอนไซม์เพปซิน และเรนนินในสัตว์ แบ่งออกเป็น 2 พวกโดยสมบัติทางกายภาพ คือ pepsin-like acid protease และ rennin-like acid protease เอนไซม์กลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าวและธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ้ว เต้าเจี้ยว รวมไปถึงอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-ซีสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) หรือไทออลโปรติเอส (thiol protease) สามารถทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลาง ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก sulfhydryl reagent เช่น p-cholomercuribenzoate สารพวก DFP มีผลต่อการทำงานเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์บางตัว ได้แก่ ไฮโดรเจนไซยาไนด์ (HCN) หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนรวมอยู่ด้วย ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์เอนไซม์ ได้แก่ *B. amyloliquefaciens, B. cereus, B. megaterium, B. subtilis* (Priest. 1985)

2.7.3 แหล่งที่มาของเอนไซม์

2.7.3.1 เอนไซม์จากพืช

(1) ปาเปน เป็นซีสเตอีนโปรตีเอสที่สกัดจากน้ำยางของมะละกอ มีการทำงานของเอนไซม์ในวงกว้าง pH 5-8 และกิจกรรมที่เหมาะสมที่สุดที่อุณหภูมิสูง คือ 65 องศาเซลเซียส (Smith and Hong-Shum. 2003) ปาเปนมีความสามารถที่ดีที่สุดเพื่อปรับปรุงความนุ่มเมื่อเทียบกับเอนไซม์โบรมิเลน ฟิกซิน และเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิด แต่ก็มีผลเสียต่อความฉ่ำน้ำและเนื้อสัมผัส (Sullivan and Calkins. 2010)

Pawar *et al.* (2003) ได้ทำการทดลองนำเอนไซม์ปาเปนมาใช้เพื่อปรับปรุงความนุ่มและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของเนื้อแพะ จากการทดลองพบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนจะช่วยย่อยโปรตีนและปลดปล่อยกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เนื้อแพะมีความนุ่มเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีการทดลองของ Ashie *et al.* (2002) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์ปาเปนต่อโปรตีนในเนื้อสัตว์และการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อโคพบว่า เอนไซม์ปาเปนสามารถปรับปรุงความนุ่มของเนื้อโคโดยการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อส่งผลให้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดน้อยลง

(2) โบรมิเลน แสดงถึงส่วนผสมของซีสเตอีนโปรติเอสจากสับปะรดรวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากก้านสับปะรดและผลไม้ เมื่อเทียบกับปาเปนจะเห็นว่ามีช่วงกิจกรรมที่แคบกว่าโดยมีช่วงค่า pH 5-7 และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้ในเนื้อเอนไซม์โบรมิเลนเพิ่มความนุ่มและสลายคอลลาเจนมากกว่าโปรตีนที่ใช้หดตัวของกล้ามเนื้อ (Sullivan and Calkins. 2010)

Ionescu *et al.* (2008) ได้ศึกษาผลของเอนไซม์โบรมิเลนต่อกล้ามเนื้อและโปรตีนคอลลาเจนของเนื้อโค โดยทำการฉีดเอนไซม์ที่ความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 10, 15 และ 20 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมเนื้อ พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีการย่อยสลายโปรตีนเนื้อสัตว์และคอลลาเจนส่งผลให้เกิดการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อโคเนื่องจากเนื้อสูญเสียความสมบูรณ์ทางกายภาพของกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) ฟิซิน สกัดจากน้ำยางของต้นมะเดื่อ กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ที่ pH 5-8 และ 45-55 องศาเซลเซียส เป็นซีสเตอีนโปรติเอสที่ให้การย่อยสลายที่สมดุลที่สุดของโปรตีนคอลลาเจนและโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ เมื่อเทียบกับโปรตีนซีสเตอีนแบบดั้งเดิมอื่นๆ (Sullivan and Calkins. 2010)

2.7.3.2 เอนไซม์จากจุลินทรีย์

เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ได้แก่ โปรติเอสที่เป็นกลาง (neutral proteases) อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline proteases) และ แอสปาร์ติกโปรตีเอส (aspartic proteases) การใช้เอนไซม์จากฟังไจถูกนำมาผลิตอาหารมาอย่างยาวนาน เช่น ซอสถั่วเหลืองและมิโซะ นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์จากแบคทีเรียถูกศึกษามานานหลายปี เอนไซม์เหล่านี้มักจะมีผลต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อยแต่มีฤทธิ์ต่อคอลลาเจนและอีลาสติน (Bekhit *et al*. 2014) มีการศึกษาเอนไซม์จากจุลินทรีย์ที่ใช้ในเนื้อสัตว์ เช่น แอสปาร์ติกโปรติเอส จาก *Aspergillus oryzae* (Ashie *et al*. 2002) ซับทิลิซิน (subtilisin) และโปรติเอสที่เป็นกลาง จาก *Bacillus subtilis* และ *Bacillus subtilis* var. *amyloliquefaciens* อัลคาไลน์อิลาสเตส (alkaline elastase) จาก *alkalophilic Bacillus* sp. Strain Ya-B (Takagi *et al*. 1992) คอลลาจีเนส (collagenase) จาก *vibro* B-30 (Miller *et al*. 1989) โปรตีเอสของจุลินทรีย์บางชนิดได้รับการอนุมัติแล้วว่ามีสถานะ GRAS และมีวางจำหน่ายทั่วไป

Qihe *et al*. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์อีลาสเตสจาก *Bacillus* sp. EL31410 ต่อความนุ่มของเนื้อโค โดยนำเอนไซม์อีลาสเตสมาหมักกับเนื้อโคส่วนไหล่ (shoulder) เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่าเอนไซม์อีลาสเตสมีความสามารถในการย่อยเส้นใยกล้ามเนื้อตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรก นอกจากนี้ยังสามารถย่อยสลายอีลาสตินและคอลลาเจนได้อีกด้วย ซึ่งอีลาสตินและคอลลาเจนเป็นสาเหตุของเนื้อที่เหนียวมากกว่าส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.7.4 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (Collagenolytic enzyme)

คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มเอนไซม์โปรติเนสที่สามารถย่อยสลาย native collagen ได้ (Tran and Nagano. 2002) คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่รู้จักในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) หรือจากพืช คือ ปาเปน (papain) คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Clostridium histolyticum* (Matsushita *et al.* 1999), *Bacillus subtilis* (Tran and Nagano. 2002), *Bacillus* sp. (Nakayama *et al.* 2000; Okamoto *et al.* 2001) จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากดิน อาหารที่มีการหมัก เช่น น้ำปลา (Nagano and To. 1999 ; Tran and Nagano. 2002) โดยทั่วไปคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ย่อยคอลลาเจนจะต้องมี Zn^{2+} เป็นโคแฟคเตอร์ตรงบริเวณเร่ง ซึ่งจัดเป็นเมทัลโล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรติเนส (Tsuruoka *et al.* 2003) บางชนิดจัดเป็นซีรีนโปรติเนสและโปรติ-เอสอื่นๆ รองลงมาคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ชนิดเมทัลโลโปรติเนสย่อยสลายสายคอลลาเจนตรงพันธะเปปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนชนิดอื่นกับไกลซีน-โพรลีน (Watanabe. 2004)

Kawahara *et al.* (1993) ศึกษาการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสจากดิน โดยใช้คอลลาเจนเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เมื่อบ่งชีสายพันธุ์จุลินทรีย์พบว่าเป็นเชื้อ *Bacillus alvei* DC-1 และเมื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์คอลลาจีเนสโดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 80 และศึกษาสมบัติของเอนไซม์คอลลาจีเนส พบว่าเอนไซม์คอลลาจีเนสสามารถทำงานได้ดีที่ค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.5, 6.0 และ 7.0 ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสชนิดใหม่ที่มีกิจกรรมที่ค่าพีเอชเป็นกรด

Nagano and To (1999) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์คอลลาจีเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 ที่คัดแยกได้จากการหมักน้ำปลาแบบดั้งเดิมในอาหารที่มีการเสริมเจลาติน พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าขนาดโมเลกุลของเอนไซม์คอลลาจีเนสจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เท่ากับ 125 กิโลดาลตัน เอนไซม์มีความเสถียรต่อพีเอชในช่วง 5.0-10.0 และเอนไซม์คอลลาจีเนสจะถูกยับยั้งด้วย 2-β-mercaptoethanol และ di-isopropyl-phospho-fluoridate (DPF) สามารถจัดเอนไซม์คอลลาจีเนสจากเชื้อ *Bacillus subtilis* FS-2 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส

Lund and Graum (1999) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนจากเชื้อ *Bacillus cereus* ในอาหาร CGY medium เลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส จากการศึกษาด้วย SDS-PAGE เอนไซม์คอลลาจีเนสที่มีขนาดโมเลกุล 10^5 กิโลดาลตัน เอนไซม์คอลลาจีเนสจะถูกยับยั้งด้วย EDTA และ 1,10-phenanthroline และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ $ZnCl_2$ จะทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ทำให้สามารถจัดเอนไซม์คอลลาจีเนสจากเชื้อ *Bacillus cereus* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเมทัลโลโปรติเนส

Nakayama *et al.* (2000) ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์คอลลาจเนสทนต่ออุณหภูมิสูงและทนกรดจากเชื้อ *Bacillus* sp. NTAP-1 โดยมีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 3.9 และไม่ถูกยับยั้งโดย EDTA ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และเอนไซม์คอลลาจีเนสมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากงานของ Okamoto *et al.* (2001) ศึกษาการผลิตเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนจากเชื้อ *Bacillus* sp. MO-1 ในอาหารที่มีการเติมคอลลาเจนลงไป พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.2 บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศา-เซลเซียสพบว่า เอนไซม์คอลลจาจีเนสที่ได้มีขนาดโมเลกุล 105 กิโลดอลตันจากการศึกษาด้วย SDS-PAGE ตำแหน่งเฉพาะที่เอนไซม์ตัดพันธะเปปไทด์ คือ ลิวซีน ไทโรซีน ฮิสทิดีน อะลานีน และไลซีน เอนไซม์คอลลาจีเนสถูกยับยั้งด้วย DFP และ phenylmethylsulfonylfluoride ทำให้สามารถจัดเอนไซม์คอลลาจีเนสจากเชื้อ *Bacillus* sp. MO-1 เป็นเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kanayama and Sakai (2005) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสชนิดใหม่จากเชื้อ *Microbacterium liquefaciens* ซึ่งคัดแยกจากดินบริเวณโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตเจลาติน โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่า เอนไซม์โปรติเอสมีขนาดโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน สามารถย่อยเจลาตินที่มีขนาด 100 กิโลดาลตัน ได้เป็นขนาด 60 และ 40 กิโลดาลตัน แต่ไม่สามารถย่อยสลายคอลลาเจนได้

2.7.5 ความแตกต่างของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์กับเอนไซม์คอลลาจีเนส

- คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ มีเอนไซม์น้อยมากที่สามารถทำลายโครงสร้างของคอลลาเจนเกลียวสามสายที่ซับซ้อนได้ โดยเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายคอลลาเจน (รวมทั้งคาเทป-ซินและอีลาสเทส) เป็นที่รู้จักกันโดยทั่วไปว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (Collagenolytic enzyme) ซึ่งคาเทปซิน เค (cathepsin K) ย่อยสลายคอลลาเจนชนิดที่ 1 ส่วนอีลาสเทสคือคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ที่ศึกษามากที่สุดและถือว่าเป็นเอนไซม์โปรตีเอสซีรีน รีน มีหน้าที่หลักในการสลายของอีลาสติน (โปรตีนที่ไม่ละลายน้ำที่มีความหนืดสูงที่พบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน) ร่วมกับคอลลาเจนเนสทำการกำหนดคุณสมบัติทางกลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยการตัดพันธะเปปไทด์โดยเฉพาะในบางครั้งคอลลาเจนถือเป็นสารตั้งต้นที่ไม่ดีสำหรับเอนไซม์คอลลาจีเนสจึงทำให้ไม่สามารถย่อยคอลลาเจน อย่างไรก็ตามหากซับสเตรทถูกย่อยโดยเอนไซม์อีลาสเทสก่อน ทำให้โปรตีโอไกลแคน (proteoglycans) ถูกกำจัดออกจากเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งทำให้ไวต่อการย่อยสลายของเอนไซม์คอลลาจีเนสมากขึ้น คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์อื่นๆ ทั้งหมดเป็นสมาชิกของ Matrix Metalloproteinase (MMP) และทำหน้าที่ในสภาวะเป็นกลาง โดย Matrix metalloproteinase จะย่อยสลายสายโซ่คอลลาเจน (native collagen) ชนิดที่ 1, 2, 3 หลังจาก Gly ในลำดับเฉพาะ (Gln/Leu)–Gly---(Ile/Leu)–(Ala/Leu) (--- ตำแหน่งที่ถูกย่อยสลาย) ซึ่งกลุ่มนี้ ได้แก่ คอลลาจีเนส MMP-1, MMP-8, MMP-13 และ MMP-18 ซึ่ง MMP-2 เป็นที่รู้จักกันในชื่อ เจลาติเนส เอ (gelatinase A)

- เอนไซม์คอลลาจีเนส เป็นเอนไซม์จำเพาะสำหรับซับสเตรทคอลลาเจน ถูกคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะจากทั้งเซลล์จุลินทรีย์และเนื้อเยื่อของสัตว์ โดยเอนไซม์คอลลาจีเนสได้จากจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น *C. histolyticum* ซึ่งเอนไซม์คอลลาจีเนสเหล่านี้จะแบ่งสายคอลลาเจนโพลีเปปไทด์แต่ละสายที่หลาย ๆ ตำแหน่ง ทำหน้าที่เป็น exotoxin ทำให้เกิดการย่อยสลายของคอลลาเจนในเซลล์โฮสต์และขัดขวางการเผาผลาญในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเอนไซม์คอลลาจีเนสจากแบคทีเรียค่อนข้างมีความหลากหลาย สามารถย่อยสลายได้ทั้งคอลลาเจนที่ไม่ละลายน้ำและที่ละลายน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 มาตรฐานเนื้อแพะ

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (2549) ได้กำหนดคุณภาพเนื้อแพะ (มกอช. 6005-2549) ดังนี้

2.8.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องไม่เกิน 5×10^5 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

2.8.2 โคลิฟอร์ม กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน 5×10^3

2.8.3 เชื้อ *Salmonella* spp. ต้องไม่พบตัวอย่าง 25 กรัม

2.8.4 เชื้อ *Staphylococcus aureus* กำหนดค่า Most Probable Number (MPN) ต่อตัวอย่าง 1 กรัม ต้องไม่เกิน 1×10^2

2.8.5 ต้องปราศจากปรสิต

2.8.6 ปราศจากสิ่งแปลกปลอมที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

นอกจากนี้ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล (2540) กล่าวว่าในการกำหนดคุณภาพเนื้อ (Meat Quality) ต้องคำนึงถึงองค์ประกอบหลัก 3 ประการ คือ คุณลักษณะคุณภาพเนื้อ (meat quality characteristics) คุณภาพของการผลิต (production quality) และความพึงพอใจของผู้บริโภค (consumer appreciation) เนื้อที่มีคุณภาพดีจะต้องให้คุณค่าทางโภชนาการครบถ้วน ได้แก่ โปรตีน ไขมัน แร่ธาตุ และไวตามินในปริมาณที่เหมาะสม ปราศจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ ปรสิต สารตกค้าง และมลพิษทางสิ่งแวดล้อม ตั้งแต่ขั้นตอนการผลิตจากฟาร์มจนถึงการแปรรูปเป็นเนื้อสัตว์ อีกทั้งยังต้องมีคุณสมบัติที่ดี เช่น ความสามารถในการอุ้มน้ำ ค่าความเป็นกรดด่างของเนื้อ และลักษณะเนื้อสัมผัส เป็นต้น แต่สุดท้ายผู้บริโภคจะเป็นผู้ตัดสินว่าเนื้อนั้นมีคุณภาพดีหรือไม่ ซึ่งคุณสมบัติของเนื้อที่มีคุณภาพดีต้องประกอบด้วยคุณสมบัติดังนี้

(1) คุณค่าทางโภชนาการ (nutrition value) ได้แก่ ปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และแร่ธาตุ

(2) คุณค่าทางการบริโภค (sensory value) ได้แก่ สีของเนื้อ (color) ไขมันแทรกที่อยู่ในระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ (marbling) ความนุ่มของเนื้อ (tenderness) กลิ่นและรสชาติ (flavor) ความชุ่มฉ่ำของเนื้อ (juiciness) ขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ (texture)

(3) คุณค่าทางด้านสุขอนามัย (hygienic value) ได้แก่ การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ (microbial contaminate) การปนเปื้อนจากปรสิต การปนเปื้อนจากมลพิษทางสิ่งแวดล้อม และสารตกค้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1) Nutrient broth (105443, Merck, Germany)
2) Agar power (RM026, Himedia, India)
3) Peptone (91079-38-8, Merck, Germany)
4) Glucose (AJA783, Ajax, Australia)
5) Plate count agar (105463, Merck, Germany)
6) Potato dextrose agar (110130, Merck, Germany)
5) Di-potassium hydrogen phosphate (7758-11-4, Merck, Germany)
7) Potassium Dihydrogen Orthophosphate (7778-11-0, Merck, Germany)
8) Gelatin (9000-70-8, Merck, Germany)
9) OmniPur Triton X-100 Surfactant (9002-93-1, Merck, Germany)
10) Papain from papaya latex (P3375, Sigma, Germany)
11) Bromelain (from pineapple) (1016651, Sigma, Germany)
12) Collagenase from *Clostridium histolyticum* (C9891, Sigma, Germany)
13) Thiobarbituric acid (TBA) (T5500, Sigma, Germany)
14) 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (T9889, Sigma, Germany)
15) Trichloroacetic acid (TCA) (1.00807.0250, Merck, Germany)
16) Hydrochloric acid (1.00317.2500, Merck, Germany)
17) Ethyl alcohol absolute (64-17-5, Carlo Erba, France)
18) Ninhydrin (Sigma, Germany)
19) Bovine serum albumin (BSA) (A7030, Sigma, Germany)
20) L-Tyrosine (T3754, Sigma, Germany)
21) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (L3771, Bio-Rad, USA)
22) Tris (hydroxymethyl) aminomethane (77-86-1, Fisher scientific, USA)
23) Acrylamind (101209309, Sigma, Germany)
24) N,N'-Methylenebisacrylamide (M7279, Sigma, Germany)
25) β-Mercaptoethanol (444203, Merck, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26) N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (808742, Sigma, Germany)
26) Coomassie brilliant blue R-250 (6104-59-2, Sigma, Germany)
27) Bromophenol blue (114391, Sigma, Germany)
27) Acetic acid (64-19-7, Merck, Germany)
28) Methanol (67-56-1, Merck, Germany)

3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

1) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
2) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius TE124, Basic, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Germany)
3) หม้อนึ่งแรงดัน (Hirayama model HVE 50, Hariyama manufacturing corporation, Japan)
4) เครื่องตีป่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, Vision Scientific, France)
5) ไมโครเวฟ (Toshiba model ER-G8C, Toshiba Thailand, Thailand)
6) ตู้ Laminar Flow (Dwyer model merk II, Corporate HQ Michigan city, USA)
7) ไมโครปิเปต ขนาด 10, 100, 200, 1,000 และ 5,000 ไมโครลิตร (Eppendorf Micropipette, Thomas Scientific, Germany)
8) เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Genie2, Scientific Industries Inc., USA)
9) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Binder GmbH, Germany)
10) เครื่องเขย่าเชื้อจุลินทรีย์แบบตั้งโต๊ะ (NB-205, N-Biotek, Korea)
11) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadsu model UV – 1061, Shimadzu corporation, Japan)
12) เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (Mettler Toledo medel SG-2, Mettler Toledo international Inc., Switzerland)
13) ตู้อบลมร้อน (Binder, Model FD 115, Binder GmbH, Germany, Germany)
14) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mammert, Mammert GmbH, Germany)
15) เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sigma 2-16 KL, Sigma, Germany)
16) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax model IKA T25 digital, IKA group, Germany)
17) เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunterlab Mini Scan EZ, Hunter Associates Laboratory Inc., USA)
18) เครื่องวิเคราะห์เค้าโครงเนื้อสัมผัส (Warner-Bratzler, Instron Model 1011, Instron company, Thailand)
19) เทอร์โมคอปเปอร์ (Fluke, Fluke Biomedical, Natherland)
20) เครื่องกวนสารให้ความร้อน (Stuart, BioCote, United Kingdom)
21) เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (ATTO model AE-6530, ATTO Corporation, Japan)
22) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Ramon, Changsha Branch Company, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

23) กระดาษกรอง (Whatman, Sigma-Aldrich, English)

24) ตู้แช่เย็น (Sanden intercool, Sanden Intercool PCL., Thailand)

25) ตู้แช่เยือกแข็ง (Snijders, Snijders Labs, Netherland)

26) ถุงสุญญากาศชนิด K-Nylon/LLDPE

27) หลอดทดลองขนาดเล็กและเครื่องแก้วชนิดและขนาดต่างๆ

28) Centrifuge tube ขนาด 10 และ 50 มิลลิลิตร

29) ช้อนตักสาร

30) กระบอกตวง

31) Disposables cuvette

ในการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลอง	แนวทางการดำเนินการวิจัย
การทดลองที่ 1 การศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะในหลอดทดลอง	1.1 การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์ แบ่งออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง ได้แก่ - เอนไซม์ปาเปน - เอนไซม์โบรมิเลน - เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* - คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 - คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. siamensis* S6 1.1.1 การทำบริสุทธิ์บางส่วนคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 1.1.2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ 1.1.3 การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อจากเนื้อแพะ 1.1.4 การสกัดโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเนื้อแพะ 1.2 การทดสอบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะ 1.3 การทดสอบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะ 1.4 การแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยเทคนิค SDS-PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม	2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อแพะ โดยแบ่งชุดการทดลองออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง ได้แก่ - น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม - เอนไซม์โบรมิเลน - คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 - คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. siamensis* S6 2.2 ศึกษาคุณภาพเนื้อแพะตามระยะเวลาในการบ่ม 2.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ - จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 2.2.2 วิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีกายภาพ - ค่าการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) - ค่าการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ ด้วยวิธี TCA-soluble peptide - ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force) - เค้าโครงเนื้อสัมผัส (TPA) - ค่าการสูญเสียน้ำ (water loss) - ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (cooking loss) - ค่าสี (Color) 2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหลอดทดลอง

เพื่อศึกษาหาประสิทธิภาพของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากเนื้อแพะในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน เปรียบเทียบกับคอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช ได้แก่ ปาเปนและโบรมิเลน กำหนดกิจกรรมของเอนไซม์ทุกกลุ่มทดลองเท่ากับ 2.5 U/ml ของการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ตามระบุวิธีการในหัวข้อการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอดทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) แบ่งเป็น 5 กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 3 ซ้ำ ดังต่อไปนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 : เอนไซม์ปาเปน ความเข้มข้น 2.5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 2 : เอนไซม์โบรมิเลน ความเข้มข้น 2.5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 3 : เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ความเข้มข้น 2.5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 4 : คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ความเข้มข้น 2.5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 5 : คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. siamensis* S6 ความเข้มข้น 2.5 U/ml

3.3.1.1 การเตรียมตัวอย่างเอนไซม์และซับสเตรต

(1) การทำบริสุทธิ์บางส่วนคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6

- การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารสกัดเอนไซม์หยาบ (crude enzyme) มาทำการกรองด้วย sterile syringe filter ขนาด 0.22 µm จากนั้นตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตโดยระดับความอิ่มตัวของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนคือ ความเข้มข้นอิ่มตัวร้อยละ 80 โดยตั้งสารละลายไว้ในสภาวะนิ่งข้ามคืน (overnight) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำสารละลายทั้งหมดมา centrifuge แยกตะกอนโปรตีนที่ความเร็ว 12,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำส่วนของตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 mM ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 และนำไปกำจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซิส (dialysis) ต่อไป

- การกำจัดเกลือออกโดยวิธีการไดอะไลซิส

นำสารละลายที่ได้จากวิธีการข้างต้นมาทำการกำจัดเกลือออกโดยบรรจุลงในถุงไดอะไลซิส (dialysis membrance) และนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 50 mM ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 โดยระหว่างการแช่ถุงไดอะไลซิสจะต้องกวนตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยต้องเปลี่ยนบัฟเฟอร์ใหม่ทุกๆ 4 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายออกจากถุงไดอะไลซิส จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยวิธีการ lyophilized และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ก่อนใช้ต่อไป

(2) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง

วิเคราะห์กิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ดัดแปลงจากวิธีการของ Tran and Nagano (2000) โดยใช้คอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon เป็นซับสเตรท ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ละลายใน 150 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ปาเปน (เชิงการค้า), เอนไซม์โบรมิเลน (เชิงการค้า), เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (เชิงการค้า), คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 0.1 N HCl ปริมาตร 1.2 มิลลิลิตร แล้วนำไป centrifuge ที่ 12,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ปล่อยออกมาด้วยวิธีนินไฮดริน (ninhydrin) โดยใช้ไกลซีนเป็นกรดอะมิโนมาตรฐาน โดยกิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ 1 ยูนิต (U) ถูกกำหนดให้เป็นปริมาณของเอนไซม์ที่ปล่อยกรดอะมิโนไกลซีน 1 ไมโครกรัมต่อนาที แสดงในหน่วย U/ml

(3) การสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

ทำการสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) ตามวิธีการของ Goll *et al.* (1974) ดัดแปลงโดย Ha *et al.* (2012) นำตัวอย่างเนื้อแพะส่วนกล้ามเนื้อไหล่ (Infraspinatus muscle, IF) มาสับให้เป็นชิ้นเล็กๆ น้ำหนัก 0.5 กรัม ละลายใน 100 mM KCl, 20 mM phosphate buffer, pH 6.8, 2 mM $CaCl_2$, 2 mM EDTA, 1 mM NaN_3 (สารละลายเกลือมาตรฐาน) ปริมาตร 5 mL นำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer เป็นเวลา 10 วินาที นำมา centrifuge ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนตะกอน จากนั้นละลายใน 6 volume (v/w) สารละลายเกลือมาตรฐาน นำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 10 วินาทีและนำมา centrifuge ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาที อีกครั้ง จากนั้นเก็บส่วนตะกอนละลายใน 8 volume (v/w) สารละลายเกลือมาตรฐาน นำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 10 วินาทีจากนั้นกรองส่วนใสด้วยตาข่ายไนลอน และ centrifuge ความเร็วรอบ 1,000 g เป็นเวลา 10 นาทีอีกครั้ง ทำซ้ำแบบเดิมอีกรอบ จากนั้นเก็บส่วนตะกอนมาละลายใน 6 volume (v/w) สารละลายเกลือมาตรฐาน ร่วมกับ 1% (v/w) Triton X-100 นำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 10 วินาทีและ centrifuge ความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเก็บส่วนตะกอนละลายใน 8 volume (v/w) สารละลายเกลือมาตรฐาน จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex และ centrifuge ความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำแบบเดิมอีก 4 รอบ แต่เปลี่ยนจากสารละลายเกลือมาตรฐานเป็น 8 volumes (v/w) of 100 mM KCl และ centrifuge ความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาทีในแต่ละรอบ เก็บส่วนตะกอนละลายใน 8 volumes (v/w) of 100 mM KCl จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 3 วินาทีและ centrifuge ความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีกรอบ จากนั้นนำส่วนตะกอนละลายใน 2 volumes (v/w) of 100 mM KCl จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่อง Homogenizer 3 วินาที จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยวิธี lyophilized

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) การสกัดโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

ตามวิธีการของ Davis and Mackle (1981) ดัดแปลงโดย Ha *et al.* (2013) นำส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein) มาละลายในสารละลายฟีนอล:อะซิติก:น้ำ (1:1:1 w/v/v) ประมาณ 8 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หลังจากนั้นเขย่าเบาๆ ที่ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 60 ชั่วโมง จากนั้นนำมา centrifuge ความเร็วรอบ 3,000 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเก็บส่วนใส โดยส่วนของคอลลาเจนที่ละลายน้ำจะอยู่ในชั้นของฟีนอล ซึ่งถูกสกัดด้วย diethyl ether ทำให้เกิดการแยกชั้น เก็บส่วนชั้นน้ำ โดยการทำการสกัดอีก 2 ครั้งก่อนการทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilized

3.3.1.2 การทดสอบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะ

ดัดแปลงจากวิธีการของ Ha *et al.* (2013) นำโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยการเติมเอนไซม์ คือ เอนไซม์ปาเปน (เชิงการค้า), เอนไซม์โบรมิเลน (เชิงการค้า), เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (เชิงการค้า), คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกกลุ่มทดลองเท่ากับ 2.5 U/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าบ่มเขย่าภายในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลาทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% Trichloroacetic acid ด้วยอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 10,000 ×g เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสที่ได้จากการ centrifuge มาวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของเอนไซม์โดยวิเคราะห์เปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก (TCA-soluble peptide) ในหน่วย μg/ml ด้วยวิธีการ Lowry โดยใช้ Tyrosine เป็นสารมาตราฐาน

3.3.1.3 การทดสอบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะ

ดัดแปลงวิธีการจาก Ha *et al.* (2013) นำโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะปริมาณ 50 มิลลิกรัม ละลายในบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปรับให้สมดุลกับอุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที ตามด้วยการเติมเอนไซม์ คือ เอนไซม์ปาเปน (เชิงการค้า), เอนไซม์โบรมิเลน (เชิงการค้า), เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (เชิงการค้า), คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกกลุ่มทดลองเท่ากับ 2.5 U/ml ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำหลอดทดลองเข้าบ่มเขย่าภายในเครื่องบ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา ทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม 10% Tricholoacetic acid ด้วยอัตราส่วน 1:1 จากนั้นนำมา centrifuge ที่ 10,000 ×g เป็นเวลา 5 นาที เก็บ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนใสที่ได้จากการ centrifuge มาวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเอนไซม์โดยวิเคราะห์เปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะเซติก (TCA-soluble peptide) ในหน่วย µg/ml ด้วยวิธีนินไฮดริน (ninhydrin) โดยใช้ Glycine เป็นสารมาตราฐาน

3.3.1.4 การแยกโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยเทคนิค dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างการทดสอบที่ครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา โดยเก็บส่วนใสที่ได้จากการ centrifuge มาเติม SDS sample buffer และ reducing agent จากนั้นนำมาทำการแยกด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีการของ Laemmli (1970) ใช้ separating gel ความเข้มข้นร้อยละ 10 และใช้ stacking gel ความเข้มข้นร้อยละ 4 ทำการแยกโปรตีนโดยใช้ Running Buffer เป็นตัวพากระแสไฟฟ้า 100โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดนำเจลไปย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue นาน 24 ชั่วโมง และนำเจลไปล้างใน destaining solution เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง หรือจนกว่าโปรตีนส่วนเกินจะถูกล้างออกจนหมดจึงนำเจล SDS-PAGE ไปสแกนด้วยเครื่องสแกน จากนั้นประมาณค่าน้ำหนักโมเลกุลจากแถบโปรตีนที่สนใจโดยใช้การเปรียบเทียบระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา โดยการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุล (log MW) กับค่า relative migration distance (Rf) ดังสมการที่ 1

$$Rf = \frac{\text{migration distance of the protein}}{\text{migration distance of the dye front}} \quad (1)$$

จากนั้นคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากสมการเส้นตรง ดังสมการที่ 2

$$y = mx + b \quad (2)$$

ดังนั้นสามารถคำนวนหาน้ำหนักโมเลกุลที่ต้องการศึกษาได้จากระยะทางการเคลื่อนที่ของโปรตีนจากการทำอิเล็กโตโฟเรซิสด้วยเทคนิค SDS-PAGE

3.3.2 การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

เพื่อปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแพะ โดยใช้เอนไซม์จากภายนอกที่ได้จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสคือ คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มาช่วยย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน ร่วมกับการใช้วิธีการบ่ม ทำให้ลดระยะเวลาการบ่มเนื้อและปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแพะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างและการเก็บตัวอย่าง

เตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อส่วนสะโพก (Semitendinosus muscles) เนื่องจากการศึกษาของผุสดี ตังวัชรินทร์ และคณะ (2561) ได้ทำการแบ่งกลุ่มเนื้อแพะตามความเหนียวพบว่าเนื้อแพะส่วนสะโพกเป็นกลุ่มเนื้อเหนียวปานกลางมีความเหนียวรองลงมาจากเนื้อส่วนไหล่ แต่มีปริมาณของเนื้อแดงมากกว่าชิ้นส่วนไหล่ จึงเลือกส่วนสะโพกมาทดสอบโดยทำการฉีดเอนไซม์ความเข้มข้น 5 U/ml ของการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ตามระบุวิธีการในหัวข้อการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง โดยฉีดเอนไซม์ปริมาตรร้อยละ 10 ของน้ำหนักเนื้อแพะ เนื่องจากการทดลองที่ 1 ได้ศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหลอดทดลองพบว่าเอนไซม์ปาเปนมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อมาก เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะอาจส่งผลให้เนื้อสัมผัสของเนื้อแพะนุ่มและเละจนเกินไป และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มากกว่าเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* จึงได้ทำการตัดเอนไซม์ปาเปนและคอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ออกจากกลุ่มการทดลอง โดยเหลือเพียง 4 กลุ่มทดลอง ดังต่อไปนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 : น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม
กลุ่มทดลองที่ 2 : เอนไซม์โบรมิเลน ความเข้มข้น 5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 3 : คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ความเข้มข้น 5 U/ml
กลุ่มทดลองที่ 4 : คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. siamensis* S6 ความเข้มข้น 5 U/ml

จากนั้นบรรจุแบบสุญญากาศ แล้วนำมาบ่มที่ห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเพื่อทำการวิเคราะห์ต่อไป

3.3.2.2 การศึกษาคุณภาพเนื้อแพะตามระยะเวลาในการบ่ม

นำมาตรวจการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านเคมีกายภาพ และจุลินทรีย์ในเนื้อแพะที่บ่มอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน ดังนี้

(1) การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ ได้แก่

- จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (Total plate count) กลุ่มใช้อากาศ ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ Total plate count ตามวิธีการของ BAM (2001) โดยนำตัวอย่างเนื้อแพะ 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อใส่สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปตีด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 1 นาที จะได้สารละลายความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่างให้ได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100 1:1000 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้นไป) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร plate count agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(PCA) แล้วผสมให้เข้ากันโดยหมุนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างเบามือ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 48±2 ชั่งโมง แล้วทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีและคำนวณโคโลนีของจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเลือกนับจานเลี่ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ต่อตัวอย่างเนื้อแพะ 1 กรัม โดยรายงานผลเป็น log CFU/g

(2) การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมีกายภาพ ได้แก่

- ค่าการออกซิเดชันของไขมัน

ทำการตรวจวัดด้วยเทคนิค Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ตามวิธีของ Buege and Aust (1978) ในขั้นแรกทำกราฟมาตรฐานของสารละลาย 1,3,3,3,tetra-ethoxypropane (TEP)(0-4 µg/mL) โดยเตรียมความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ ให้ความร้อนในน้ำเดือด (95-100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที (ให้ความร้อนพร้อมกับตัวอย่างเนื้อแพะ) ทำให้เย็นด้วยการเปิดน้ำไหลผ่าน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร สำหรับการวิเคราะห์ TBARS ในตัวอย่างเนื้อสัตว์ ทำโดยชั่งตัวอย่างเนื้อแพะ 5 กรัม ใส่ในหลอด centrifuge 50 ml และบันทึกน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ในสารละลาย TBA (0.375% TBA, 15% trichloroactic acid, 0.25N HCl) ปริมาณ 25 มิลลิลิตร นำไป Homogenize ที่ความเร็วรอบ 9,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ความร้อนในน้ำเดือด (95-100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นด้วยการเปิดน้ำไหลผ่าน นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,500 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 25 นาที เก็บสารละลายส่วนใส ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร คำนวณค่าความเข้มข้นของ TBARS ที่ได้ โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร 1,3,3,3,tetra-ethoxypropane

- ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ ด้วยวิธี TCA-Soluble peptide

นำตัวอย่างเนื้อแพะที่ครบระยะเวลาบ่ม มาบดชั่งประมาณ 1.5 กรัม (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) เติมสารละลายกรด 5% (w/v) TCA ปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ (Homogenize) ตัวอย่างเป็นเวลา 30 วินาที จำนวน 2 รอบ ในสภาพที่ตัวอย่างเย็น จากนั้นเก็บรักษาตัวอย่างในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 8,000 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเก็บส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์ค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรด (TCA-Soluble peptide) ด้วยวิธีการหาโปรตีนตามเทคนิคของ Lowry (1951) โดยทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อ 1 ทรีตเมนท์ คำนวณความเข้มข้นของ Tyrosine ในตัวอย่าง โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Tyrosine แสดงค่าที่วิเคราะห์ได้เป็นปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรด (TCA-Soluble peptide) ในหน่วย µmol Tyrosine/g muscle

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (shear force)

นำตัวอย่างเนื้อแพะที่ครบระยะเวลาบ่มมาใส่ในถุงร้อนและทำการไล่อากาศออกด้วยเครื่องบรรจุสุญญากาศและนำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส จนได้อุณหภูมิใจกลางเนื้อที่ 70-75 องศาเซลเซียส จึงนำถุงที่ใส่ชิ้นเนื้อไปลดอุณหภูมิด้วยการใช้น้ำไหลผ่านประมาณ 30 นาทีแล้วตัดชิ้นเนื้อเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าตามแนวยาวของเส้นใยกล้ามเนื้อให้มีขนาดกว้าง×ยาว×หนา เท่ากับ 1×1×2.5 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ชิ้น และนำไปวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อด้วยเครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ โดยกำหนดหน่วยเป็นนิวตัน (N) (Boccard *et al.*, 1981)

- เค้าโครงเนื้อสัมผัส (texture profile analysis, TPA)

ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Instron model 1011 (Calibration Laboratory, USA) โดยตัดตัวอย่างเนื้อให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5×1.5×1.5 เซนติเมตร ทำการวัดค่าตัวอย่างด้วยหัววัดแบบกด (compression) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15.5 เซนติเมตร โหลดเซลล์ที่ใช้ในการวัดค่า 500 นิวตัน กำหนดการวัดค่าของตัวอย่างจะถูกกดลงไปเป็นระยะทางร้อยละ 40 ของความสูงตัวอย่าง ตัวอย่างทดลองละ 10 ซ้ำ บันทึกค่าความแข็ง (hardness, N) ค่าความเหนียวคล้ายยาง (gumminess, N) ค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness, N) ค่าความยืดหยุ่น (springiness, ratio) และค่าการเกาะตัวกัน (cohesiveness, ratio) (Bourne. 2002)

- ค่าการสูญเสียน้ำในระหว่างการบ่ม (weight loss)

ทำตามวิธีการของ Zhao et al. (2012) นำตัวอย่างเนื้อแพะมาฉีดน้ำกลั่น, เอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 จากนั้นเช็ดผิวหน้าเนื้อเพื่อกำจัดน้ำบนผิวเนื้อและชั่งน้ำหนักเนื้อ นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาตามกำหนด เมื่อครบตามช่วงเวลาการบ่ม นำเนื้อหลังการฉีดด้วยเอนไซม์มาชั่งน้ำหนัก โดยการสูญเสียน้ำของเนื้อสัตว์คำนวณด้วยสูตรต่อไปนี้

$$\% \text{ weight loss} = \frac{\text{น้ำหนักเนื้อแพะก่อนการบ่ม-น้ำหนักเนื้อแพะหลังการบ่ม}}{\text{น้ำหนักเนื้อแพะก่อนการบ่ม}} \times 100$$

- ค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก (cooking loss)

ทำการวัดค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุกโดยชั่งน้ำหนักเนื้อแพะที่ครบระยะเวลาบ่มก่อนการนำไปต้มหรือการปรุงสุก จากนั้นนำตัวอย่างเนื้อแพะบรรจุถุงสุญญากาศไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีอุณหภูมิใจกลางที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และชั่งน้ำหนักเนื้อแพะหลังการปรุงสุก นำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกด้วยสูตรต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$\% \text{ cooking loss} = \frac{\text{น้ำหนักเนื้อแพะก่อนการปรุงสุก-น้ำหนักเนื้อแพะหลังการปรุงสุก}}{\text{น้ำหนักเนื้อแพะก่อนการปรุงสุก}} \times 100$$

- การวัดค่าสี (Color)

ทำการวัดค่าสีโดยการ calibrate เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunter Lab Mini Scan EZ) ด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐานสีดำและสีขาว แล้วทำการหั่นตัวอย่างเนื้อแพะให้ผิวเนื้อด้านในที่จะทำการวัดค่าสีให้มีลักษณะที่เรียบ โดยวัดค่าสีของตัวอย่างเนื้อแพะในรูปแบบ CIE (L* a* และ b*) ด้วยเครื่องวัดค่าสีของเนื้อ ทำการบันทึกค่าความสว่าง (Lightness, L*) ค่าสีแดง (redness, a*) และค่าสีเหลือง (yellowness, b*) เปลี่ยนตำแหน่งการวัดสีบนตัวอย่างเนื้อเพิ่มอีก 2 ตำแหน่ง เพื่อให้สามารถเป็นตัวแทนที่ดีของการวัดสี และบันทึกค่าที่ได้

3.3.2.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดลองโดยใช้การจัดกลุ่มทดลองแบบ 4×6 Factorial in CRD โดยทำการทดลองซ้ำ 3 รุ่นการผลิต นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for Windows version 17.0: SPSS Inc.) (Steel and Torrie. 1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะในหลอดทดลอง

จากงานวิจัยของ Sorapukdee *et al*. (2020) ศึกษาการคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียจำนวน 400 สายพันธุ์ โดยพบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่สูงในการย่อยสลายคอลลาเจนแต่มีผลต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย เมื่อบ่งชี้สายพันธุ์จุลินทรีย์พบว่าเป็นเชื้อ *B. subtilis* B13 และ *B. siamemsis* S6 จึงได้นำเอนไซม์จาก 2 สายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบหาประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน โดยเปรียบเทียบกับเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช ได้แก่ ปาเปนและโบรมิเลน

4.1.1 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์โดยใช้คอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon เป็นซับสเตรท (ตารางที่ 4.1) เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมของเอนไซม์ (unit activity) พบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum*, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6, เอนไซม์โบรมิเลน และเอนไซม์ปาเปน ตามลำดับ โดยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 16.10, 5.81, 5.32, 5.05 และ 2.61 U/ml ตามลำดับ จากนั้นทำการปรับฐานความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกกลุ่มการทดลองให้เท่ากัน โดยปรับให้ความเข้มข้นทุกกลุ่มทดลองอยู่ที่ 2.5 U/ml of Collagenolytic activity เนื่องจากความเข้มของเอนไซม์มีผลต่อประสิทธิภาพการย่อยสลายซับสเตรท

4.1.2 การทดสอบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะ

ผลประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในหลอดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน ของแต่ละกลุ่มทดลองมีดังต่อไปนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 กิจกรรมการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ก่อนการย่อยโปรตีนเนื้อแพะในหลอดทดลอง

treatment	Collagenolytic activity using collagen from bovine Achilles tendon	
	Enzyme powder/assay (mg/ml)	Unit activity (U/ml)
Commercial enzyme		
- Papain	1	2.61
- Bromelain	1	5.05
- Collagenase from *C. histolyticum*	1	5.81
Collagenolytic enzyme		
- *B. subtilis* B13	1	16.10
- *B. siamensis* S6	1	5.32

4.1.2.1 เอนไซม์ปาเปน

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide พบว่าเอนไซม์ปาเปนหลังการบ่ม 3 วันมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดปริมาณ 334.88 μg/ml ($P<0.05$) และในวันที่ 6-12 ของการบ่มมีปริมาณเปปไทด์เพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงการบ่ม ($P<0.05$) และมีปริมาณสูงที่สุดในที่วันที่ 15 ของการบ่ม โดยมีปริมาณเปปไทด์อยู่ที่ 441.93 μg/ml ($P<0.05$) จากนั้นลดลงเล็กน้อยจนครบระยะเวลาบ่ม (ภาพที่ 4.1 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.1 ข) พบว่าเอนไซม์ปาเปนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้อย่างรวดเร็ว โดยมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนไมโอซิน (myosin heavy chain) มากโดยไม่พบแถบความเข้มข้นของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ประมาณ 200 kDa และมีการย่อยสลายโปรตีนแอลฟ่า-แอคตินิดิน (∝-actinin) ที่ขนาด 90 kDa รวมถึงแถบความเข้มข้นโปรตีนแอคตินที่ขนาด 42 kDa ตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่ม ซึ่งผลรูปแบบการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของเอนไซม์จากพืชสอดคล้องกับงานวิจัยของ Ha *et al.* (2012) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเอนไซม์ทางการค้าจากพืชต่อการย่อยสลายสารสกัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อพบว่า เอนไซม์ปาเปนมีความสามารถในการการย่อยสลายโปรตีนที่คล้ายกัน โดยมีการย่อยสลายแถบโปรตีนไมโอซิน (223 kDa) และแอคติน (42 kDa) นอกจากนี้ Kang and Rice (1970) รายงานว่าเอนไซม์ปาเปนมีกิจกรรมที่สูงต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อโดยมีฤทธิ์ในการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อมากกว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.2 เอนไซม์โบรมิเลน

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide พบว่า เอนไซม์โบรมิเลนมีปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นตลอดช่วงการบ่ม ($P<0.05$) โดยหลังการบ่ม 3 วันมีปริมาณเปปไทด์ปริมาณ 308.54 µg/ml ($P<0.05$) และหลังการบ่มที่ 18 วันมีปริมาณเปปไทด์อยู่ที่ 380.59 µg/ml ($P<0.05$) และลดลงในช่วงท้ายของการบ่ม (ภาพที่ 4.2 ก) ซึ่งมีปริมาณเปปไทด์รองลงมาจากเอนไซม์ปาเปน เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.2 ข) พบว่าเอนไซม์โบรมิเลนมีรูปแบบการย่อยสลายโปรตีนที่คล้ายกับเอนไซม์ปาเปนแต่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อน้อยกว่าเอนไซม์ปาเปนเล็กน้อย โดยมีการย่อยสลายโปรตีนไมโอซินตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มและไม่พบความเข้มข้นของแถบโปรตีนขนาดใหญ่นี้หลังการบ่ม 9 วัน อีกทั้งแถบความเข้มข้นโปรตีนแอคตินที่ขนาด 42 kDa ก็ถูกย่อยตั้งแต่ 3 วันของการบ่ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ha *et al.* (2012) กล่าวว่าเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลนมีรูปแบบการย่อยสลายโปรตีนที่คล้ายกัน

4.1.2.3 เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum*

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide พบว่าเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* หลังการบ่ม 3 วันมีปริมาณเปปไทด์ปริมาณ 125.04 µg/ml โดยหลังการบ่มที่ 3-12 วันมีปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P<0.05$) และในวันที่ 18 ของการบ่มมีปริมาณเปปไทด์สูงที่สุด (201.91 µg/ml) ในช่วงท้ายของการบ่มมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดคงที่จนสิ้นสุดการบ่ม ($P>0.05$) (ภาพที่ 4.3 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.3 ข) พบว่ามีการย่อยสลายแถบความเข้มข้นของโปรตีนไมโอซินขนาดใหญ่ตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่มเช่นเดียวกันเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลนแต่ไม่ส่งผลกระทบต่อการย่อยสลายโปรตีนแอคติน โดยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้แต่น้อยกว่าเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

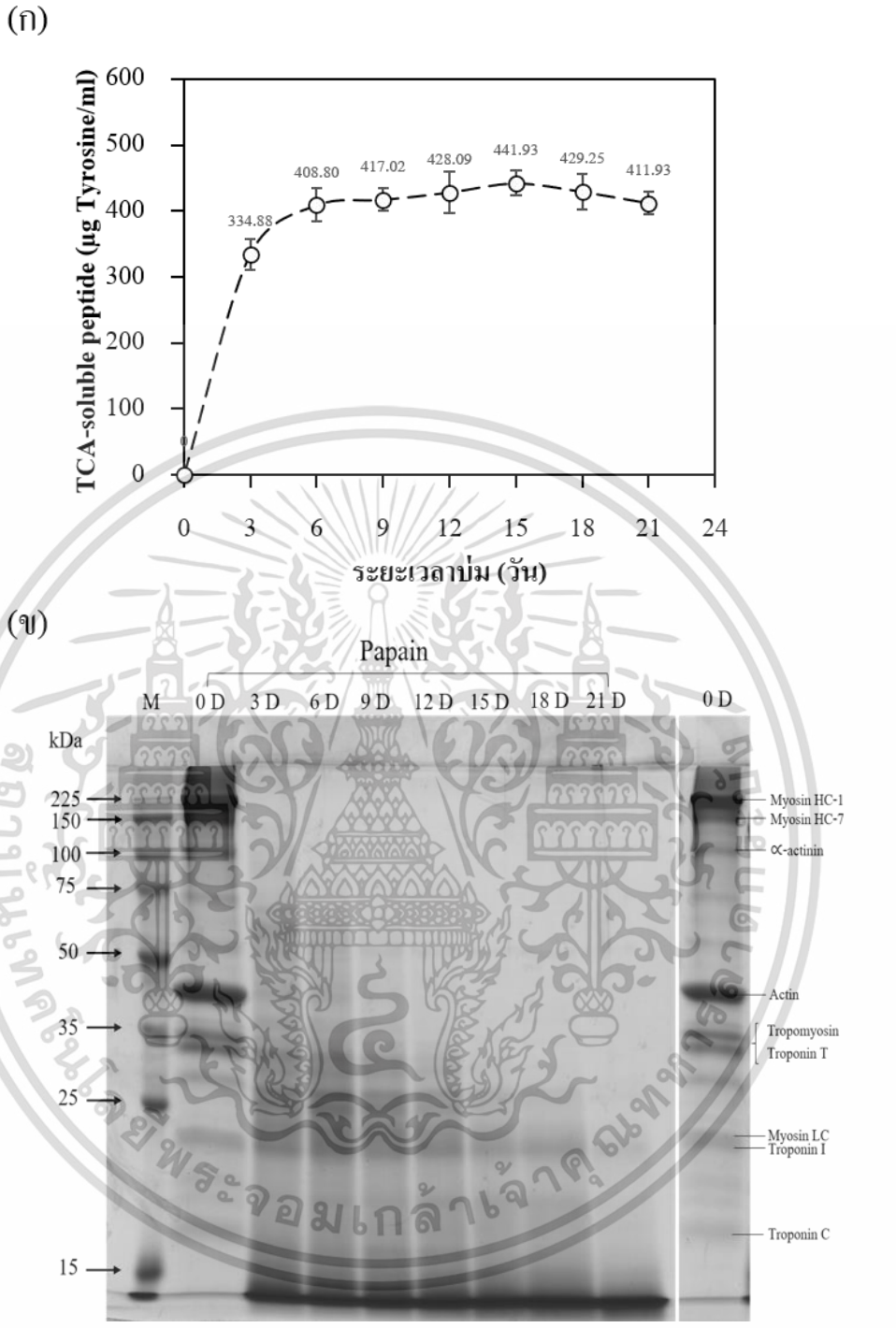
4.1.2.4 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide พบว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย โดยหลังการบ่มที่ 3-12 วันมีปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P<0.05$) และในช่วงท้ายของการบ่มมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดสูงที่สุดในวันที่ 15 ของการบ่มและคงที่จนสิ้นสุดการบ่ม ($P>0.05$) โดยเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดเพียง 162.32 µg/ml (ภาพที่ 4.4 ก) ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์เชิงการค้าจากพืชและเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.4 ข) พบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อบ้างเพียงเล็กน้อย โดยยังสามารถมองเห็นแถบความเข้มข้นของโปรตีนไมโอซินที่มีขนาดใหญ่ (myosin heavy chain) ที่มีขนาดประมาณ 200 kDa ได้ในช่วง 9 วันแรกของการบ่มและโปรตีนแอคตินจะเริ่มย่อยสลายอย่างชัดเจนหลังวันที่ 9 ของการบ่ม

4.1.2.5 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide พบว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดเพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P<0.05$) โดยหลังการบ่มที่ 3 วันมีปริมาณเปปไทด์อยู่ที่ 98.52 µg/ml ($P<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีปริมาณเปปไทด์อยู่เพียง 121.38 µg/ml ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.5 ก) ซึ่งน้อยกว่าเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช, เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.5 ข) พบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อบ้างเพียงเล็กน้อย โดยยังสามารถมองเห็นแถบความเข้มข้นของโปรตีนไมโอซินที่มีขนาดใหญ่ (myosin heavy chain) ที่มีขนาดประมาณ 200 kDa ได้ในช่วง 9 วันแรกของการบ่มและโปรตีนแอคตินจะเริ่มย่อยสลายอย่างชัดเจนหลังวันที่ 9 ของการบ่มเช่นกัน

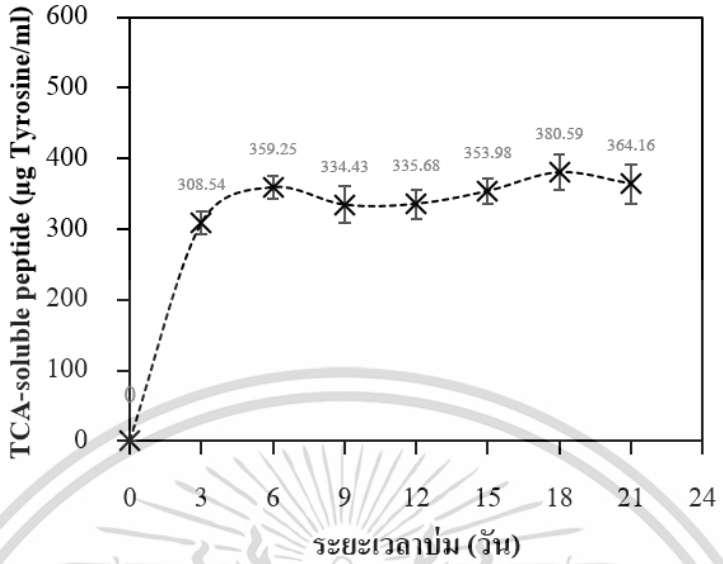
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



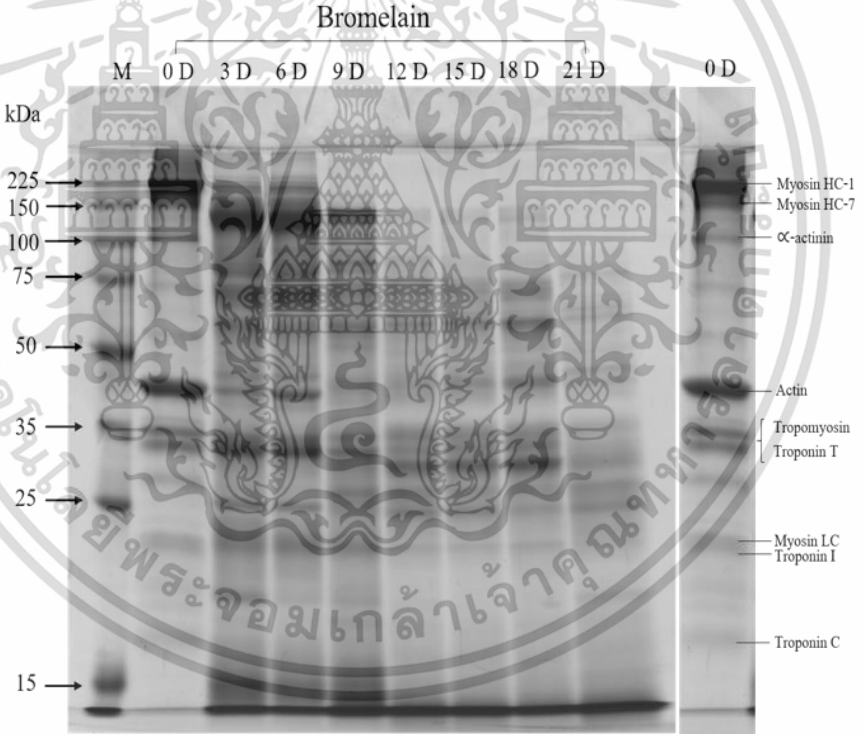
ภาพที่ 4.1 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



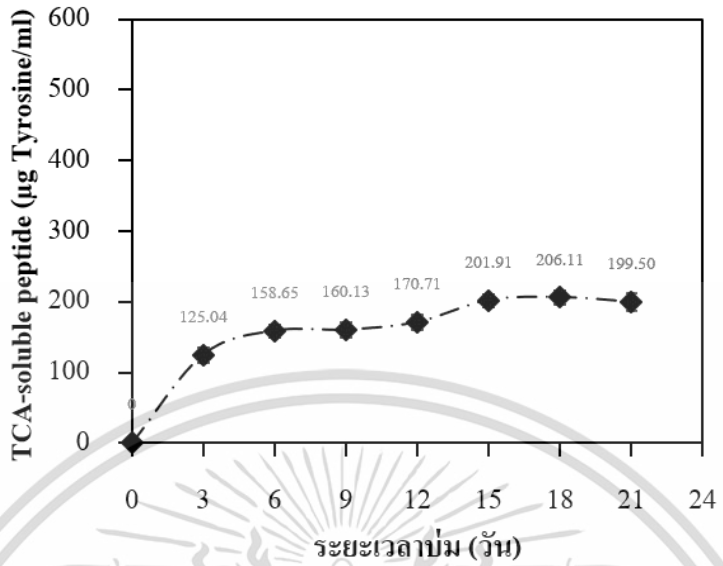
(ข)



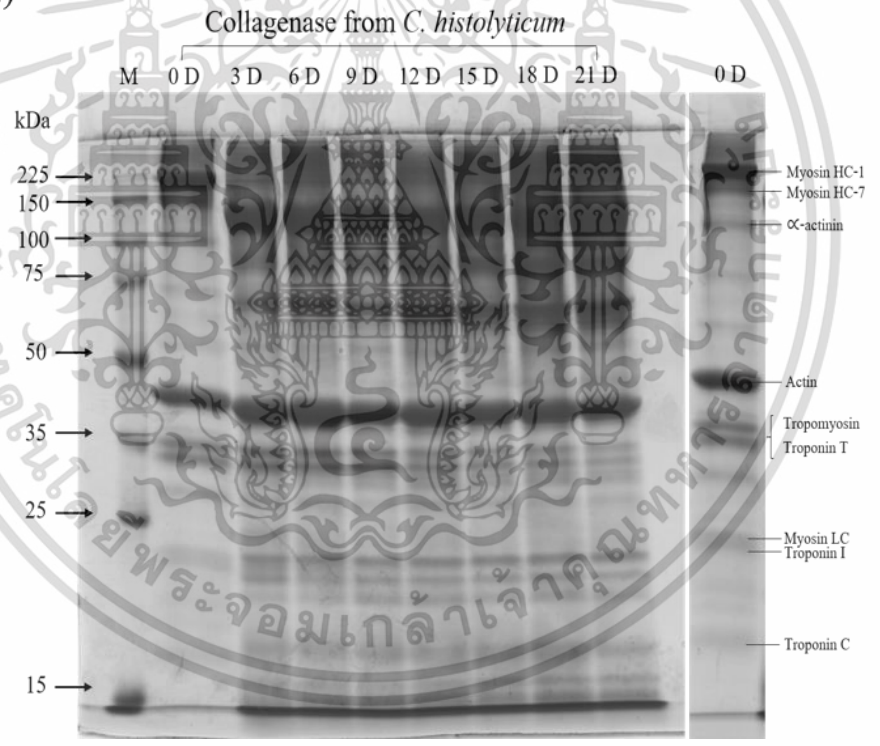
ภาพที่ 4.2 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข)), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



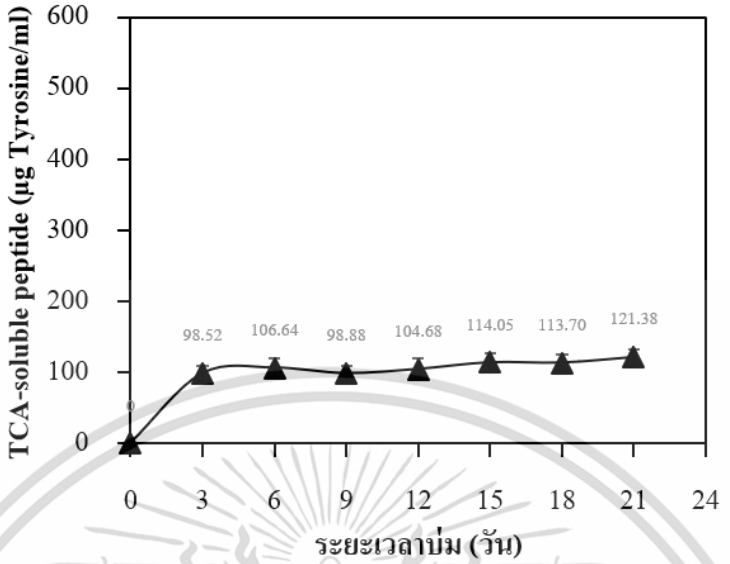
(ข)



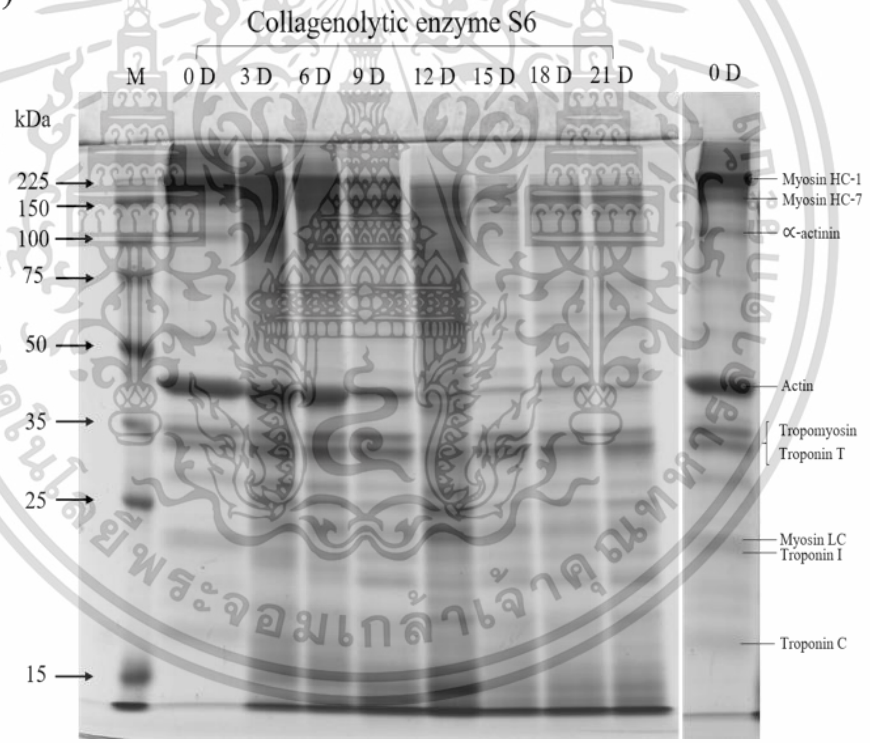
ภาพที่ 4.3 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดได้จากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



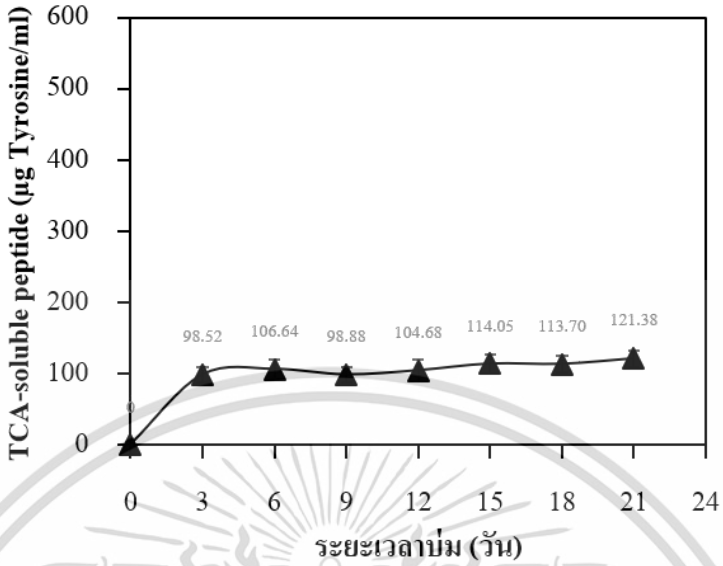
(ข)



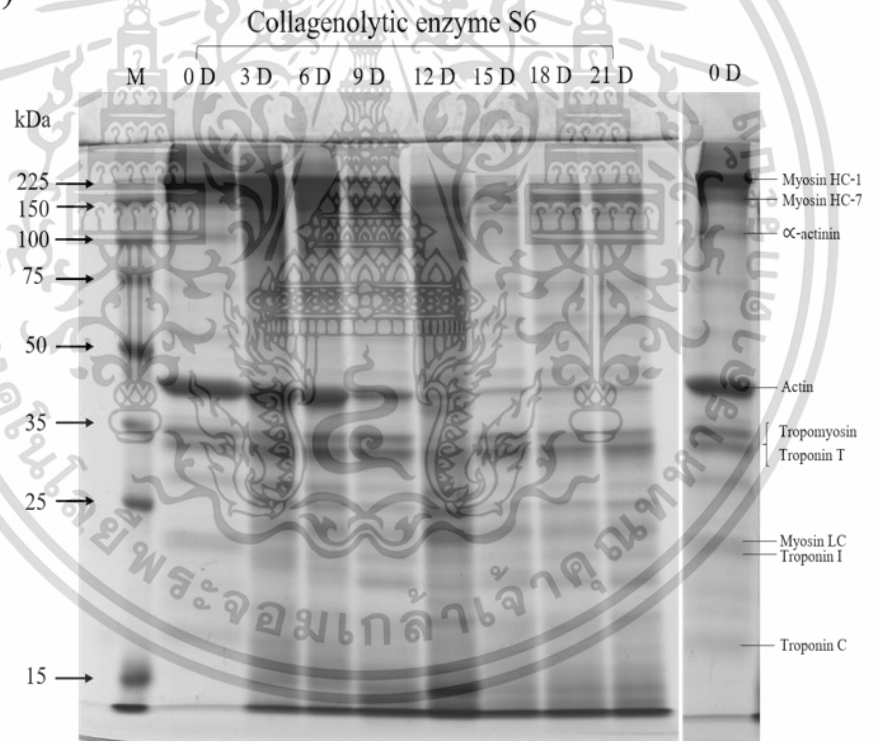
ภาพที่ 4.4 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



(ข)



ภาพที่ 4.5 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 การทดสอบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะที่สกัดได้จากเนื้อแพะ

ผลประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน ของแต่ละกลุ่มทดลองมีดังต่อไปนี้

4.1.3.1 เอนไซม์ปาเปน

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยวิธีนินไฮดรินพบว่า เอนไซม์ปาเปนมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดเพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P<0.05$) โดยหลังการบ่ม 3 วันแรกมีปริมาณเปปไทด์อยู่ที่ 2.58 µg/ml ($P<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดปริมาณ 4.04 µg/ml ($P<0.05$) ซึ่งเอนไซม์ปาเปนมีการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อยที่สุด (ภาพที่ 4.6 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.6 ข) พบว่า มีการย่อยสลายเปปไทด์ทำให้เกิดแถบมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 22 kDa และสามารถย่อยสลายมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa ได้เล็กน้อย อีกทั้งยังสามารถเห็นแถบมวลโมเลกุลที่ 55 kDa ตลอดระยะบ่ม โดยทั่วไปโปรตีเอสจากพืชทุกชนิดสามารถย่อยสลายได้ทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อแต่เอนไซม์จะมีประสิทธิภาพต่ำในการย่อยสลายคอลลาเจนในเนื้อสด อย่างไรก็ตามเอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่อเนื้อสัตว์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) ในระหว่างการปรุงสุก (Wada *et al.* 2002)

4.1.3.2 เอนไซม์โบรมิเลน

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยวิธีนินไฮดรินพบว่า เอนไซม์โบรมิเลนมีปริมาณเปปไทด์ในระหว่างการย่อยสูงสุดใน 3 วันแรกของการบ่ม โดยมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดอยู่ที่ 10.93 µg/ml ($P<0.05$) หลังจากนั้นในวันที่ 6-21 วันของการบ่มมีปริมาณเปปไทด์คงที่ ($P>0.05$) เมื่อสิ้นสุดการบ่มมีเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดปริมาณ 10.77 µg/ml (ภาพที่ 4.7 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.7 ข) พบว่า เอนไซม์โบรมิเลนมีการย่อยสลายเปปไทด์มวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa ที่มากกว่าเอนไซม์ปาเปน และมีการย่อยสลายเปปไทด์มวลโมเลกุล 55 kDa และมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 22 kDa ซึ่งเอนไซม์โบรมิเลนมีประสิทธิภาพการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ใกล้เคียงกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์ โดยเอนไซม์โบรมิเลนจะย่อยสลายคอลลาเจนประมาณร้อยละ 40 ของซาร์โคเลมมา จากนั้นจึงย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (Wang *et al.* 1958; Kang and Rice. 1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.3 เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum*

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยวิธีนินไฮดรินพบว่า เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* มีประสิทธิภาพการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และมีประสิทธิภาพมากในช่วงท้ายของการบ่ม ซึ่งสังเกตได้จากปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดที่เพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P>0.05$) โดยปริมาณเปปไทด์ในระหว่างการย่อย 3 วันแรกของการบ่มอยู่ที่ 13.17 μg/ml ($P<0.05$) และมีปริมาณเปปไทด์สูงที่สุดเมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 21 วัน โดยมีเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดปริมาณ 36.59 μg/ml ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.8 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.8 ข) พบว่า เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* มีการย่อยเปปไทด์โมเลกุลประมาณ 150 kDa และเกิดเป็นแถบมวลโมเลกุล 100 kDa อีกทั้งมีการย่อยมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 22 kDa ตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่ม โดยสอดคล้องกับการวิจัยของ Foegeding and Larick (1986) ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้คอลลาจีเนสบริสุทธิ์ที่ผลิตจาก *C. histolyticum* เป็นสารปรับปรุงความนุ่มเนื้อ ผลการศึกษาพบว่าคอลลาจีเนสมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายคอลลาเจนที่ไม่ละลายน้ำได้ดีกว่าโปรตีนที่ละลายในเกลือ (salt-soluble protein)

4.1.3.4 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13

เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยวิธีนินไฮดรินพบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นตลอดการบ่ม ($P<0.05$) โดยปริมาณเปปไทด์ในระหว่างการย่อย 3 วันแรกของการบ่มอยู่ที่ 29.43 μg/ml ($P<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดสูงที่สุดปริมาณ 33.03 μg/ml ($P<0.05$) ซึ่งคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6, เอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช (ภาพที่ 4.9 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE (ภาพที่ 4.9 ข) พบว่า เปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa จะเริ่มย่อยสลายหลังการบ่มที่ 9 วันและมวลโมเลกุล 55 kDa ถูกย่อยสลายตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่มและเกิดแถบมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 22 kDa สอดคล้องกับการทดลองของ Takagi *et al.* (1992) ทำการศึกษาการใช้เอนไซม์อีลาสเทสจากแบคทีเรียสายพันธุ์บาซิลลัสเพื่อย่อยสลายโปรตีนเนื้อสัตว์พบว่า เอนไซม์อีลาสเทสมีความสามารถในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีอีลาสตินและคอลลาเจนเป็นส่วนประกอบมากกว่าโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ

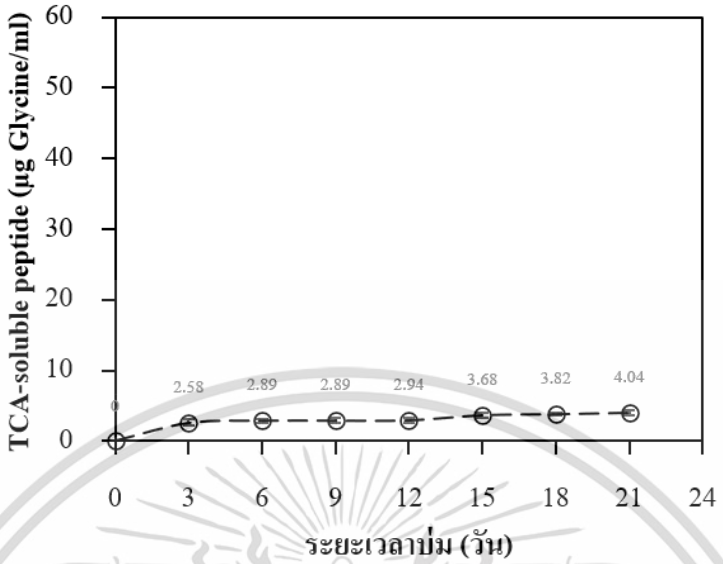
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3.5 คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6

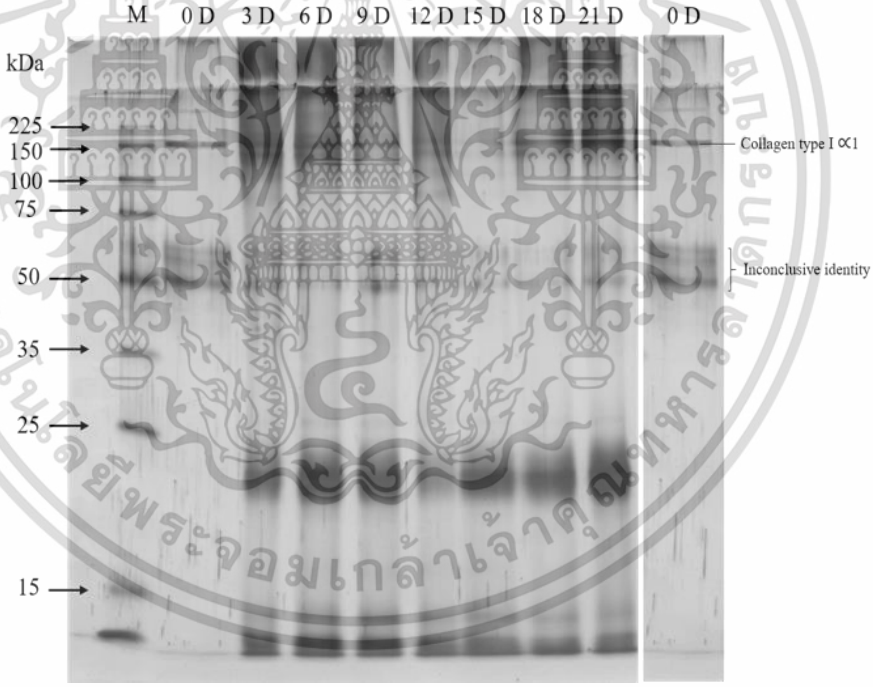
เมื่อพิจารณาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยวิธีนินไฮดรินพบว่า คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่คงที่ ($P<0.05$) โดยปริมาณเปปไทด์ในระหว่างการย่อย 3 วันแรกของการบ่มอยู่ที่ 15.42 µg/ml ($P<0.05$) เมื่อผ่านการบ่มที่ 15 วัน มีปริมาณเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นอยู่ที่ 15.67 µg/ml ($P<0.05$) และเมื่อสิ้นสุดการบ่มมีเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดสูงที่สุดปริมาณ 15.99 µg/ml ($P<0.05$) โดยตลอดช่วงระยะเวลาบ่มมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดออกมาปริมาณ 15.42-15.99 µg/ml ($P<0.05$) (ภาพที่ 4.10 ก) เมื่อพิจารณาควบคู่กับรูปแบบโปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่า เปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 150 kDa จะเริ่มย่อยสลายหลังการบ่มที่ 12 วัน และมวลโมเลกุล 55 kDa ถูกย่อยสลายตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่มและเกิดแถบมวลโมเลกุลต่ำประมาณ 22 kDa เช่นเดียวกับรูปแบบโปรตีนที่ถูกย่อยสลายโดยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



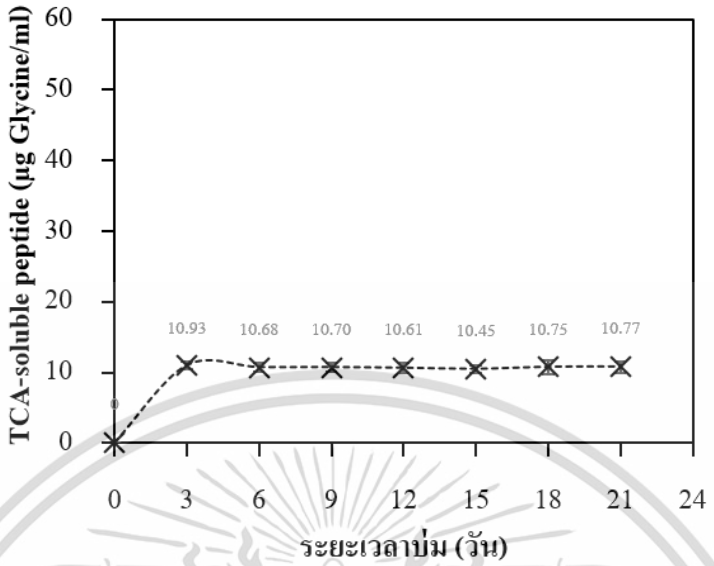
(ข)



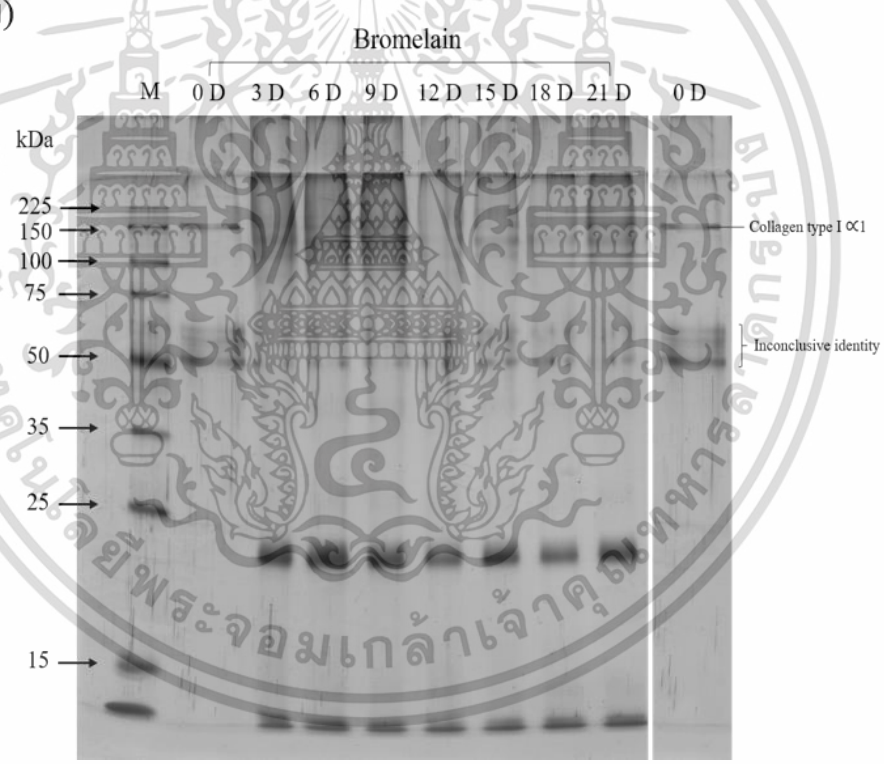
ภาพที่ 4.6 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์ปาเปนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



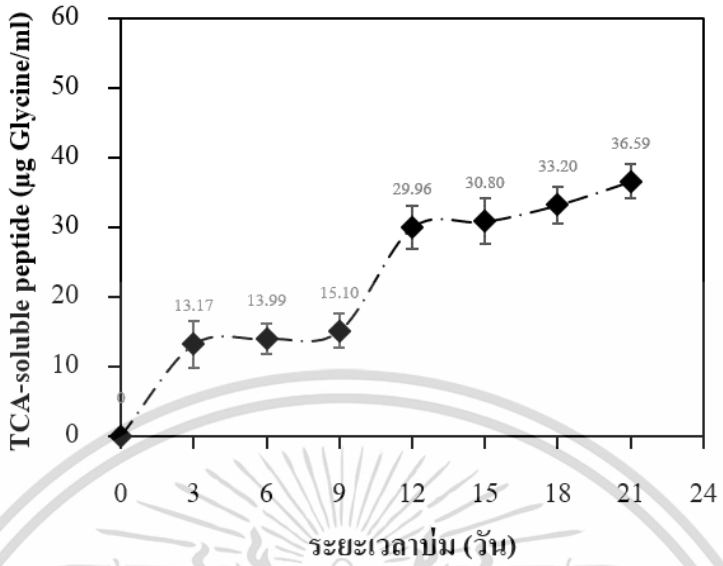
(ข)



ภาพที่ 4.7 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

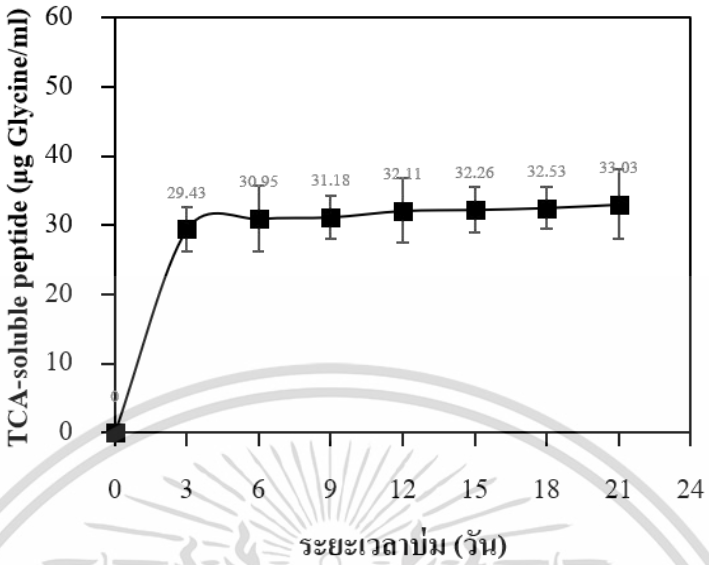


(ข)

ภาพที่ 4.8 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)

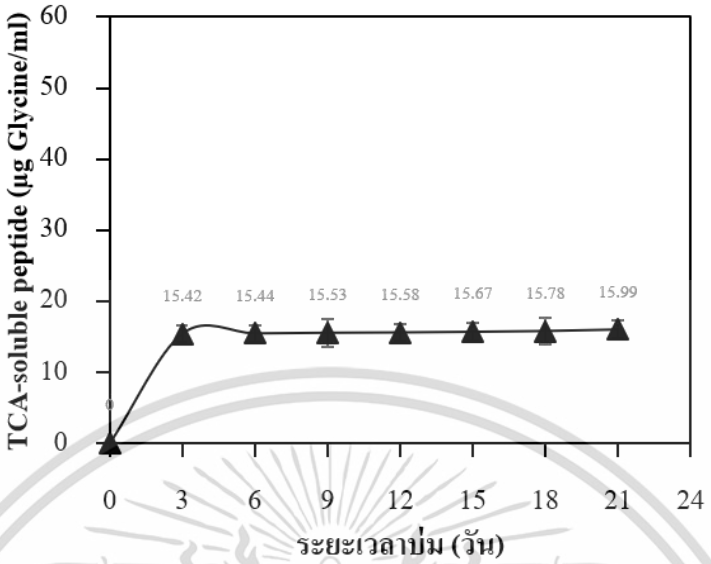


(ข)

ภาพที่ 4.9 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ก)



(ข)

ภาพที่ 4.10 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดระหว่างการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 (ก) การวิเคราะห์ SDS-PAGE ของรูปแบบการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดจากเนื้อแพะด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน (ข), M คือ โปรตีนมาตรฐาน (Maker), D คือ ระยะเวลาบ่ม (Day)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองข้างต้นทำให้สรุปประสิทธิภาพการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของเนื้อแพะในหลอดทดลอง (ตารางภาคผนวกที่ 1) พบว่าเอนไซม์ปาเปนมีศักยภาพในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อมากที่สุด รองลงมาคือเอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* ตามลำดับ อย่างไรก็ตามคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย ในด้านประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ตารางภาคผนวกที่ 2) พบว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีศักยภาพในการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สูงกว่าเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช โดยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 พบกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงที่สุด รองลงมาคือคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* เอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์ปาเปน ตามลำดับ โดยคุณสมบัติที่ดีของเอนไซม์ที่ทำให้เนื้อนุ่มควรจะมีความจำเพาะต่อการย่อยคอลลาเจนและอีลาสตินที่สูงและมีความจำเพาะต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อต่ำ การที่โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อถูกย่อยถือเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดความนุ่มของเนื้อที่แสดงให้เห็นถึงการถูกรบกวนโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งมีความสัมพันธ์กับค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ลดลงและเป็นการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ อีกทั้งในเนื้อสัตว์ยังมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบด้วยคอลลาเจนย่อยหลายชนิดและอีลาสติน (Kemp *et al.* 2010 ; Bailey and Light. 1989 ; Lawrie. 1998) โดยลักษณะโครงสร้างหลักสองประการของกล้ามเนื้อที่มีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้อคือความสมบูรณ์ของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งสัดส่วนสัมพัทธ์ของส่วนประกอบเหล่านี้ถือว่ามีผลต่อโครงสร้างและเนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์ในด้านความนุ่ม (Wheeler *et al.* 2000) นอกจากนี้ในกระบวนการบ่มเอนไซม์คาลเปนเป็นเอนไซม์หลักในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณ Z-line ส่งผลให้เนื้อนุ่ม (Taylor *et al.* 1995) อย่างไรก็ตามคอลลาเจนที่เป็นส่วนประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะไม่สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์คาลเปน (Purslow. 2005) ซึ่งการใช้เอนไซม์จากภายนอกเพื่อใช้ในการย่อยสลายคอลลาเจนได้รับความสนใจอย่างมาก โดยเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรคมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เพื่อทำให้เนื้อนุ่ม เนื่องจากมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ดีกว่า ดังนั้นคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamemsis* S6 ซึ่งมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สูงจึงมีความเหมาะสมต่อการนำไปประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะร่วมกับการบ่มเพื่อปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดลองที่ 2 การประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อคุณภาพเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

จากผลของประสิทธิภาพคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ได้จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamemsis* S6 ต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สกัดได้จากเนื้อแพะในหลอดทดลอง จึงได้นำคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อแพะ โดยทดสอบทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้คอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon เป็นซับสเตรท (ตารางที่ 4.2) ทำการปรับฐานความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกกลุ่มการทดลองให้เท่ากัน โดยปรับให้ความเข้มข้นทุกกลุ่มทดลองอยู่ที่ 5 U/ml of Collagenolytic activity ก่อนการประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะร่วมกับวิธีการบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อและนำมาวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆ ได้ผลการทดลองดังนี้

ตารางที่ 4.2 กิจกรรมการย่อยคอลลาเจนจาก bovine Achilles tendon ของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ก่อนนำมาประยุกต์ใช้ในเนื้อแพะร่วมกับการบ่ม

treatment	Collagenolytic activity using collagen from bovine Achilles tendon	
	Enzyme powder/assay (mg/ml)	Unit activity (U/ml)
Commercial enzyme		
- Bromelain	1	5.05
Collagenolytic enzyme		
- *B. subtilis* B13	1	16.10
- *B. siamensis* S6	1	5.32

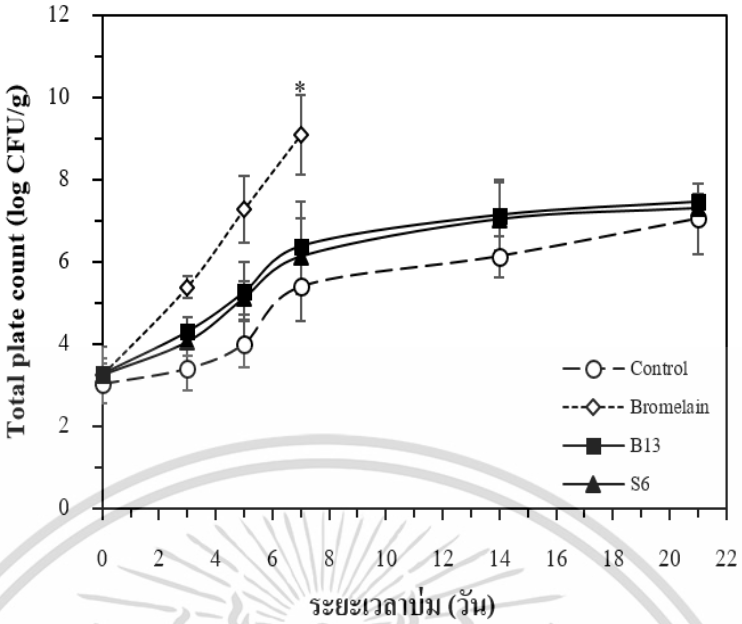
4.2.1 คุณภาพด้านจุลินทรีย์ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

จำนวนจุลินทรีย์มีผลต่อการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ โดยทั่วไปจำนวนจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดสี กลิ่น และรสที่ผิดปกติ รวมไปถึงทำให้เกิดสารพิษที่เป็นอันตรายจึงไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค โดยคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเนื้อสัตว์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์เริ่มต้นในเนื้อสัตว์ อุณหภูมิและการเก็บรักษา จากการศึกษาด้านจุลินทรีย์ของเนื้อแพะโดยการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อแพะที่มีการใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ร่วมกับวิธีการบ่มแบบเปียก (wet aging) แสดงในภาพที่ 4.11 โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ในช่วงวันแรกของการบ่มทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(P>0.05) ในวันที่ 3-7 วันของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่ากลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (P<0.05) และในช่วงวันที่ 14-21 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีจำนวนจุลินทรีย์ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ในกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ จากผลการทดลองที่ได้กล่าวมาสรุปได้ว่า กลุ่มทดลองที่มีการฉีดเอนไซม์จากภายนอก ได้แก่ เอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 จะมีการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่ากลุ่มควบคุม เนื่องจากเอนไซม์มีความสามารถในการรวมตัวกับสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ และทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมีส่งผลต่อการเสื่อมสภาพทางเนื้อสัตว์ (Tauro *et al.* 1986) โดยเอนไซม์จะเข้าไปย่อยสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่ให้เป็นกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งต่อมาจะเป็นแหล่งโภชนะของจุลินทรีย์ต่อไป ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญและเพิ่มกิจกรรมมากขึ้นเรื่อยๆ (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529 ; Rao *et al.* 1998) เนื่องจากเอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในหลอดทดลองสูง (การทดลองที่1) ส่งผลให้มีการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากกว่ากลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีผลต่อความอุ้มน้ำภายในเนื้อทำให้ชิ้นเนื้อมีน้ำภายในโครงสร้างที่สูง รวมทั้งสภาวะการบ่มในถุงสุญญากาศนั้นเมื่อมีการสูญเสียน้ำในระหว่างการบ่มน้ำที่สูญเสียออกมาจากภายในชิ้นเนื้อจะอยู่ในถุงสุญญากาศและไม่สามารถระเหยออกมาสู่ภายนอกได้ ส่งผลให้มีค่า a_w สูงเหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาจำนวนจุลินทรีย์ตามมาตรฐานเนื้อแพะ มกอช. 6005-2549 กำหนดให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต้องไม่เกิน 5.70 log CFU/g (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2549) พบว่า กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเป็นไปตามมาตรฐานเนื้อแพะในวันที่ 3 ของการบ่ม เท่ากับ 5.40 log CFU/g กลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 เป็นไปตามมาตรฐานในวันที่ 5 ของการบ่ม เท่ากับ 5.28 และ 5.13 log CFU/g ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมเป็นไปตามมาตรฐานในวันที่ 7 ของการบ่ม เท่ากับ 5.14 log CFU/g ตามปกติเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์แช่เย็นเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic bacteria) เช่น *Pseudomonas* เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่เก็บไว้ได้นานเสื่อมคุณภาพ โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาบ่มเนื้อนานขึ้น (P<0.05) สอดคล้องกับการทดลองของSabow *et al.* (2016) พบว่าการเก็บรักษาเนื้อแพะแบบแช่เย็น (4 องศาเซลเซียส) มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

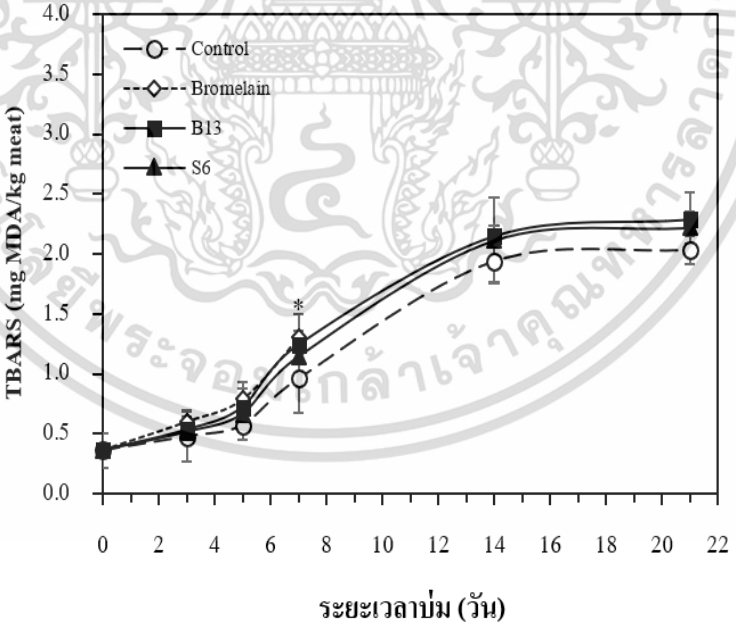
4.2.2 คุณภาพทางเคมีกายภาพของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

4.2.2.1 ค่าการออกซิเดชันของไขมัน

การเกิดออกซิเดชันของไขมันเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเสื่อมคุณภาพทางด้านสี กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการในเนื้อสัตว์ (kim *et al.* 2018) การปรากฏตัวของไขมันไม่อิ่มตัว ตัวเร่งปฏิกิริยาโลหะ เม็ดสีฮีม และสารออกซิไดซ์มากมายในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อทำให้ไวต่อการเน่าเสียจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Renerre *et al.* 1999 ; Popova *et al.* 2009 ; Liu *et al.* 2015) จากภาพที่ 4.12 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเดชันของไขมันในเนื้อแพะระหว่างการบ่ม โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองพบว่าในวันที่บ่มเดียวกันทุกกลุ่มทดลองมีค่าออกซิเดชันของไขมันไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงค่าออกซิเดชันของไขมันพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าออกซิเดชันของไขมันเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม ($P>0.05$) ในวันที่ 0-5 ของการบ่มค่าออกซิเดชันของไขมันมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามค่าการออกซิเดชันของไขมันในวันที่ 7-21 ของการบ่มมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับวันแรกของการบ่ม ($P<0.05$) โดยค่าออกซิเดชันของไขมันเริ่มต้นเท่ากับ 0.36 มิลลิกรัม MDA ต่อกิโลกรัมเนื้อสัตว์ และเมื่อสิ้นสุดการบ่มที่ 21 วัน กลุ่มที่ฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 กลุ่มที่ฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุม มีค่าออกซิเดชันของไขมันเท่ากับ 2.29, 2.22 และ 2.04 มิลลิกรัม MDA ต่อกิโลกรัมเนื้อสัตว์ ตามลำดับ ในกลุ่มที่มีการฉีดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ ซึ่งค่าเกณฑ์ของ TBARS ที่มากกว่า 5 มิลลิกรัม MDA ต่อกิโลกรัมเนื้อสัตวจะบ่งบอกถึงกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์และรสชาติที่ไม่ดีในเนื้อสัตว์ (Insausti *et al.* 2001) นอกจากนี้การออกซิเดชันของไขมันเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมสภาพทางเคมีในเนื้อสัตว์ โดยอาจเกิดขึ้นในกล้ามเนื้อของสัตว์ในขณะมีชีวิตและทวีความรุนแรงขึ้นภายหลังการฆ่า เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมและการสูญเสียความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระภายใน โดยอัตราการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการบ่มอาจเกิดจากการย่อยสลายไขมันจากคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระและนำไปสู่การก่อตัวของสารประกอบที่เป็นพิษ เช่น มาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) และผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันของคอเลสเตอรอล (cholesterol oxidation products) โดยกระบวนการเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสภาพของรสชาติ การเกิดกลิ่นหืน การเปลี่ยนสีและการผลิตสารประกอบที่อาจเป็นพิษซึ่งอาจส่งผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Morrissey *et al.* 1998 ; Falowo *et al.* 2014) จากการศึกษาค่าการออกซิเดชันของไขมันในเนื้อแพะระหว่างการบ่มให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Adeyemi *et al.* (2015) และ Sabow *et al.* (2016) พบว่าการเก็บรักษาแบบแช่เย็นมีผลอย่างมากต่อการเกิดออกซิเดชันของไขมันส่งผลให้มีค่า TBARS เพิ่มสูงขึ้น ($P<0.05$)



ภาพที่ 4.12 ค่าการออกซิเดชันของไขมัน (TBARS) ในเนื้อแพะระหว่างการบ่ม, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

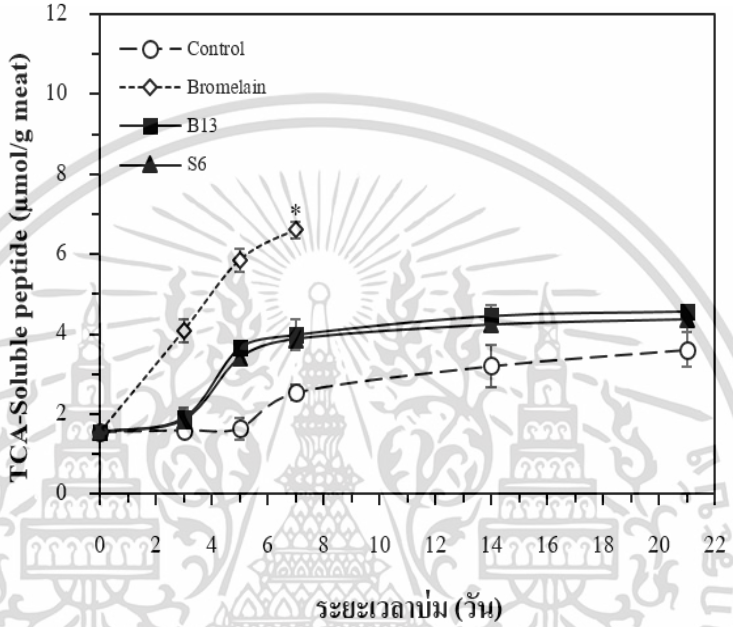
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.2 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ

ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อเป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในกรด (TCA-Soluble peptide) ซึ่งบ่งบอกถึงระดับการที่โปรตีนกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายเนื่องมาจากเอนไซม์ จากภาพที่ 4.13 แสดงปริมาณเปปไทด์จากการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม โดยกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่มมีผลต่อปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ช่วงระยะการบ่มที่ 3 วัน กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีปริมาณเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายมากกว่ากลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ช่วงระยะเวลาบ่ม 5-7 วัน กลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนมีปริมาณเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายมากที่สุด ($P<0.05$) รองลงมาคือ กลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และ คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 ซึ่งทั้งสองกลุ่มมีปริมาณเปปไทด์มากกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และในช่วงท้ายของการบ่มที่ 14-21 วัน กลุ่มที่ฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีปริมาณเปปไทด์มากกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ในกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ โดยเอนไซม์จากโบรมิเลนมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อในหลอดทดลองที่มากที่สุด อย่างไรก็ตามกิจกรรมการย่อยสลายคอลลาเจนของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 อยู่ในระดับสูงกว่า (การทดลองที่ 1) ส่งผลให้การย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในเนื้อแพะในกลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์จากภายนอกมีปริมาณเปปไทด์มากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในเนื้อแพะส่งผลต่อการย่อยสลายเปปไทด์ เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างโปรติเอสได้ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าดัชนีการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาบ่ม ($P<0.05$) ต่างจากกลุ่มควบคุมในวันที่บ่ม 7-21 วัน มีปริมาณเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายเพิ่มขึ้นจากวันที่ 0-5 ของระยะเวลาบ่ม ($P<0.05$) ซึ่งระดับของไทโรซีนบ่งบอกปริมาณเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ละลายได้ในกรดแสดงให้เห็นการเสื่อมสลายของโปรตีน (protein degradation) จากการถูกย่อยด้วยโปรติไลติกซ์เอนไซม์ภายในเนื้อสัตว์ร่วมกับคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากภายนอก โดย Pearson (1968) กล่าวว่า ค่าไทโรซีนที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (Deamination) จนถึงระดับที่เกิดการก่อตัวเป็นกรดอะมิโนอิสระ และจากการศึกษาค่าการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค TCA-soluble peptides ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่มให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Kannan *et al.* (2002) พบว่าระยะเวลาการบ่มมีผลต่อการแตกหักของเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar fragmentation) ของสันนอกแพะ ($P<0.05$) โดยการแตกหักของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม แม้ว่าการเพิ่มขึ้นหลัง 7 วันจะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการทดลองของ Nagaraj *et al.* (2005) ศึกษาผลของการบ่ม เนื้อแพะชิ้นส่วน *longissimus dorsi* (LD) *semitendinosus* (ST) *bicep formaris* (BF) และ *semimembranosus* (SM) ต่อค่าการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อพบว่า มีค่าการแตกหักของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดการบ่ม



ภาพที่ 4.13 ค่าการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-soluble peptide ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

4.2.2.3 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

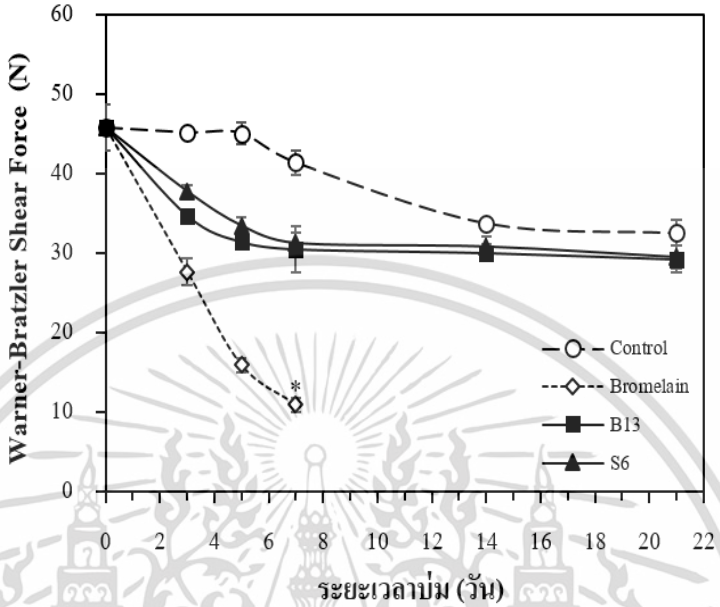
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อเป็นค่าที่มีความสำคัญในการพิจารณาความนุ่มของเนื้อ ซึ่งเป็นหนึ่งในคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่มีผลต่อคุณภาพด้านการบริโภคและเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค จากการศึกษาค่าแรงตัดผ่านเนื้อแสดงในภาพที่ 4.14 โดยกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่มมีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ในช่วงระยะเวลาบ่มที่ 3-5 วันกลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ($P<0.05$) ระยะเวลาบ่มที่ 7 วันกลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 โดยทั้งสองกลุ่มนี้มีค่าแรง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัดผ่านเนื้อที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด ($P<0.05$) ช่วงท้ายของการบ่มที่ 14-21 วัน พบว่ากลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ จากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีผลไปในแนวทางเดียวกันกับปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดด้วยวิธี TCA-Soluble peptide (การทดลองที่ 1) กล่าวคือ เมื่อเนื้อแพะถูกย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่สูงจะมีการปลดปล่อยปริมาณเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายในปริมาณมากส่งผลให้เนื้อแพะมีความนุ่มมากตามไปด้วย โดยเอนไซม์โบรมิเลนมีผลต่อการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่สูง ในขณะที่คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่ด้อยกว่าแต่มีความสามารถในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ดี ส่งผลให้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงและตัวอย่างชิ้นเนื้อแพะไม่นุ่มมากเกินไปจนเละเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อ โดย Naveena *et al.* (2004) รายงานว่าเนื้อกระบือที่ได้รับการฉีดโปรติโอไลติกซ์เอนไซม์จะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยโปรติโอไลติกซ์เอนไซม์มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อเนื่องจากการสลายตัวของคอลลาเจนและโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าแรงตัดผ่านเนื้อในแต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อระยะบ่มเพิ่มขึ้นพบว่า ทุกกลุ่มทดลองมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงจากวันแรกของการบ่ม ($P<0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่มตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่มและมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงตลอดระยะการบ่ม และกลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่มขึ้นตั้งแต่การบ่มที่ 3 วันแรกเช่นกัน โดยค่าแรงตัดผ่านเนื้อแพะก่อนการบ่มมีค่าสูงที่สุด เท่ากับ 45.74 นิวตัน เมื่อผ่านการบ่ม 3 วัน กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง ($P<0.05$) เท่ากับ 27.65, 34.70 และ 37.72 นิวตัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อผ่านการบ่ม 7 วัน เนื้อแพะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงจาก 0-5 วันแรก ($P<0.05$) สอดคล้องกับการทดลองของ Duckett *et al.* (1998) รายงานว่า ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงตามระยะเวลาการบ่มที่นานขึ้น ส่งผลให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลง 46 เปอร์เซ็นต์จากวันที่ 1 ถึงวันที่ 12 ในเนื้อสันนอกแกะติดซี่โครงที่ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 1, 3, 6, 12 และ 24 วันภายหลังสัตว์ตายและงานวิจัยของ Abdullah and Qudsieh. (2009) พบว่า เนื้อแกะมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 28.3 นิวตันในวันแรก เมื่อผ่านการบ่ม 7 วัน มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงเท่ากับ 20.7 นิวตัน ซึ่งแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าลดลง 26 เปอร์เซ็นต์ โดยอิทธิพลของระยะเวลาบ่มมีผลต่อค่าแรงตัดผ่านเนื้อเนื่องจากระยะเวลาในการบ่มเนื้อที่ยาวนานจะเกิดการทำงานของเอนไซม์ภายในเนื้อที่ย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อร่วมกับเอนไซม์จากภายนอกที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทำให้เนื้อมีความนุ่มเพิ่มมากขึ้น โดยระยะเวลาในการบ่มชาก 7 วันแรกจะทำให้เนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นุ่มเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมาก แต่ถ้าใช้ระยะเวลาในการบ่มซากนาน 14 ถึง 21 วัน ความนุ่มของเนื้อจะเพิ่มขึ้นจากระยะเวลาบ่ม 7 วันแรกเพียงเล็กน้อย (Acker and Cunningham. 1991)



ภาพที่ 4.14 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

4.2.2.4 เค้าโครงเนื้อสัมผัส

ลักษณะโดยรวมของเนื้อแพะหลังจากการทดสอบด้วยเครื่องวิเคราะห์เค้าโครงเนื้อสัมผัสแสดงในภาพที่ 4.15 โดยกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่มมีผลต่อค่าความแข็ง (hardness) (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าค่าความแข็ง (hardness) ของตัวอย่างเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.15 ก) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยในวันที่ 3 ของการบ่ม เนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความแข็ง (hardness) น้อยที่สุด ($P<0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความแข็ง (hardness) ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ในวันที่ 5 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความแข็ง (hardness) ไม่ต่างจากกลุ่มโบรมิเลนและคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 แต่มีค่าความแข็ง (hardness) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความแข็ง (hardness) มากกว่าโบรมิเลน ($P<0.05$) แต่มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และในวันที่ 7 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความแข็ง (hardness) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ในวันที่ 14-21 ของการบ่มกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13,คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความแข็ง (hardness) ที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มต่อค่าความแข็ง (hardness) ในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความแข็ง (hardness) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความแข็ง (hardness) ลดลงตั้งแต่ 3 วันแรกของการบ่ม ($P<0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความแข็ง (hardness) ในวันที่ 5 ลดลงจากวันที่ 0-3 ของการบ่ม ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีค่าลดลงจากวันแรกเมื่อผ่านการบ่ม 7 วัน ($P<0.05$)

ค่าความเหนียว (gumminess) ของเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.15 ข) โดยกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่มมีผลต่อค่าความเหนียว (gumminess) (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ในวันที่ 3 ของการบ่มเนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความเหนียว (gumminess) น้อยที่สุด ($P<0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความเหนียว (gumminess) ที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ในวันที่ 5-7 ของการบ่ม เนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความเหนียว (gumminess) น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ในช่วงวันที่ 14-21 ของการบ่มกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไล-ติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความเหนียว (gumminess) ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาระยะเวลาบ่มต่อค่าความเหนียว (gumminess) ในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความเหนียว (gumminess) ที่ลดลง ($P<0.05$) ซึ่งไปในแนวทางเดียวกับค่าความแข็ง (hardness) โดยเนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความเหนียว (gumminess) ลดลงในวันที่ 3-7 ของการบ่ม ($P<0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความเหนียว (gumminess) ที่ลดลงในวันที่ 5-7 ของการบ่ม ($P<0.05$) จากนั้นมีค่าคงที่จนถึงวันที่ 21 ของการบ่ม ($P>0.05$) และกลุ่มควบคุมมีค่าความเหนียว (gumminess) ที่ลดลงตั้งแต่วันที่ 7 ของการบ่ม ($P<0.05$)

ค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ของเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.15 ค) โดยกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่มมีผลต่อค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ในวันที่ 3 ของการบ่มกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) น้อยที่สุด ($P<0.05$) กลุ่มที่ฉีดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ในวันที่ 5-7 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) น้อยที่สุด (P<0.05) รองลงมาคือ กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 โดยทั้งสองกลุ่มนี้มีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) ในช่วงวันที่ 14-21 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (P<0.05) โดยกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ เมื่อพิจารณาระยะเวลาบ่มต่อค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) แต่ละกลุ่มทดลอง พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ลดลง (P<0.05) โดยกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ที่ลดลงตลอดระยะเวลาบ่ม (P<0.05) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ที่ลดลงในวันที่ 5 ของการบ่ม (P<0.05)

ค่าความยืดหยุ่น (springiness) ของเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.15 ง) โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ในวันที่ 0-3 และ 14-21 ของการบ่มทุกกลุ่มทดลองมีค่าความยืดหยุ่น (springiness) ที่ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่ในวันที่ 5 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความยืดหยุ่น (springiness) สูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มควบคุมและเอนไซม์โบรมิเลน ตามลำดับ (P<0.05) และในวันที่ 7 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์ B13, S6 และกลุ่มควบคุมมีค่าความยืดหยุ่นไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่ทั้งสามกลุ่มมีค่าความยืดหยุ่น (springiness) ที่สูงกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (P<0.05) เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มต่อค่าความยืดหยุ่น (springiness) ในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความยืดหยุ่น (springiness) เพิ่มขึ้นในวันที่ 7 ของการบ่ม (P<0.05) และกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความยืดหยุ่น (springiness) ที่ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) โดยตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์

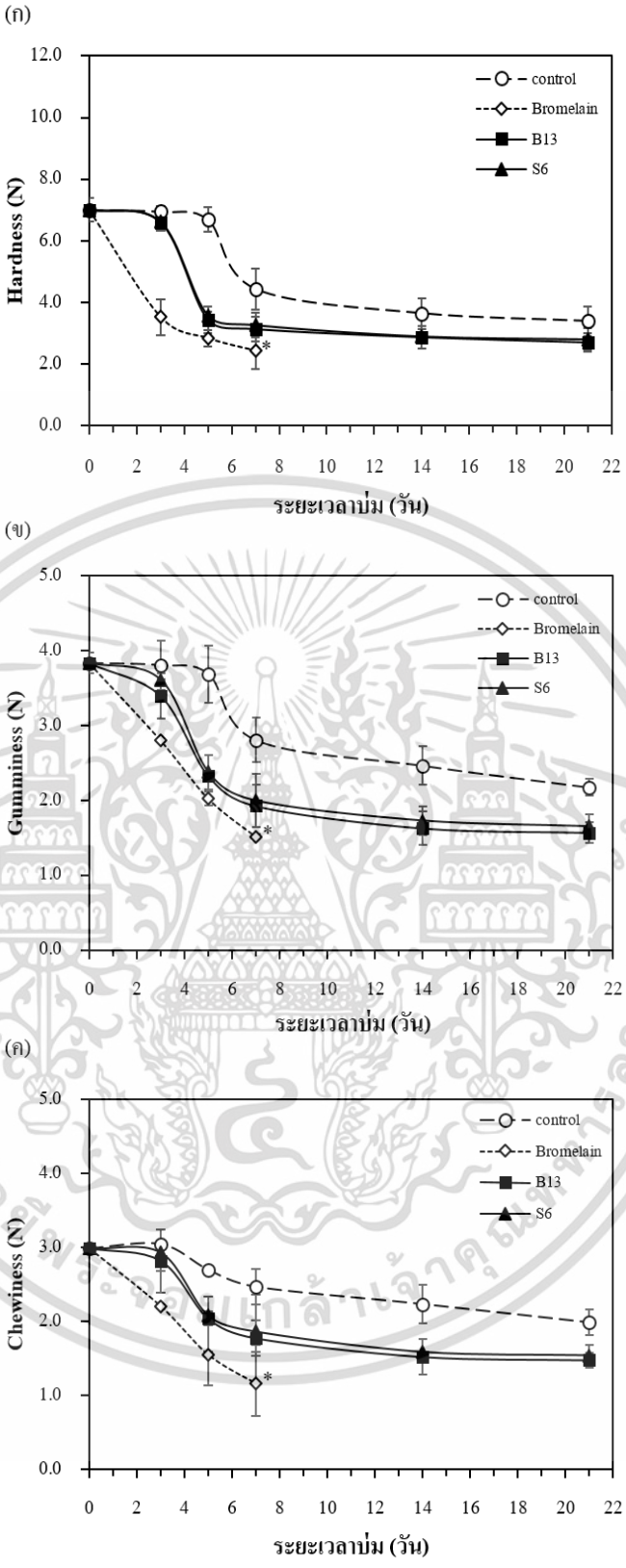
ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) ของเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.15 จ) โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) ของเนื้อแพะไม่แตกต่างกัน (P>0.05) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิทธิพลของระยะเวลาบ่มไม่มีผลต่อค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวกัน (cohesiveness) ในทุกกลุ่มทดลอง (P>0.05)

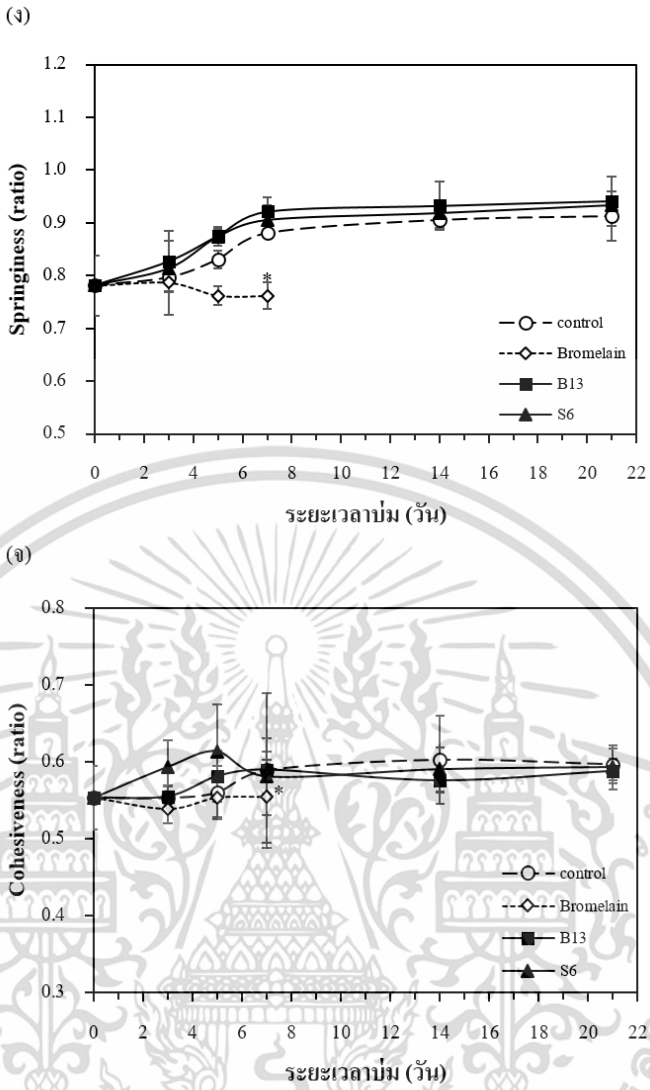
เมื่อพิจารณาเค้าโครงเนื้อสัมผัสในด้านของค่าค่าความแข็ง (hardness), ค่าความเหนียว (gumminess) และค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ร่วมกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อจะเห็นได้ว่า เนื้อแพะที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีความนุ่มมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13, คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Qihe *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาผลของเอนไซม์อีลาสเทสจากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสต่อการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อโค โดยเนื้อโคที่ผ่านการฉีดเอนไซม์มีค่าความแข็ง (hardness) ลดลงตลอดระยะการเก็บรักษา ซึ่งกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์อีลาสเทสมีค่าความแข็ง (hardness) ที่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์ปาเปน และทั้งสองกลุ่มมีค่าความแข็ง (hardness) ที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ค่าความแข็ง (hardness) ที่ลดลงตลอดระยะเวลาการบ่มสอดคล้องกับงานวิจัยของ Karlović *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและระยะเวลาการบ่มต่อลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อสดพบว่า ค่าความแข็ง (hardness) ลดลงตลอดช่วงระยะเวลาบ่ม ในขณะที่ความนุ่มมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทันทีในช่วง 24 ชั่วโมงแรก นอกจากนี้ค่าความยากในการเคี้ยว (chewiness) ที่น้อยมีความสัมพันธ์โดยตรงกับความนุ่มเนื้อและมีผลต่อการรับรู้ของผู้บริโภค โดยปกติการตรวจสอบความนุ่มของเนื้อสัตว์ (hardness) จะใช้การทดสอบด้วยค่าแรงตัดผ่านเนื้อและการวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสโดยรวม ซึ่งงานวิจัยส่วนใหญ่นิยมทดสอบค่าความนุ่มด้วยค่าแรงตัดผ่านเนื้อมากกว่า แต่การวิจัยในภายหลังเริ่มมีการใช้วิธีวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสโดยรวม เนื่องจากเป็นวิธีที่ดีกว่าเพื่อทำนายลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อ (Huidobro *et al.* 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 เค้าโครงเนื้อสัมผัสของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ได้แก่ hardness (ก) gumminess (ข) chewiness (ค) springiness (ง) และ cohesiveness (จ), * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



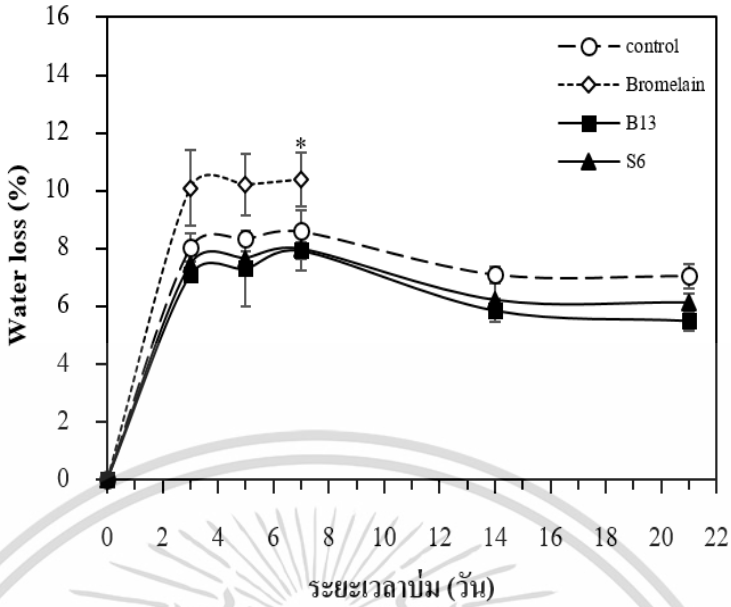
ภาพที่ 4.15 (ต่อ) เค้าโครงเนื้อสัมผัสของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ได้แก่ hardness (ก) gumminess (ข) chewiness (ค) springiness (ง) และ cohesiveness (จ), * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.5 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่ม

ความสามารถของเนื้อสัตว์ในการกักเก็บน้ำไว้โดยธรรมชาติ เรียกว่าความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-holding capacity ; WHC) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับค่าการสูญเสียน้ำในเนื้อสัตว์ โดยค่าการสูญเสียน้ำเป็นหนึ่งในคุณลักษณะทางกายภาพที่สำคัญของเนื้อสัตว์ เพราะจะส่งผลกระทบต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสและคุณภาพโดยเฉพาะในด้านความฉ่ำน้ำและความนุ่มของเนื้อสัตว์ จากการศึกษาค่าการสูญเสียน้ำในระหว่างการบ่ม แสดงในภาพที่ 4.16 โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อพิจารณาความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันพบว่า ระยะเวลาการบ่มที่ 3-7 วันกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ($P<0.05$) และในวันที่ 14-21 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีการสูญเสียน้ำน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มของแต่ละกลุ่มทดลองเมื่อระยะการบ่มเพิ่มขึ้นพบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 0-7 และมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มลดลงในวันที่ 14-21 ของการบ่ม ($P<0.05$) โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kristensen and Purslow (2001) พบว่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อจะลดลงในช่วง 2-7 วันแรกภายหลังสัตว์ตายและจะเพิ่มขึ้นในระหว่างการบ่ม เมื่อสิ้นสุดระยะการบ่มกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มน้อยที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ การสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มในช่วงแรกเป็นผลมาจากกิจกรรมการย่อยสลายโครงสร้างโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์และกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อแตกหักและสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ (Pearce *et al.* 2011) อย่างไรก็ตามกระบวนการบ่มมีผลต่อการปรับปรุงความอุ้มน้ำของเนื้อ เมื่อระยะการบ่มนานขึ้นกระบวนการย่อยสลายโปรตีนทำให้เกิดการแตกหักของโครงสร้างกล้ามเนื้อส่งผลให้ช่องทางการสูญเสียน้ำถูกรบกวนและเกิดสภาวะ sponge effect ที่กักเก็บน้ำและป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียน้ำ (Huff-Longergan and Lonergan. 2005 ; Farouk *et al.* 2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



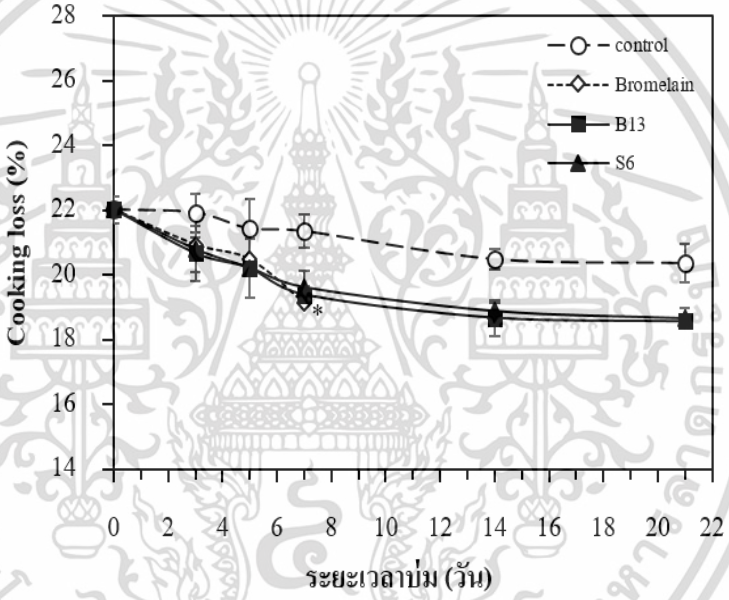
ภาพที่ 4.16 ค่าการสูญเสียน้ำของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วัน ตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

4.2.2.6 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก

จากการศึกษาค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกัน แสดงในภาพที่ 4.17 พบว่า ในช่วง 0-5 วันของการบ่มทุกกลุ่มการทดลองมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่ที่ระยะการบ่มที่ 7 วัน กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกไม่ต่างจากกลุ่มเอนไซม์โบรมิเลน ($P>0.05$) แต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ในวันที่ 14-21 กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่ม เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาบ่มต่อการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกที่ลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มที่นานขึ้น ($P<0.05$) โดยกลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 โดยมีร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกลดลงตั้งแต่วันที่ 3 ของการบ่ม ($P<0.05$) กลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกที่ลดลงในวันที่ 5 ของการบ่ม ($P<0.05$) และกลุ่มควบคุมมีร้อยละการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกที่ลดลงในวันที่ 14 ของการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

($P<0.05$) การสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกได้รับผลกระทบจากปัจจัยที่ซับซ้อนหลายด้าน เช่น วิธีการถ่ายเทความร้อน พื้นผิวและอุณหภูมิภายในของเนื้อสัตว์ (Panea *et al.* 2008) โดย Davis *et al.* (1975) รายงานว่า กระบวนการบ่มช่วยลดการสูญเสียน้ำระหว่างการปรงสุก เนื่องจากการสลายตัวของช่องทางที่น้ำสูญเสียไปอันเป็นผลมาจากการสลายโครงสร้างของกล้ามเนื้อและการเกิดสภาวะ sponge effect ที่ดักจับน้ำและป้องกันไม่ให้สูญเสียน้ำ (Farouk *et al.* 2012) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yanar and Yetim (2001) พบว่า กล้ามเนื้อ *Longissimus* และ *Semimembranosus* มีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกจาก 29.9 เปอร์เซ็นต์ในวันแรกของการบ่ม ลดลงเหลือ 26.8 เปอร์เซ็นต์หลักจากผ่านการบ่ม 7 วัน และงานวิจัยของ Kannan *et al.* (2006) พบว่า เนื้อแพะมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกในวันที่ 0 มากกว่าวันที่ 4, 8 และ 12 ของการเก็บรักษา



ภาพที่ 4.17 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกของเนื้อแพะ, * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2.7 ค่าสี

สีของเนื้อสัตว์เป็นหนึ่งในลักษณะทางประสาทสัมผัสที่สำคัญ ซึ่งส่งผลต่อการยอมรับของผู้บริโภคและมีบทบาทสำคัญในการตัดสินใจเลือกซื้อ (Carpenter *et al.* 2001) สีของเนื้อสัตว์ถูกกำหนดด้วยไมโอโกลบินเป็นหลัก โดยความเข้มข้นของไมโอโกลบินในกล้ามเนื้ออาจขึ้นอยู่กับกิจกรรมทางสรีรวิทยาและประเภทของเส้นใยกล้ามเนื้อในโครงสร้าง (Mancini and Hunt. 2005) โดยคุณภาพด้านสีของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม แสดงในภาพที่ 4.18 โดยไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มทดลองและระยะเวลาบ่ม (ตารางภาคผนวกที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบค่าความสว่าง (Lightness) ของแต่ละกลุ่มทดลองในวันที่บ่มเดียวกันของเนื้อแพะ (ภาพที่ 4.18 ก) พบว่า ในวันที่ 0-3 ของการบ่มทุกกลุ่มทดลองมีค่าความสว่างไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ในวันที่ 5-7 วัน ของการบ่มกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีค่าความสว่างไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความสว่างน้อยกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และกลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ($P<0.05$) ช่วงท้ายของการบ่มที่ 14-21 วัน กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการฉีดคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความสว่างที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยกลุ่มที่มีการฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนตัวอย่างเนื้อแพะหลังวันที่ 7 นุ่มมากเกินไปและมีชิ้นเนื้อเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อจึงตัดออกจากการวิเคราะห์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่ม เมื่อพิจารณาอิทธิพลของระยะเวลาบ่มในแต่ละกลุ่มทดลองพบว่า กลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าความสว่างลดลงเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้น ($P<0.05$) โดยมีค่าความสว่างต่ำสุดในช่วงวันที่ 14-21 ของการบ่ม ($P<0.05$) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนที่ระยะเวลาการบ่มไม่มีผลต่อค่าความสว่าง ($P>0.05$) การเปลี่ยนแปลงของค่าความสว่างสัมพันธ์กับค่าความอุ้มน้ำที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการบ่ม โดยพบว่าในกลุ่มที่มีการฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 จะมีค่าความสว่างน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆ เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเนื้อส่งผลให้กักเก็บน้ำไว้ในโครงสร้างได้มากขึ้น ซึ่งปริมาณการสูญเสียน้ำที่น้อยลงทำให้ปริมาณไมโอโกลบินยังมีอยู่ภายในโครงสร้างของเนื้อมาก นอกจากนี้การสูญเสียน้ำที่ผิวหน้าของเนื้อจะทำให้แสงสะท้อนลดต่ำลง จึงทำให้มองเห็นว่าเนื้อมีสีออกคล้ำๆ ซึ่งเป็นการเปลี่ยนสีรูปแบบหนึ่ง (ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529)

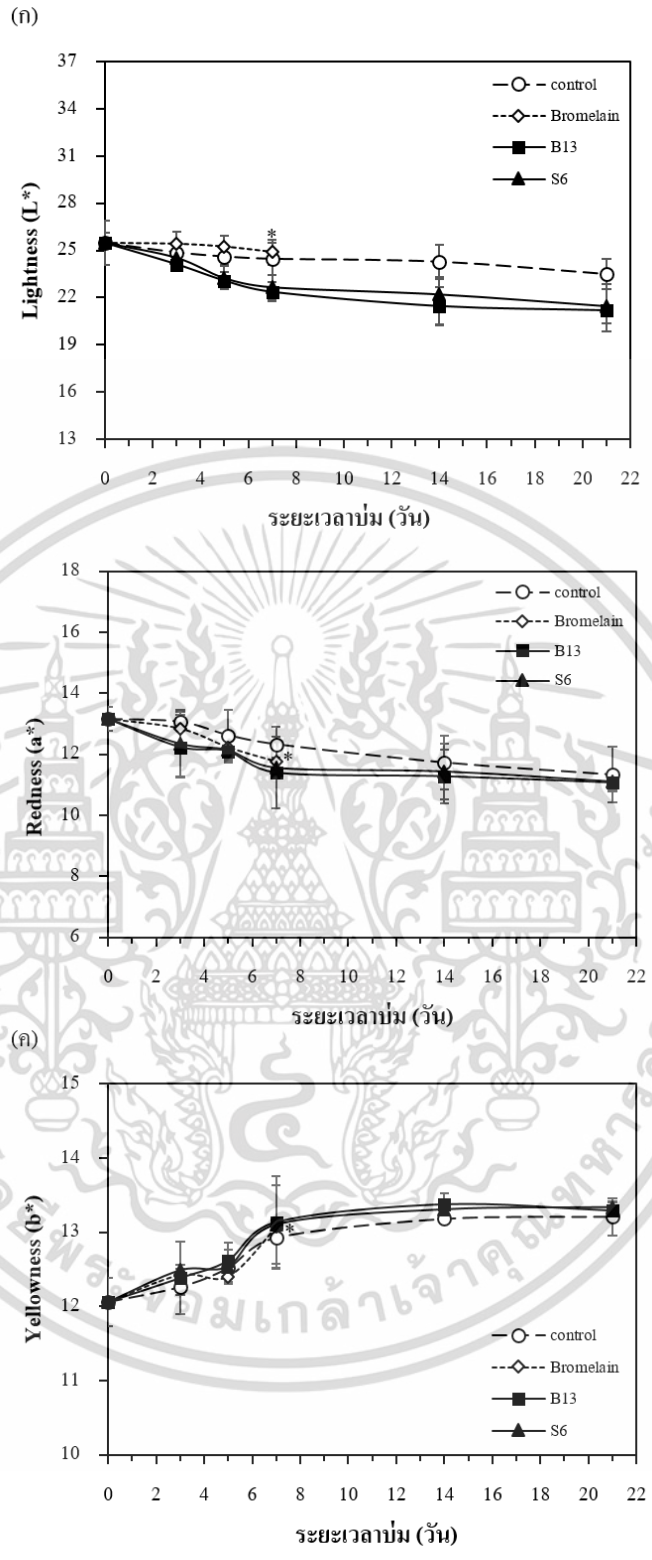
ค่าสีแดงเป็นพารามิเตอร์ที่สำคัญที่สุดสำหรับการประเมิน โดยอาจเกี่ยวข้องกับการออกซิเดชันของไมโอโกลบิน (myoglobin oxidation) ส่งผลให้ดีออกซีไมโอโกลบิน (deoxymyoglobin) หรือออกซีไมโอโกลบิน (oxymyoglobin) เปลี่ยนไปเป็นเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin) เนื่องจากการลดการทำงานของ metmyoglobin reducing activity (MRA) ซึ่งนำไปสู่การสะสมเมทไมโอโกลบินในเนื้อสัตว์ (Xue *et al.* 2012) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มทดลองในช่วงระยะเวลาบ่มเดียวกันพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีแดงไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่ระยะเวลาบ่มมีอิทธิพลต่อค่าสีแดง (ภาพที่ 4.18 ข) โดยพบว่าระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นส่งผลต่อการลดลงของค่าสีแดงในทุกกลุ่มทดลอง (P<0.05) โดยกลุ่มควบคุมมีค่าสีแดงที่ต่ำสุดในวันที่ 14 ของการบ่ม กลุ่มที่มีการฉีดเอนไซม์โบรมิเลนและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าสีแดงที่ลดลงจากวันแรกในวันที่ 7 ของการบ่ม (P<0.05) โดย Kannan *et al.* (2001) รายงานว่า ระยะเวลาบ่มมีผลต่อการลดลงของค่าสีแดงและค่าองศาของสีในชิ้นส่วนขา ไหล่ สันนอก/ซี่โครงของเนื้อแพะ การเปลี่ยนสีของเนื้อแพะเกิดขึ้นภายใน 4-8 วัน โดยในระหว่างการบ่มการเปลี่ยนแปลงของค่าสีแดงเกี่ยวข้องกับการเกิดออกซิเดชันของไขมัน โดย Seydim *et al.* (2006) รายงานว่าการลดลงของค่าสีแดงเกิดจากการออกซิเดชันของไมโอโกลบิน นอกจากนี้อาจเกิดมาจากเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของฮีม (heme structure) ส่งผลให้เนื้อแพะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเนื่องจากผลิตผลพลอยได้ (by-product) จากกิจกรรมของจุลินทรีย์ โดยเกี่ยวข้องกับอนุพันธ์ไมโอโกลบิน 2 ตัวที่ทำให้เนื้อสัตว์ปรากฏเป็นสีเขียวคือ Choleglobin เป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่างไมโอโกลบิน (เฟอร์รัสหรือเฟอร์ริก) กับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ Sulfmyoglobin เกิดจากการกระทำของไฮโดรเจนซัลไฟด์และออกซิเจนในไมโอโกลบินที่ลดลง (Lawrie. 1985)

ค่าสีเหลือง (ภาพที่ 4.18 ค) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มทดลองในช่วงระยะเวลาบ่มเดียวกันพบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าสีเหลืองที่ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่เมื่อระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าสีเหลืองในทุกกลุ่มการทดลอง (P<0.05) โดยกลุ่มควบคุม กลุ่มเอนไซม์โบรมิเลน และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ S6 มีค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้นจากวันแรกเมื่อผ่านการบ่ม 7 วัน (P<0.05) เช่นเดียวกับการทดลองของ Karami *et al.* (2010) พบว่าเมื่อระยะเวลาบ่มนานขึ้นค่าสีเหลืองของเนื้อจะสูงขึ้น โดยการเปลี่ยนสีของเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับอัตราการออกซิเดชันของไมโอโกลบินเป็นเมทไมโอโกลบิน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของเม็ดสี ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ ออกซิเจน แสง จำนวนจุลินทรีย์และการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Faustman and Cassens. 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.18 ค่าสีของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม ได้แก่ lightness (ก) redness (ข) yellowness (ค), * กลุ่ม Bromelain หลังการบ่มที่ 7 วันตัวอย่างเนื้อแพะเละจนเสียรูปร่างชิ้นเนื้อจึงไม่วิเคราะห์คุณภาพหลังจาก 7 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสพบว่า กลุ่มเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช (ปาเปนและโบรมิเลน) และเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่มากกว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรีย *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 โดยเอนไซม์จากแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ดังกล่าวมีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อบ้างเพียงเล็กน้อยโดยยังสามารถมองเห็นแถบความเข้มข้นของโปรตีนไมโอซินและโปรตีนแอคตินตลอดทุกช่วงการบ่ม ในทางกลับกันคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 จะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากกว่าเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช โดยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 มีกิจกรรมของการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากที่สุด จากผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันได้ว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากแต่มีผลต่อโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเพียงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum* และเอนไซม์เชิงการค้าจากพืช ดังนั้นคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 จึงเป็นตัวเลือกสำหรับเอนไซม์ที่ช่วยปรับปรุงความนุ่มของเนื้อที่เหนียวเนื่องจากมีโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงโดยจะส่งผลให้เนื้อสัมผัสของเนื้อสัตว์ไม่เละหรือนุ่มจนเกินไป

การศึกษาคุณภาพด้านจุลินทรีย์ของเนื้อแพะในระหว่างการบ่มตามมาตรฐานเนื้อแพะ มกอช. 6005-2549 พบว่า กลุ่มที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากกว่ากลุ่มควบคุมแต่น้อยกว่ากลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลน โดยกลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนบ่มได้นานสุดที่ 3 วันของการบ่ม กลุ่มที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 บ่มได้นานสุดที่ 5 วันของการบ่ม และกลุ่มควบคุมบ่มได้นานสุดที่ 7 วันของการบ่ม นอกจากนี้ระยะเวลาบ่มที่นานขึ้นส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในทุกกลุ่มทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาคุณภาพทางเคมีกายภาพของเนื้อแพะในระหว่างการบ่มพบว่า กลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีความสามารถในการปรับปรุงคุณภาพเนื้อแพะในด้านความนุ่มมากที่สุด โดยมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อและค่าความแข็งต่ำที่สุดสอดคล้องกับมีผลการย่อยสลายของปริมาณเปปไทด์ในเนื้อสูงที่สุด ส่งผลให้ใช้ระยะเวลาบ่มเนื้อแพะที่สั้นเมื่อเปรียบเทียบกับกับกลุ่มทดลองอื่นๆ อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนมีข้อจำกัดในด้านลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อ โดยหลังการบ่มที่ 7 วันเนื้อแพะมีลักษณะนุ่มเละจนเสียรูปการเป็นชิ้นเนื้อ ในทางตรงกันข้ามกลุ่มที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีความสามารถในการปรับปรุงคุณภาพในด้านความนุ่มของเนื้อแพะเช่นกันและไม่พบปัญหาด้านลักษณะเนื้อสัมผัสที่นุ่มเละจนเกินไป ซึ่งมีค่าความนุ่มของเนื้อแพะรองจากกลุ่มที่ฉีดด้วยเอนไซม์โบรมิเลนแต่มากกว่ากลุ่มควบคุมสอดคล้องกับปริมาณเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาบ่ม โดยเนื้อแพะที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 ในวันที่ 5 ของการบ่มมีค่าความนุ่มของเนื้อที่เทียบเท่ากับเนื้อแพะกลุ่มควบคุมที่บ่มที่ 21 วัน รวมทั้งมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่มและค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกน้อยกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงท้ายของการบ่ม นอกจากนี้ค่าการออกซิเดชันของไขมันในทุกกลุ่มทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากผ่านการบ่มที่ 7 วัน และค่าสีในกลุ่มที่ฉีดด้วยคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และ *B. siamensis* S6 มีค่าความสว่างและค่าสีแดงที่ลดลง และมีค่าสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการบ่ม

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการคงประสิทธิภาพของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส เมื่อนำมาใช้ร่วมกับวิธีการบ่มจะส่งผลให้เอนไซม์ยังคงประสิทธิภาพไว้ได้ตลอดระยะเวลาบ่ม

5.2.2 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จากแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัสร่วมกับวิธีการอื่นๆ เพื่อพัฒนาคุณภาพด้านความนุ่มของเนื้อแพะ

5.2.3 การจัดการผลิตภัณฑ์เนื้อแพะหลังการบ่มควรมีการจัดจำหน่ายในรูปแบบผลิตภัณฑ์แช่แข็ง (frozen meat products) เพื่อควบคุมคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ให้เป็นไปตามมาตรฐานเนื้อแพะก่อนถึงมือผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กัลป์ยกร วงศ์กาฬสินธุ์ 2540. “การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR 25 สู่ *Escherichia coli* ด้วยระบบหลอมกับจีเอสทียีน.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2539. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์ขั้นสูง.** กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2540. **การจัดการโรงฆ่า.** กรุงเทพฯ : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชัยณรงค์ คันธพนิต. 2529. **วิทยาศาสตร์เนื้อสัตว์.** กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. **เอนไซม์ทางอาหารตอนที่ 1.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, ศุภลักษณ์ สรภักดี และสุภาพรรณ ศฤงคาร. 2561. “การพัฒนาผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อแพะขึ้นรูปใหม่พร้อมปรุง.” รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2547. **การจัดการเนื้อสัตว์.** เชียงใหม่ : ธนบรรณการพิมพ์.

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2549. **มาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ: เนื้อแพะ.** กรุงเทพมหานคร : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุรศักดิ์ คชภักดี. 2549. **รวมบทความการเลี้ยงแพะพัทลุง.** พัทลุง : มหาวิทยาลัยทักษิณ.

Abdelhadi, O., Babiker, S.A., Hocquette, J.F., Picard, B., Durand, D. and Faye, B. 2013. “Effect of ageing on meat quality of the one humped camel (Camelus dromedarius).” **Emirate Journal Food Agriculture.** 25(2) : 150-158.

Abdullah, Y.A. and Qudsieh, R.I. 2009. “Effect of slaughter weight and ageing time on the quality of meat from Awassi ram lambs. **Meat Science.** 82 : 309-316.

Acker, D. and Cunningham, M. 1991. **Animal Science and industry.** New Jersey : Prentic-Hall.

Adeyemi, K.D., Sabow, A.B., Shittu, R.M., Karim, R., Karsani, S.A. and Sazil, A.Q. 2015. “impact of chill storage on antioxidant status, lipid and protein oxidation, color, drip loss and fatty acid of semimembranosus muscle in goat.” **CYTA-Journal of Food.**

Ahnström, L.M., Seyfert, M., Hunt, M.C. and Jonhson, D.E. 2006. “Dry aging of beef in a bag highly permeable to water vapour.” **Meat Science.** 73 : 674-679.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Anderson, T.J. and Parrish, F.C.J.R. 1989. "Post-mortem degradation of titin and nebulin of beef steaks varying in tenderness." **Journal of Food Science.** 54 : 748-749

AOAC. 2005. **Official Method of Analysis AOAC international.** 18 th ed. Gathersburg.

Ashie, I., Sorensen, T. and Nielsen, P. 2002. "Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness." **Journal of Food Science.** 67 : 2138-2142.

Astruc, T. 2014. "Muscle Structure and Digestive Enzyme Bioaccessibility to Intracellular Compartments." 193-222. in Boland, M., Singh, H. and Golding, M. (Eds). **Food Structures, Digestion and Health.** San Diego : Academic Press.

Bailey, A.J. and Light, N.D. 1989. **Connective tissue in meat and meat product.** Essex : Elsevier Science.

BAM. 2001. **Bacteriological Analytical Manual online, chapter 3 Aerobic plate count.** [Online]. Available : https//www.fda.gov/food/foodsciencereserch/laboratorymethods/ucm063346.htm.

Basinger, K.L., Shanks, B.C., Apple, J.K., Cadwell, J.D., Yancey, J.W.S., Backes, E.A.,Wilbers, L.S., Johnson, T.M. and Bax, A.L. 2019. "Application of tension to prerigor goatcaracsses to impro.ve cooked meat tenderness." **Meat Science.** 147 : 1–5.

Bekhit, A.E.D., Cassidy, L., Hurst, R.D. and Farouk, M.M. 2007. "Post-mortem metmyoglobin reduction in fresh venison." **Meat Science.** 75 : 53-60.

Bekhit, A.A., Hopkins, D.L., Geesink, G., Bekhit, A.A. and Franks, P. 2014. "Exogenous proteases for meat tenderization." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition.** 54 : 1012-1031.

Bertram, C.H., Aaslyng, D.M. and Andersen, J.H. 2004. "Elucidation of the relationship between cooking temperature, water distribution, and sensory attributes of pork. A combined NMR and sensory study." **Meat Science.** 70 (1) : 75-81.

Boakye, K. and Mittal, G.S. 1996. "Changes in colour of beef m. longissimus dorsi muscle during ageing." **Meat Science.** 42(3) : 347–354.

Boccard, R., Buchter, C., Casteels, M., Cosentino. E., Dransfield, E., Hood, D. E., Joseph, R. L., MacDougall, D.B., Rhodes, D.N., Schon, I., Tinbergen, B.J. and Touraille, C. 1981. "Procedures for measuring meat quality characteristics in beef production experiments. Report of a working group in the commission of the European communities' (CEC) beef production research programme." **Livestock Production Science.** 8 : 385.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Boehm, M. L., Kendall, T. L., Thompson, V. F. and Goll, D. E. 1998. "Changes in the Calpains and Calpastatin during post mortem storage of bovine muscle." **Journal of Animal Science.** 76 : 2415-2434.

Bolumar, T., Enneking, M., Toepfl, S. and Heinz, V. 2013. "New developments in shockwave technology intended for meat tenderization: Opportunities and challenges: A review." **Meat science.** 95 : 931-939.

Bourne, M. 2002. Principle of objective texture measurement. in Bourne, M. **Food texture and viscosity: concept and measurement (chapter 4).** New York : Academic Press.

Bouton, P.E., Harris, P.V. and Shorthose, W.R. 1972. "The effect of ultimate pH on ovine muscle: Water holding capacity." **Journal of Food Science.** 37 : 351-355.

Buege, J.A. and Aust, S.D. 1978. "Microsomal lipid peroxidation." **Methods in enzymology** 52 : 302-310.

Carpenter, C.E., Cornforth, D.P. and Whittier, D. 2001. "Cosumer preferences for beef color and packaging did not affect eating satisfaction." **Meat Science.** 57 : 359-363.

Dalling. M. 1972. "Classification of Proteolytic Enzyme." 1-18. in **Plant Proteolytic Enzyme.** Florida : CRC Press.

Davis, K.A., Huffman, D.L. and Cordray, J.A. 1975. "Effect of mechanical tenderization, aging and pressing on beef quality." **Journal of Food Science.** 40 : 1222-1224.

Davis, P.F. and Mackle, Z.M. 1981. "A simple procedure for the separation of insoluble collagen and elastin." **Analytical Biochemistry.** 115(1) : 11–17

Dhanda, J.S., Taylor, D.G. and Murray, P.J. 2003. "Growth, carcass and meat quality parameters of male goat: effects of genotype and liveweight at slaughter. **Small Ruminant Research.** 50 : 57-66.

Dinh, N.T.T. 2006. "Meat quality: understanding of meat tenderness and influence of fat content on meat flavor." **Science and Technology Development**. 9 : 12-17.

Duckett, S.K., Klein, T.A., Donson, M.V. and Snowder, G.D. 1998. "Tenderness of normal and callipyge lamb aged fresh or after freezing" **Meat Science.** 49 : 19-26.

Falowo, A.B., Fayemi, P.O. and Muchenje, V. 2014. "Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review." **Food Research International**. 64 : 171–181.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Farouk, M.M., Mustafa, N.M., Wu, G. and Krsinic, G. 2012. "The 'sponge effect' hypothesis: an alternative explanation of the improvement in the water-holding capacity of meat with ageing." **Meat Science.** 90 : 670-677.

Faustman, C. and Cassens, R.G. 1990. "The biochemical basis for discoloration in fresh meat: a review." **Journal of Muscle Foods.** 1 : 217-243.

Gerrard, D.E. and Grant, A.L. 2003. **Principles of Animal Growth and Development**. USA : Kendall Hunt.

Goll, D.E., Young, R.B. and Stromer, M.H. 1974. "Separation of subcellular organelles by differential and density gradient centrifugation." 250–290. in Powell, T. and Booren, B. (ed). **Proceedings of the 27th Annual Reciprocal Meat Conference of the American Meat Science Association**. TX : College Station.

Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R.G. and Zalewska, T. 1992. "Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin." **BioEssays.** 14 : 549-556.

Guo, W. and. Greaser, M.L. 2007. "Muscle Structure, Proteins, and Meat Quality." 13-31. in Purslow P.P. **New Aspects of Meat Quality From Genes to Ethics.** Tandil : Woodhead.

Ha, M., Bekhit, A.E.D, Carne, A., Hopkins, D.L. 2012. "Characterization of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins." **Food Chemistry.** 134(1) : 95–105.

Ha, M., Bekhit, A.E.D, Carne, A., Hopkins, D.L. 2013. "Comparison of the Proteolytic Activity of New Commercially Available Bacterial and Fungal Protease toward Meat Proteins." **Journal of Food Science.** 78 : 170-177.

Heinze, P.J., Smith, M.C., Naude, R.T. and Boccard, R.L. 1986. "Influence of breed and age on collagen content and solubtlty of some ovine and goat muscles." in **The 32nd Meeting of European Research Works Workers.** Belgium : Ghent.

Hergenreder, J. 2011. **The effects of freezing and thawing rates on tenderness and sensory quality of beef subprimals.** Lincoln : University of Nebraska.

Huang, F., Huang, M., Zhang, H., Guo, B., Zhang, D. and Zhou, G. 2014. "Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during post-mortem ageing of beef skeletal muscle." **Food Chemistry.** 148 : 1-6.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Huff-Lonergan, E. and Longergan, S.M. 2005. "Mechanism of water-holding capacity of meat: the role of postmortem bio-chemial and structural changes." **Meat Science.** 71 : 194-204.

Huff-Lonergan, E. and Parrish, F.C.J.R. 1993. "Bovine longissimus muscle tenderness as affected by post-mortem ageing time, animal age and sex." **Journal of Food Science.** 58(4) : 713-716.

Huff-Lonergan, E., Baas, T.J., Malek, M., Dekkers, J.C., Prusa, K. and Rothschild, M.F. 2002. "Correlations among selected pork quality traits." **Journal of Animal Science.** 80 : 617- 627.

Huff-Lonergan, E., Parrish, F.C.J.R. and Robson, R.M. 1995. "Effects of post-mortem aging time, animal age, and sex on degradation of titin and nebulin in bovine longissimus muscle." **Journal of Animal Science.** 73 : 1064–1073.

Huff-Lonergan, E., Zhang, W.G. and Lonergan, S.M. 2010. "Biochemistry of post-mortem muscle Lessons on mechanisms of meat tenderization." **Meat Science.** 86(1) : 184-195.

Huidobro, F.R., Miguel, E., Blázquez, B., Onega, E. 2004. "A comparison between two methods (WarnerBratzler and texture profile analysis) for testing either raw meat or cooked meat." **Meat Science.** 69 : 527-536.

Hwang, I.H., Devine, C.E. and Hopkins, D.L. 2003. "The biochemical and physical effects of electrical stimulation on beef and sheep meat tenderness." **Meat Science.** 65 : 677-691.

Hwang, I.H., Park, B.Y., Cho, S.H. and Lee, J.M. 2004. "Effect of muscle shortening and proteolysis on Warner-Bratzler shear force in beef *longissimus* and *semitendinosus*." **Meat Science.** 68 : 497-505.

Insausti, K., Beriain, M., Purroy, A., Alberti, P., Gorraiz, C. and Alzueta, M. 2001. "Shelf life of beef from local Spanish cattle breeds stored under modified atmosphere." **Meat Science.** 57 : 273-281.

Ionescu, A., Aprodu, I. and Pascaru, G. 2008. "Effect of papain and bromelin on muscle and collagen proteins in beef meat." **Journal of Food Technology.** 31 : 9-16

James, S.J. and James, C. 2002. **Meat Refrigeration**. 33-92. Abington : Woodhead.

Jayasooriya, S.D., Torley, P., D'arcy, B.R. and Bhandari, B.R. 2007. "Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine Semitendinosus and Longissimus muscles." **Meat Science.** 75 : 628-639.

Jirajaroenrat, K., Opatpatanakit, Y., Srisuwan, L. and Sethakul, J. 2007. "Myofibrillar protein degradation over ageing period of Kampaengsaen beef." 193-194. in **Proceeding of 53rd International Congrees of meat Science and Technology.** Beijing : China.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jung, S., de Lamballerie-Anton, M. and Ghoul, M. 2000. "Modifications of ultrastructure and myofibrillar proteins of post-rigor beef treated by high pressure" **LWT-Food Science and Technology.** 33 : 313-319.

Kadim, I.T., Mahgoub, O., Al-Ajmi, D.S., Al-Maqbaly, R.S., Al-Saqri, N.M., Ritchie, A. 2004. "An evaluation of the growth, carcass and meat quality characteristics of Omanigoat breeds." **Meat Science**. 66 : 203–210.

Kanayama, Y. and Sakai, Y. 2005. "Purification and properties of a new type of protease produced by *Microbacterium liquefaciences.* **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 69 : 916-921.

Kang, C.K. and Rice, E.E. 1970. "Degradation of various meat fractions by tenderizing enzymes." **Journal of Food Science.** 35 : 563-577.

Kannan, G., Chawan, C.B., Kouakou, B. and Gelaye, S. 2002. "Influence of packaging method and storage time on shear value and mechanical strength of intramascular connective tissue of chevon" **Journal of Animal Science.** 80 : 2383-2389.

Kannan, G., Gadiyaram, K.M., Galipalli, S., Carmichael, A., Kouakou, B., Pringle, T.D., McMillin, K.W. and Gelaye, S. 2006. "Meat quality in goats as influenced by dietary protein and energy levels, and postmortem aging." **Small Ruminant Research.** 61 : 45-52.

Kannan, G., Kouakou, B. and Gelaye, S. 2001. "Colour changes reflecting myoglobin and lipid oxidation in chevon cuts during refrigerated display." **Small Rumininant Research.** 42 : 67-75.

Karami, M., Alimon, A.R., Sazili, A.Q., Goh, Y.M. and Ivan, M. 2010. "Effect of dietary antioxidants on the quality, fatty acid profile, and lipid oxidation of *longissimus* muscle in Kacang goat with aging time." **Meat Science.** 88 : 102-108

Karlović, S., Ježek, D., Blažić, M., Tripalo, B., Brnćić, M., Bosiljkov, T., Šimunek, M. 2004. "Influence of refrigeration and ageing time on textural characteristics of fresh meat." **Croatian Journal of Food Science and Technology.** 1(2) : 1-6.

Kawahara, H., Kusumoto, M. and Obata, H. 1993. "Isolation and characterization of a new type of collagenase producing bacterium, *Bacillus alvei* DC-1." **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.** 57 : 1372-1373

Kemp, C.M., Sensky, P.L., Bardsley, R.G., Buttery, P.J. and Parr, T. 2010. "Tenderness – An enzymatic view." **Meat Science.** 84 : 248-256.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kerth, C.R., Miller, M.F. and Ramsey, C.B. 1995. "Improvement of beef tenderness and quality traits with calcium chloride injection in beef loins 48 hours post-mortem." **Journal of Animal Science.** 73 : 750-756.

Keith, F.K.M., Vol, D.L.D., Miles, R.S., Bechtel, P.J. and Carr, T. R. 1985. "Chemical and Sensory Properties of Thirteen Major Beef Muscles." **Journal of Food Science.** 50 : 869-872.

Killefer, J. 2004. "Effect of enhancement of pork and beef on post mortem events" 20-23. in **Proceedings of the 59th Reciprocal Meats Conference**. Lexington : Kentucky.

Kim, S.Y., Yong, H.I., Nam, K.C., Jung, S., Yim, D.G., Jo, C. 2018. "Application of high temperature (14 °C) aging of beef *M. semimembranosus* with low-dose electron beam and X-ray irradiation." **Meat Science.** 136 : 85-92.

Koohmaraie, M. 1994. "Muscle proteinases and meat aging." **Meat Science.** 36 : 93–104.

Koohmaraie, M. 1996. "Biochemical factors regulating the toughening and tenderisation processes of meat." **Meat Science.** 43 : 193-201.

Koohmaraie, M. & Geesink, G.H. 2006. "Contribution of post-mortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system." **Meat Science.** 74 : 34-43.

Kristensen, L. and Purslow, P.P. 2001. "The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins." **Meat Science.** 58 : 17-23.

Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural protein during the assembly the head of bacteriophage T4." **Nature.** 227 : 680-685.

Lantto, R., Kruus, K., Puolanne, E., Honkapaa, K., Roininen, K., & Buchert, J. 2009. "Enzymes in Meat Processing." 264-291. in Whitehurst, R.J. and van Oort, M. (Eds). **Enzymes in Food Technology.** UK : Wiley-Blackwell.

Lawrie, R.A. 1985. **Meat Science.** New York : Pergammon Press.

Lawrie, R.A. 1998. **Lawrie's meat science.** 6th ed. Cambridge : Woodhead.

Leak, F.W., Kemp, J.D., Fox, J.D. and Langlois, B.E. 1987. "Effects of Boning Time, Mechanical Tenderization and Partial Replacement of Sodium Chloride on the Quality and Microflora of Boneless Dry-Cured Ham." **Journal of Food Science.** 52 : 263-266.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewis, D.A. and Luh, B.S. 1988. "Application Of Actinidin From Kiwifruit To Meat Tenderization And Characterization Of Beef Muscle Protein Hydrolysis." **Journal Food Biochemmistry.** 12 : 147-158.

Leygonie, C., Britz, T.J. and Hoffman, L.C. 2012. "Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review." **Meat Science.** 9 : 93-98.

Liu, F., Xu, Q., Dai, R. and Ni, Y. 2015. "Effect of natural antioxidants on colour stability, lipid oxidation and metmyoglobin reducing activity in raw beef patties." **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria.** 14 : 37-44.

Lomiwes, D., Farouk, M.M., Wu, G. and Young O.A. 2014. "The development of meat tenderness is likely to be compartmentalized by ultimate pH." **Meat Science.** 96 : 646-651.

Lund, T. and Granum, P.E. 1999. "The 105-kDa protein component of Bacillus cereus non-haemolytic enterotoxin (Nhe) is a metalloprotease with gelatinolytic and Collagenolytic activity." **FEMS Microbiology Letters.** 178 : 355-361.

Mancini, R.A. and Hunt, M.C. 2005. "Current research in meat colour." **Meat Science.** 71 : 100- 121.

Miller, A., Strange, E. and Whiting, R. 1989. "Improved Tenderness of Restructured Beef Steaks by a Microbial Collagenase Derived from Vibrio BÜ30." **Journal of Food Science.** 54 : 855-857.

Morrissey, P., Sheehy, P., Galvin, K., Kerry, J. and Buckley, D. 1998. "Lipid stability in meat and meat products." **Meat Science.** 49 : S73–S86.

Nagano, H. and To, K.A. 1999. "Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from Bacillus subtilis FS-2." **Bioscience Biotechnology and Biochemistry.** 63 : 181–183.

Nagaraj, N.S., Anilakumar, K.R. and Santhanam, K. 2005. "Biochemical and Physicochemical changes in goat meat during pastmortem aging" **Journal of muscle foods.** 17 : 198-213.

Nakayama, T., Tsuruoka, N., Akai, M. and Nishino, T. 2000. "Thermostable Collagenolytic activity of a novel thermophilic isolate, *Bacillus* sp. strain NTAP-1." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 89 : 612-614.

Naveena, B.M., Mendiratta, S.K. 2004. "The tenderization of buffalo meat using ginger extract." **Journal of Muscle Foods.** 15 : 235-244.

Offer, G., Knight, P., Jeacocke, R., Almond, R., Cousins, T., Elsey, J., Parsons, N., Sharp, A., Starr R. & Purslow, P. 1989. "The Structural Basis of the Water-Holding, Appearance and Toughness of Meat and Meat Products." **Food Microstructure.** 8 : 151-170.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Okamoto, M., Yonejima, Y., Tsujimoto, Y., Suzuki, Y., Watanabe, K. 2001. "A thermostable collagenolytic protease with a very large molecular mass produced by thermophilic Bacillus sp. strain MO-1." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 57 : 103–108.

Panea, B., Sañudo, C., Olleta, J.L. and Civit, D. 2008. "Effect of ageing method, ageing period, cooking method and sample thickness on beef textural characteristics. **Spanish Journal of Agricultural Research.** 6 : 25-32.

Pawar, V.D., Surve, V.D., and Machewad, G.M.. 2003."Tenderization of chevon by papain and trypsin treatments." **Journal of Food Science.** 40 : 296-298.

Pearce, K.L., Rosenvold, K., Andersen, H.J. and Hopkins, D.L. 2011. "Water Distribution and mobility in meat during the conversion of muscle to meat and ageing and the impact on fresh meat quality attributes – a review." **Meat Science.** 89 : 111-124.

Pearson, A.M. and Young, R.B. 1989. **Muscle and meat biochemistry.** San Diego : Academic Press.

Pearson, D. 1968. "Application of chemical methods for the assessment of beef quality. II. Methods related to protein breakdown." **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 19 : 366-369

Popova, T., Marinova, P., Vasileva, V., Gorinov, Y. and Lidji, K. 2009. "Oxidative changes in lipids and proteins in beef during storage." **Archiva Zootechnica.** 3 : 30-38.

Priest, F.G. 1977. "Extracellular enzyme Synthesis in the Genus Bacillus." **Bacteriological Reviews.** 41 : 711-753.

Priest, F.G. 1985. "Extracellular enzyme protease." 38-48. in **Commercial enzyme.** New York : Chapman & Hall.

Purslow, P.P. 2005. "Intramuscular connective tissue and its role in meat quality." **Meat Science.** 70 : 435-447.

Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J. and Hui, N. 2006. "Effects of elastase from a Bacillus strain on the tenderization of beef meat." **Food Chemistry.** 98 : 624-629.

Rao, D.N., Nair, K.K.S. and Sakhare, P.Z. 1998. "Meat microbiology and spoilage in tropical countries." 220-265. in **The Microbiology of Meat and Poultry.** London : Blackie Academic and Professional.

Renerre, M., Dumont, F. and Gatellier, P. 1996. "Antioxidant enzyme activities in beef in relation to oxidation of lipid and myoglobin." **Meat Science.** 43 : 111-121.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reo, M.B., Tanksale, A.M., Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. "Molecular an biotechnological aspect of microbiol protease." **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** 62 **:** 597-635**.**

Robbins, K., Jensen, J., Ryan, K.J., Homco-Ryan, C., McKeith, F.K. and Brewer, M.S. 2002. "Enhancement effects on sensory and retail display characteristics of beef rounds." **Journal of Muscle Foods.** 13 : 279-288.

Ross, M.H. and Pawlina, W. 2011. **Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.** Baltimore : Lippincott Williams & Wilkins.

Sabow, A.B., Sazili, A.Q., Aghwan, Z.A., Zulkifli, I., Goh, Y.M., Kadir, M.Z.A., Nakyinsige, K., Kaka, U. and Adeyemi, K.D. 2016. "Changes of microbial spoilage, lipid-oxidation and physicochemical properties during post mortem refrigerated storage of goat meat" **Journal of Animal Science.** 87 : 816-826.

Schonfeldt, H.C. 1989. "A comparison of the quality characteristics of goat meat with that of sheep meat" M.Sc. Dissertation, Department of Home Economics and Dietetics, Faculty of Science, University of Pretoria, RSA.

Seideman, S.C., Cross, H.R., Smith, G.C. and Durland, P.R. 1984. "Factors associated with fresh meat color: a review." **Journal of Food Quality.** 6 : 211-237.

Seydim, A., Acton, J., Hall, M. and Dawson, P. 2006. "Effect of packaging atmospheres on shelf-life quality of ground ostrich meat." **Meat Science.** 73 : 503-510.

Shackelford, S.D., Koomaraie, M., Cundiff, L.V., Gregory, K.E., Rohrer, G.A. and Savell, J.W. 1994. "Heritabilities and phenotypic and genetic correlations for bovine post rigor calpastatin activity, intramuscular fat content, Warner-Bratzler shear force, retail product yield, and growth rate." **Journal of Animal Science.** 72 : 857-863.

Simela, L., Webb, E.C., Frylinck, L. 2004. "Effect of sex, age, and pre-slaughter con-ditioning on pH, temperature, tenderness and colour of indigenous South Africangoats." **South African Journal of Animal Science.** 34 : 208–211.

Smith, J. and Hong-Shum, L. 2003. "Enzymes." 365-454. In Smith**,** J. **Food additives data book**. 2 nd ed. UK : Blackwell Science.

Sorapukdee, S., Sampavapol, P., Benjakul, S. and Tangwatcharin, P. 2020. "Collagenolytic protease from Bacillus subtilis B13 and B. siamensis S6 and their specificity toward

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

collagen with low hydrolysis of myofibrils." **LWT-Food Science and Technology.** 126 : 109307.

Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. 1980. **Principle and Procedure of statistic.** 2 nd ed. New York : Macgraw-Hill.

Sullivan, G.A. and Calkins, C. 2010. "Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue." **Meat Science.** 85 : 730-734.

Takagi, H., Kondou, M., Tomoaki, H., Nakamori, S., Tsai, Y.-C. H. and Yamasaki, M. 1992. "Effects of an alkaline elastase from an alkalophilic Bacillus strain on the tenderization of beef meat." **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** 40 : 2364–2368.

Tauro, P., Kapoor, K.K., and Yadaw, K.S. 1986. **An introduction to microbiology.** New Delhi : New Age International.

Taylor, R.G., Geesink, G.H., Thompson, V.F., Koohmaraie, M. and Goll, D.E. 1995. "Is Z- disk Degradation Responsible for Post-mortem Tenderization?" **Journal of Animal Science.** 73 : 1351-1367.

Toldrá, F. and Flores, M. 2000. "The use of muscle enzymes as predictors of pork meat quality." **Food Chemistry.** 69 : 387-395.

Tran, L.H. and Nagano, H. 2002. "Isolation and characteristics of Bacillus subtilis CN2 and its collagenase production." **Journal of Food Science.** 67 : 1184-1187.

USDA. 1998. **Sheep and Goats**. Washington (DC) : U.S. Department of Agricultural.

Veiseth, E., Shackelford, S., Wheeler, T. and Koohmaraie, M. 2004. "Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter." **Meat Science.** 68 : 635-640.

Varnam, A. and Sutherland, J. 1996. **Meat and meat products: technology, chemistry and microbiology.** London : Chapman and Hall.

Wada, M., Suzuki, T., Yaguti, Y., and Hasegawa, T. 2002. "The effects of pressure treatments with kiwi fruit protease on adult cattle semitendinosus muscle." **Food Chemistry.** 78 : 167-171.

Wang, H., Weir, C.E., Marion, L., Birkner, M.L., Ginger, B. 1998. "Studies on Enzymatic Tenderization of Meat. III. Histological and Panel Analyses of Enzyme Preparations From Three Distinct Sources." **Food Research International.** 23 : 423-438.

Ward, O.P. 1983. "Proteinnae." 251-317. in **Microbiol Enzyme and Biotechnology.** New York : Applied Science.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Warren, E.K. and Kastner, C.L. 1992. "A comparison of dry-aged and vacuum-aged beef strip loin." **Journal of Muscle Foods.** 3 : 151-157.

Watanabe, K. 2004. "Collagenolytic protease from becteria." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 63 : 520-526.

Wheeler, T.L., Shackelford, S.D. and Koohmaraie, M. 2000. "Variation in proteolysis, sarcomere length, collagen content, and tenderness among major pork muscle." **Journal of Animal Science.** 78 : 958-965.

Xue, M., Huang, F., Huang, M., O'Neill, E. and Zhou, G. 2012. "Influence of oxidation on myofibrillar proteins degradation from bovine via μ-calpain." **Food Chemistry.** 134 : 106-112

Yanar, M. and Yetim, H. 2001. "The effect of aging period and muscle type on the textural quality characteristics of mutton." **Turkish Journal of Veterinary and Animal Science.** 25 : 203-207.

Zhang, W., Lonergan, S., Gardner, M. and Huff-Lonergan, E. 2006. "Contribution of postmortemchanges of integrin, desmin and μ-calpain to variation in water holding capacity of pork." **Meat Science.** 74(3) : 578–585.

Zhao, G.Y., Zhou, M.Y., Chen, X.L., Xie, B.B., Zhang, X.Y., He, H.L., Zhou, B.C. and Zhang, Y.Z. 2012. "Tenderization effect of cold-adapt Collagenolytic Protease MCP-01 on beef meat at low temperature and its mechanism." **Food Chemistry.** 134 : 1738-1744.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดจากการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อของเนื้อแพะในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน

ชนิดโปรตีน	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	กลุ่มทดลอง				
		ปาเปน	โบรมิเลน	คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum*	คอลลาจีโนไลติกซ์ เอนไซม์ B13	คอลลาจีโนไลติกซ์ เอนไซม์ S6
โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ	0	-	-	-	-	-
	3	334.88 ± 23.36^{a}	308.54 ± 16.31^{a}	125.04 ± 10.68^{a}	107.80 ± 14.04^{a}	98.52 ± 11.01^{a}
	6	408.80 ± 25.05^{b}	359.25 ± 15.78^{c}	158.65 ± 9.23^{b}	137.89 ± 16.06^{c}	106.64 ± 13.28^{b}
	9	417.02 ± 17.05^{b}	334.43 ± 26.31^{b}	160.13 ± 10.76^{b}	131.38 ± 13.51^{b}	98.88 ± 10.23^{a}
	12	428.09 ± 31.57^{bc}	335.68 ± 20.73^{b}	170.71 ± 10.23^{c}	135.93 ± 12.02^{bc}	104.68 ± 14.85^{b}
	15	441.93 ± 18.84^{c}	353.98 ± 18.16^{c}	201.91 ± 9.09^{d}	166.02 ± 12.27^{d}	114.05 ± 13.03^{c}
	18	429.25 ± 26.52^{bc}	380.59 ± 5.78^{d}	206.11 ± 10.20^{d}	167.45 ± 13.58^{d}	113.70 ± 11.77^{c}
	21	411.93 ± 17.58^{b}	364.16 ±28.21^{e}	199.50 ± 13.26^{d}	162.63 ± 15.05^{d}	121.38 ± 11.77^{d}

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรดจากการย่อยสลายโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อแพะในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 วัน

ชนิดโปรตีน	ระยะเวลาบ่ม (วัน)	กลุ่มทดลอง				
		ปาเปน	โบรมิเลน	คอลลาจีเนสจาก *C. histolyticum*	คอลลาจีโนไลติกซ์ เอนไซม์ B13	คอลลาจีโนไลติกซ์ เอนไซม์ S6
โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน	0	-	-	-	-	-
	3	2.58 ± 0.46^{a}	10.93 ± 0.53^{d}	13.17 ± 3.36^{a}	29.43 ± 3.13^{a}	15.42 ± 1.15^{a}
	6	2.89 ± 0.27^{b}	10.68 ± 0.64^{bc}	13.99 ± 2.13^{b}	30.95 ± 4.75^{b}	15.43 ± 1.22^{a}
	9	2.89 ± 0.35^{b}	10.70 ± 0.60^{bc}	15.10 ± 2.48^{c}	31.18 ± 3.10^{b}	15.43 ± 2.01^{a}
	12	2.94 ± 0.32^{b}	10.61 ± 0.70^{b}	29.96 ± 3.12^{d}	32.11 ± 4.66^{c}	15.48 ± 1.11^{ab}
	15	3.68 ± 0.37^{c}	10.45 ± 0.48^{a}	30.80 ± 3.30^{e}	32.26 ± 3.31^{c}	15.67 ± 1.22^{bc}
	18	3.82 ± 0.22^{d}	10.75 ± 0.93^{bc}	33.20 ± 2.62^{f}	32.53 ± 3.08^{c}	15.78 ± 1.84^{c}
	21	4.04 ± 0.36^{e}	10.77 ± 0.83^{c}	36.59 ± 2.47^{g}	33.03 ± 5.04^{d}	15.99 ± 1.25^{cd}

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 3 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์และเคมีกายภาพของเนื้อแพะในระหว่างการบ่ม

ลักษณะที่ศึกษา	กลุ่มทดลอง					ระยะเวลาบ่ม (วัน)							P-value		
	กลุ่มควบคุม	โบรมิเลน	คอลลาจีโนไลติกซ์ B13	คอลลาจีโนไลติกซ์ S6	SEM	0	3	5	7	14	21	SEM	กลุ่มทดลอง	ระยะเวลาบ่ม	interaction
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)	4.81^{a}	6.21^{b}	5.65^{b}	5.49^{ab}	0.56	3.21^{a}	4.30^{b}	5.37^{c}	6.70^{d}	6.77^{d}	7.24^{d}	0.56	0.00	0.00	0.39
ค่าการออกซิเดชันของไขมัน (mg MDA/kg meat)	1.06	1.25	1.23	1.17	0.07	0.36^{a}	0.53^{b}	0.69^{c}	1.17^{d}	2.07^{e}	2.18^{f}	0.07	0.13	0.00	0.67
TCA-soluble peptide (µmol/g meat)	2.50^{a}	4.66^{d}	3.16^{c}	2.90^{b}	0.12	1.55^{a}	2.40^{b}	3.33^{c}	3.92^{d}	4.09^{d}	4.36^{e}	0.12	0.00	0.00	0.00
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (N)	40.47^{c}	25.05^{a}	33.28^{b}	33.71^{b}	2.09	45.73^{c}	35.99^{b}	29.33^{a}	28.93^{a}	31.93^{a}	29.75^{a}	2.09	0.00	0.00	0.00
เค้าโครงเนื้อสัมผัส															
- ค่าความแข็ง (N)	5.37^{c}	3.95^{a}	4.29^{ab}	4.37^{b}	0.27	7.00^{d}	5.92^{c}	4.14^{b}	3.31^{a}	3.14^{a}	3.02^{a}	0.27	0.00	0.00	0.00
- ค่าความเหนียว (N)	3.13^{b}	2.54^{a}	2.45^{a}	2.53^{a}	0.12	3.83^{c}	3.40^{d}	2.60^{c}	2.06^{b}	1.94^{ab}	1.79^{b}	0.12	0.00	0.00	0.00
- ค่าความยากในการเคี้ยว (N)	2.57^{c}	1.97^{a}	2.08^{ab}	2.15^{b}	0.09	2.99^{d}	2.75^{c}	2.08^{b}	1.79^{a}	1.77^{a}	1.65^{a}	0.09	0.00	0.00	0.00
- ค่าความยืดหยุ่น (ratio)	0.85^{b}	0.77^{a}	0.87^{c}	0.88^{bc}	0.01	0.78^{a}	0.80^{a}	0.84^{b}	0.87^{c}	0.92^{d}	0.93^{d}	0.01	0.00	0.00	0.08
-ค่าการเกาะรวมตัว (ratio)	0.58	0.55	0.58	0.59	0.02	0.55	0.56	0.58	0.58	0.59	0.59	0.02	0.29	0.39	0.98
ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการบ่ม	7.82^{b}	10.23^{c}	6.74^{a}	7.08^{a}	0.39	-†	8.17^{b}	8.38^{b}	8.72^{b}	6.39^{a}	6.22^{a}	0.39	0.00	0.00	0.99
ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก	21.27^{c}	20.23^{b}	19.65^{a}	19.76^{a}	0.38	20.76^{c}	21.09^{c}	20.59^{c}	19.88^{b}	19.36^{ab}	19.21^{a}	0.38	0.00	0.00	0.98
ค่าสี															
- ความสว่าง	24.58^{c}	23.92^{b}	23.23^{a}	22.84^{a}	0.38	20.76^{c}	21.09^{c}	20.59^{c}	19.88^{b}	19.36^{ab}	19.21^{a}	0.38	0.00	0.00	0.69
- สีแดง	12.37	12.43	11.96	11.69	0.45	13.15^{e}	12.78^{de}	12.26^{cd}	11.69^{bc}	11.29^{ab}	10.83^{a}	0.45	0.09	0.00	0.99
- ค่าสีเหลือง	12.75	12.50	12.83	12.88	0.17	12.06^{a}	12.39^{b}	12.49^{b}	13.09^{c}	13.43^{d}	13.46^{d}	0.17	0.58	0.00	1.00

ตัวอักษรตัวพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

† ไม่มีค่าการสูญเสียน้ำในวันแรกของการบ่ม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายวิวัฒน์ สัมฤทธิ์ผล
วัน เดือน ปีเกิด	18 กรกฎาคม 2539 ที่กรุงเทพมหานคร
ที่อยู่	249 หมู่ 2 ตำบลในคลองบางปลากด อำเภอพระสมุทรเจดีย์ สมุทรปราการ 10290
ประวัติการศึกษา	2556 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนราชประชาสมาสัย ฝ่ายมัธยม รัชดาภิเษก ในพระบรมราชูปถัมภ์ 2560 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2564 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ “Hydrolytic properties of crude protease from *Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis* M13.” The 8th International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (8th ICIST). Jingde, Anhui, PR China. November 19-22, 2019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้