

การผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และการประยุกต์ใช้ใน
ผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคซูวี

**PRODUCTION OF COLLAGENOLYTIC ENZYME FROM
Bacillus subtilis B13 AND APPLICATION IN SOUS VIDE BEEF PRODUCT**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2564

KMITL-2021-AG-M-031-340

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**PRODUCTION OF COLLAGENOLYTIC ENZYME FROM
Bacillus subtilis B13 AND APPLICATION IN SOUS VIDE BEEF PRODUCT**



**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-031-340

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	การผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก <i>Bacillus subtilis</i> B13 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สเต็มเนื้อโคซูวี
นักศึกษา	นางสาวอภิญญา คำสอน
รหัสประจำตัว	61604034
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร.ผุสดี ตั้งวัชรินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 และการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สเต็มเนื้อโคซูวี โดยการศึกษาขั้นแรกเป็นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ซึ่งผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเจลาติน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และเวลาในการบ่ม เป็นปัจจัยสำคัญจากแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) จากนั้นทำการปรับปรุงปัจจัยสำคัญให้เหมาะสม โดยใช้แผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) ภายใต้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) ซึ่งปัจจัยสำคัญที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มการผลิตคอลลาจีเนสผ่านแผนการทดลองแบบ CCD และวิธีการตอบสนองของพื้นผิว คือ เจลาติน 19 กรัม/ลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.16 สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ และเวลาบ่ม 59 ชั่วโมง ซึ่งให้กิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์สูงสุดที่ทำนายไว้ที่ 63.96 U/ml เจอนี้พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าเมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้ปรับให้เหมาะสม (15 U/ml) กิจกรรมที่ดีที่สุดของเอนไซม์นี้อาจแสดงถึงเอนไซม์คอลลาเจนที่มีศักยภาพสำหรับการใช้งานหลายประเภทรวมถึงเอนไซม์ที่ทำให้เนื้อนุ่ม

การประยุกต์ใช้การซูวีรวมกับการใช้เอนไซม์โบรมิเลน และคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 ในผลิตภัณฑ์สเต็มเนื้อโค ที่ซูวีที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง และทำการเปรียบเทียบการทดลองระหว่างกลุ่มเอนไซม์และกลุ่มควบคุม สำหรับค่าการสูญเสียระหว่างการซูวี พบว่าการใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ทำให้มีการสูญเสียให้น้อยกว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลนและกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ภายหลังจากซูวีตัวอย่างมีค่าความสว่างและค่าสีแดงที่ลดลง ($P < 0.05$) ในขณะที่มีค่าสีเหลืองเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) จากการวิเคราะห์ค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัส (Texture profile analysis) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Shear Force) พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มเอนไซม์โบรมิเลนทำให้ตัวอย่างมีความนุ่มมากกว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 ในขณะที่คอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความนุ่มอย่างมีประสิทธิภาพกว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลน นอกจากนี้การวิเคราะห์ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ยังเป็นการยืนยันว่าความนุ่มของเนื้อที่ใช้คอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 เกิดจากการย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากกว่าโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งเอนไซม์โบรมิเลนสามารถย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้ดีที่สุด ($P < 0.05$) โดยทำให้ตัวอย่างมีลักษณะที่ละเอียดเกินไปจนไม่สามารถคงรูปของผลิตภัณฑ์สแต็กไว้ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ II อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Production of Collagenolytic Enzyme from <i>Bacillus subtilis</i> B13 and Application in Sous Vide Beef Product
Student	Miss Apinya Khamson
Student ID	61604034
Degree	Master of Science
Program	Animal science
Year	2021
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr.Supaluk Sorapukdee
Thesis Co-advisor	Assoc. Prof. Dr.Pussadee Tangwacharin

ABSTRACT

The main objective of this study was to produce collagenolytic enzyme from *Bacillus subtilis* B13. And its application in sous vide beef steak products. The first step of the study was to study the optimum conditions for the production of collagenolytic enzyme B13. The results showed that gelatin concentration, initial pH, and incubation time were accounted for significant factors from PB design and then applied for a central composite design (CCD) under response surface methodology (RSM) for optimization of significant factors were performed. The optimum parameters for the enhancing gelatinase production through CCD and response surface methodology were 19 g/l of pork gelatin, initial pH 6.16 for culture medium, and 59 h of incubation time, which provided the predicted maximum collagenolytic activity of 63.96 U/ml. This condition allowed approximately increasing 4-folds as compared to un-optimized condition (15 U/ml). The obtained optimal activity of this enzyme might be expressed the potential collagenase for several applications including meat tenderizing enzyme.

A combination of sous vide and enzymatic treatment (Bromelain and Collagenolytic enzyme from *Bacillus subtilis* B13) in beef steak products at temperature 55 °C for 0, 3, 6, 12, 24 and 48 h. The experiment was compared between the enzyme group and the control group. For water loss, it was found that the use of collagenolytic enzyme B13 resulted in less water loss than bromelain and control group ($P < 0.05$). After sous vide, the sample had a lower brightness and redness value ($P < 0.05$), while the yellowness value increased ($P < 0.05$). In the texture profile analysis and shear force, it was found that the bromelain group made the samples tender than the control and the

collagenolytic enzyme group B13. While collagenolytic enzyme B13 makes the product softer more efficiently than bromelain. In addition, an index analysis of the degradation of muscle protein by TCA-Soluble peptide method also confirmed that the tenderness of the meat due to the collagenolytic enzyme B13 was due to denaturing of connective tissue rather than fibrous protein. Bromelain was able to denature myofibrillar protein the best ($P<0.05$) by making the samples too mushy and unable to maintain the shape of the steak.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากท่าน รศ.ดร.ศุภลักษณ์ สรภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรศ.ดร.ผุสดี ตั้งวัชรินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ท่านได้กรุณาให้ความรู้ และคำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยอย่างยิ่ง จึงก่อให้เกิดความสำเร็จตามเป้าหมายได้เป็นอย่างดี ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณคณะกรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษาตลอดระยะเวลา 4 ภาคการศึกษา และทุนส่งเสริมงานวิจัยของบัณฑิตศึกษาของคณะเทคโนโลยีการเกษตร

ขอขอบคุณ คุณฉมหทัย วิจิตโรทัย คุณจรรยา คงฤทธิ์ คุณสุภาพรรณ ศฤงฆาร และ คุณจันทร์เพ็ญ เอื้อสกุลรุ่งเรือง นักวิทยาศาสตร์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่คอยให้คำชี้แนะความช่วยเหลือต่างๆ และถ่ายทอดความรู้ในการใช้เครื่องมือ รวมทั้งวิธีวิเคราะห์คุณภาพทางด้านต่างๆ แก่ข้าพเจ้า รวมถึงเพื่อนนักศึกษาปริญญาโท หลักสูตรสัตวศาสตร์ แขนงวิชาเอกวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือจนการทำวิทยานิพนธ์สำเร็จได้เป็นอย่างดี

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รัก และเคารพยิ่ง ตลอดจนจรรยาอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ถ่ายทอดความรู้ และประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้า

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ผู้วิจัยขอมอบแด่ทุกท่านที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

อภิัญญา คำสอน

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 สมมุติฐานของการศึกษา.....	2
1.4 ขอบเขตการวิจัย.....	2
1.5 ขั้นตอนของการศึกษา.....	3
บทที่ 2 ผลการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเนื้อสัตว์.....	4
2.1.1 โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein).....	4
2.1.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein).....	5
2.1.3 โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue).....	5
2.2 ความนุ่มของเนื้อสัตว์.....	7
2.2.1 การนุ่มเนื่องจากเอนไซม์ภายในเนื้อ.....	9
2.2.2 เทคนิคสำหรับปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์.....	9
2.3 เอนไซม์โปรติเอส (Protease).....	11
2.3.1 เอ็กโซเพปติเดส (Exopeptidase).....	11
2.3.2 เอนโดเพปติเดส (Endopeptidase).....	12
2.4 เอนไซม์คอลลาจีเนส (Collagenase).....	13
2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนส.....	14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ VI อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.5 แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส.....	16
2.5.1 เอนไซม์จากพืช (Plant-derived enzymes).....	16
2.5.2 เอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Microbial proteases).....	17
2.6 กระบวนการซูวี (Sous-vide).....	17
2.6.1 ความหมายของกระบวนการซูวี.....	17
2.6.2 กระบวนการซูวีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.....	18
2.6.3 ผลของความร้อนต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์.....	19
2.7 วิธีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ซูวี.....	24
2.8 เนื้อโคปนั้รู่บราห้มัน.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	28
3.2 วัสดุ-อุปกรณ์ และเครื่องมือ.....	28
3.3 วิธีการทดลอง.....	30
3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต คอลล่าจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก <i>Bacillus subtilis</i> B13.....	30
3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการนำคอลล่าจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ไปใช้ในผลิตภัณฑ์ สเต็กเนื้อ โคซูวี.....	36
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	
4.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลล่าจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ของเชื้อ <i>Bacillus subtilis</i> B13.....	39
4.1.1 การคัดเลือกตัวแปรที่สำคัญโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD).....	39
4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลล่าจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง.....	42
4.2 ผลการศึกษาการนำคอลล่าจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ไปใช้ในผลิตภัณฑ์ สเต็กเนื้อ โคซูวี.....	50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และ VII อ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2.1 คุณภาพด้านเคมี.....	50
4.2.2 คุณภาพด้านกายภาพ.....	52
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	65
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	65
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	66
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	81

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของเนื้อสัตว์.....	6
3.1 สถานะการทดลอง (Runs) 12 ชุดการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ PBD.....	32
3.2 ปัจจัยที่สำคัญ, หน่วย, ระดับ ในการทดลองด้วยวิธี RSM เพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก <i>Bacillus subtilis</i> B13.....	33
3.3 การออกแบบการทดลองด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อใช้ในการศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM).....	34
4.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของผล PBD ในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก <i>B. subtilis</i> B13 สำหรับตัวแปร 11 ปัจจัย.....	40
4.2 การทดลอง PBD 12 สถานะการทดลอง (Runs) สำหรับตัวแปร 11 ตัวเพื่อสังเกตการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก <i>B. subtilis</i> B13.....	41
4.3 การออกแบบการทดลองด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อใช้ในการศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology; RSM) และค่าของกิจกรรมผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่สังเกตได้ (U/mL).....	43
4.4 ANOVA สำหรับวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)	44
4.5 การทดสอบกิจกรรมของ <i>B. subtilis</i> B13 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจาก RSM.....	48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบและโครงสร้างพื้นฐานของกล้ามเนื้อ.....	5
2.2 โมเลกุลของโทรโปคอกลาเจน.....	7
2.3 ชิ้นส่วนไหลของเนื้อโคที่ย่างที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (131 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 1.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง.....	21
4.1 กราฟพื้นผิว (response surface plot) (ซ้าย) และกราฟโครงร่าง (contour plot) (ขวา) ของผลของ (a) เจลาติน และความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, (b) เจลาติน และเวลาการต้ม และ (c) ความเป็นกรด- ด่างเริ่มต้น และเวลาต้มในกิจกรรมการผลิตคอลลาเจนโนโลติกซ์เอนไซม์.....	45
4.2 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติส่วนตักข้าง.....	47
4.3 แผนภูมิการกระจายส่วนตักข้างกับลำดับข้อมูล.....	47
4.4 แผนภูมิการกระจายส่วนตักข้างในแต่ละระดับของปัจจัย.....	47
4.5 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ที่ระยะเวลาการชงที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	51
4.6 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ที่ระยะเวลาการชงที่แตกต่างกันภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	51
4.7 ค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการชงที่ระยะเวลาแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	52
4.8 ค่าการสูญเสียไอน้ำระหว่างการปรุงสุกที่ระยะเวลาการชงที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	53
4.9 ค่าสีภายหลังการชงที่ระยะเวลาการชงที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	55
4.10 ค่าสีภายหลังการปรุงสุกที่ระยะเวลาการชงที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	57
4.11 ค่า TPA ของตัวอย่างเนื้อโคที่ชงที่ระยะเวลาแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	61
4.12 ค่า TPA ของตัวอย่างเนื้อโคที่ชงที่ระยะเวลา แตกต่างกันภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	62
4.13 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคที่ระยะเวลาการชง แตกต่างกันภายหลังการชงของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	64
4.14 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคที่ระยะเวลาการชงแตกต่างกัน ภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง.....	64

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื้อสัตว์ประกอบด้วยน้ำประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์ และไขมัน 5 เปอร์เซ็นต์ โปรตีนแบ่งออกได้เป็นสามกลุ่ม ได้แก่ โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (myofibrillar protein) หรือโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วยแอกติน (actin) และไมโอซิน (myosin) โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein) หรือโปรตีนที่ละลายน้ำ และโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein) ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) การให้ความร้อนกับเนื้อสัตว์ที่อุณหภูมิต่างๆ มีผลทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และทำให้เนื้อสัตว์นุ่มขึ้น โดยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นส่วนประกอบสำคัญที่ทำให้เนื้อสัตว์เกิดความเหนียว และมักเริ่มเสียสภาพธรรมชาติที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 70 องศาเซลเซียส) ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของเนื้อสัตว์มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งหมายความว่าส่วนใหญ่คอลลาเจนจะเป็นตัวกำหนดความนุ่มของเนื้อสัตว์ (Dinh, 2006 ; Lantto *et al.* 2009)

ซูวี (Sous vide) เป็นวิธีการปรุงอาหารแบบหนึ่งซึ่งมีการนำวัตุดิบบรรจุลงในถุงสุญญากาศ แล้วนำไปผ่านความร้อนในอ่างน้ำหรืออุปกรณ์ไอน้ำที่อุณหภูมิคงที่จนกว่าจะสุก การปรุงอาหารแบบซูวีทำให้อาหารสุกเท่ากันทุกส่วนในระดับที่ต้องการ ภายในสุกดีในขณะที่ภายนอกไม่สุกจนเกินไป ไม่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการและความชุ่มชื้นของอาหาร ช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษา และยับยั้งการเกิดกลิ่นรสเนื่องจากการเกิดออกซิเดชัน อีกทั้งยังสามารถลดการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ออกซิเจน อุณหภูมิที่ใช้ในการซูวีจะต่ำกว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการปรุงอาหารโดยทั่วไป โดยมักจะอยู่ที่ประมาณ 55 ถึง 60 องศาเซลเซียสสำหรับเนื้อสัตว์ ดังนั้นระยะเวลาที่ใช้ในการซูวีเพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อสัตว์จึงนานกว่าวิธีการปรุงสุกโดยทั่วไป คือตั้งแต่ 1 ถึง 7 ชั่วโมง ไปจนถึง 48 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น เนื่องจากเอนไซม์ในเนื้อสัตว์ถูกกระตุ้นให้ย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และที่ระดับอุณหภูมินี้สามารถทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเริ่มเสียสภาพธรรมชาติ (Church, 1998; Creed, 1998; García-Linares *et al.* 2004; Ghazala *et al.* 1996; Lassen *et al.* 2002; Schellekens, 1996)

เอนไซม์สามารถถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ด้วยความร้อน อย่างไรก็ตามเอนไซม์ในเนื้อสัตว์จัดเป็นโปรตีนซาร์โคพลาสมิกชนิดหนึ่ง ซึ่งถูกทำลายได้เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 ถึง 60 องศาเซลเซียส ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์จากแหล่งต่างๆ ทั้งจากผลไม้ เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย เพื่อเพิ่มความนุ่มของเนื้อสัตว์ จากงานวิจัยของ Hofer (2018) ซึ่งศึกษาการใช้เอนไซม์แอกติเนดอินที่ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ ในผลิตภัณฑ์เนื้อสุกรซูวี พบว่าผลิตภัณฑ์ใช้เวลาที่ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพื่อให้มีความนุ่มเพิ่มขึ้นที่เวลา 4 ชั่วโมง และเมื่อเปรียบเทียบกับที่เวลา 8 ชั่วโมงพบว่ามีความนุ่มใกล้เคียงกัน

ปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับการนำเอนไซม์จากแบคทีเรียมาใช้ปรับปรุงความนุ่มของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สุวี นอกเหนือจากนี้ จากงานวิจัยของ Sorapukdee *et al.* (2020) พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* B13 สามารถผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ (collagenolytic enzyme) ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดคอลลาเจน แต่งานวิจัยยังศึกษาไม่ครอบคลุมถึงสภาวะการเลี้ยงแบคทีเรียที่เหมาะสม และยังไม่ได้ศึกษาถึงการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สุวี เนื้องานวิจัยครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ และนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคสุวีเพื่อลดระยะเวลาในการสุวีให้สั้นลง และสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเนื้อโคที่มีมูลค่าต่ำได้

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13

1.2.2 เพื่อศึกษาการนำคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคสุวี

1.3 สมมุติฐานของการศึกษา

1.3.1 สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 ได้

1.3.2 ทราบศักยภาพของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ เมื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคสุวี โดยสามารถใช้เวลาสุวีสั้นลง และเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบเนื้อโคที่มีมูลค่าต่ำได้

1.4 ขอบเขตการศึกษา

ขอบเขตการวิจัยเริ่มทดลองจากการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส คือ *Bacillus subtilis* B13 ซึ่งเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกระบุไว้ว่าสามารถผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ได้ และมีความปลอดภัย เพื่อให้สามารถผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ที่มีกิจกรรมดีที่สุดในำคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ที่ผลิตได้ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ไปประยุกต์ใช้กับการสุวีในผลิตภัณฑ์เนื้อสเต็กโคสุวีโดยใช้ชิ้นส่วนสะโพกของโค

1.5 ขั้นตอนของการศึกษา

1.5.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13

1.5.2 ประยุกต์ใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 ที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 1 เปรียบเทียบกับเอนไซม์จากพืชที่ระยะเวลาการชงวีที่แตกต่างกันในผลิตภัณฑ์สติกเนื้อโคชูวี



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โครงสร้างและองค์ประกอบของเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความซับซ้อน มีหลากหลายองค์ประกอบ และเป็นอาหารประเภทที่ไม่รวมเป็นเนื้อเดียวกัน องค์ประกอบของเนื้อสัตว์ ได้แก่ น้ำ 75 เปอร์เซ็นต์, โปรตีน 20 เปอร์เซ็นต์, ไขมัน 3 เปอร์เซ็นต์ และสารที่ไม่ใช่โปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ (โลหะ, วิตามิน, คาร์โบไฮเดรต ฯลฯ) (Tornberg *et al.* 1997) องค์ประกอบเหล่านี้มีความแตกต่างกันในคุณสมบัติเชิงหน้าที่ และตอบสนองต่อความเค้นทางกายภาพ ความเค้นเนื่องจากความร้อน และความเค้นเชิงกลที่ต่างกัน โครงสร้างกล้ามเนื้อ (muscle structure) ประกอบด้วย เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์ไขมัน หลอดเลือด เส้นเอ็น กระดูกอ่อนและหนัง ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียกว่า เอพิไมเซียม (epimysium) มัดกล้ามเนื้อ (muscle bundle) ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า เพอริไมเซียม (perimysium) ภายในประกอบด้วยการรวมตัวกันของเส้นใยกล้ามเนื้อ (muscle fiber) ที่เรียงตัวขนานกัน เส้นใยกล้ามเนื้อถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเอ็นโดไมเซียม (endomysium) เส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละเส้นประกอบไปด้วยเส้นใยย่อยที่เรียกว่า ไมโอไฟบริล (myofibril) ซึ่งเรียงตัวขนานกันและถูกล้อมรอบด้วยนิวคลีโอ (nuclei) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซาร์โคพลาสมิกรีติคิวลัม (sarcoplasmic reticulum) อนุภาคของไกลโคเจน (glycogen) และเอนไซม์ชนิดต่างๆ เส้นใยกล้ามเนื้อประกอบไปด้วยหน่วยย่อยที่เรียกว่า ซาร์โคเมอร์ (sarcomere) ซึ่งเป็นหน่วยย่อยที่สุดในกล้ามเนื้อที่มีการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยเส้นใยบาง (thin filament) ที่มีโปรตีนแอกติน (actin) และเส้นใยหนา (thick filament) ที่มีโปรตีนไมโอซิน (myosin) (ภาพที่ 2.1)

จากการศึกษาในปัจจุบันมีเพียงกลุ่มย่อยของโปรตีนเท่านั้นที่มีบทบาทสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์ โดยสามารถแบ่งโปรตีนออกได้เป็น 3 กลุ่มหลักๆ ได้แก่ โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) โปรตีนซาร์โคพลาสมิค (sarcoplasmic protein) และโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

2.1.1 โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein)

โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดประมาณ 50 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อสัตว์ โปรตีนชนิดนี้ทำหน้าที่ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ และเป็นองค์ประกอบหลักของหน่วยย่อยของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เรียกว่า

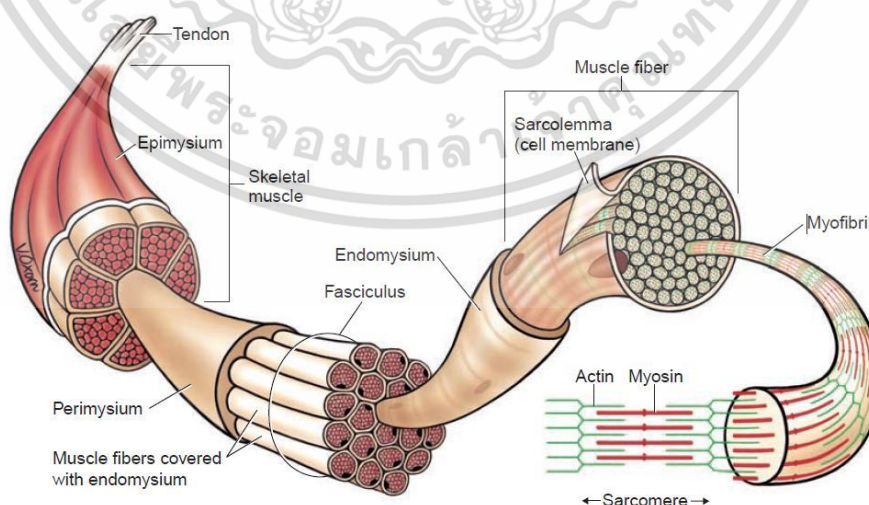
ซาร์โคเมียร์ (sarcomere) โปรตีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มนี้ คือ ไมโอซิน (myosin) แอคติน (actin) โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) และโทรโปนิน (troponin) (ตารางที่ 2.1)

2.1.2 โปรตีนซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasmic protein)

โปรตีนซาร์โคพลาสซึมเป็นโปรตีนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญระดับเซลล์ (metabolism) เป็นโปรตีนที่ห่อหุ้มรอบเส้นใยย่อย (myofibril) ซึ่งละลายอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม โดยมีประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ (ตารางที่ 2.1) สามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายเกลือความเข้มข้นต่ำ มีส่วนประกอบประมาณ 50 ชนิด ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ และไมโอโกลบิน (myoglobin) โดยไมโอโกลบินเป็นโปรตีนที่มีอิทธิพลต่อสีของเนื้อสัตว์ และการเกิดสีของเนื้อสัตว์จะขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของเมทไมโอโกลบิน (metmyoglobin ; MMb^+) ไมโอโกลบิน (myoglobin ; MB) และออกซีไมโอโกลบิน (oxymyoglobin ; MbO_2)

2.1.3 โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (intramuscular connective tissue ; IMCT) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ไม่ละลายน้ำ และยังทำหน้าที่พยุงและปกป้องกล้ามเนื้อ เป็นโครงร่าง ช่วยยึดเกาะ และแบ่งแยกเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ โดยมีประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ โปรตีนกลุ่มนี้ประกอบด้วยคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ที่ตั้งอยู่ระหว่างเซลล์ โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในกล้ามเนื้อแบ่งตามการห่อหุ้มได้ 3 ชนิด ได้แก่ 1) เอนโดไมเซียม (endomysium) ทำหน้าที่ห่อหุ้มเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละเส้น 2) เพอริไมเซียม (perimysium) ซึ่งห่อหุ้มมัดของเส้นใยกล้ามเนื้อ และ 3) อีพิไมเซียม (epimysium) ซึ่งห่อหุ้มมัดกล้ามเนื้อ (Purslow. 2005 ; Nishimura. 2010)



ภาพที่ 2.1 องค์ประกอบและโครงสร้างพื้นฐานของกล้ามเนื้อ

ที่มา : Kraemer *et al.* (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของเนื้อสัตว์

องค์ประกอบ	องค์ประกอบย่อย	ปริมาณร้อยละ	แหล่งที่มา
Meat	Water	75%	Tornberg <i>et al.</i> (1997)
	Proteins	20%	
	Fats	3%	
	Other	2%	
Main Proteins	Myofibrillar	50-55%	Tornberg (2005)
	Connective tissue	10-15%	
	Sarcoplasmic	30-34%	
Myofibrillar Proteins	Myosin	43%	Zarkadas <i>et al.</i> (1988)
	Actin	22%	Calculated
	Tropomyosin	5.2%	
	Troponin	5.8%	Calculated
Connective Tissue	Collagen	1-15%*	Nishimura (2010),
	Elastin	0.6-3.7%*	Purslow (2005)

* ปริมาณทั้งหมดในกล้ามเนื้อ (วัตถุแห้ง)

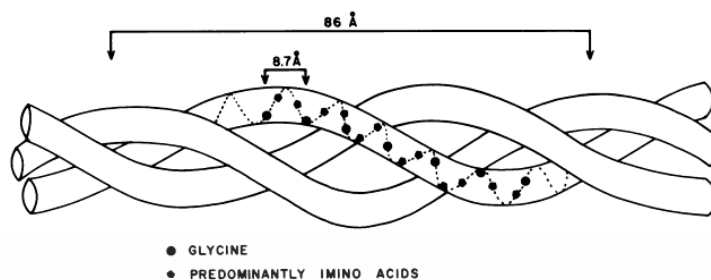
ที่มา : Fareh (2018)

2.1.3.1 คอลลาเจน (collagen)

เป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของสัตว์ และเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยให้ความแข็งแรงแก่กล้ามเนื้อ คอลลาเจนบางส่วนสามารถละลายได้ในสารละลายเกลือ สารละลายกรด และบางส่วนไม่สามารถละลายได้ คอลลาเจนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีประมาณร้อยละ 20 ถึง 25 ของโปรตีนทั้งหมด โมเลกุลของคอลลาเจนเรียกว่า โทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) ซึ่งประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 3 สาย มี 2 สายที่มีลักษณะเหมือนกันเป็นชนิดแอลฟา 1 และอีกสายเป็นชนิดแอลฟา 2 ทั้ง 3 สายพันกันเป็นเกลียว (triple helix) โมเลกุลของโทรโปคอลลาเจนจะเชื่อมต่อกันระหว่างหัวต่อปลาย (head-to-tail) ซึ่งจะต่อเชื่อมกันทำให้เป็นสายขวางบนเส้นใยคอลลาเจน ทำให้โครงสร้างคอลลาเจนมีลักษณะเป็นตาข่าย ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Foegeding *et al.* (1996) ; Burghagen. (1999)) (ภาพที่ 2.2) คอลลาเจนมีสีขาวและมีความยืดหยุ่นต่ำ มักพบในกระดูก เอ็น และหนัง คอลลาเจนมีความสัมพันธ์กับความเหนียวของเนื้อเนื่องจากคอลลาเจนจะแปรสภาพไปเป็น เจลาติน (gelatin) ได้ง่ายเมื่อถูกความร้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งความร้อนชื้น (moisture heat) ดังนั้น กล้ามเนื้อที่มีคอลลาเจนสูงจึงมักทำให้สุกโดยการต้มหรือเคี่ยวเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลานาน เพื่อให้เกิดไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของคอลลาเจน เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การละลายของคอลลาเจนจะเพิ่มขึ้นด้วย



ภาพที่ 2.2 โมเลกุลของโทรโปคอลลาเจน

ที่มา : Vogel and Venugopalan (2003)

2.1.3.2 อีลาสติน (elastin)

เป็นโปรตีนภายนอกเซลล์ที่ไม่ละลายน้ำและมีปริมาณมากเป็นอันดับสองในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Wise and Weiss, 2009) พบมากในเส้นเอ็น (ligaments) และผนังของเส้นเลือด อีลาสตินเป็นเส้นใยที่ให้ความยืดหยุ่นและสามารถทนต่อแรงได้ดี แต่เมื่อมองในมุมมองของเรื่องความนุ่มพบว่าอีลาสตินมีปริมาณค่อนข้างต่ำและไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์ (Brown, 2014)

2.1.3.3 เรติคิวลิน (reticulin)

ประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็ก ซึ่งจะสร้างเป็นโครงข่ายอยู่รอบเซลล์เส้นเลือด ระบบประสาท โดยจะเชื่อมระหว่างเอนโดไมเซียมและชาร์โคเลียมมาที่ห่อหุ้มอยู่รอบเซลล์กล้ามเนื้อ เรติคิวลินจะไม่แปรสภาพไปเป็นคอลลาเจนเมื่อนำไปผ่านการให้ความร้อน

2.2 ความนุ่มของเนื้อสัตว์

ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดคุณภาพของเนื้อสัตว์ ได้แก่ ข้อกำหนดด้านความปลอดภัย สวัสดิภาพสัตว์ และความดีงูคุดทางประสาทสัมผัสของเนื้อสัตว์ เมื่อผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ถูกทำให้สุก ความนุ่ม ความฉ่ำ รสชาติ และกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ต้องเป็นไปตามความต้องการของผู้บริโภค (Aaslyng, 2002) รสชาติและกลิ่นรสสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายโดยการเติมเครื่องเทศหรือเครื่องปรุง ส่วนความฉ่ำสามารถปรับปรุงได้ด้วยการใช้วิธีการปรุงสุกที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามความนุ่มของเนื้อสัตว์ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น โครงสร้างและองค์ประกอบของเนื้อสัตว์ การบ่มเนื้อ การแช่แข็งและการละลาย และอุณหภูมิและระยะเวลาในการปรุงสุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความนุ่มของเนื้อสัตว์เป็นลักษณะที่ทำให้การคาดการณ์เป็นไปได้ยาก แต่เป็นตัวแปรที่สำคัญที่สุดของคุณภาพเนื้อสัตว์ที่มีอิทธิพลต่อการยอมรับและการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค (Gerrard and Grant. 2003) ความนุ่มของเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่จะขึ้นอยู่กับสององค์ประกอบของโครงสร้างเนื้อสัตว์ คือ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และ โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (Marsh and Leet. 1966 ; Nishimura *et al.* 1995 ; Smith and Judge. 1991) ในอดีต “ความเหนียว” ถูกระบุว่าส่วนใหญ่เกิดจากปริมาณและชนิดของคอลลาเจนที่ยึดระหว่างมัดกล้ามเนื้อต่างๆกัน ในขณะที่ตอนหลังถูกระบุว่าเกิดจากโครงสร้างของไมโอไฟบริลลาร์ ซึ่งรวมถึงโครงสร้างของเซลล์ (Bekhit *et al.* 2014 ; Ouali.1990) ในกล้ามเนื้อที่นุ่มจะมีปริมาณคอลลาเจนต่ำกว่าในกล้ามเนื้อที่เหนียว (Keith *et al.* 1985) Torrescano *et al.* (2003) ได้ทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าแรงตัดผ่านเนื้อ ปริมาณคอลลาเจน และความยาวของซาร์โคเมอร์ของกล้ามเนื้อโค 14 ชนิด และแสดงให้เห็นว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณของคอลลาเจนทั้งหมดและคอลลาเจนที่ไม่ละลายน้ำ การลดลงของความยาวของซาร์โคเมอร์จะทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นและส่งผลให้มีความนุ่มที่ลดลง (Herring *et al.* 1965)

โดยปกติแล้วก่อนรับประทานเนื้อสัตว์จะต้องนำไปผ่านความร้อนก่อน ดังนั้นสิ่งที่สำคัญคือต้องมีความเข้าใจเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการทำให้สุก อุณหภูมิและเวลาในการทำให้เนื้อสุกมีอิทธิพลอย่างมากต่อคุณสมบัติทางกายภาพและคุณภาพด้านการกิน ปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการควบคุมความเหนียวของเนื้อสัตว์ คือ โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญของเนื้อสัตว์เมื่อได้รับความร้อน เช่น เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายการหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ เกิดการรวมตัวกันและการเกิดเจลของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและ โปรตีนซาร์โคพลาสติก และการหดตัวและการละลายของโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (García- Segovia *et al.* 2007 ; Tornberg. 2005)

ความเหนียวหรือความนุ่มของเนื้อสัตว์จะถูกกำหนดโดยความสามารถในการเคี้ยวหรือการกัด ความนุ่ม ความน้ำน้ำ และกลิ่นรส ซึ่งถือเป็นองค์ประกอบหลักของคุณภาพทางประสาทสัมผัสของอาหาร เมื่อเนื้อสัตว์ถูกเคี้ยวจะทำให้เกิดการผิรูปและแตกหักของโครงสร้าง โดยแรงที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ แรงในการตัด บีบอัด และแรงดึง การวิเคราะห์หาความนุ่มของเนื้อสัตว์จากการศึกษาส่วนใหญ่มักใช้การทดสอบแรงเฉือน (Warner-Bratzler (WB) shear test) ซึ่งจะเกี่ยวกับการตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างให้มีแนวการเรียงตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อในทิศทางตั้งฉากกับใบมีดของเครื่อง เมื่อเนื้อสัตว์ถูกปรุงสุกที่อุณหภูมิ 50 ไปจนถึง 65 องศาเซลเซียส จะพบว่ามีความนุ่มลดลง และจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 80 องศาเซลเซียส (Baldwin. 2012)

นอกจากนี้พันธุสัตว์เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อและคุณภาพของเนื้อ โดยพบว่าโคเขตร้อน (*Bos indicus*) เนื้อจะมีความนุ่มน้อยกว่าโคเขตหนาว (*Bos taurus*) ซึ่งมีสาเหตุเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์คาลปาสแตติน (calpastatin) ที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากการฆ่า ซึ่งโคเชตร้อนจะมีเอนไซม์คาลปาสเตตินในเนื้อสูงกว่าโคเชตหนาว โดยเอนไซม์คาลปาสเตตินมีหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาลเพน (calpain) จึงทำเนื้อโคเชตร้อน มีแนวโน้มของความนุ่มเนื้อและคุณภาพในการบริโภคที่ต่ำกว่าเนื้อโคเชตหนาว

2.2.1 ความนุ่มเนื่องจากเอนไซม์ภายในเนื้อ

เอนไซม์คาลเพนและคาร์เทปซินเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเพิ่มความเหนียวของแอตโตไมโอซิน เนื่องจากเป็นตัวเร่งการสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ เนื่องจากเมื่อซากสัตว์เข้าสู่การเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ซึ่งเกิดจากการยึดเกาะกันของแอคตินและไมโอซิน เนื่องจากไม่มี ATP จึงทำให้เกิดเนื้อที่มีลักษณะเหนียว หลังจากนั้นไม่นานเอนไซม์คาลเพนและคาร์เทปซินจะทำงาน ทำให้โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายและเนื้อจะนุ่มขึ้น (Brevie. 2007)

2.2.2 เทคนิคสำหรับการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์

2.2.2.1 กระบวนการทางกายภาพ

การปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์ด้วยกระบวนการทางกายภาพ ได้แก่ วิธีการกระตุ้นโดยใช้กระแสไฟฟ้า (Hwang *et al.* 2003), การใช้คลื่นอัลตราซาวด์กำลังสูง (Jayasooriya *et al.* 2007) การบ่ม การใช้ระบบการแช่เยือกแข็งและการละลาย (freezing-thawing cycle) ((Lagerstedt *et al.* 2008 ; Leygonie *et al.* 2012) การใช้กระบวนการกระตุ้นด้วยพลังงานคลื่นกระแทก (shockwave processing) (Bolumar *et al.* 2013) กระบวนการใช้ความดันสูง (high hydrostatic pressure) (Jung *et al.* 2000) และ การใช้วิธีการทางกล เช่น การสไลด์ การบด การเจาะแทง และการสับหรือทุบให้เนื้อนุ่ม

การทำให้เนื้อนุ่มด้วยวิธีทางกล หรือเรียกอีกอย่างว่าการทำให้เนื้อนุ่มด้วยใบมีด โดยเป็นการใช้ใบมีดทำลายเส้นใยกล้ามเนื้อ ทั้งนี้การทำให้เนื้อนุ่มด้วยวิธีทางกลมีข้อเสียคือสามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่อยู่ผิวหน้าเนื้อเข้าสู่ภายในชั้นเนื้อได้ ด้วยเหตุนี้ทำให้การทำให้เนื้อนุ่มด้วยวิธีทางกลจึงจำเป็นต้องมีการพาสเจอร์ไรซ์หรือทำให้สุกก่อนรับประทาน (Baldwin. 2012 ; Juárez *et al.* 2011) และการทำให้เนื้อนุ่มด้วยวิธีนี้อาจส่งผลเสียต่ออายุการเก็บรักษา สี การสูญเสียเนื้อระหว่างการเก็บรักษาหรือการสูญเสียเนื้อภายหลังการปรุงสุก และอัตราผลผลิตของเนื้อสด (Kerry and Ledward. 2009)

2.2.2.2 กระบวนการทางเคมี

ในอดีตการแปรรูปทางอุตสาหกรรมวิธีการทางเคมีถือว่ามีความสำคัญในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ (Bekhit *et al.* 2014) ตัวอย่างวิธีการทางเคมี ได้แก่ การหมัก การฉีด และการแช่ด้วยสารละลายเคมี (เช่น เกลือแคลเซียม เกลือโซเดียม และเกลือฟอสเฟต) หรือสารละลายที่ใช้หมักทางการค้าที่มีส่วนประกอบของมอลโตเด็กซ์ตรินและแป้ง แคลเซียมสามารถกระตุ้นเอนไซม์ภายนอกได้ (เช่น เอนไซม์คาลเพน) โซเดียมคลอไรด์สามารถเพิ่มการสักระบาย

โปรตีนในขณะที่ฟอสเฟตสามารถช่วยปรับปรุงความชุ่มชื้นในเนื้อสัตว์ได้ อย่างไรก็ตามสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์โดยไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล้ามเนื้อบางส่วนที่มีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหนาแน่นสูงของสัตว์ที่มีอายุมากจะมีความสามารถของเอนไซม์โปรติโอลลิติกภายในกล้ามเนื้อที่ไม่เพียงพอ (Veiseth *et al.* 2004) จากสถานการณ์เช่นนี้จึงทำให้การใช้โปรติเอสจากภายนอกสามารถปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์ได้อย่างมีประสิทธิภาพกว่าการใช้สารเคมี

1) การแช่น้ำเกลือ (brining)

การแช่น้ำเกลือเป็นการละลายโครงสร้างบางส่วนที่ทำหน้าที่ในการรองรับและค้ำจุนเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นการขัดขวางการรวมตัวหรือการก่อตัวอย่างหนาแน่นของเส้นใยกล้ามเนื้อ อีกทั้งยังช่วยให้เนื้อสามารถดูดซับน้ำได้ 10 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเนื้อ (McGee. 1984) จากการศึกษาของ Offer *et al.* (1989) ได้ระบุว่าเส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการขยายตัวออกทางด้านข้างและสามารถอุ้มน้ำได้ และจากการศึกษาของ Juárez *et al.* (2011) พบว่าการปรุงรสด้วยเกลือก่อนปรุงสุกจะช่วยเพิ่มความชุ่มชื้น ความนุ่ม และสีน้ำตาล อีกทั้งยังพบว่าการฉีดสารละลายโวลเคียมคลอไรด์ (โดยเฉพาะสารละลายฟอสเฟต) มีประสิทธิภาพสูงในการเพิ่มความนุ่มและความชุ่มชื้นของเนื้อสัตว์ และการฉีดเกลือแคลเซียมจะช่วยกระตุ้นระบบเอนไซม์คาลเพน แต่อาจทำให้เสียรสชาติ โดยอีกทางเลือกอื่นที่ให้ผลลัพธ์คล้ายคลึงกับแคลเซียมคลอไรด์และฟอสเฟต แต่ไม่มีผลต่อรสชาติคือสารละลายที่มีส่วนผสมของแอมโมเนียม

2) การหมัก (marinating)

การหมักเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ก่อนการทำให้เนื้อนุ่ม น้ำหมักที่ใช้ส่วนใหญ่มีความเป็นกรดเนื่องจากมีส่วนผสมของน้ำส้มสายชู ไวน์ น้ำผลไม้ บัตเตอร์มิลค์ และโยเกิร์ต สารละลายที่เป็นกรดจะไปยับยั้งการเกิดพันธะไฮโดรเจนของเส้นใยคอลลาเจนจึงทำให้เกิดการขยายตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน การใช้แอลกอฮอล์ในการหมักเนื้อร่วมกับกรดจะช่วยเพิ่มการแพร่กระจายของน้ำหมัก เนื่องจากแอลกอฮอล์สามารถละลายได้ในไขมัน (Juárez *et al.* 2011) แต่อย่างไรก็ตามการใช้แอลกอฮอล์จะทำให้เกิดการพองตัวของถุงสุญญากาศในระหว่างการปรุงสุกเนื่องจากความดันไอของแอลกอฮอล์ที่ต่ำลง (Baldwin. 2012) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดผลกระทบทางการค้า โดยจะเป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่สดและไม่สามารถขายได้ในตลาดสากล

2.2.2.3 กระบวนการทางเอนไซม์

เอนไซม์บางชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์ แหล่งของเอนไซม์ที่ใช้มาจากพืช หรือจุลินทรีย์ เช่น เชื้อรา และเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีการต่างๆ ได้แก่ การฉีดเข้าไปภายในชิ้นเนื้อ การหมักหรือการแช่ และการฉีดพ่นที่พื้นผิวภายนอก เอนไซม์ที่ได้จากพืชที่ใช้กันทั่วไป ได้แก่ ปาเปน (papain) จากมะละกอ บรอมีเลน (bromelain) จากสับปะรด ไฟซิน (ficin) จากผลมะเดื่อ ซิงกิเปียน (zingibain) จากขิง และแอคตินิดิน (actinidin) จากกีวี

2.3 เอนไซม์โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนหรือที่มีชื่อเรียกทั่วไปว่าเพปติเดส (peptidase) โปรติเอส (protease) โปรติเนส (proteinase) และโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) เป็นหนึ่งในตระกูลเอนไซม์ที่เก่าแก่และมีความหลากหลายมากที่สุดที่รู้จักและมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของสิ่งมีชีวิตทุกด้าน อีกทั้งยังจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะต่างๆด้วยน้ำ (hydrolytic enzyme หรือ hydrolase) ที่มีขนาดใหญ่และซับซ้อนซึ่งย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนขนาดเล็ก

การแยกกลุ่มของเอนไซม์ย่อยโปรตีนในสมัยแรกๆได้มีการแยกตามขนาดโมเลกุล ประจุ หรือความจำเพาะต่อสับสเตรท ต่อมาได้มีการจัดจำแนกอย่างเป็นระบบมากยิ่งขึ้นโดยอาศัยการเปรียบเทียบบริเวณเร่ง กลไกการเร่ง และโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีการกลุ่มของกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งต่างกัน ทำให้เกิดโครงรูปที่จำเพาะของบริเวณนั้นๆ ซึ่งเป็นผลทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนมีความจำเพาะต่อการเร่งปฏิกิริยาได้แตกต่างกัน การจำแนกเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถจำแนกได้เป็น 2 ประเภท คือ การจำแนกตามลักษณะของสับสเตรท และการจำแนกตามตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยา

การจำแนกตามลักษณะของสับสเตรทมี 2 ชนิด คือ โปรติเนส ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์ของสายโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ และ เพปติเดส ทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเพปไทด์สายสั้นให้มีขนาดเล็กลงหรือเป็นกรดอะมิโน (Dalling, 1972)

การจำแนกตามตำแหน่งการเกิดปฏิกิริยามี 2 ชนิด คือ เอ็กโซเพปติเดส (exopeptidase) และเอนโดเพปติเดส (endopeptidase)

2.3.1 เอ็กโซเพปติเดส (exopeptidase)

คือเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะจากปลายด้านคาร์บอกซีหรือปลายด้านอะมิโนของสับสเตรท ทำให้สามารถแบ่งเอ็กโซเพปติเดสได้เป็นอะมิโนเพปติเดส (aminopeptidase) และคาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) (Reo *et al.* 1998)

2.3.1.1 อะมิโนเพปติเดส (aminopeptidase) จะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายอะมิโนอิสระ (N-terminal) ของสายโพลีเพปไทด์ได้กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวโดเพปไทด์ และไตรเพปไทด์ อะมิโนเพปติเดสสามารถพบได้ในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งแบคทีเรียและรา

2.3.1.2 คาร์บอกซีเพปติเดส (carboxypeptidase) จะเกิดปฏิกิริยาที่ตำแหน่งปลายคาร์บอกซี (C-terminal) ของสายโพลีเพปไทด์ได้กรดอะมิโนโมเลกุลเดี่ยวหรือโดเพปไทด์ คาร์บอกซีเพปติเดสสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆตามลักษณะของกรดอะมิโนบริเวณเร่งของเอนไซม์ คือ ซีรีน คาร์บอกซีเพปติเดส (serine carboxypeptidase) เมทัลโล คาร์บอกซีเพปติเดส (metallo carboxypeptidase) และซิสเตอีนคาร์บอกซีเพปติเดส (cysteine carboxypeptidase)

2.3.2 เอนโดเปปติเดส (endopeptidase)

เป็นเอนไซม์ที่เกิดปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ภายในสายของโพลีเพปไทด์ทางปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซี ซึ่งกลุ่มของอะมิโนและคาร์บอกซีอิสระจะมีผลกระทบในทางลบต่อกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์โปรติเอสที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส ซึ่งสามารถแบ่งออกได้ 4 กลุ่มย่อยตามลักษณะทางการเร่งปฏิกิริยาหรือกลไกการทำงาน คือ ซีรีนโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอส (serine protease หรือ alkaline protease) แอสปาร์ติกโปรติเอสหรือแอสิดโปรติเอส (aspartic protease หรือ acid protease) ซีสเตอินโปรติเอสหรือไทออลโปรติเอส (cysteine protease หรือ thiol protease) และเมทัลโลโปรติเอส (metalloprotease) (Reo *et al.* 1998)

2.3.2.1 ซีรีนโปรติเอส (serine protease) หรืออัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์คือ 7 ถึง 11 และอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส (Outtrup and Boyce. 1990) มีหมู่ฮิสติดีนตรงบริเวณเร่ง ซึ่งจะถูกยับยั้งโดย DFP (diisopropyl-phospho-fluoridate) ที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ -OH ของอนุมูลซีรีล (seryl residue) ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์กลุ่มนี้ผลิตได้ทั้งในเชื้อราและแบคทีเรีย โดยเฉพาะในแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส (*Bacillus spp.*) เป็นส่วนใหญ่ ได้แก่ *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* และ alkalophilic *Bacillus* ซึ่งเอนไซม์จะถูกสร้างและปล่อยออกเป็นอิสระในน้ำเลี้ยงเชื้อ (extracellular enzyme) และอาจสร้างไปพร้อมกับนิวทรัลโปรติเอสหรืออาจมีการสร้างนิวทรัลโปรติเอสก่อนการสร้างแอลคาไลน์โปรติเอส (Halpern. 1981) ซีรีนโปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ ซีรีนแอลคาไลน์โปรติเอส (serine alkaline protease) และซับทิลิซิน (subtilisins)

1) ซีรีนแอลคาไลน์โปรติเอส (serine alkaline protease) สามารถผลิตได้จากแบคทีเรีย ยีสต์ และรา เป็นต้น พีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 9 แบคทีเรียที่ผลิตซีรีนแอลคาไลน์โปรติเอส เช่น *Arthrobacter*, *Streptomyces* และ *Flavobacterium spp.* เป็นต้น

2) ซับทิลิซิน (subtilisins) มักพบการสร้างในแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Subtilisin Carlsberg ที่ผลิตได้จาก *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus pumilus* และ Subtilisin BPN (Bacterial Protease Nagarase) หรือ Subtilisin NOVO :ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus amyloliquefaciens*

2.3.2.2 ซิสเตอินโปรติเอส (cystein protease) หรือไทออลโปรติเอส (thiol protease) เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีหมู่ sulfhydryl อยู่ตรงบริเวณเร่ง ส่วนใหญ่สามารถทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง คือ 6 ถึง 7.5 และมีความคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 60 ถึง 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulfhydryl reagents หรือ sulfhydryl group (-SH) ตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ชนิดนี้ได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* และ *Bacillus subtilis* เป็นต้น (Priest. 1985)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.3 แอซิดโปรติเอส (acid protease) หรือแอสปาร์ติกโปรติเอส (aspartic protease) เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ช่วงพีเอช 3 ถึง 4 และมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีหมู่แทนที่เป็นวงแหวน และกรดอะมิโนที่มีขนาดใหญ่ เช่น ไทโรซีนและฟีนิลอะลานีน เอนไซม์ชนิดนี้สามารถพบได้ส่วนใหญ่ในราและยีสต์ แต่พบได้น้อยมากในแบคทีเรีย แบ่งออกเป็น 2 พวกโดยสมบัติทางกายภาพ คือ pepsin-like acid protease ที่ผลิตโดย *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* และ *Neurospora* (Reo *et al.* 1998) มักนำไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพของแป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง และใช้ย่อยโปรตีนของถั่วเหลืองในอุตสาหกรรมการทำซีอิ๊ว (soy sauce) และอีกพวกคือ rennin-like acid protease ที่ผลิตโดย *Mucor spp.*, *Endothia* และ *Rhizomucor miehei* (Yamashita *et al.* 1987 ; Preetha and Boopathy. 1997) เอนไซม์กลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าว และธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุเติมในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว รวมไปถึงอุตสาหกรรมขนมอบและเนยแข็ง

2.3.2.4 เมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) หรือนิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) เอนไซม์กลุ่มนี้ช่วงปฏิกิริยาที่พีเอชเป็นกลางคือ 6.5 ถึง 7.5 และมีไอออนของโลหะเป็นส่วนประกอบที่บริเวณเร่ง โดยอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่มนี้จึงถูกยับยั้งด้วย EDTA เอนไซม์ชนิดนี้พบได้ทั่วไปในแบคทีเรียและรา โดยเฉพาะในกลุ่มแบคทีเรียบาซิลลัสหลายชนิด เช่น *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* และ *Bacillus thermoproteolyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะเมทัลโลโปรติเอสเท่านั้น (Prist. 1977) แต่ใน *Bacillus subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งเมทัลโลโปรติเอสและซีรีนโปรติเอส นอกจากนี้ยังมี *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus pumilis* และ *Bacillus polymyxa* (Griffin and Forgy. 1973) เป็นต้น เมทัลโลโปรติเอสจะรวมถึงเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ เช่น คอลลาจีเนส (collagenases) จากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สารพิษฮีโมราจิก (hemorrhagic toxins) จากงูพิษ และเทอร์โมไลซิน (thermolysin) จากแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเสถียรน้อยกว่าซีรีนโปรติเอสจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่พบว่ามีนำมาใช้ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมผลิตเบียร์ การทำขนมอบ การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร

2.4 เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase)

เอนไซม์คอลลาจีเนสเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดหนึ่งในกลุ่มของเอนไซม์โปรติเอสที่สามารถย่อยสลาย native collagen ซึ่งเป็นโปรตีนคอลลาเจนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และยากต่อการย่อยสลาย (Tran and Nagano. 2002) เอนไซม์คอลลาจีเนสที่รู้จักในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เพปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) หรือจากพืช คือ ปาเปน (papain) (Harrington. 1996) เอนไซม์คอลลาจีเนสสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ เช่น *Clostridium*

histolyticum (Matsushita *et al.* 1999), *Bacillus subtilis* (Nagano and To. 1999) และจากเชื้อกลุ่ม

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาซิลลัสชนิดอื่น จุลินทรีย์เหล่านี้สามารถคัดแยกได้จากดิน อาหารที่มีการหมักปลา เช่น น้ำปลา โดยทั่วไปเอนไซม์คอลลาจิเนสที่ย่อยสลายคอลลาเจนจัดเป็นเมทัลโลโปรตีเอส (Tsuruoka *et al.* 2003) บางชนิดจัดเป็นซีรีน โปรตีเอสและโปรตีเอสอื่นๆรองลงมา (Watanabe. 2004)

2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนส

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสให้มีการเจริญของเชื้อสูงและมีการผลิตเอนไซม์คอลลาจิเนสปริมาณสูงมีดังนี้

2.4.1.1 อาหาร

คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่แหล่งคาร์บอนจะเป็นพวกคาร์โบไฮเดรต เช่น แป้ง กลูโคส ซูโครส อะราบินอส เป็นต้น ซึ่งแหล่งน้ำตาลจะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้เร็ว และผลิตเอนไซม์ได้สูง กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้โดยง่ายในช่วง stationary phase เมื่อแหล่งอาหารและพลังงานน้อยลง เชื้อจะเริ่มสร้างสปอร์พร้อมกับเอนไซม์ แต่ถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณกลูโคสที่มากเกินไป กลูโคสจะกวดการทำงานของการควบคุมการสร้างเอนไซม์ (catabolite repression) (Doi. 1973 ; Bemlohr. 1964)

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเช่นกัน แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อของจุลินทรีย์มีทั้งสารอินทรีย์ที่เป็นสารผสมเชิงซ้อน เช่น ยีสต์สกัด เปปโตน ทริปโตน และสารที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโน เช่น โปรตีนต่างๆ และแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น แกลือแอมโมเนียม และแกลือไนเตรท แต่การผลิตเอนไซม์โปรตีเอสนิยมใช้โปรตีนชนิดต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสจะถูกสร้างขึ้นเพื่อทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเพปไทด์ของสายโพลีเพปไทด์ในโปรตีน โปรตีนที่นิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อจุลินทรีย์ คือ เจลาติน จากการศึกษาของ Lama *et al.* 2005 ซึ่งศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสจากเชื้อ *Salinivibrio* genus ที่คัดแยกจากน้ำทะเล ในอาหาร saline solution yeast extract (SSY medium) ที่มีพีเอชเท่ากับ 9 และศึกษาการเติมเจลาตินเพิ่มลงในอาหารที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 และ 12 (กรัมต่อลิตร) เปรียบเทียบกับที่ไม่เติมเจลาติน พบว่าการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเจลาตินเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตเอนไซม์โปรตีเอสได้สูงกว่าอาหารที่ไม่เติมเจลาติน

ฟอสเฟตมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์สารพันธุกรรม (DNA and RNA) และโปรตีน การย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต และการหายใจของเซลล์รวมถึงควบคุมระดับ ATP ในกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์โปรตีเอส ฟอสเฟตจะมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรของ mRNA โดยการยับยั้งการทำงานของ RNase และช่วยให้เอนไซม์ที่สร้างขึ้นถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ได้ดีขึ้น แต่หากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณฟอสเฟตที่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกวดกันการสร้างโปรตีเอสได้ (Moon and Parulekar. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอออนของโลหะมีส่วนสำคัญในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) มีความสำคัญและจำเป็นต่อการเจริญ การแบ่งตัว ขนาดและรูปร่างของเชื้อ มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ในการเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณแมกนีเซียมมากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญและกีดกันการสร้างเอนไซม์ (Wabb. 1949) ส่วนไอออนอื่นๆ เช่น แมงกานีส (Mn) และเหล็ก (Fe) พบว่าเป็นโคแฟกเตอร์สำหรับเอนไซม์หลายชนิดในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไนโตรเจน โดยมีกลูตามีน-ซินทิเตสเป็นเอนไซม์สำคัญในการใช้ในโตรเจนจากอนินทรีย์ในโตรเจน (John and David. 1991) นอกจากนี้ยังมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ซึ่งมีส่วนช่วยในการเพิ่มความเสถียรให้กับเอนไซม์ที่อุณหภูมิสูงๆ (Raja *et al.* 1993)

2.4.1.2 พีเอซเริ่มต้น

พีเอซในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอส ตลอดจนโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อาจมีพีเอซที่เหมาะสมต่อการเจริญแตกต่างจากพีเอซที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ ซึ่งเชื้อชนิดเดียวกันอาจมีพีเอซที่เหมาะสมต่างกันขึ้นอยู่กับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสถานะอื่นๆ

2.4.1.3 อุณหภูมิ

การผลิตเอนไซม์ให้ได้ปริมาณมากและมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่คืนนั้นจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ คือต้องเลี้ยงในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์ และอาจต่างจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ด้วย จุลินทรีย์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มตามอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ คือ กลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส (psychrophiles) กลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิห้องประมาณ 40 องศาเซลเซียส (mesophiles) และกลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (thermophiles)

2.4.1.4 การให้อากาศและการกวน

การเติมอากาศและการกวนจะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการผลิตเอนไซม์ โดยเฉพาะขนาดของถังหมัก ชนิดของจุลินทรีย์ และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะขึ้นอยู่กับอัตราการกวนและการให้อากาศภายในถังหมัก ซึ่งปริมาณออกซิเจนที่พอเหมาะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และการสร้างเอนไซม์ ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำจะทำให้เชื้อใช้กลูโคสไม่สมบูรณ์ ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อลดลง (Moon and Parulekar. 1991)

2.5 แหล่งของเอนไซม์โปรติเอส

2.5.1 เอนไซม์จากพืช (Plant-derived enzymes)

ปาเปน (papain) (EC 3.4.22.2) เป็นเอนไซม์ที่สกัดจากน้ำยางของต้นมะละกอมีการทำงานของเอนไซม์ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างกว้างที่ 5 ถึง 8 และมีกิจกรรมที่ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงถึง 65 องศาเซลเซียส (Smith and Hong-Shum, 2003) ปาเปนมีความสามารถในการปรับปรุงความนุ่มได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับบรอมีเลน ไฟซิน และจิงสิดที่ผ่านการผสมกับเอนไซม์จากจุลินทรีย์บางชนิด แต่ให้ผลที่เป็นลบกับเนื้อสัตว์ในด้านความฉ่ำน้ำและคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส (Sullivan and Calkins, 2010)

บรอมีเลน (bromelain) เป็นเอนไซม์จากสับปะรด รวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากก้านสับปะรด (EC3.4.22.32) และผลไม้ (EC3.4.22.33) มีการทำงานของเอนไซม์ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่แคบกว่าคือ 5 ถึง 7 และแสดงกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เมื่อเทียบกับปาเปน เมื่อใช้ในเนื้อสัตว์จะเพิ่มความนุ่ม และลดปริมาณคอลลาเจนได้มากกว่าโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ (Sullivan and Calkins, 2010)

ไฟซิน (ficin) (EC 3.4.22.3) เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากน้ำยางของมะเดื่อ (Kramer and Whitaker, 1964) กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 8 และที่อุณหภูมิ 45 ถึง 55 องศาเซลเซียส และมีความเฉพาะเจาะจงสำหรับย่อยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (Schwimmer, 1981)

ซิงกิเบียน (zingibain) กิจกรรมสูงสุดจะสังเกตได้ในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 6 ถึง 7 และที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จึงมีความสำคัญต่อความนุ่มเนื้อสัตว์ แต่มีข้อจำกัดเนื่องจากรสชาติ การใช้จึงได้รับการรับรองว่าเป็นสารที่โดยทั่วไปแล้วถือว่าปลอดภัย (Generally Recognised as Safe; GRAS) โดยองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา (Food and Drug Administration of United States; FDA) แต่ยกเว้นซิงกิเบียน อย่างไรก็ตามได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นจากการใช้ซิงกิเบียน เนื่องจากมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นต่อการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Ha *et al.* 2012)

แอคตินิดิน (actinidin) หรือแอคตินิเดียน (actinidain) (EC.3.4.22.14) สกัดได้จากผลกีวี่สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของกีวี่จะมีระดับของแอคตินิดินที่ต่างกัน กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (Ha *et al.* 2013) และที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 7 (Boyes *et al.* 1997) การประยุกต์ใช้แอคตินิดินในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์มีแนวโน้มลดลงเนื่องจากความจำเพาะที่กว้างกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่นๆ (Toohey *et al.* 2011)

2.5.2 เอนไซม์จากจุลินทรีย์ (Microbial proteases)

โปรตีนเอสจากจุลินทรีย์อาจประกอบด้วย โปรตีนเอสที่เป็นกลาง (Neutral protease) อัลคาไลน์โปรตีนเอส (Alkaline protease) และแอสปาร์ติกโปรตีนเอส (Aspartic protease) จากเชื้อรา และแบคทีเรีย การใช้เอนไซม์จากสายพันธุ์ของเชื้อราถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารแบบดั้งเดิม เช่น ซอสถั่วเหลือง และมิโซะ เป็นเวลานานในประวัติศาสตร์และกิจกรรม โปรตีนของแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ได้รับการศึกษามานานหลายปี เอนไซม์เหล่านี้มักจะมีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ แต่มีผลในการย่อยคอลลาเจนและอีลาสติน (Bekhit *et al.* 2014) โปรตีนเอสจาก *Bacillus subtilis* และ *Aspergillus oryzae* สามารถย่อยโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ดีกว่าโปรตีนคอลลาเจน และส่งผลดีต่อการประเมินทางประสาทสัมผัส โดยทั่วไปโปรตีนเอสจากจุลินทรีย์จะทำปฏิกิริยาในช่วง pH ที่กว้าง และมีกิจกรรมที่ค่อนข้างเฉพาะ (Ashie *et al.* 2002 ; Bekhit *et al.* 2014)

2.6 กระบวนการซูวี (Sous vide)

2.6.1 ความหมายของกระบวนการซูวี

Sous vide เป็นภาษาฝรั่งเศส หมายถึง “ภายใต้สุญญากาศ” การปรุงอาหารด้วยการซูวีถูกให้คำนิยามว่า “วัตถุดิบ หรือวัตถุดิบของอาหารกึ่งแข็งที่ปรุงสุกภายใต้สภาวะการควบคุมอุณหภูมิและเวลาในถุงสุญญากาศ (Schellekens. 1996) การซูวีแตกต่างจากวิธีการทำอาหารแบบดั้งเดิม คืออาหารถูกบรรจุและปิดผนึกแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกที่ทนความร้อนและถูกให้ความร้อนโดยการนำไปแช่ในน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ การปิดผนึกสุญญากาศมีประโยชน์ คือช่วยให้ความร้อนสามารถถ่ายโอนจากน้ำหรือไอน้ำ ไปยังอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ สามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาอาหารโดยลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนระหว่างการเก็บรักษา ยับยั้งกลิ่นรสที่ไม่พึงประสงค์จากการเกิดออกซิเดชัน และป้องกันการสูญเสียของรสชาติและความชื้นในระหว่างการปรุงอาหาร (Church and Parsons. 2000) อีกทั้งยังทำให้ อาหาร เช่น เนื้อสัตว์มีอุณหภูมิตามที่กำหนดอย่างสม่ำเสมอตั้งแต่ขอบจนถึงภายในชิ้นเนื้อ

อาหารที่ผ่านกระบวนการซูวีแล้วสามารถนำมาปรุงเพิ่มเติมหรือจัดเสิร์ฟได้ทันที หรือเก็บรักษาแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 0 ถึง 3 องศาเซลเซียส โดยต้องผ่านการให้ความร้อนอีกครั้งก่อนนำมาบริโภค ซึ่งในการเก็บรักษาแช่เย็นอาจจะต้องคำนึงถึงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่มที่ไม่ต้องการอากาศ เช่น *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ดังนั้นเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตและสร้างสารพิษจึงต้องมีการ ควบคุมความปลอดภัยหรือชะลอการเกิดเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าว เช่น การใช้สารต้านการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ การควบคุมระยะเวลาและอุณหภูมิในการทำให้เย็นทันที และการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษา

2.6.2 กระบวนการซูวีในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

2.6.2.1 การซูวีโดยใช้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรส์

กระบวนการซูวีด้วยวิธีการใช้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 100 องศาเซลเซียส จากข้อมูลในบทความวิจัยของ Mar *et al.* (2013) และ José and Antonio. 2012 พบว่า มีกระบวนการแปรรูปที่มีการใช้กระบวนการซูวีใน 2 ลักษณะคือ

1) การใช้อุณหภูมิต่ำ - เวลานาน (LTLT : Low Temperature - Long Time)

เป็นการใช้ความร้อนต่ำ โดยจากผลงานวิจัยของ Vaudagna *et al.* (2002) พบว่า การซูวีเนื้อโคส่วนสะโพกที่อุณหภูมิ 50 ถึง 65 องศาเซลเซียส ช่วยให้เนื้อมีความนุ่มขึ้น นอกจากนี้เนื้อยังคงมีสีแดงชมพูระเรื่อของเนื้ออยู่ ช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนได้ดีที่สุด (Vaudagna *et al.*, 2008) และช่วยรักษาคคุณค่าทางโภชนาการไว้โดยเฉพาะวิตามินบี 3 และบี 12 (Massimiliano *et al.*, 2004)

2) การใช้อุณหภูมิสูง-เวลาสั้น (HTST : High Temperature-Short Time)

วิธีนี้ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าวิธีแรก แต่ใช้เวลาน้อยกว่า คือ อุณหภูมิที่ใช้อยู่ในช่วง 70 ถึง 100 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fandos *et al.* (2005) ได้ทำการซูวีเนื้อปลาแซลมอนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที Massimiliano *et al.* (2004) ได้ทำการซูวีเนื้อวัวส่วนสะโพกพบว่าการซูวีที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื้อวัวมีการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการโดยเฉพาะวิตามินบี 12 สูง และมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แข็งขึ้น เนื่องจากการใช้ความร้อนระดับสูงทำให้โปรตีนไมโอไฟบริลเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ เกิดการรวมกลุ่มเป็นก้อน โปรตีนที่แข็งขึ้นและเมื่ออุณหภูมิสูงมากกว่า 70 องศาเซลเซียส ระหว่างสายเปปไทด์ของแอกโตไมโอซินจะเกิดพันธะไดซัลไฟด์ทำให้เนื้อมีความเหนียวมากขึ้น (Cross *et al.*, 1986)

2.6.2.2 การซูวีโดยใช้ความดันสูง

การใช้ความดันสูงในการแปรรูปอาหารเป็นกระบวนการแปรรูปที่ไม่ใช้ความร้อน (non thermal processing) หรืออาจทำให้เกิดความร้อนขึ้นน้อยมาก เกิดจากการกดอัดในระหว่างการให้ความดัน (pressurization) หรือที่เรียกว่า adiabatic heat อยู่ในช่วงตั้งแต่ 100 ถึง 1000 เมกะปาสคาล (Megapascal, MPa) ซึ่งอาหารที่ผ่านการแปรรูปภายใต้ความดันสูงนี้ คุณค่าอาหารจะถูกทำลายน้อย สามารถรักษาสีและลักษณะปรากฏได้ดี จึงทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารยังคงรักษาความสดและรสชาติได้ใกล้เคียงกับธรรมชาติเมื่อเทียบกับกระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อน (เบญจวรรณ, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับ Sikes *et al.* (2013) ใช้ความดันสูง (200 MPa 76 องศาเซลเซียส 20 นาที) ในการแปรรูปเนื้อสัตว์ ทำให้เนื้อวัวมีความนุ่มและมีความชื้นสูง การสูญเสีย น้ำหนักต่ำกว่าร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับการให้ความร้อนอื่นที่สูญเสีย น้ำหนักมากกว่าร้อยละ 30

การซูวีภายใต้ความดันสูงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะใช้ความดันอยู่ในช่วง 260 ถึง 600 MPa โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้拿去ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบจะถูกบรรจุในถุงพลาสติกแล้วปิดผนึกแบบสุญญากาศ จากนั้นนำมาให้ความดันในหม้อหรือถัง (vessel) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิ ความดัน และเวลาให้สามารถทำงานได้ตามต้องการ Picouet *et al.* (2011) ใช้เทคนิคซูวีในการปรับปรุงคุณภาพของเนื้อปลาแซลมอน โดยใช้ความดันที่ 310 MPa พบว่าเนื้อปลามีค่าความแน่นลดลงเมื่อเพิ่มความดันสูงขึ้นและสามารถช่วยยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ได้นาน 6 วัน

2.6.3 ผลของความร้อนต่อความนุ่มของเนื้อสัตว์

2.6.3.1 ผลของความร้อนและเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเนื้อสัตว์

การให้ความร้อนกับเนื้อสัตว์มีวัตถุประสงค์เบื้องต้นสามประการ คือ เพื่อให้เนื้อสัตว์มีความปลอดภัย เพื่อทำให้เกิดความนุ่ม และเพื่อพัฒนาและปรับปรุงรสชาติ และจากตามทีก้าวไว้ข้างต้น วิธีการทางชีวเคมีและวิธีการทางกลมีความสำคัญต่อการทำให้เนื้อนุ่ม แต่อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีประสิทธิภาพค่อนข้างน้อยกว่าวิธีการทำให้นุ่มด้วยความร้อน การทำให้เนื้อนุ่มด้วยความร้อนเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการอื่นๆ และส่งผลให้คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของเนื้อสัตว์ลดลง เช่นเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ การถูกสกัดละลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ และการเปลี่ยนแปลงของสี เป็นต้น ความสำคัญหรือสาระสำคัญของการซูวีคือ การค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างความปลอดภัยของอาหาร การรักษาไว้ซึ่งสารอาหาร และความนุ่ม การให้ความร้อนมีผลกระทบที่หลากหลายต่อองค์ประกอบต่างๆของเนื้อสัตว์

การทำให้เนื้อสัตว์สุก ความร้อนที่ใช้จะไปเปลี่ยนแปลง หรือทำลาย โปรตีนเนื้อสัตว์ โปรตีนชนิดใดหรือปริมาณที่ถูกทำลายส่วนใหญ่นั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและเวลา อาจแบ่งโปรตีนออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (50 ถึง 55 เปอร์เซ็นต์) โปรตีนซาร์โคพลาสมิค (30 ถึง 34 เปอร์เซ็นต์) และโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (10 ถึง 15 เปอร์เซ็นต์) โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (ส่วนใหญ่เป็น myosin และ actin) และ โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจน) จะเกิดการหดตัวเมื่อได้รับความร้อน ในขณะที่โปรตีนซาร์โคพลาสมิคจะเกิดการขยายตัว (Tornberg, 2005)

ในระหว่างการให้ความร้อนเส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการหดตัวตามขวางและตามยาว โปรตีนซาร์โคพลาสมิคเกิดการรวมตัวกันและเกิดเจล และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเกิดการหดตัวและละลาย สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่รวดเร็วเกิดโดยเส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มหดตัวที่อุณหภูมิ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส และมีการหดตัวเกือบที่จะเพิ่มขึ้นอย่างคงที่ด้วยอุณหภูมิสูงถึง 80 องศาเซลเซียส การรวมตัวและการเกิดเจลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิคเริ่มต้นที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส และสิ้นสุดที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิเดียวกันกับที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันเริ่มหดตัว และจะหดตัวมากกว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ในส่วนของการเปลี่ยนแปลงที่ช้าส่วน

ใหญ่จะเป็นการเพิ่มความนุ่ม โดยเกิดการละลายคอลลาเจนเป็นเจลาตินและลดการยึดเกาะกันระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ (Baldwin. 2012)

การเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเหล่านี้ไปสู่การกำหนดระดับความสุกของเนื้อสัตว์ทั่วไปมี 5 ระดับ โดยมีรายละเอียดดังนี้

1) สุกน้อย (rare) เนื้อมีลักษณะดิบหรือไม่สุกมาก ภายในชิ้นเนื้อยังคงเป็นสีแดง ความสุกระดับนี้เป็นการทำให้สุกโดยใช้เวลาสั้น อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 49 ถึง 52 องศาเซลเซียส

2) สุกน้อยถึงสุกปานกลาง (medium-rare) เนื้อมีลักษณะกึ่งสุกกึ่งดิบ ภายในชิ้นเนื้อส่วนตรงกลางเป็นสีชมพูเข้ม อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 55 ถึง 57 องศาเซลเซียส เมื่อหั่นชิ้นเนื้อจะมีน้ำเลือดและน้ำเนื้อไหลออกมา เป็นระดับที่ได้รับความนิยมมากที่สุด

3) เนื้อสุกปานกลาง (medium) ภายในชิ้นเนื้อเป็นสีชมพูอ่อน อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 63 องศาเซลเซียส

4) เนื้อสุกปานกลางถึงสุกมาก (medium well) ภายในชิ้นเนื้อเป็นสีขาวยึดเกือบทั้งหมด ยกเว้นส่วนตรงกลางยังคงเป็นสีชมพูอ่อน อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 63 องศาเซลเซียส

5) สุกมาก (well done) เนื้อมีลักษณะแห้งและค่อนข้างเหนียว มีน้ำเนื้อมากหรือไม่มีเลย ภายในชิ้นเนื้อเป็นสีขาวยึดทั้งหมด อุณหภูมิที่ใช้ประมาณ 71 องศาเซลเซียส

สีของเนื้อสัตว์ที่ปรุงสุกที่อุณหภูมิเดียวกันนั้นขึ้นอยู่กับว่าเนื้อสัตว์จะมีอุณหภูมิถึงที่กำหนดเร็วแค่ไหนและคงอยู่ที่อุณหภูมินั้นนานเท่าใด อุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เนื้อมีสีแดงมากขึ้น และเมื่อเวลานานขึ้นจะทำให้เนื้อสัตว์มีสีซีดลง (Charley and Weaver. 1998) สำหรับเนื้อสัตว์ที่ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ถึง 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อแยกอธิบายการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในเนื้อสัตว์ สามารถแยกได้เป็น 3 ประเด็น ดังนี้

1) โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein)

เส้นใยกล้ามเนื้อเริ่มหดตัวที่อุณหภูมิ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส และหดตัวต่อเนื่องจนเกือบเป็นเส้นตรงถึง 70 องศาเซลเซียส (Baldwin. 2012) ความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อทั้งหมดถูกควบคุมโดยการหดตัวและการพองตัวของเส้นใยไมโอไฟบริล (myofibrils) ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของน้ำในกล้ามเนื้อจะอยู่ภายในระหว่างเส้นใยไมโอซินหรือเส้นใยชนิดหนา และเส้นใยแอกตินหรือเส้นใยชนิดบาง ระหว่างอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ 60 องศาเซลเซียส เส้นใยกล้ามเนื้อหดตัวตามขวางและขยายช่องว่างระหว่างเส้นใย จากนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส (เส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการหดตัวตามยาวและทำให้เกิดการสูญเสียอย่างมาก และการหดตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (Liu *et al.* 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

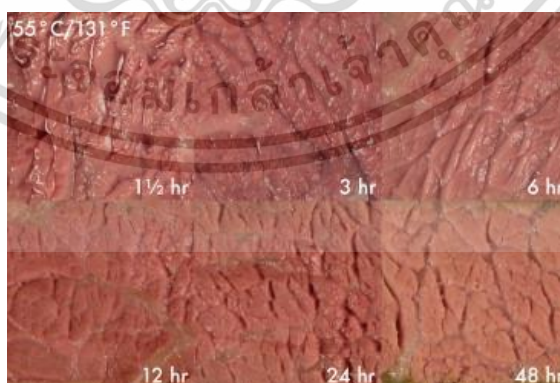
2) โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein)

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกหรือโปรตีนที่ละลายน้ำได้เป็นส่วนประกอบประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อสัตว์ และส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์และไมโอโกลบิน ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์และโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ก็จะเกิดการขยายตัวเมื่อได้รับความร้อน การรวมตัวและการเกิดเจลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกเริ่มต้นที่อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส และเกิดมากที่สุดที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะถูกทำลาย เอนไซม์เหล่านี้สามารถเพิ่มความนุ่มของเนื้อสัตว์ได้อย่างมาก ความสามารถในการละลายของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึงจุดสิ้นสุด โดยมีความสามารถในการละลายที่ลดลง (Liu *et al.* 2013 ; Tornberg *et al.* 1997) อย่างไรก็ตาม Davey and Gilbert (1974) พบว่าการรวมตัวของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากกล้ามเนื้อของโคสามารถขยายได้ถึง 90 องศาเซลเซียส การรวมตัวของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกทำให้เกิดความสม่ำเสมอของเนื้อสุก โดยการสร้างเจลระหว่างองค์ประกอบ โครงสร้างที่แตกต่างกันของเนื้อสัตว์ ให้เกิดการเชื่อมโยงกันต่อกัน (Davey *et al.* 1976 ; Tornberg. 2005 ; Tornberg *et al.* 1997).

โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในการชวีจะอยู่ที่ 55 ถึง 65 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิในช่วงนี้ทำให้เกิดการเสียดสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ซาร์โคพลาสมิกจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม เอนไซม์คอลลาจีเนสบางชนิดยังคงสามารถทำงานได้และสามารถเพิ่มความนุ่มได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง (Tornberg. 2005 ; Laakkonen *et al.* 1970)

3) โปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue)

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ จะเห็นได้ใน ภาพที่ 2.4 เนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจนและอีลาสติน เส้นใยคอลลาเจนเริ่มเสียดสภาพธรรมชาติหรือหดตัวที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส และหดตัวมากกว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2.3 ชิ้นส่วนไหล่ของเนื้อโคที่ย่างที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (131 องศาฟาเรนไฮต์) เป็นเวลา 1.5, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง

ที่มา : Baldwin (2012)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3.2 เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและการเกิดเจลติน

ถึงแม้ว่าคอลลาเจนจะมีปริมาณเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ แต่เป็นตัวสำคัญที่บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเนื้อสัมผัสของเนื้อสุก (Powell *et al.* 2000) เมื่อคอลลาเจนได้รับความร้อนจะเสียสภาพธรรมชาติ เกิดการหดตัว และเริ่มสลายตัวไป (Covington and Covington. 2009) การเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนที่เกิดขึ้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ความสมบูรณ์ของคอลลาเจน อัตราในการให้ความร้อน และความชื้นสัมพัทธ์ (Powell *et al.* 2000)

คอลลาเจนจะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติในช่วงอุณหภูมิ 53 ถึง 63 องศาเซลเซียส ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดความเสียหายของพันธะไฮโดรเจน ทำให้เกิดการคลายโครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ และเกิดการหดตัวของเส้นใยคอลลาเจน (Christensen *et al.* 2011) ผลของความร้อนที่ต่อคอลลาเจนสามารถทำให้เกิดการผันกลับได้ (reversible) และการผันกลับไม่ได้ (irreversible) การเปลี่ยนแปลงที่ผันกลับได้ของคอลลาเจนหมายถึงการคลายตัวของโครงสร้างเมื่ออยู่ในสถานะที่อุณหภูมิปานกลางและสามารถฟื้นคืนสภาพเมื่อกลับสู่อุณหภูมิปกติ ส่วนการเปลี่ยนแปลงที่ผันกลับไม่ได้เกิดจากการให้ความร้อนสูงอย่างรุนแรงแก่คอลลาเจน ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ที่เรียกว่าเจลติน โดยจะมีโครงสร้างเป็นสายอิสระที่มีลักษณะขดงอ การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดจากการแตกหักของพันธะไฮโดรเจน ซึ่งโดยปกติจะทำให้เกิดความเสถียรของโครงสร้างคอลลาเจน (Wright and Humphrey. 2002) ที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส สามารถทำให้เกิดการแตกหักของโครงสร้างเกลียวของคอลลาเจน และเกิดการหดตัวเมื่อให้ความร้อนแบบต่อเนื่อง จึงส่งผลให้ กล้ามเนื้อมีความแข็งเพิ่มมากขึ้น และเมื่อให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 70 ถึง 75 องศาเซลเซียส จะทำให้คอลลาเจนบางส่วนเกิดการสลายตัว เกิดเป็นเจลติน (Powell *et al.* 2000 ; Purslow. 2005) ถึงแม้ว่าจะไม่มีอุณหภูมิเฉพาะที่คอลลาเจนถูกทำให้เสียสภาพธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ แต่อัตราการเสียสภาพจะเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณเมื่อมีการใช้ อุณหภูมิที่สูงขึ้น และด้วยเหตุผลความปลอดภัย อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ถือเป็นอุณหภูมิที่ต่ำสุดที่สามารถทำให้การเสียสภาพธรรมชาติของคอลลาเจน ทั้งนี้ในการทำให้สุกของชิ้นเนื้อสัตว์ที่มีความเหนียว การใช้ระยะเวลาและอุณหภูมิสูงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการเปลี่ยนคอลลาเจนให้เป็นเจลตินและลดการยึดเกาะระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อ (Baldwin. 2012)

2.6.3.3 การสูญเสียน้ำหนักหลังการปรุงสุกและความนุ่มของเนื้อ

การปรุงสุกเป็นการทำให้เกิดการหดตัวของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ การขยายตัวของโปรตีนซาร์โคพลาสซึม รวมทั้งการหดตัวและการละลายของคอลลาเจน ซึ่งส่งผลให้เนื้อสัตว์มีความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง ความสามารถในการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อทั้งหมดถูกควบคุมโดยการหดและการขยายตัวของโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ประมาณร้อยละ 80 ของน้ำในกล้ามเนื้อสัตว์จะถูกกักเก็บไว้ใน โครงสร้างของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ คือช่องว่างระหว่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์อื่นใด
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโอซินและแอกติน ซึ่งช่องว่างระหว่างไมโอซินและแอกตินมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำ และการกระจายตัวของน้ำภายในกล้ามเนื้อ การปรุงสูงด้วยอุณหภูมิที่ต่ำลงระหว่าง 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส เส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการหดตัวตามขวางทำให้ช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละเส้นมีความกว้างเพิ่มขึ้น ในขณะที่การปรุงสูงที่อุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส เส้นใยกล้ามเนื้อจะหดตัวตามยาว ซึ่งเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการสูญเสียน้ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และทำให้กล้ามเนื้อที่มีความแข็งเพิ่มขึ้น (Baldwin, 2012) การหดตัวซึ่งเป็นสาเหตุจากการสูญเสียน้ำไม่ได้ถูกจำกัดอยู่ที่การสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อน แต่อาจเกิดจากการที่ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงหรือการหดตัวของซาร์โคเมอร์ในระหว่างการเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อหลังสัตว์ตาย (Tomberg, 2005)

ลำดับการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญสรุปได้ดังนี้ (Tomberg, 2005 ; Liu *et al.* 2013)

การหดตัวตามขวางเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 40 ถึง 60 องศาเซลเซียส

- การหดตัวทำให้เกิดการขยายช่องว่างระหว่างเส้นใยและเอนโดไมเซียมโดยรอบ
- ที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียส เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดการหดตัวตามยาวอย่างพร้อมกันและหดตัวเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ การหดตัวนี้ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำมากที่สุดซึ่งสังเกตได้จากการปรุงสูง
- น้ำที่สูญเสียออกมาเกิดจากการถูกบีบออกโดยความดันที่เกิดจากการหดตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและการสูญเสียน้ำจะสามารถเกิดอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ถึงแม้ว่าอุณหภูมิที่ใช้จะต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส แต่อัตราและระดับการสูญเสียน้ำจะเกิดค่อนข้างน้อย

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2013) ซึ่งพบว่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสูงจะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ การเพิ่มขึ้นครั้งแรกเกิดที่อุณหภูมิ 60 ถึง 65 องศาเซลเซียส และครั้งที่สองเกิดที่อุณหภูมิ 70 ถึง 75 องศาเซลเซียส และอาจมีความแตกต่างกันเนื่องจากประเภทของกล้ามเนื้อที่แตกต่างกัน และเงื่อนไขในการทดลอง เป็นต้น และจากการทดลองของ Palka and Daun. (1999) ซึ่งแสดงผลลัพธ์ที่สอดคล้องกัน โดยพบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันระหว่างความยาวของซาร์โคเมอร์และค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสูง ซึ่งทำให้เห็นว่าความยาวของซาร์โคเมอร์เป็นตัวบ่งชี้ที่ดีของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อสัตว์ระหว่างการปรุงสูง โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสูง

การสูญเสียน้ำโดยรวมของกล้ามเนื้อคือการระเหยออกจากผิวหนังเนื้อและน้ำที่ไหลออกมาจากกล้ามเนื้อที่ถูกตัด น้ำที่ไหลซึมออกมาโดยแรงโน้มถ่วงของโลกจากผิวหนังของกล้ามเนื้อที่ถูกตัดเกิดจากของเหลวที่มีความหนืดต่ำและแรงของเส้นเลือดฝอยไม่แข็งแรงพอที่จะกักเก็บน้ำไว้ได้ (Tomberg, 2005) การศึกษาของ Offer *et al.* (1989) แสดงให้เห็นว่าน้ำที่สูญเสียออกมาจากกล้ามเนื้อเกิดจากช่องว่างตามยาวระหว่างมัดเส้นใยกล้ามเนื้อ การทำให้กล้ามเนื้อมีอุณหภูมิ

ลดลงก่อนการตัดแต่งเป็นการช่วยเพิ่มความหนืด ทำให้การเกิดเจลเกิดได้ง่ายขึ้น และช่วยลดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูญเสีย น้ำ ความนุ่มของเนื้อสัตว์มีความสัมพันธ์กันอย่างมากระหว่างการสูญเสีย น้ำหลังการปรุงสุก จากการศึกษาของ Liu *et al.* (2013) พบว่าความเหนียวของเนื้อสัตว์ (วัดจากแรงเฉือน) แบ่งได้เป็น 4 ช่วง คือ (1) ความเหนียวเพิ่มขึ้นจากเนื้อดิบไปจนถึงเนื้อที่ปรุงสุกที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส, (2) ความเหนียวลดลงจากอุณหภูมิที่ 55 จนถึง 60 องศาเซลเซียส, (3) ความเหนียวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากอุณหภูมิที่ 70 จนถึง 75 องศาเซลเซียส และ (4) ความเหนียวลดลงอย่างรวดเร็วจากอุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส และคงที่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส การเพิ่มขึ้นของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส เป็นผลมาจากการเสียดสภาพธรรมชาติของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของค่าแรงตัดผ่านเนื้อที่ผ่านการปรุงสุกที่อุณหภูมิต่ำกว่า 80 องศาเซลเซียส เป็นผลมาจากการเสียดสภาพธรรมชาติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

2.7 วิธีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์สุวี

การใช้เอนไซม์ในเนื้อสัตว์จะทำให้เกิดการกระจายของเอนไซม์อย่างสม่ำเสมอภายในเนื้อสัตว์ได้ยาก เนื่องจากความสอดคล้องทางชีวเคมีและโครงสร้างของเนื้อสัตว์ วิธีการที่ใช้กันทั่วไปในปัจจุบัน ได้แก่ การจุ่มหรือการแช่ การหมัก การนึ่ง และการนึ่งผัด การจุ่มและการหมักอาจเป็นวิธีเดียวกันซึ่งหมายถึงการจุ่มเนื้อและหมักในสารละลายเอนไซม์ การพ่นรวมถึงการฉีดพ่น เอนไซม์หรือสารละลายบนพื้นผิวของเนื้อสัตว์ วิธีการเหล่านี้มีการใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่มีข้อเสียเปรียบคือการแทรกซึมที่ไม่ดีของเอนไซม์จากพื้นผิวไปยังภายในเนื้อสัตว์ ดังนั้นวิธีการเหล่านี้มักจะถูกจำกัดให้มีการตัดเนื้อสัตว์ให้มีลักษณะค่อนข้างบาง มีการใช้กระบวนการหลายขั้นตอนเพื่อให้ได้การกระจายของเอนไซม์ทั่วทั้งเนื้อเยื่อ เช่น การใช้ส้อมจิ้มเนื้อสัตว์ก่อนหรือหลังการใช้เอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการนึ่งจะต้องใช้เอนไซม์ในปริมาณที่ต่ำกว่ามากเพื่อให้ได้ความนุ่มในระดับเดียวกัน เหตุผลที่เป็นไปได้คือเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของพื้นที่สัมผัสระหว่างเอนไซม์และโปรตีนจากเนื้อสัตว์ (Ashie *et al.* 2002) วิธีการนึ่งมักถูกนำมาใช้บ่อยสำหรับชิ้นเนื้อขนาดใหญ่ แต่การกระจายของเอนไซม์ยังคงค่อนข้างแย่ จึงทำให้เกิดบริเวณที่นุ่มและในตำแหน่งที่ฉีดงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ามีการกระจายตัวของเอนไซม์และโครงสร้างโปรตีนที่ถูกทำลายมากขึ้นในเนื้อโคหลังจากการใช้เอนไซม์ไปพร้อมกับการใช้สภาวะสุญญากาศ (Huerta-Montauti *et al.* 2008) เนื่องจากภายในบรรจุภัณฑ์เป็นสภาวะสุญญากาศ ทำให้ตัวบรรจุภัณฑ์และเอนไซม์ น้ำหมักหรือเครื่องปรุงต่างๆแนบกับเนื้อสัตว์ เป็นการบังคับให้เอนไซม์ถูกดูดซึมหรือแทรกซึมเข้าไปในเนื้อสัตว์ได้ อย่างรวดเร็ว และมีความสม่ำเสมอ (Lesky *et al.* 2001) จากการศึกษาของ Chang and Han (2020) ซึ่งศึกษาการสุวีร่วมกับการใช้เอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ทางการค้า (Neutrase; NE) และเอนไซม์จากผลไม้สองชนิดจากกีวี (KE) และ สับปะรด (PE) ในเนื้อสุกรส่วนขาหน้า โดยทำการสุวีที่อุณหภูมิ 45, 60, 70 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5, 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าการสุวีทำให้อุณหภูมิมีความแข็งลดลง 27 เปอร์เซ็นต์ และการใช้เอนไซม์ทำให้มีความนุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังเว็บไซต์อื่น การทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตถือว่าผิดกฎหมาย และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(38-60%) โดยการให้ KE ทำให้มีความนุ่มมากกว่า PE และ NE นอกจากนี้จากการศึกษาของ Zhu (2017) ซึ่งศึกษาการประยุกต์ใช้แอคตินินในการปรุงอาหารแบบซูวีในเนื้อโคส่วนอก โดยการฉีดสารละลายแอคตินินทางการค้าที่ความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ ในสเต็กเนื้อโค และนำไปซูวีที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าสี และค่าการสูญเสียไอน้ำภายหลังการปรุงสุกของเนื้อสเต็กที่ฉีดด้วยแอคตินินไม่มีการเปลี่ยนแปลง และพบว่ามีคะแนนการประเมินทางประสาทสัมผัสที่ดีสำหรับค่าความนุ่ม ความฉ่ำน้ำ และกลิ่นรสเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การศึกษาโครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่ามีการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโครงสร้างเส้นใยกล้ามเนื้อ

2.8 เนื้อโคพันธุ์บราห์มัน

โคบราห์มันจัดเป็นโคเนื้อในเขตร้อน (*Bos indicus*) มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมในประเทศอินเดีย โดยคำว่าบราห์มัน เชื่อว่ามาจากคำว่า Bramini ซึ่งเป็นประเพณีทางศาสนาพราหมณ์ที่มีพ่อโคศักดิ์สิทธิ์ชื่อพราหมณ์ โดยโคบราห์มันเป็น โคที่พัฒนาพันธุ์มาจากพันธุ์ดั้งเดิมของโคเมืองร้อนหลายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ Guzerat, Nellore หรือ Ongole, Gir, Krishna และ Valley เป็นต้น ซึ่งโคเหล่านี้เป็นพันธุ์โคเมืองร้อนที่นิยมเลี้ยงกันในทุกภูมิภาคของโลก ใช้เป็นโคเนกประสงค์ทั้งในแง่ของการผลิตเป็นโคพันธุ์แท้ โคลูกผสมโคเนื้อหรือโคนม โดยใช้เป็นแม่พื้นฐานในการสร้างสายพันธุ์โคพันธุ์ใหม่ โดยได้รับการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์ในประเทศสหรัฐอเมริกาเป็นประเทศแรก จึงมีชื่อเรียกว่าพันธุ์อเมริกันบราห์มัน (American Brahman) ในเวลาต่อมาโคสายพันธุ์อเมริกันบราห์มัน เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ระหว่าง 3 สายพันธุ์ คือ พันธุ์กีร์, พันธุ์เชอร์ราจซ์ และพันธุ์เนลลอร์ ลักษณะตัวโดยทั่วไปลำตัวมีสีหลากหลายตั้งแต่ สีขาว เทาอ่อน สีลายและจนถึงเกือบดำ จมูก กีบ และพู่หางมีสีดำ บางตัวอาจมีสีแดง จึงเรียกว่า บราห์มันแดง (Red Brahman) แต่ที่นิยมเลี้ยงกันมากที่สุด คือ สีขาวและสีเทา

สำหรับในประเทศไทย โคสายพันธุ์อเมริกันบราห์มันส่วนใหญ่ นำเข้ามาจากประเทศสหรัฐอเมริกา และออสเตรเลีย แล้วนำมาคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์โดยกรมปศุสัตว์ และฟาร์มของเกษตรกรรายใหญ่ กรมปศุสัตว์โดยกองบำรุงพันธุ์สัตว์ได้นำโคพันธุ์อเมริกันบราห์มันจากประเทศสหรัฐอเมริกาเข้ามาเลี้ยงตั้งแต่ปี พ.ศ. 2497 และทำการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์มาโดยตลอด ในระยะแรกการคัดเลือกพ่อพันธุ์เพื่อทดแทนในฝูงผสมพันธุ์ได้ใช้วิธีการทดสอบสมรรถภาพการเจริญเติบโตที่สถานีทดสอบกลาง โดยทำการทดสอบ โคเพศผู้ที่ศูนย์วิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์ทำพระสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์มหาสารคาม และปัจจุบันที่ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ลำพูนกลาง มีการเก็บข้อมูล ซึ่งได้แก่ พันธุ์ประวัติ ลักษณะการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์พันธุ์ หลังจากปี พ.ศ. 2538 ได้ดำเนินการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์โดยใช้คุณค่าการผสมพันธุ์ ผลจากการปรับปรุง

คัดเลือกพันธุ์ดังกล่าวจึงถูกเรียกว่า "โคพันธุ์ไทยบราห์มัน"

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการเรียนเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 ปัจจัยที่กำหนดความนุ่มเหนียวของเนื้อ

ลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนื้อและคุณภาพของเนื้อ โคพັນบราห์มันนอกจากจะมีความเหนียวเนื่องจากเป็นโคเขตหนาวซึ่งมีปริมาณของเอนไซม์คาลิปาสเตดินในกล้ามเนื้อสูงกว่าโคเขตหนาวแล้ว ยังอาจมีสาเหตุอื่นๆที่เป็นตัวกำหนดความเหนียวของเนื้อโคพันบราห์มัน ซึ่งได้แก่

2.2.1.1 ปัจจัยก่อนสัตว์ตาย (ผันแปรตาม ชนิด พันธุ์ เพศ อายุของสัตว์)

1) ระดับการสะสมไขมันแทรก เนื้อที่มีปริมาณไขมันแทรกมากจะมีผลทำให้เนื้อนุ่ม และปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอิทธิพลทางพันธุกรรมของสัตว์ โดยโคเขตร้อน (*Bos indicus*) จะมีการสะสมไขมันแทรกได้น้อยกว่าโคเขตหนาว (*Bos taurus*) สอดคล้องกับ ปรารธนา พุกษะศรี (2548) รายงานว่า เนื้อโคพันชาร์โลเลย์ (Charolais) มีปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อสูงกว่าโคพันธุ์อเมริกันบราห์มัน (American Brahman) แม้ว่าจะได้รับการเลี้ยงดูและให้อาหารเหมือนกัน และสอดคล้องกับ McKeith *et al.* (1985) รายงานว่าเนื้อโคพันธุ์แองกัส (Angus) มีปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อสูงกว่าพันธุ์อเมริกันบราห์มัน ภายใต้การเลี้ยงด้วยอาหารชนิดเดียวกัน อีกทั้งอายุโคที่โตเต็มที่ (mature) จะทำให้โคสามารถสะสมไขมันแทรกได้มากขึ้น

2) ปริมาณและความสามารถในการละลายของคอลลาเจน คอลลาเจนเป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เมื่อสัตว์อายุมากขึ้นจำนวนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจะมากขึ้นด้วยโครงสร้างของคอลลาเจนที่แข็งแรงเนื่องจากการเชื่อมข้ามของสายคอลลาเจน ปริมาณคอลลาเจนเพิ่มขึ้นจะเกิดเชื่อมข้ามที่เพิ่มขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนลดต่ำลง และทำให้เนื้อมีความเหนียวขึ้นเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Elzo *et al.* (2012) ซึ่งทำการวิเคราะห์คุณภาพด้านต่างๆของเนื้อโคพันธุ์บราห์มัน โคพันธุ์แองกัส และโคลูกผสมบราห์มัน-แองกัส พบว่าเนื้อโคพันธุ์บราห์มันมีความนุ่มต่ำที่สุดเมื่อวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ และมีคะแนนความนุ่ม และมีปริมาณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงที่สุด เมื่อประเมินทางประสาทสัมผัส

2.2.1.2 ปัจจัยหลังสัตว์ตาย (ผันแปรตาม การแช่เย็น อุณหภูมิในการเก็บรักษาเนื้อสัตว์ และระยะเวลาในการเก็บรักษา)

1) ความยาวซาร์โคเมียร์ (sarcomere length) เมื่อกล้ามเนื้อเกิดการหดตัวทำให้ซาร์โคเมียร์สั้นลง และทำให้เนื้อมีความเหนียวเพิ่มขึ้น สาเหตุหลักที่ทำให้ซาร์โคเมียร์สั้นลง เกิดจากการลดอุณหภูมิของกล้ามเนื้อไม่เหมาะสม Cold Shortening คือการหดตัวอย่างรุนแรงของกล้ามเนื้อเนื่องจากการลดอุณหภูมิของกล้ามเนื้ออย่างรวดเร็ว (15-16 องศาเซลเซียส) ก่อนการเกิด rigor onset ซึ่งในกล้ามเนื้อมี ATP อยู่มาก และส่วนของซาร์โคพลาสติคเรติคูลัม ไม่สามารถเก็บ Ca^{2+} ไว้ได้ ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวอย่างรุนแรง เกิดได้ง่ายในซากที่มีไขมันหุ้มชากน้อย เช่นเดียวกันกับการเกิด

Thaw rigor คือการหดตัวของกล้ามเนื้ออย่างรุนแรงเนื่องจากการแช่แข็งเร็วเกินไป โดยซาร์โคพลาสติก-เรติคูลัม ถูกทำลายเนื่องจากผลึกน้ำแข็ง

2) การย่อยสลายของเส้นใยย่อยในกล้ามเนื้อ (proteolysis) การเกิดการย่อยสลายของเส้นใยย่อยในกล้ามเนื้อจะทำให้เนื้อมีความนุ่มมาก ซึ่งการย่อยสลายเกิดจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่แล้วในกล้ามเนื้อสัตว์ (Endogenous proteases) ได้แก่ คาลเพน (calpain) และ คาลเทปซิน (cathepsin) ซึ่งจะย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการบ่มเนื้อที่อุณหภูมิต่ำ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 Calcium chloride (CaCl ₂)	(CAS No: 10043-52-4, Merck, Germany)
3.1.2 Ethyl alcohol 99.99%	(CAS No: 64-17-5, Scharlau, Spain)
3.1.3 Gelatin	(CAS No: 9000-70-8, Merck, Germany)
3.1.4 Glucose	(CAS No: 5996-10-1, Chemipan, Thailand)
3.1.5 Glycerol	(CAS No: 56-81-5, Merck, Germany)
3.1.6 Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	(CAS No: 10034-99-8, Merck, Germany)
3.1.7 Ninhydrin	(CAS No: 485-47-2, Sigma, Germany)
3.1.8 Nutrient Agar (NA)	(CAS No: 105450, Merck, Germany)
3.1.9 Nutrient broth (NB)	(CAS No: 105443, Merck, Germany)
3.1.10 Peptone	(CAS No: 107228, Merck, Germany)
3.1.11 Sodium chloride (NaCl)	(CAS No: 7647-14-5, Sigma, Germany)
3.1.12 Trizma Base	(CAS No: 77-86-1, Sigma, Germany)
3.1.13 Trizma hydrochloride	(CAS No: 1185-53-1, Sigma, Germany)
3.1.14 Yeast extract	(CAS No: 8013-01-2, Merck, Germany)
3.1.15 Hydrochloric acid	(CAS No: 7647-01-0, Merck, Germany)

3.2 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.2.1 ตู้อบเครื่องแก้ว	(CM500, Hot-air oven, Memmert GmbH, Germany)
3.2.2 เครื่องชั่งชนิดหยาบ	(1144, Tanita Digital Scale, Tanita Corporation, Japan)
3.2.3 เครื่องชั่งชนิดละเอียด	(Sartorius ENTRIS64-1S, Sartorius, Germany)
3.2.4 หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ	(HVE 50, HICLAVE HVE series, HIRAYAMA Manufacturing Corp., Japan)
3.2.5 ไมโครเวฟ	(ER-G8C, Toshiba, Toshiba Corporation, Japan)
3.2.6 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath WNE14, Memmert, Memmert, GmbH + Co. KG, Germany)	
3.2.7 เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (KMC-1300V, Vision, Vision Scientific co.,ltd, Korea)	
3.2.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (SG-2, Mettler Toledo, Mettler-Toledo (Thailand) lid., Switzerland)	
3.2.9 ตู้เจ็ยเชื้อแบบ Laminar Flow	(model BD, Laminar Flow, Dwyer, USA)
3.2.10 เครื่องบรรจุสุญญากาศ	(Ramon, Changsha Branch Company, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ยืมได้เห็นว่าเอกสารฉบับนี้มีความสำคัญ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.11 เครื่อง Homogenizer (T25 digital Ultra turrax, IKA, IKA scientifica, Germany)
- 3.2.12 ตู้อบลมร้อน (FD115, Binder, Binder GmbH, Germany)
- 3.2.13 ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (BD WTB Binder, Binder, Binder GmbH, Germany)
- 3.2.14 เครื่องเขย่าเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (NB-205, N-Biotek, N-Biotek Co., Ltd., Korea)
- 3.2.15 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sigma 2-16 KL, Sigma, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Germany)
- 3.2.16 เครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (Warner-Bratzler, Instron Model 1011, Instron corporation, USA)
- 3.2.17 เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (EZ4500L, Hunterlab MiniScan, Hunterlab, USA)
- 3.2.18 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV-1601, Shimadzu, ThermoFisher scientific, Japan)

ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลอง	แนวทางการดำเนินงานวิจัย
<p>การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์จาก <i>Bacillus subtilis</i> B13</p>	<p>1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรีย <i>Bacillus subtilis</i> B13 โดยการเพิ่มจำนวนเชื้อบนอาหารแข็ง และถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลวเพื่อเพิ่มจำนวนเชื้อ 2) การคัดเลือกตัวแปรที่สำคัญโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) 3) หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) 4) ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย 5) ตรวจสอบกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์ ด้วยการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น และคำนวณค่ากิจกรรม (U/ml) <p>1.2 การทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์</p> <p>1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</p>
<p>การทดลองที่ 2 ศึกษาการนำคอลลาจีโนไลติกส์-เอ็นไซม์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์สแต็กเนื้อโคซูวี</p>	<p>2.1 เตรียมตัวอย่างเนื้อโค โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่</p> <ul style="list-style-type: none"> - ควบคุม (Control) - บรอมีเลน (Bromelain) - คอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์จาก <i>Bacillus subtilis</i> B13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ภายในงานวิจัยเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่สู่สาธารณะโดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<p>(การนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก การทดลองที่ 1 มาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เด็กเนื้อโคซูวี เพื่อศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ต่อความนุ่มของผลิตภัณฑ์ และการลดระยะเวลาในการซูวี)</p>	<p>จากนั้นซูวีตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (48 ชั่วโมง)</p> <p>2.2 ตรวจวิเคราะห์คุณภาพของเด็กเนื้อโคซูวี โดยสุ่มตัวอย่างเวลาที่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง</p> <p>2.3.1 ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี-กายภาพ (ภายหลังการซูวี) ได้แก่</p> <ul style="list-style-type: none"> - วิเคราะห์ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide - ค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังซูวี (Weight loss, %) - ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (Cooking loss, %) - ค่าสี (CIE L*, a* และ b*) - ค่าเคี้ยวโครงเนื้อสัมผัส (TPA) - ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (Shear force) <p>2.3.2 ทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางด้านเคมี-กายภาพ (ภายหลังการปรุงสุก)</p> <ul style="list-style-type: none"> - วิเคราะห์ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide - ค่าสี (CIE L*, a* และ b*) - ค่าเคี้ยวโครงเนื้อสัมผัส (TPA) - ค่าแรงตัดผ่านชิ้นเนื้อ (Shear force) <p>2.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ</p>
--	---

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การทดลองที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาเจนไฮดริซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13

3.3.1.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาเจนไฮดริซ์เอนไซม์

1) เตรียมกล้าเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B13 จากสต็อกถูกนำมาแยกเชื้อใช้บริสุทธิ์และฉีดเพิ่มจำนวนลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร nutrient agar (NA) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อไปยังอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในหลอด

เซ็นทรีฟิวท์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 180 รอบ ต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ

2) การคัดเลือกตัวแปรที่สำคัญโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD)

Design (PBD)

ในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์สามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อที่ผลิตได้จากการทดลองที่ 3.3.1.1 ด้วยอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร องค์ประกอบของอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ และสภาวะการเจริญของเชื้อถูกกำหนดโดยการคัดเลือกตัวแปรหรือปัจจัยที่สำคัญโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) หลังจากนั้นกำจัดเซลล์แบคทีเรียด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ไม่มีเซลล์มากรองด้วย sterile syringe filters ขนาด 0.22 μm ก่อนจะนำไปวิเคราะห์กิจกรรมการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์

การคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญสำหรับการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ องค์ประกอบต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อและพารามิเตอร์การเพาะเลี้ยงโดยใช้แผนการทดลองแบบ PBD ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 11 ปัจจัย ได้แก่ (1) เจลาติน (2) กลูโคส (3) กลีเซอรอล (4) โซเดียมคลอไรด์ (5) แมกนีเซียมซัลเฟต (6) แคลเซียมคลอไรด์ (7) สารสกัดจากยีสต์ (8) ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, (9) ปริมาตรกล้าเชื้อที่ใช้, (10) ความเร็วและ (11) ระยะเวลาในการบ่ม แต่ละปัจจัย จะทำการทดลองสองระดับ ได้แก่ ระดับต่ำ (-1) และระดับสูง (+1) ซึ่งแบ่งได้เป็น 12 ชุดสภาวะการทดลอง (runs) (ตารางที่ 3.1) ทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 รุ่นการผลิต

องค์ประกอบของอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์และสภาวะการเจริญของเชื้อ มีการกำหนดทั้งหมด 11 ปัจจัย ดังนี้

X_1 : เจลาติน	10 และ 15	กรัมต่อลิตร
X_2 : กลูโคส	0 และ 5	กรัมต่อลิตร
X_3 : กลีเซอรอล	0 และ 10	เปอร์เซ็นต์
X_4 : โซเดียมคลอไรด์	0 และ 10	เปอร์เซ็นต์
X_5 : แมกนีเซียมซัลเฟต	0 และ 0.2	เปอร์เซ็นต์
X_6 : แคลเซียมคลอไรด์	0 และ 0.2	เปอร์เซ็นต์
X_7 : สารสกัดจากยีสต์	0 และ 1	เปอร์เซ็นต์
X_8 : ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	6.5 และ 7.5	
X_9 : ปริมาตรกล้าเชื้อที่ใช้	2 และ 7	เปอร์เซ็นต์
X_{10} : ความเร็วในการเหวี่ยง	100 และ 200	รอบต่อนาที
X_{11} : ระยะเวลาในการบ่ม	24 และ 48	ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคสเป็นแหล่งน้ำตาล เจลาติน และสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจน และนอกจากนี้โซเดียมคลอไรด์ยังเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอนินทรีย์ ไอออนของโลหะที่มีส่วนสำคัญในการเจริญและการสร้างเอนไซม์ในเชื้อแบคทีเรียกลุ่มบาซิลลัส ได้แก่ แมกนีเซียมซัลเฟต และแคลเซียมคลอไรด์

ตารางที่ 3.1 สภาวะการทดลอง (Runs) 12 ชุดการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ PBD

สภาวะการทดลอง (Runs)	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	15	0	0	10	0.2	0.2	0	6.5	7	100	48
2	15	5	10	0	0.0	0.0	1	6.5	2	100	48
3	10	0	10	10	0.2	0.0	0	7.5	2	200	48
4	15	5	10	0	0.2	0.2	0	6.5	2	200	24
5	10	5	0	0	0.2	0.0	1	6.5	7	200	48
6	10	0	10	10	0.0	0.2	1	6.5	7	200	24
7	10	5	0	10	0.2	0.2	1	7.5	2	100	24
8	15	0	0	0	0.0	0.2	1	7.5	2	200	48
9	10	0	0	0	0.0	0.0	0	6.5	2	100	24
10	15	5	0	10	0.0	0.0	0	7.5	7	200	24
11	15	0	10	0	0.2	0.0	1	7.5	7	100	24
12	10	5	10	0	0.0	0.2	0	7.5	7	100	48

X_1 : เจลาติน, X_2 : กลูโคส, X_3 : กาลีเซอรอล, X_4 : โซเดียมคลอไรด์, X_5 : แมกนีเซียมซัลเฟต, X_6 : แคลเซียมคลอไรด์, X_7 : สารสกัดจากยีสต์, X_8 : ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, X_9 : ปริมาตรกล้าเชื้อที่ใช้, X_{10} : ความเร็วในการเขย่า และ X_{11} : ระยะเวลาในการบ่ม

3) การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ด้วยวิธีการ พื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

หลังจากได้ปัจจัยที่สำคัญจากการใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) แล้ว จากนั้นจะทำการใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) โดยวางแผนการทดลองแบบเซ็นทรัลคอมโพสิต (Central Composite Design, CCD) เพื่อสร้างแบบจำลองในการทำนายผลของสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ ตัวแปรสำคัญที่ได้จากการใช้แผนการทดลองแบบ PBD ได้แก่ เจลาติน, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และระยะเวลาการบ่ม โดยแบ่งปัจจัยออกเป็น 5 ระดับ ได้แก่ -1.682, -1, 0, +1 และ +

1.682 (ตารางที่ 3.2)
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.2 ปัจจัยที่สำคัญ, หน่วย, ระดับ ในการทดลองด้วยวิธี RSM เพื่อการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13

ปัจจัยที่สำคัญ	หน่วย	ตัวแปร	ระดับ				
			-1.682	-1	0	+1	+1.682
เจลาติน	g/l	X_1	12.64	14.00	16.00	18.00	19.36
ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น	-	X_3	6.16	6.50	7.00	7.50	7.84
ระยะเวลาบ่ม	h	X_7	15.11	25.00	39.50	54.00	63.89

จากนั้นทำการผลิตเอนไซม์โดยกำหนดสภาวะการผลิตเอนไซม์ที่ได้จากการออกแบบการทดลองด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อใช้ในการศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) โดยมีทั้งหมด 20 สภาวะการทดลอง (ตารางที่ 3.3) จากนั้นนำไปวัดการเจริญของแบคทีเรีย และนำไปตรวจวัดกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ แล้วนำผลการทดลองที่ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ จากนั้นนำไปวิเคราะห์โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนองด้วยสมการพหุนามกำลังสอง ซึ่งจะอธิบายความสัมพันธ์ระหว่างค่าผลตอบสนอง (ค่ากิจกรรมคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์) ที่ได้จากการทำนายและค่าของปัจจัยสำคัญ โดยที่สมการพหุนามกำลังสองดังกล่าวแสดงได้ตามสมการที่ 3.1

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (3.1)$$

โดยที่ Y คือการตอบสนองที่คาดการณ์ไว้ (collagenolytic activity) β_0 คือ สัมประสิทธิ์ของโมเดลทดลองซึ่งเป็นค่าคงที่ β_i คือสัมประสิทธิ์เชิงเส้นตรงของตัวแปร β_{ii} คือ สัมประสิทธิ์เชิงเส้นโค้งของตัวแปร และ β_{ij} คือ สัมประสิทธิ์ของปฏิกริยาสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร ในขณะที่ X_i, X_i^2 และ X_j คือตัวแปรอิสระ

จากนั้นนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่าเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) จึงต้องมีการทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อใช้ในการศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

การทดลอง	ปัจจัยที่สำคัญ		
	Gelatin (g/l)	Initial pH	Incubation time (h)
1	16.00	7.00	63.89
2	16.00	7.00	39.50
3	14.00	6.50	25.00
4	16.00	7.00	15.11
5	19.36	7.00	39.50
6	18.00	7.50	54.00
7	16.00	7.00	39.50
8	16.00	6.16	39.50
9	12.64	7.00	39.50
10	18.00	6.50	54.00
11	16.00	7.00	39.50
12	14.00	7.50	25.00
13	18.00	6.50	25.00
14	16.00	7.00	39.50
15	16.00	7.00	39.50
16	16.00	7.84	39.50
17	18.00	7.50	25.00
18	16.00	7.00	39.50
19	14.00	6.50	54.00
20	14.00	7.50	54.00

4) ตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรีย

เป็นการตรวจสอบการเจริญของเชื้อ *Bacillus subtilis* B13 ของทั้งการทดลองที่ 3.3.1.1 ในข้อ 1), 2) และ 3) โดยใช้ปิเปตดูดเชื้อลงในคิวเวทท์และนำไปวัดการเจริญของเชื้อด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) การวัดความหนาแน่นของเซลล์ โดยวัดความขุ่น ใช้หลักการดูดกลืนคลื่นแสงที่ไม่เท่ากันของจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียที่มากขึ้น ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์

5) ตรวจวัดกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (Collagenolytic activity,

U/ml)

เป็นการตรวจวัดกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ของทั้งการทดลองที่ 3.3.1.1 ในข้อ 2) และ 3) โดยนำเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ไปปั่นเหวี่ยง ด้วยแรงเหวี่ยง $13,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ เพื่อแยกส่วนตะกอนออก ทำการเก็บส่วนใสกรองด้วย sterile syringe filters ขนาด $0.22 \mu m$ เพื่อหา กิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์

กิจกรรมการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ถูกกำหนดโดยใช้ เจลาตินเป็นสารตั้งต้นจากการตัดแปลงวิธีการตามรายงานของ Tran and Nagano (2000) องค์ประกอบของปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายเจลาติน 0.2 เปอร์เซ็นต์ 0.6 มิลลิลิตร, 150 mM Tris-HCl ที่มี $CaCl_2$ 12 mM (ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5) 0.4 มิลลิลิตร และส่วนใสที่ปราศจากเซลล์แบคทีเรีย 0.2 มิลลิลิตร ปฏิกิริยาถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 0.1 N HCl 1.2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารนินไฮดริน (ninhydrin) 2 เปอร์เซ็นต์ นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 5 นาที นำไปวัดค่าด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร (OD_{570}) การใช้วิธีสารนินไฮดรินเพื่อประเมินปริมาณกรดอะมิโนอิสระ หนึ่งหน่วย (U) ของกิจกรรมการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ถูกกำหนดเป็นปริมาณของเอนไซม์ที่ปลดปล่อยไกลซีน (glycine) 1 ไมโครกรัมต่อนาที

6) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์

การวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation) ด้วยโปรแกรม SPSS โดยตัวแปร X คือการเจริญของแบคทีเรีย (OD_{600}) และตัวแปร Y คือกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (U/ml) ซึ่งเป็นการหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) โดยมีค่าตั้งแต่ 0 ถึง 1 และมีระดับความสัมพันธ์คือ 0.00 ถึง 0.19 (ต่ำมากหรือถือว่าไม่มีความสัมพันธ์), 0.2 ถึง 0.49 (ต่ำ), 0.5 ถึง 0.69 (ปานกลาง), 0.7 ถึง 0.85 (สูง) และ 0.86 ถึง 1.0 (สูงมาก)

3.3.1.2 การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ซึ่งตัดแปลงวิธีการของ Harris and Angal (1989) เป็นการนำ ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงในการทดลองที่ 3.3.1.1 มาตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต (ammonium sulfate) ที่ความเข้มข้น 60 เปอร์เซ็นต์ของความอิ่มตัวในสภาวะการกวนสารที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $12,000 \times g$ ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนตะกอน (P_1) และส่วนใสได้นำไปตกตะกอน โปรตีนต่อด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ของความอิ่มตัว กวนสารที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $12,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนตะกอน (P_2) รวบรวมตะกอนที่ได้ทั้งสองส่วนมาละลาย ด้วย 50mM Tris-HCl, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 หลังจากนั้นนำไปกำจัดเกลือและสาร โมเลกุลเล็ก ออกจากเอนไซม์ให้ได้มากที่สุดด้วยถุงไดอะไลซิส (dialysis membrane) และแช่ในสารละลาย บัฟเฟอร์ 50mM Tris-HCl, ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง และเก็บส่วนเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.1.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ออกแบบการทดลองด้วยแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design ซึ่งอาศัยโปรแกรม Minitab Version 17 โดยคัดเลือกปัจจัยที่สำคัญหรือมีอิทธิพลต่อการ ทดลองจากการแจกแจงแบบ Student's t-test ด้วยระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้น ทำการศึกษาหาระดับความสำคัญของปัจจัยต่อไปโดยออกแบบการทดลองทางสถิติด้วยวิธีพื้นผิว ตอบสนอง โดยหลักการของวิธี Central Composite Design เพื่อทำนายสูตรที่เหมาะสมต่อการผลิต คอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ การวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq) เพื่อ วิเคราะห์ว่าการออกแบบที่ใช้ในการทดลองมีความเหมาะสมหรือไม่ การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เป็นการตรวจสอบแหล่งผันแปรของแบบจำลอง โดยพิจารณาจากค่า p-value ของเทอม ต่างๆที่วิเคราะห์ความแปรปรวน ได้เปรียบเทียบกับค่านัยสำคัญทางสถิติที่กำหนด

3.3.2 การทดลองที่ 2 ศึกษาการนำคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์สแต็กเนื้อโคซูวี

3.3.2.1 การเตรียมตัวอย่างเนื้อโค

นำชิ้นส่วนสะโพกพับนอก (*M. semitendinosus*) ของโคพันธุ์บราห์มัน (Brahman) มาหั่นเป็นชิ้นสแต็ก แบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดควบคุม (ฉีดด้วยน้ำ DI) บรอมิ เลน (bromelain) และคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 (ที่เลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม จากการทดลองที่ 1) ฉีดเอนไซม์ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักชิ้นเนื้อ โดยมีกิจกรรมของคอลลาจี โนไลติกส์เอนไซม์ B13 และบรอมิเลนเท่ากับ 3 Unit/ml บรรจุในถุงพลาสติกทนความร้อนชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K-Nylon/LLDPE ในสถานะสุญญากาศ (vacuum) จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยวิธีการซูวี ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (48 ชั่วโมง) และทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ไปทำการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี-กายภาพ

3.3.2.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี-กายภาพ (ภายหลังการซูวี)

1) วิเคราะห์ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกลูตามีนด้วยวิธี TCA-Soluble peptide คัดแปลงตามวิธีการของ Benjakul *et al.* (2002) โดยนำตัวอย่างบดจำนวน 1.5 กรัม ใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์พลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 5 เปอร์เซ็นต์ TCA ปริมาตร 13.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องโฮโมจีไนท์ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที (2 รอบ) ในสภาพที่ตัวอย่างเย็น จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 8,000×g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) เพื่อวิเคราะห์ค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดด้วยเทคนิค Lowry โดยปิเปตสารละลายส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลาย Reagent C (50 ml Reagent A และ 1 ml Reagent B) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมสารละลายทั้งสองให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (vortex) และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Folin (1 Folin : 1 Distilled water) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทำ 2 ซ้ำ และคำนวณความเข้มข้นของไทโรซีน (Tyrosine) โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร 1M Tyrosine และรายงานค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรด (TCA-soluble peptide) ในหน่วย $\mu\text{mol tyrosine/g sample}$

2) วัดค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังซูวี (Weight loss %) คัดแปลงวิธีการของวิธีการของ Lee and Chin (2017) โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างก่อนการซูวี (W_a) จากนั้นเมื่อทำการซูวีเสร็จทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังการซูวี (W_b) แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังการซูวี ดังสูตร

$$\% \text{ Weight loss} = \frac{W_a - W_b}{W_a} \times 100 \quad (3.2)$$

3) วัดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก (Cooking loss %) คัดแปลงวิธีการของวิธีการของ Lee and Chin (2017) ทำการวัดค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังการซูวี (C_a) และจากนั้นนำตัวอย่างไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างมีอุณหภูมิใจกลางที่ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ชั่งน้ำหนักตัวอย่างหลังต้ม (C_b) แล้วนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุก ดังสูตร

$$\% \text{ Cooking loss} = \frac{C_a - C_b}{C_a} \times 100 \quad (3.3)$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4) วัดค่าสีด้วยเครื่องวัดสีของเนื้อด้วยเครื่องวัดสี HunterLab Mini Scan EZ 4000L (Hunter Lab Inc, Reston, VA, USA) โดยทำการเปรียบเทียบค่าเครื่อง (Calibrate) ด้วยแผ่นสีมาตรฐานก่อนการวัดทุกครั้ง ทำการวัดค่าสีตัวอย่างแต่ละตัวอย่างทดลองทำการวัดค่า 3 ครั้ง (ซ้ำ) และบันทึกค่าที่เครื่องแสดงผลซึ่งเป็นค่าความสว่าง (Lightness, L*) ค่าสีแดง (Redness, a*) และค่าสีเหลือง (Yellowness, b*) ในรูปแบบ CIE

5) วิเคราะห์ค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัส (Texture Profile Analysis, TPA) ของตัวอย่างด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส Instron (Warner-Bratzler, Instron model 1011, Instron company, Thailand) โดยทำการตัดตัวอย่างชิ้นสี่เหลี่ยมให้เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5×1.5×1.5 เซนติเมตร ทำการวัดค่าตัวอย่างด้วยหัววัดแบบกด (compression) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15.5 เซนติเมตร ทำการวัดค่าตัวอย่างและบันทึกค่าความแข็ง (Hardness, N) ค่าความเหนียวคล้ายยาง (Gumminess, N) ค่าการทนต่อการเคี้ยว (Chewiness, N) ค่าความยืดหยุ่น (Springiness, ratio) และค่าการเกาะตัวกัน (Cohesiveness, ratio)

6) วิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Shear Force) โดยใช้หัววัด Warner-Bratzler shear ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) รุ่น 3344 โดยตัดตัวอย่างตามแนวยาวของกล้ามเนื้อขนาด 1×1×2.5 เซนติเมตร จำนวน 5 ชิ้น

3.3.2.3 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี-กายภาพ (ภายหลังการปรุงสุก)
วิธีการเหมือนกับที่กล่าวไปข้างต้น

1) วิเคราะห์ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide

2) วัดค่าสี วิธีการเหมือนกับที่กล่าวไปข้างต้น

3) วิเคราะห์ค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัส (Texture Profile Analysis, TPA) Thailand)

4) วิเคราะห์ค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัส (Texture Profile Analysis, TPA)

3.3.2.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ทำการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบแบบ 3×6 factorial in CRD โดยทำการทดลองซ้ำ 3 รุ่นการผลิต ซึ่งมีปัจจัยในการทดลองคือ กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม บรอมิเลน และคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 และระยะเวลาที่ใช้ในการซูวี ได้แก่ 0, 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for Windows version 17.0: SPSS Inc.)

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* B13

4.1.1 การคัดเลือกตัวแปรที่สำคัญโดยใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD)

การคัดเลือกตัวแปรหรือปัจจัยทั้งหมด 11 ปัจจัย เพื่อใช้พิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ โดยการใช้แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) ตามวิธีการทดลองที่ 3.3.1.1 ข้อ 2) เนื่องจากมีปัจจัยในแผนการทดลองทั้งหมด 11 ปัจจัย แสดงในตารางที่ 4.1 จึงทำการเลือกแผนการทดลองที่มีจำนวนทรีตเมนต์หรือสภาวะการทดลอง (runs) เท่ากับ 12 จากนั้นทำการทดลองตามสภาวะการทดลองทั้ง 12 การทดลอง ผลการทดลองพบว่า มีกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์สูงสุดที่สภาวะการทดลองที่ 8 ซึ่งประกอบด้วย เจลาติน 15 กรัมต่อลิตร, แคลเซียมคลอไรด์ 0.2 เปอร์เซ็นต์, สารสกัดจากยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5, ปริมาตรกล้าเชื้อ 2 เปอร์เซ็นต์, ความเร็วในการเขย่า 200 รอบต่อนาที และระยะเวลาบ่ม 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.2)

จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปัจจัยที่สำคัญ โดยการวิเคราะห์ผลการทดลองสำหรับแผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design สามารถทำได้โดยการทดสอบค่าที (t-test) ของแต่ละปัจจัย ซึ่งปัจจัยที่มี p-value ต่ำกว่า 0.05 ถือว่ามีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ จากการศึกษาการใช้แผนการทดลอง PBD พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการบ่ม (p-value เท่ากับ 0.041) เป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ตามด้วยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น (p-value เท่ากับ 0.046) และความเข้มข้นของเจลาติน (p-value เท่ากับ 0.047) ตามลำดับ ดังนั้นปัจจัยทั้งสามนี้จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับการหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุด โดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD ภายใต้วิธี RSM

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์ทางสถิติของผล PBD ในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 สำหรับปัจจัย 11 ปัจจัย

ปัจจัย	ระดับ		Estimate	Coefficient	t-value	p-value
	ต่ำสุด (-1)	สูงสุด (+1)				
Gelatin (X_1)	10	15	11.17	5.58	13.40	0.047*
Glucose (X_2)	0	5	-6.83	-3.42	-8.20	0.077
Glycerol (X_3)	0	10	-0.83	-0.42	-1.00	0.500
NaCl (X_4)	0	10	-7.83	-3.92	-9.40	0.067
MgSO ₄ (X_5)	0	0.2	1.167	0.58	1.40	0.395
CaCl ₂ (X_6)	0	0.2	-6.50	-3.25	-7.80	0.081
Yeast extract (X_7)	0	1	7.5	3.75	9.00	0.070
Initial pH (X_8)	6.5	7.5	-11.50	-5.75	-13.80	0.046*
Inoculation size (X_9)	2	7	-1.83	-1.42	-1.00	0.500
Speed (X_{10})	100	200	5.83	2.92	7.00	0.090
Incubation time (X_{11})	24	48	12.83	6.42	15.40	0.041*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 การทดลอง PBD 12 สภาวะการทดลอง (Runs) สำหรับตัวแปร 11 ตัวเพื่อสังเกตการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13

Runs	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	X ₁₀	X ₁₁	U/ml
1	15	0	0	10	0.2	0.2	0	6.5	7	100	48	40
2	15	5	10	0	0.0	0.0	1	6.5	2	100	48	39
3	10	0	10	10	0.2	0.0	0	7.5	2	200	48	15
4	15	5	10	0	0.2	0.2	0	6.5	2	200	24	20
5	10	5	0	0	0.2	0.0	1	6.5	7	200	48	35
6	10	0	10	10	0.0	0.2	1	6.5	7	200	24	28
7	10	5	0	10	0.2	0.2	1	7.5	2	100	24	6
8	15	0	0	0	0.0	0.2	1	7.5	2	200	48	50
9	10	0	0	0	0.0	0.0	0	6.5	2	100	24	26
10	15	5	0	10	0.0	0.0	0	7.5	7	200	24	20
11	15	0	10	0	0.2	0.0	1	7.5	7	100	24	15
12	10	5	10	0	0.0	0.2	0	7.5	7	100	48	10

X₁: เจลาติน, X₂: กลูโคส, X₃: กลิเซอรอล, X₄: โซเดียมคลอไรด์, X₅: แมกนีเซียมซัลเฟต, X₆: แคลเซียมคลอไรด์, X₇: สารสกัดจากยีสต์, X₈: ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, X₉: ปริมาตรกล้าเชื้อที่ใช้, X₁₀: ความเร็วในการเขย่า และ X₁₁: ระยะเวลาในการบ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ด้วยวิธีการพื้นผิวตอบสนอง

ในงานวิจัยนี้ PBD และ CCD ภายใต้วิธี RSM เป็นวิธีการทางสถิติที่มีประสิทธิภาพในการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 จากปัจจัยอิสระทั้ง 11 ปัจจัย ผลการศึกษาจาก PBD พบว่าเวลาการบ่ม ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของเจลาติน เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* B13 นอกจากนี้ยังทำการทดลอง CCD เพื่อหาชุดของระดับปัจจัยที่ดีที่สุดเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์

ผลของการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ทั้งหมด 20 การทดลองของแผนการทดลองแบบ CCD จากปัจจัย 3 ปัจจัย (ระยะเวลาการบ่ม, ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของเจลาติน) แสดงในตารางที่ 4.3 จากวิธีการทดลองที่ 3.3.1.1 ข้อ 3 ผลลัพธ์จากการประมวลผลด้วยโปรแกรมเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความสำคัญของตัวแปรอิสระแต่ละตัวของแบบจำลองยังถูกกำหนดโดย p-value เห็นได้ชัดว่าความเข้มข้นของเจลาติน (X_1), ระยะเวลาในการบ่ม (X_7), และอิทธิพลร่วมระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและระยะเวลาในการบ่ม (X_3X_7) เป็นตัวแปรที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 4.4)

ผลการวิเคราะห์ความเหมาะสมของตัวแบบจำลองเพื่อหารูปแบบสมการที่เหมาะสม พบว่าแบบจำลอง (model) มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดย p-value ของแบบจำลองเท่ากับ 0.004 และค่าการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (R^2) ของแบบจำลองมีค่าเท่ากับ 0.8492 แสดงให้เห็นว่าแบบจำลองนี้สามารถอธิบายความผันแปรของการตอบสนองได้ 84.92 เปอร์เซ็นต์ สมการมีค่า R^2 ยิ่งสูงเท่าใดความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเน ผลลัพธ์ย่อมมีสูงมากยิ่งขึ้น โดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 หากสูงกว่า 0.9 ถือว่าดีมาก ดังนั้นแบบจำลองแบบกำลังสองดังแสดงในสมการ 3.1 มีความเหมาะสมสำหรับเป็นตัวแทนแบบจำลองที่จะใช้ในการทำนายการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (Y) โดย *B. subtilis* B13 และสามารถนำมาเขียนเป็นสมการถดถอยเพื่อแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าตัวแปรต่างๆกับค่าการตอบสนอง หลังจากตัดตัวแปรที่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติออกได้ ดังแสดงในสมการที่ 4.1

$$Y = -507 + 24.0X_1 + 89.5X_3 + 0.96X_7 - 1.85X_3X_7 + 0.1209X_7X_7 - 0.065X_3X_7 - 0.394X_1^2 - 4.26X_3^2 - 0.02469X_7^2 \quad (4.1)$$

โดยที่ Y คือการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ (U/ml) ที่คาดการณ์ไว้ และ X_1 , X_2 และ X_3 คือค่าของความเข้มข้นของเจลาติน (g/l), ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และระยะเวลาการบ่ม (h) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 การออกแบบการทดลองด้วยการวางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อใช้ในการศึกษาวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM) และค่าของกิจกรรมผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ที่ทำนายได้ (U/mL)

Run	ตัวแปร			Cell growth (OD600)	Collagenolytic activity (U/ml)	
	Gelatin (g/l)	Initial pH	Incubation time (h)		Mean Observed ^{/1}	ค่าการทำนาย
1	16.00	7.00	63.89	1.20	41.80 ± 3.62	41.77
2	16.00	7.00	39.50	1.49	40.04 ± 3.11	44.53
3	14.00	6.50	25.00	1.33	24.39 ± 4.14	25.51
4	16.00	7.00	15.11	1.27	18.46 ± 1.34	17.92
5	19.36	7.00	39.50	1.40	47.57 ± 4.45	50.89
6	18.00	7.50	54.00	1.17	54.31 ± 1.30	50.25
7	16.00	7.00	39.50	1.46	52.22 ± 0.00	44.53
8	16.00	6.16	39.50	1.56	42.77 ± 1.62	43.46
9	12.64	7.00	39.50	1.31	33.14 ± 5.32	29.27
10	18.00	6.50	54.00	1.41	59.82 ± 0.59	57.20
11	16.00	7.00	39.50	1.46	54.50 ± 3.31	44.53
12	14.00	7.50	25.00	1.24	28.15 ± 3.15	27.85
13	18.00	6.50	25.00	1.41	39.43 ± 7.29	35.07
14	16.00	7.00	39.50	1.45	40.80 ± 0.95	44.53
15	16.00	7.00	39.50	1.47	48.68 ± 2.32	44.53
16	16.00	7.84	39.50	1.40	40.82 ± 4.45	39.59
17	18.00	7.50	25.00	1.29	31.41 ± 1.22	30.01
18	16.00	7.00	39.50	1.42	37.04 ± 1.14	44.53
19	14.00	6.50	54.00	1.40	35.14 ± 3.27	33.62
20	14.00	7.50	54.00	1.26	32.64 ± 1.30	34.07

^{/1} ค่าที่แสดงคือค่า mean ± SD (n = 2).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ANOVA สำหรับวิธีพื้นผิวตอบสนอง (RSM)

Source	DF	SS	MS	F-value	p-value
Model	9	1,832.18	203.575	6.26	0.004*
X ₁	1	578.94	578.938	17.80	0.002*
X ₃	1	17.74	17.736	0.55	0.477
X ₇	1	700.10	700.099	21.52	0.001*
X ₁ X ₃	1	35.87	35.873	1.10	0.318
X ₁ X ₇	1	16.36	16.365	0.50	0.494
X ₃ X ₇	1	388.49	388.491	11.94	0.006*
X ₁ ²	1	27.35	27.347	0.84	0.381
X ₃ ²	1	98.35	98.351	3.02	0.113
X ₇ ²	1	1.77	1.768	0.05	0.820
Residual error	10	325.33	32.533		
Lack of fit	5	65.57	13.114	0.25	0.921
Pure error	5	259.76	51.953		
Correlation of total	19	2,157.51			

R^2 , 0.8492; Adj- R^2 , 0.7135; Pred- R^2 , 0.5890

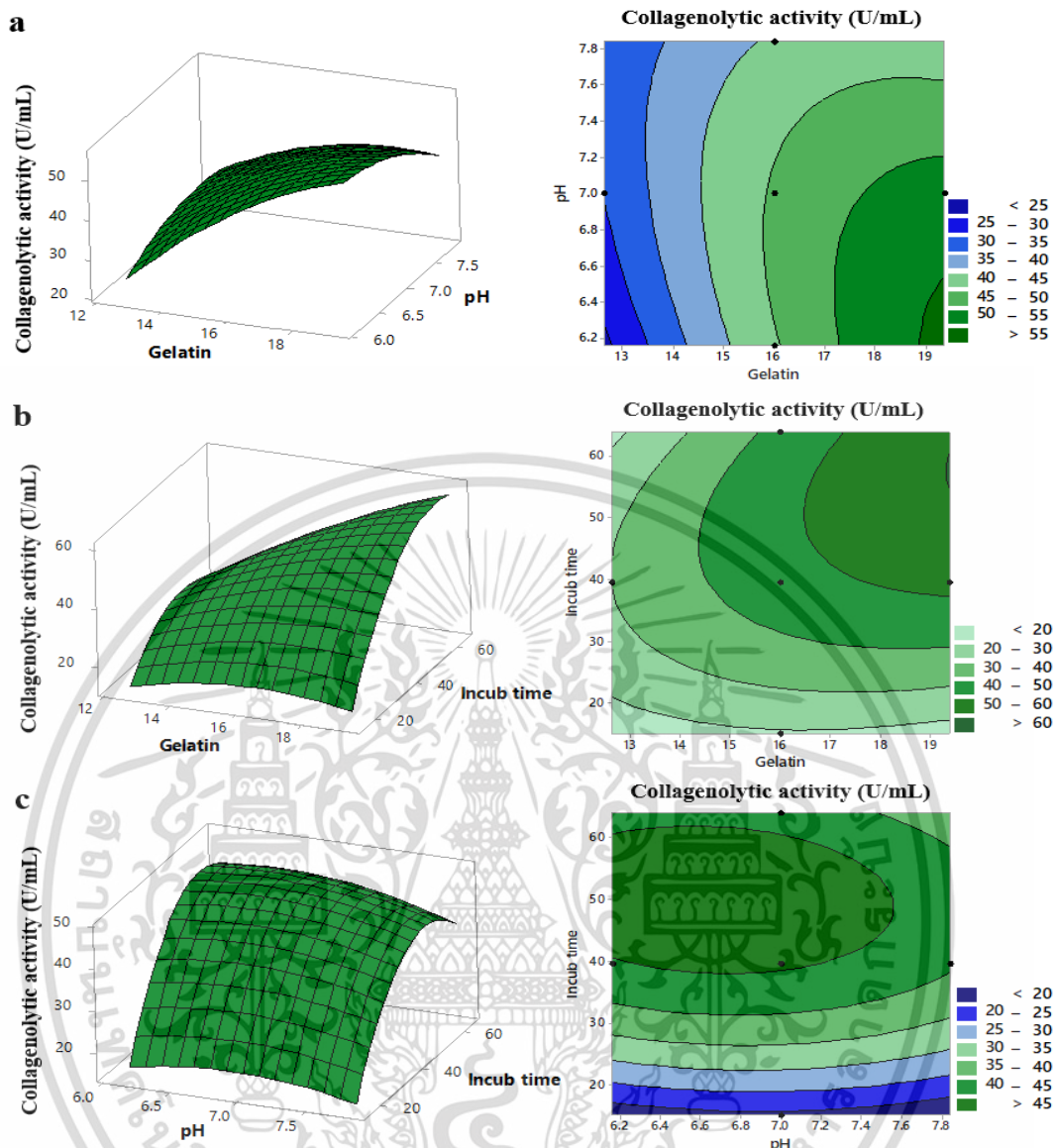
DF degree of freedom, SS sum of squares, MS mean square

* Significant at P<0.05

4.1.2.1 การแสดงผลการวิเคราะห์ด้วยกราฟพื้นผิวและกราฟโครงร่าง

นอกจากนี้การศึกษากราฟพื้นผิว (response surface plot) แบบสามมิติ และกราฟโครงร่าง (contour plot) แบบสองมิติตามสมการแบบจำลองยังช่วยเพิ่มความเข้าใจต่อรูปแบบของการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ที่มีต่ออิทธิพลร่วมระหว่างปัจจัยมากยิ่งขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 4.4 การเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินที่ 19 กรัมต่อลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 6.2 ถึง 6.4 จะทำให้การผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 4.4a) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างเจลาตินและระยะเวลาการบ่ม การเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินในช่วง 16.5 ถึง 19.0 กรัมต่อลิตร กับเวลาในการบ่มช่วง 40 ถึง 60 ชั่วโมง มีผลในเชิงบวกต่อการผลิตเอนไซม์ (ภาพที่ 4.4b) การตอบสนองของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและระยะเวลาการบ่มดังแสดงในภาพที่ 4.4c พบว่าสภาวะที่มีการผลิตเอนไซม์ได้สูงสุดคือ ช่วงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.2 ถึง 7.5 และเวลาในการบ่มเป็นช่วงเวลา 40 ถึง 60 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.1 กราฟพื้นผิว (response surface plot) (ซ้าย) และกราฟโครงร่าง (contour plot) (ขวา) ของผลของ (a) เจลาติน และความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น, (b) เจลาติน และเวลาการบ่ม และ (c) ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และเวลาบ่มในกิจกรรมการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.2 การทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

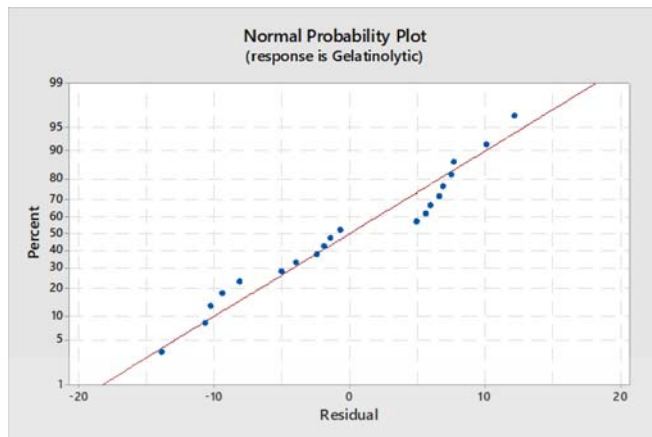
เมื่อทำการทดลองการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์ทั้ง 20 การทดลอง แล้วนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่าเหมาะสมหรือไม่ ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R^2) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) จึงต้องมีการทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลอง โดยการตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอน ได้แก่

1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงปกติ ซึ่งเป็นการตรวจสอบส่วนตกค้างของข้อมูลว่ามีการกระจายของค่าส่วนตกค้าง (ภาพที่ 4.1) พบว่ามีการกระจายตัวตามแนวเส้นตรง แสดงให้เห็นว่าส่วนตกค้างจากการทดลองของการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์ B13 ไม่แสดงสิ่งผิดปกติให้เห็น จึงสรุปได้ว่าค่าส่วนตกค้างมีการแจกแจงปกติ

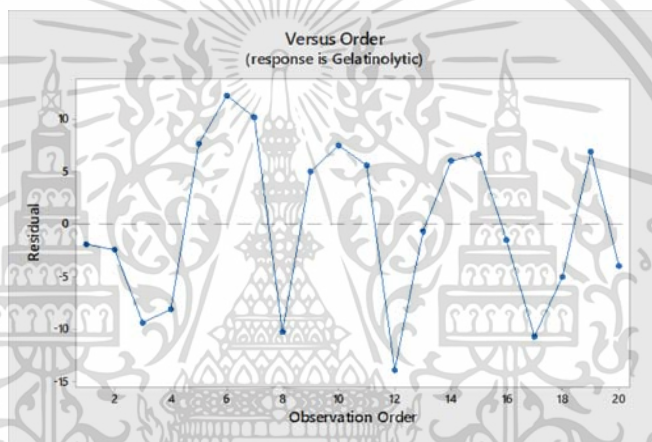
2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล (ภาพที่ 4.2) พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์ B13 ไม่มีรูปแบบที่แน่นอนหรือไม่สามารถประมาณรูปแบบที่แน่นอนได้ มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอแสดงว่าข้อมูลมีความเป็นอิสระ

3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน โดยใช้แผนภูมิกระจายของส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย (ภาพที่ 4.3) พบว่าส่วนตกค้างของผลการทดลองของการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอ็นไซม์มีการกระจายอย่างสม่ำเสมอทั้งทางบวกและทางลบ แสดงว่าข้อมูลมีความเสถียรของความแปรปรวน

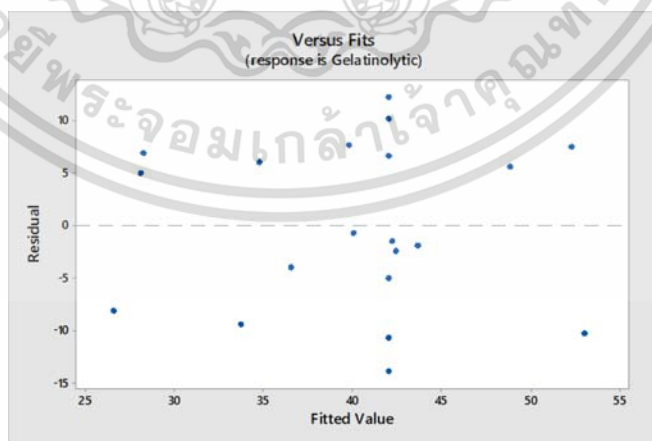
จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองทั้ง 3 ขั้นตอนแสดงให้เห็นว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน



ภาพที่ 4.2 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติส่วนตกค้าง



ภาพที่ 4.3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างกับลำดับข้อมูล



ภาพที่ 4.4 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.2.3 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์

เมื่อทำการทดลองทั้ง 20 การทดลอง จากนั้นทำการตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย (วิธีการทดลองที่ 3.3.1.1 ข้อ 4) และทำการตรวจวัดกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 (วิธีการทดลองที่ 3.3.1.1 ข้อ 5) ได้ข้อมูลดังแสดงในตารางที่ 4.3 จากนั้นการวิเคราะห์ค่าความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ พบว่าการเจริญของแบคทีเรียไม่มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.36 ซึ่งถือว่ามีความสัมพันธ์อยู่ในระดับต่ำ (ภาคผนวก)

4.1.2.4 การทดลองโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีการฟื้นฟิวตบสนอง

เมื่อทำการแทนค่าตัวแปรในสมการที่ 4.1 โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ คือ ความเข้มข้นของเจลาตินที่ 19 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.16 และเวลาในการบ่ม 59 ชั่วโมง ทำให้การคาดคะเนการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 ได้ค่าสูงสุด คือ 65.39 U/ml (จากสมการทำนายด้วยโปรแกรม) สำหรับการตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลองการทดลองการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B13 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมนี้ได้ดำเนินการทดลองทั้งหมดสามรอบ ค่าการทดลองที่สังเกตได้ดังแสดงในตารางที่ 4.5 คือ 65.18 ± 2.67 U/ml ซึ่งมีความใกล้เคียงกับค่าที่คาดการณ์ (65.36 U/ml)

ตารางที่ 4.5 การทดสอบกิจกรรมของ *B. subtilis* B13 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจาก RSM

ครั้งที่	กิจกรรมของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ (U/mL)
1	62.15
2	66.18
3	67.20
เฉลี่ย	65.18 ± 2.67

ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของเจลาตินสูงสามารถเพิ่มการผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ได้ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Patel *et al.* (2005) ซึ่งระบุว่าแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอสในความเข้มข้นของเจลาตินที่หลากหลายตั้งแต่ 0 ถึง 20 กรัม/ลิตร ยิ่งไปกว่านั้น Suphatharaprateep *et al.* (2011) ยังพบว่าความเข้มข้นของเจลาตินที่ 15 ถึง 10 กรัม/ลิตร แสดงให้เห็นว่ามีการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสจาก *B. cereus* CNA1 ที่เพิ่มขึ้น เจลาตินเป็นหนึ่งในคอลลาเจนชนิดต่างๆ ที่เสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสออกนอกเซลล์ (Pal and Suresh,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อคุณได้เห็นใบเซอร์เวอชิงนี้ กรุณา
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2016) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเจลาติน *B. subtilis* B13 สามารถผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสใน ระดับที่สูงขึ้นอาจเป็นเพราะการควบคุมการเมแทบอลิซึมทำให้แบคทีเรียสามารถสังเคราะห์ เอนไซม์คอลลาจีเนสได้มาก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lama *et al.* (2005) ซึ่งรายงานว่าการผลิต เอนไซม์โปรตีเอสที่เพิ่มขึ้นของแบคทีเรียสกุล *Salinivibrio* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเจลาตินจาก 10 เป็น 20 กรัม/ลิตร และแนะนำว่าเจลาตินเป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้น การผลิตเอนไซม์

สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ค่าที่ทำนายไว้ในการศึกษา ปัจจุบันสำหรับสภาวะที่เหมาะสมคือ 6.5 Liu *et al.* (2010) ระบุว่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็นตัว แปรที่สำคัญที่สุดที่มีผลต่อการผลิตโปรตีเอส โดย *B. sphaericus* DS11 และ Suphatharaprateep *et al.* (2011) พบว่า *B. cereus* CNA1 มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิตคอลลา เจนเท่ากับ 7.5 ในขณะที่ Sela *et al.* (1998) ระบุว่าการทำงานของคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ที่ เหมาะสมที่สุดสำหรับ *B. cereus* อยู่ในช่วงความเป็นกรด-ด่าง 5.4 ถึง 8.2 และนอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ โดย *B. alvei* DC-1 นั้นลดลงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 6.0 (Kawahara *et al.* 1993) ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเปลี่ยนกระบวนการของ เอนไซม์และถ่ายโอนของสารอาหารต่างๆ ทัวเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Moon and Paruleka. 1991) เซลล์จุลินทรีย์ที่แตกต่างกันมีความสามารถในการรักษาความผันแปรในค่าความเป็นกรด- ด่างของตัวกลางที่อยู่นอกเซลล์แตกต่างกันด้วย (Nielsen and Villadsen. 1994) โดยทั่วไปแล้ว neutrophilic *Bacillus* sp. (เช่น *B. subtilis* และ *B. licheniformis*) มีของเหลวภายในเซลล์ในไซโต- พลาสซึมที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.5 ในขณะที่ alkilophilic *Bacillus* sp. (เช่น *B. firmus*) มี ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.2 ถึง 8.5 (Çalik *et al.* 2001) จากข้อมูลนี้ทำให้ยืนยันได้ว่าคอลลาจีโนไล ติกส์-เอนไซม์ที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ได้มาจาก neutrophilic *Bacillus* sp.

ผลิตเอนไซม์โปรตีเอส โดยปกติเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 24 ถึง 120 ชั่วโมง ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Bacillus* และเอนไซม์เป้าหมาย (Chu *et al.* 1992 ; Mabrouk *et al.* 1999 ; Beg and Gupta. 2003) สำหรับงานวิจัยของ Tran and Nagano (2002) พบว่ามีการสร้าง เอนไซม์คอลลาจีเนสสูงสุดโดย *B. Sublilis* CN2 ที่เวลาการบ่ม 14 ชั่วโมง Suphatharaprateep *et al.* (2011) พบว่าการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนสโดย *B. cereus* CNA1 แสดงผลการผลิตเอนไซม์สูงสุด ที่ 48 ชั่วโมงของการบ่ม เวลาในการบ่มที่นานขึ้น (59 ชั่วโมง) สำหรับการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนส โดย *B. subtilis* B13 มากกว่าเวลาในการบ่มจากงานวิจัยต่างๆที่กล่าวไปข้างต้นนั้นอาจเกี่ยวข้องกับ ความเข้มข้นของเจลาตินที่สูงขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ความเข้มข้นของเจลาตินที่เพิ่มขึ้นทำให้เวลาใน การบ่มนานขึ้น และนอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มการผลิตเอนไซม์คอลลาจีเนส โดย *B. amyloliquefaciens* H11 (Sai-Ut *et al.* 2014)

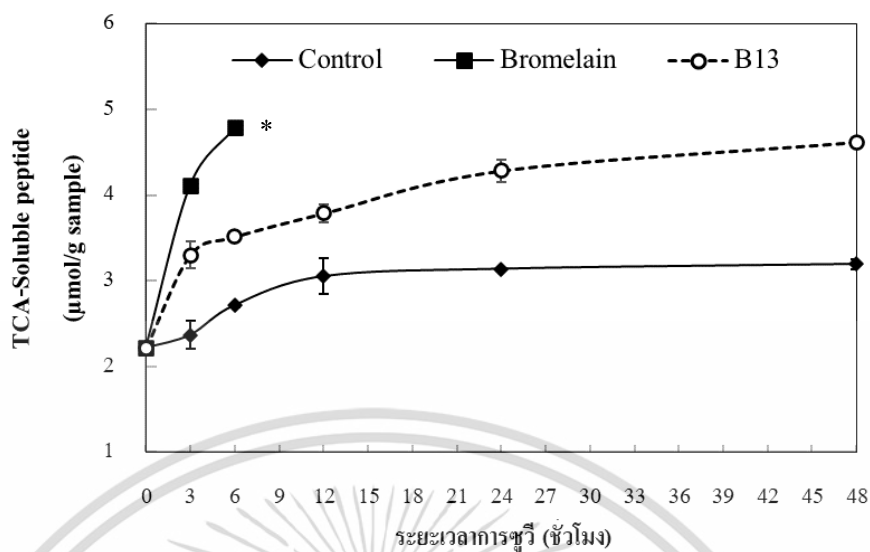
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาการนำคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์สเด็กเนื้อโคชวี

4.2.1 คุณภาพด้านเคมี

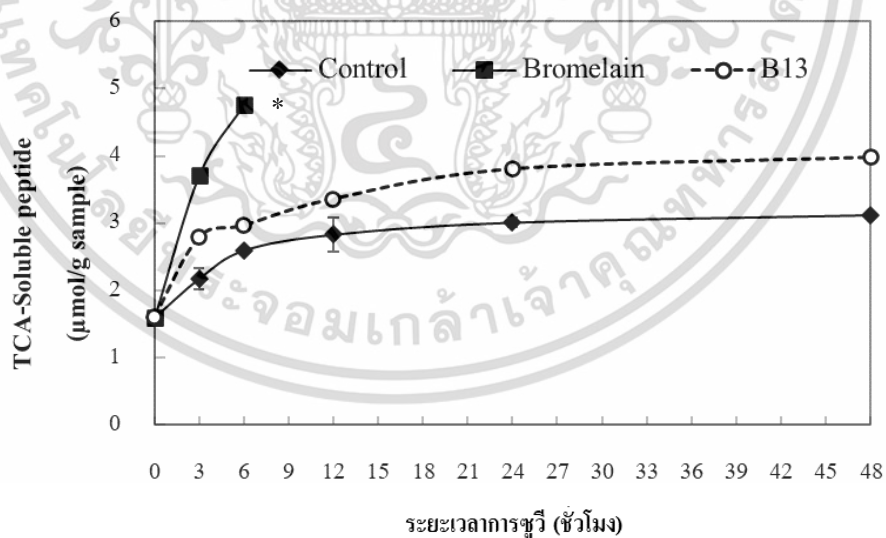
4.2.1.1 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide

ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ของผลิตภัณฑ์สเด็กเนื้อโคชวีหลังการชวีและภายหลังการปรุงสุก (ภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6 ตามลำดับ) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก) โดยกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อมากที่สุดเมื่อชวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ และพบว่าระยะเวลาการชวีมีผลทำให้ค่าการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุม และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการชวี กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีลักษณะนุ่มและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้ อีกทั้งยังพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชวีซึ่งมีผลทำให้ค่าการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งค่า TCA-Soluble peptide สูงบ่งบอกถึงมีการย่อยสลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อที่สูงและความนุ่มของเนื้อ (Rawdkuen *et al.* 2013)



ภาพที่ 4.5 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ที่ระยะเวลาการซุวีแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะเลอะมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

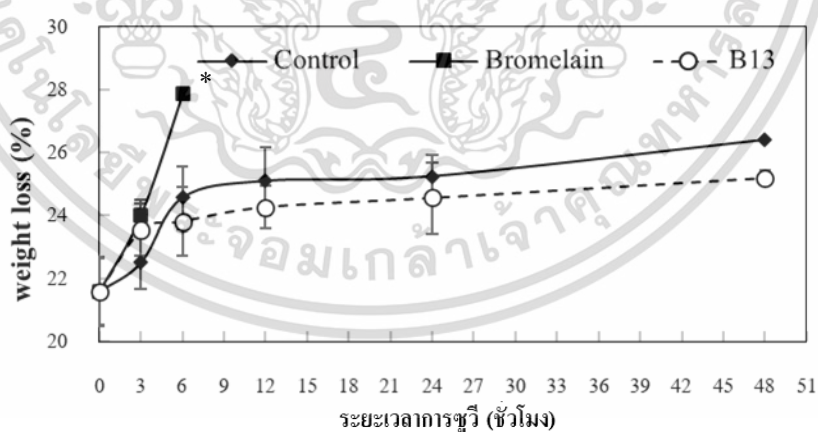


ภาพที่ 4.6 ค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide ที่ระยะเวลาการซุวีแตกต่างกันภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะเลอะมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

4.2.2 คุณภาพด้านกายภาพ

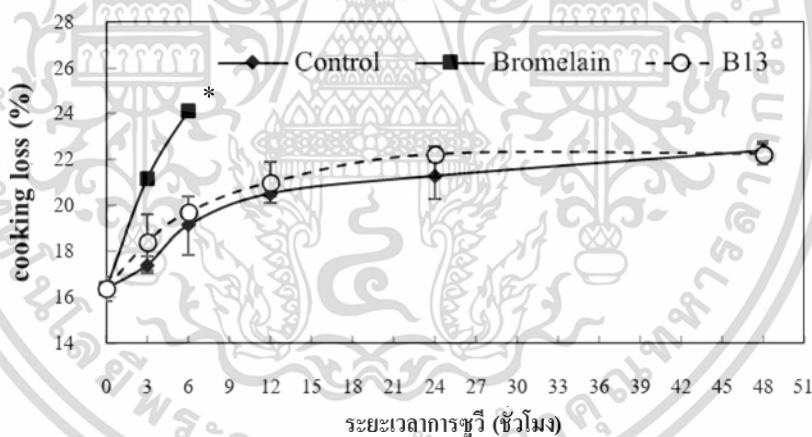
4.2.2.1 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการชงวี ดังแสดงในภาพที่ 4.7 พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่าการสูญเสียน้ำระหว่างชงวีมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มควบคุม และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีมีผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างชงวีของทุกกลุ่มการทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อพิจารณาผลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวีซึ่งมีผลทำให้ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการชงวีที่ 6 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 3 และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ กลุ่มควบคุมมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการชงวีที่ 6 ถึง 48 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 3 และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ค่ามากที่สุดเมื่อทำการชงวีที่ 3, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง รองลงมาคือ 0 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ismail *et al.* (2019) ซึ่งทำการชงวีตัวอย่างสติกเนื้อโคส่วนสะโพกพันอก (*M. semitendinosus*) ที่อุณหภูมิ 60, 65, 70 และ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง พบว่าเมื่อทำการชงวีเป็นเวลานานขึ้น และอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำเพิ่มมากขึ้น ซึ่งความร้อนที่อุณหภูมิ 60 ถึง 70 องศาเซลเซียสจะทำให้เกิดการหดตัวของขวางของเส้นใยกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำอย่างมาก และการหดตัวจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น



ภาพที่ 4.7 ค่าการสูญเสียน้ำระหว่างการชงวีที่ระยะเวลาแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะเละมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

4.2.2.2 ค่าการสูญเสียไน้ระหว่างการปรุงสุก ดังแสดงในภาพที่ 4.8 การปรุงสุกเป็นการทำให้ผลิตภัณฑ์ซูวีมีอุณหภูมิใจกลางเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิของเนื้อสุก) ซึ่งพบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าการสูญเสียไน้ระหว่างการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อซูวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่าการสูญเสียไน้ระหว่าง ปรุงสุกมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 และกลุ่มควบคุม และยังพบว่าระยะเวลาในการซูวีมีผลทำให้ค่าการสูญเสียไน้ระหว่างปรุงสุกของทุกกลุ่มการทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกทั้งยังพบว่าเมื่ออิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาซูวีซึ่งมีผลทำให้ค่าการสูญเสียไน้ระหว่างซูวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการซูวีที่ 6 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 3 และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ กลุ่มควบคุมมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการซูวีที่ 48 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 24 และ 12, 6, 3 และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 ค่ามากที่สุดเมื่อทำการซูวีที่ 24 และ 48 ชั่วโมง รองลงมาคือ 12, 6, 3 และ 0 ชั่วโมง ตามลำดับ (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก)



ภาพที่ 4.8 ค่าการสูญเสียไน้ระหว่างการปรุงสุกที่ระยะเวลาการซูวีแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

4.2.2.3 ค่าสี

1) ภายหลังกการชวูวี้ ดั่งแสดงในภาพที่ 4.9 (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก)

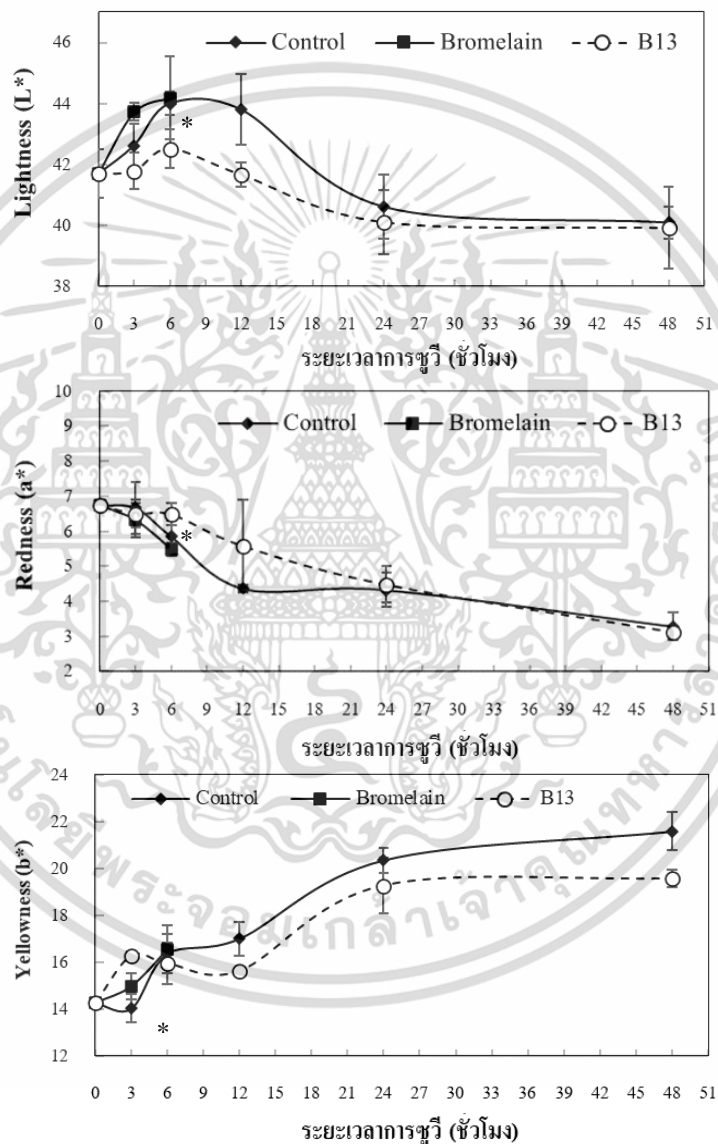
ค่าความสว่าง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความสว่างภายหลังกการชวูวี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชวูวี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่าความสว่างมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มควบคุม และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ตามลำดับ และเมื่อชวูวี้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนและกลุ่มควบคุมมีค่าความสว่างมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ค่าความสว่างที่สูงของกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนอาจเกิดขึ้นเนื่องจากเอนไซม์บรอมิเลนมีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้ดีทำให้ผลิตภัณฑ์สเตร็กเนื้อโคชวูวี้สูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ ผิวหน้าผลิตภัณฑ์จึงมีน้ำมาก (Rees *et al.* 2003) อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชวูวี้มีผลต่อค่าความสว่างภายหลังกการชวูวี้ของทุกกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชวูวี้ ($P > 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมมีค่าความสว่างเพิ่มขึ้นเมื่อทำการชวูวี้ที่ 0 ถึง 12 ชั่วโมง ซึ่งที่ชั่วโมงที่ 6 และ 12 มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือที่ 3 และ 0 ชั่วโมง และมีค่าลดลงเมื่อทำการชวูวี้ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกันกับกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ที่มีค่าลดลงเมื่อชวูวี้ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง แต่มีค่าความสว่างไม่แตกต่างกันที่ 0, 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ค่าความสว่างที่เพิ่มขึ้นในช่วงแรกของระยะเวลาชวูวี้เกิดจากเสียสภาพธรรมชาติและเกิดการจับตัวกันของโปรตีนเนื่องจากการให้ความร้อนเป็นเวลานานขึ้น (Christensen *et al.* 2011) และค่าความสว่างที่ลดลงในช่วงท้ายของระยะเวลาชวูวี้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลหรือเกิดขึ้นของสีน้ำตาลจากการให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์เป็นเวลานาน (Gök *et al.* 2008) และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่ามากที่สุดเมื่อทำการชวูวี้ที่ 6 และ 3 ชั่วโมง รองลงมาคือที่ 0 ชั่วโมง

ค่าสีแดง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าสีแดงภายหลังกการชวูวี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชวูวี้เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าสีแดงมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มควบคุม และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชวูวี้มีผลทำให้ค่าสีแดงภายหลังกการชวูวี้ของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาชวูวี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชวูวี้ ($P < 0.05$) ซึ่งค่าสีแดงที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการชวูวี้เพิ่มขึ้นเกิดจากความร้อนที่อุณหภูมิ 55 ถึง 65 องศาเซลเซียส ทำให้ไมโอโกลบินเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (Hunt *et al.* 1999)

ค่าสีเหลือง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าสีเหลืองภายหลังกการชวูวี้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชวูวี้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าสีเหลืองมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชวูวี้มีผลทำให้ค่าสีเหลืองภายหลังกการชวูวี้ของทุก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่มการทดลองมีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาชงวีย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวีย ($P < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Christensen *et al.* (2011) และ Becker *et al.* (2015) ซึ่งพบว่าค่าสีเหลืองของเนื้อสัตว์ที่ผ่านการชงวียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเนื้อสัตว์ที่ปรุงสุกภายใต้วิธีการชงวียมีค่าสีเหลืองที่สูงอาจเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของเมทไมโอโกลบินทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีสีน้ำตาล (Botinestea *et al.* 2016)



ภาพที่ 4.9 ค่าสีภายหลังการชงวียที่ระยะเวลาการชงวียที่แตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

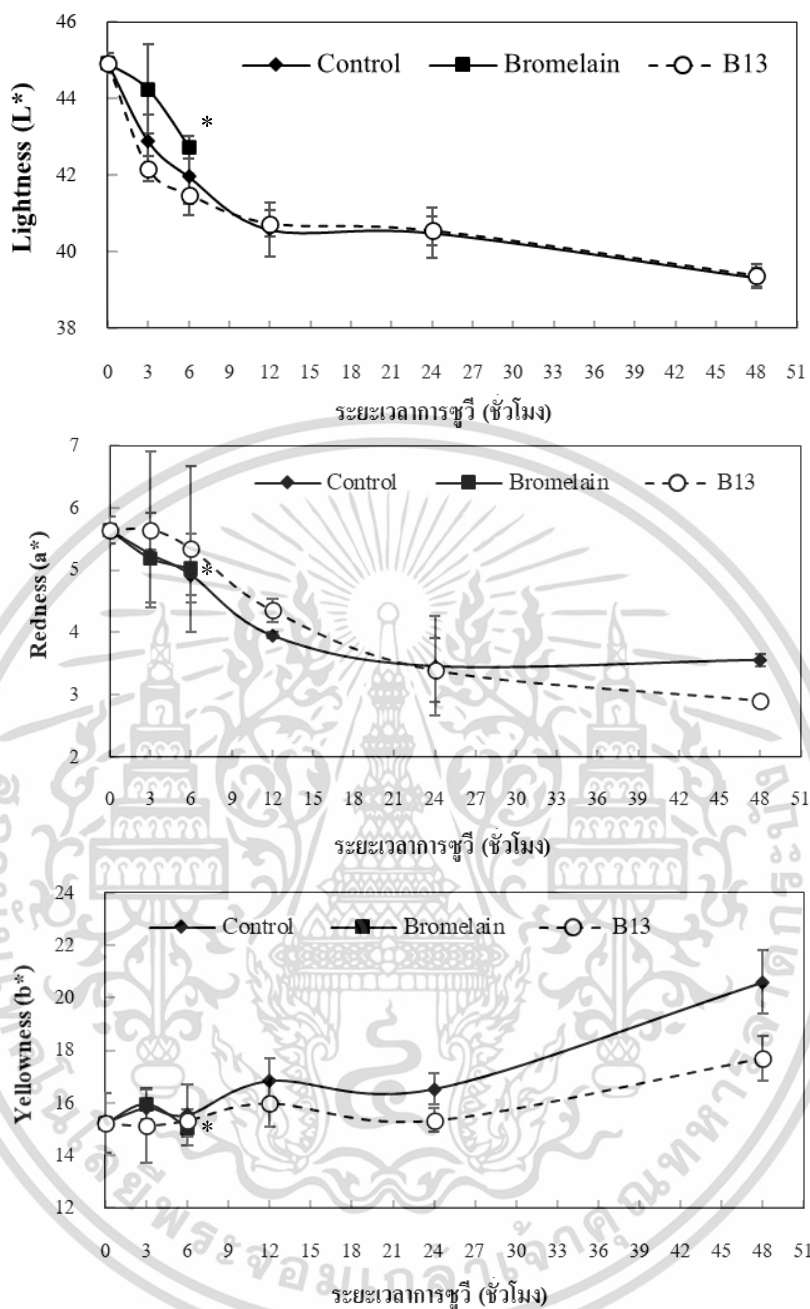
2) ภายหลังจากการปรุงสุก ดังแสดงในภาพที่ 4.10 (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก)

ค่าความสว่าง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความสว่างภายหลังจากการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่าความสว่างมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มควบคุม และกลุ่มคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความสว่างภายหลังจากการปรุงสุกของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่พบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P > 0.05$) ซึ่งค่าความสว่างที่ลดลงเนื่องจากการให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กับผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการชงวีมาแล้วจะทำให้เกิดการสูญเสียน้ำระหว่างการปรุงสุกมากขึ้น และเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนมากขึ้น และอาจเป็นผลมาจากความร้อนจะทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบินทำให้เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาล เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างหมู่อะมิโนของโปรตีนในกล้ามเนื้อและน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งมีอยู่ในเนื้อเยื่อ (Faustman and Suman, 2017)

ค่าสีแดง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าสีแดงภายหลังจากการปรุงสุกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และพบว่าระยะเวลาในการชงวีมีผลทำให้ค่าสีแดงภายหลังจากชงวีของทุกกลุ่มการทดลองมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ García-Segovia *et al.* (2007) ซึ่งพบว่าค่าสีแดงของผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคที่ผ่านการปรุงสุกที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีค่าลดลง และยังพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อโคที่ผ่านการปรุงสุกอุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ลดความเข้มข้นของรงควัตถุไดออกซีไมโอโกลบิน (Deoxy myoglobin) และออกซีไมโอโกลบิน (Oxy myoglobin) และเพิ่มความเข้มข้นของรงควัตถุเมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) และซัลไมโอโกลบิน (Sulfmyoglobin) หรือกล่าวคือการสูญเสียความเป็นสีแดงและการเพิ่มขึ้นของสีน้ำตาล-เขียว

ค่าสีเหลือง พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าสีเหลืองภายหลังจากการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าความสว่างมากที่สุด รองลงมาคือ กลุ่มคอลลาจีโนไลติกส์เอนไซม์ B13 และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าสีเหลืองภายหลังจากการปรุงสุกของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P < 0.05$) โดยค่าสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นเกิดจากเพิ่มความเข้มข้นของรงควัตถุเมทไมโอโกลบิน (Metmyoglobin) และซัลไมโอโกลบิน (Sulfmyoglobin) หรือการเพิ่มขึ้นของสีน้ำตาล-เขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.10 ค่าสีภายหลังการปรุงสุกที่ระยะเวลาการชงวีแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง
* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมี
ลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

4.2.2.4 การวิเคราะห์ค่าโครงสร้างเนื้อสัมผัส

1) ภายหลังจากการชงวี ดังแสดงในภาพที่ 4.11 (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก)

ค่าความแข็ง (Hardness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความแข็งภายหลังจากการชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าความแข็งมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน ตามลำดับ กล่าวคือผลิตภัณฑ์กลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีความนุ่มเนื้อมากที่สุด เนื่องจากเอนไซม์บรอมิเลนมีความสามารถในการย่อยเส้นใยกล้ามเนื้อได้ดีที่สุด รองลงมาคือผลิตภัณฑ์กลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความแข็งภายหลังจากการชงวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P < 0.05$)

ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัว (Cohesiveness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวภายหลังจากการชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวภายหลังจากการชงวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P > 0.05$)

ค่าความเหนียว (Gumminess) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความเหนียวภายหลังจากการชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าความเหนียวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความเหนียวภายหลังจากการชงวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P < 0.05$)

ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความยืดหยุ่นภายหลังจากการชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความยืดหยุ่นมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน และเมื่อชงวีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความยืดหยุ่นภายหลังจากการชงวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลนมีค่าลดลงตลอดระยะเวลาชงวี และกลุ่มคอลลาจีโนไล-

ดิกซ์เอนไซม์ B13 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาชงวี นอกจากนี้ยังพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P<0.05$)

ค่าความยากในการเคี้ยว (Chewiness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความยากในการเคี้ยวภายหลังการชงวีมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความยากในการเคี้ยวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน และที่ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าความยากในการเคี้ยวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน ตามลำดับ อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความยากในการเคี้ยวภายหลังการชงวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P<0.05$)

การวิเคราะห์ค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ภายหลังการชงวีของการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Roldán *et al.* (2013) ซึ่งทำการชงวีเนื้อแกะที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับการทดลองมีค่าความยืดหยุ่น ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัว และค่าความยากในการเคี้ยว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในด้านของอุณหภูมิระยะเวลาชงวี และอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาชงวี และพบว่าค่าความแข็ง และค่าความเหนียว มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในด้านของระยะเวลาชงวี และอิทธิพลร่วมระหว่างอุณหภูมิและระยะเวลาชงวี

2) ภายหลังปรุงสุก ดังแสดงในภาพที่ 4.12 (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก)

ค่าความแข็ง (Hardness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความแข็งภายหลังการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าความแข็งมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน ตามลำดับ และที่ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความแข็งมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความแข็งภายหลังการปรุงสุกของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชงวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P<0.05$)

ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัว (Cohesiveness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวภายหลังการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชงวีเป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชงวีทำให้ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัวภายหลังการปรุงสุกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชงวี ($P<0.05$)

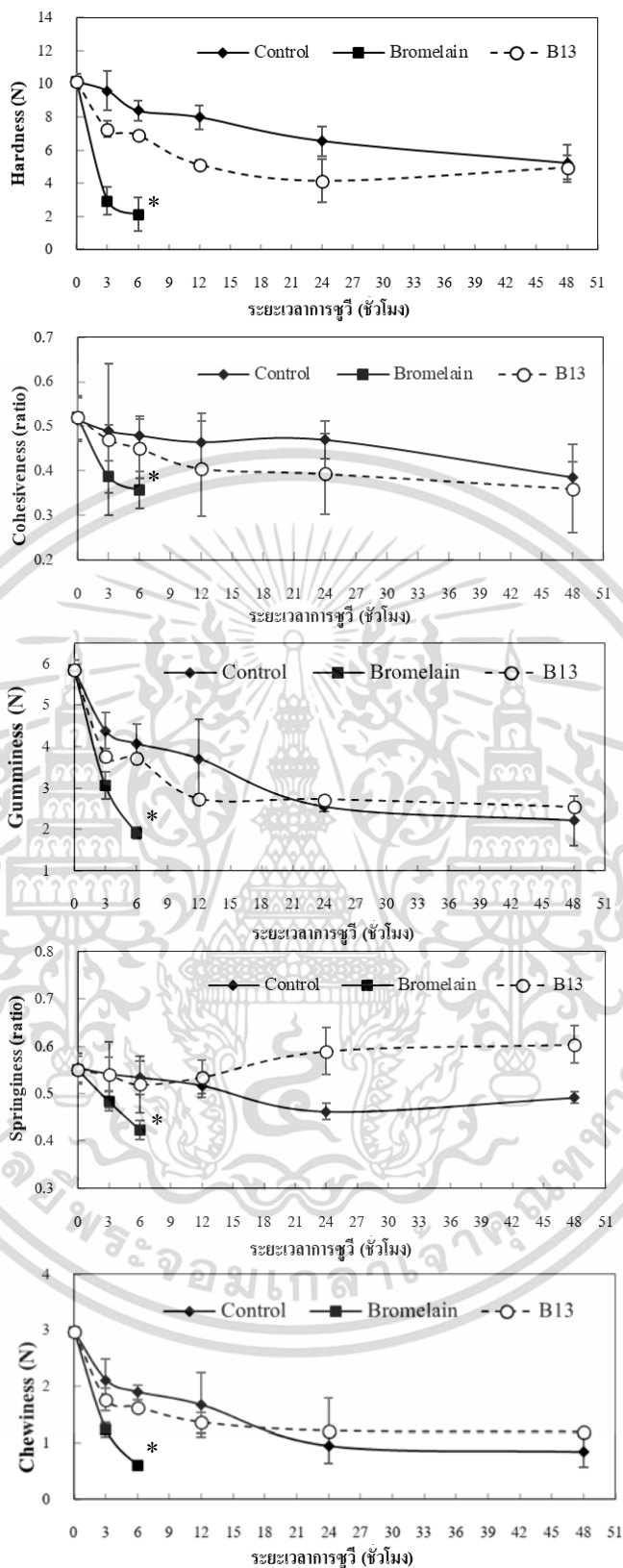
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรุงสูงสุดตลอดระยะเวลาชิวี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชิวี่ ($P>0.05$)

ค่าความเหนียว (Gumminess) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความเหนียวภายหลังการปรุงสูงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชิวี่เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความเหนียวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชิวี่ทำให้ค่าความเหนียวภายหลังการปรุงสูงของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชิวี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชิวี่ ($P<0.05$)

ค่าความยืดหยุ่น (Springiness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความยืดหยุ่นภายหลังการปรุงสูงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชิวี่เป็นเวลา 12 และ 48 ชั่วโมง กลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่าระยะเวลาในการชิวี่ไม่มีผลต่อค่าความยืดหยุ่นภายหลังการปรุงสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อีกทั้งไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชิวี่ ($P>0.05$)

ค่าความยากในการเคี้ยว (Chewiness) พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าความยากในการเคี้ยวภายหลังการปรุงสูงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเมื่อชิวี่เป็นเวลา 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมและกลุ่มคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีค่าความยากในการเคี้ยวมากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มเอนไซม์บรอมิเลน อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการชิวี่ทำให้ค่าความยากในการเคี้ยวภายหลังการปรุงสูงของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาชิวี่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าไม่มีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาชิวี่ ($P<0.05$)



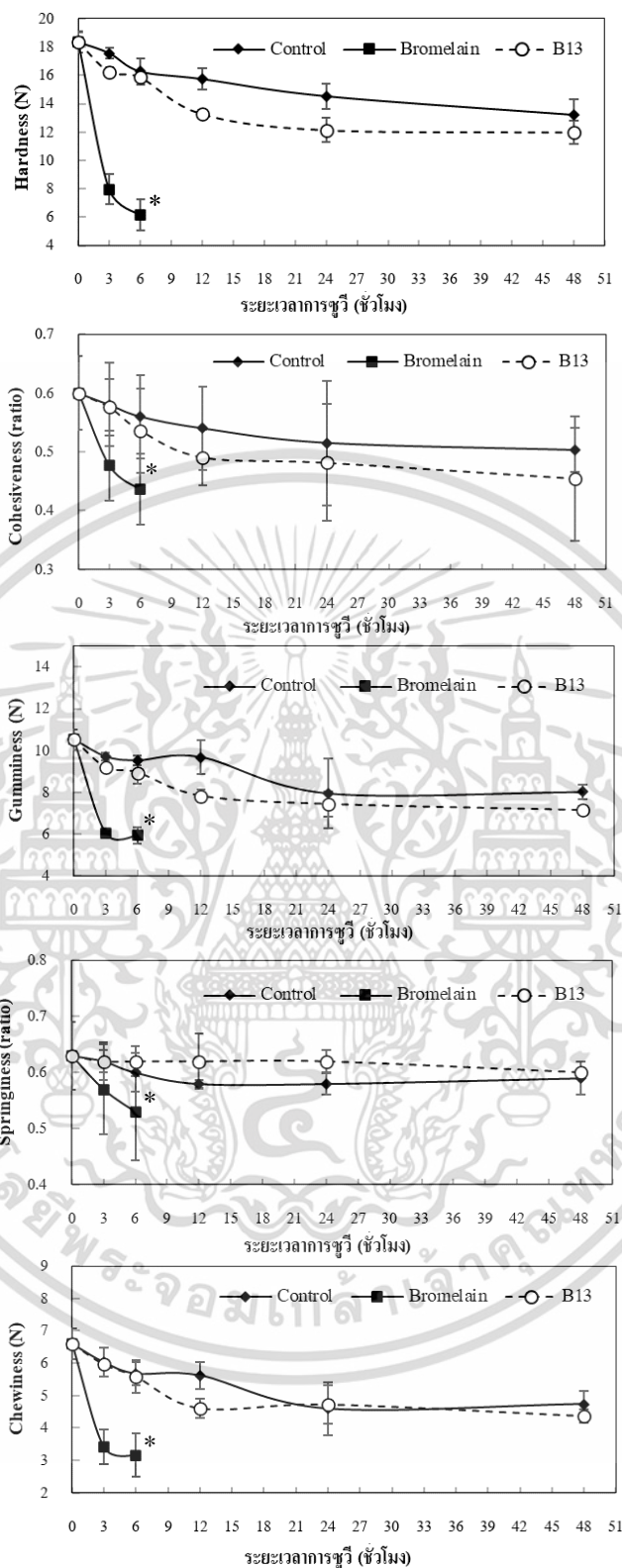
ภาพที่ 4.11 ค่า TPA ของตัวอย่างเนื้อโคที่ชงวีที่ระยะเวลาแตกต่างกันของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (**■** Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมี


ลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.12 ค่า TPA ของตัวอย่างเนื้อโคที่ชงวีที่ระยะเวลาแตกต่างกันภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน ( Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

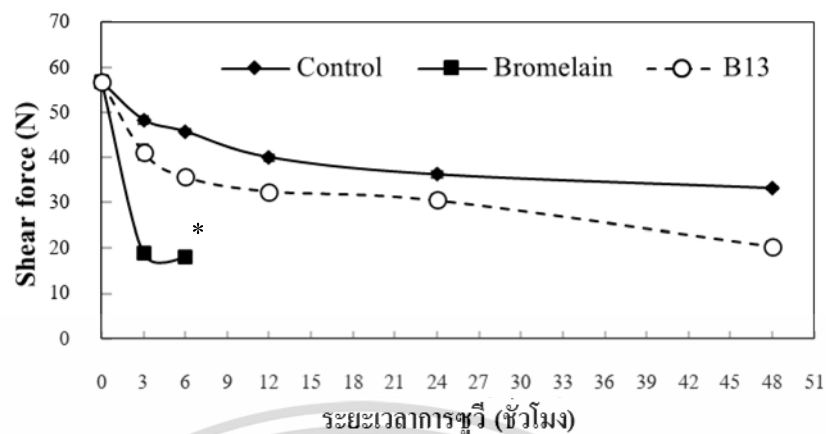
4.2.2.5 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ

ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อ โคภายหลังการซูวี ดังแสดงในภาพที่ 4.13 พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ดูข้อมูลสถิติในภาคผนวก) โดยที่ระยะเวลาซูวีที่ 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มบรอมิเลน ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อ โคที่ใช้เอนไซม์ร่วมกับการซูวีมีความนุ่มกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ใช้การฉีดน้ำ DI ร่วมกับการซูวี และการใช้เอนไซม์บรอมิเลนร่วมกับวิธีการซูวีมีความนุ่มมากกว่าการใช้คอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 เนื่องจากเอนไซม์บรอมิเลนมีความจำเพาะสูงกับโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ สามารถย่อยเส้นใยกล้ามเนื้อได้จึงทำให้ผลิตภัณฑ์มีความนุ่มมากจนมีลักษณะและและเหลวเมื่อซูวีที่เวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้ไม่สามารถวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อได้และคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีความสามารถในการย่อยโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อได้ดีกว่าเอนไซม์บรอมิเลนทำให้ตัวอย่างมีลักษณะไม่นุ่มและ แต่คอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 มีความสามารถในการย่อยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันได้ดี จึงทำให้ตัวอย่างมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อซูวีที่เวลา 48 ชั่วโมง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhu *et al.* (2018) ซึ่งทำการใช้เอนไซม์แอสคินีดินร่วมกับการซูวีในเนื้อโค พบว่าเนื้อโคที่ใช้เอนไซม์แอสคินีดินร่วมกับการซูวีมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่าระยะเวลาในการซูวีมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อภายหลังการซูวีของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาซูวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาซูวี ($P < 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ismail *et al.* (2019) ซึ่งพบว่าค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคที่ผ่านการซูวีมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระยะเวลาซูวีเพิ่มขึ้น และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น

เช่นเดียวกันกับค่าแรงตัดผ่านเนื้อภายหลังการซูวี พบว่ากลุ่มการทดลองมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของผลิตภัณฑ์สเต็กเนื้อ โคซูวีภายหลังการปรุงสุกมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ระยะเวลาซูวีที่ 3 และ 6 ชั่วโมง กลุ่มควบคุมมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มคอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 และกลุ่มบรอมิเลน ตามลำดับ พบว่าระยะเวลาในการซูวีมีผลทำให้ค่าแรงตัดผ่านเนื้อภายหลังการปรุงสุกของทุกกลุ่มการทดลองลดลงตลอดระยะเวลาซูวีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และพบว่ามีอิทธิพลร่วมระหว่างกลุ่มการทดลองและระยะเวลาซูวี ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.14)

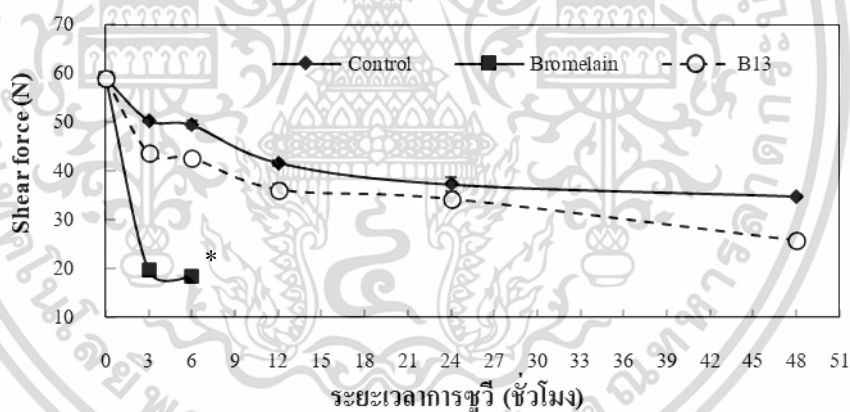
ดังนั้นการใช้คอลลาจิโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 ร่วมกับการซูวีที่เวลา 3 ชั่วโมง สำหรับการวิเคราะห์ค่าแรงตัดผ่านเนื้อทั้งภายหลังการซูวีและภายหลังการปรุงสุกพบว่าสามารถทำให้เนื้อโคมีความนุ่มใกล้เคียงและเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมที่ทำการซูวีเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคที่ระยะเวลาการชงวีแตกต่างกันภายหลังการชงวีของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้



ภาพที่ 4.14 ค่าแรงตัดผ่านเนื้อของเนื้อโคที่ระยะเวลาการชงวีแตกต่างกันภายหลังการปรุงสุกของทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง

* ตัวอย่างกลุ่มเอนไซม์บรอมีเลน (—■— Bromelain) ชั่วโมงที่ 12, 24 และ 48 ตัวอย่างมีลักษณะและมากจึงไม่สามารถวัดค่าได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกปัจจัยทั้งหมด 11 ปัจจัย เพื่อใช้พิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์โดยการใช่แผนการทดลองแบบ Plackett and Burman Design (PBD) พบว่ามีปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ เวลาการบ่ม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของเจลาติน และจากปัจจัยทั้งสามนี้จึงเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดสำหรับการหาชุดของระดับปัจจัยที่ดีที่สุดโดยใช้แผนการทดลองแบบ CCD ภายใต้วิธี RSM ซึ่งพบว่าการผลิตคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์มีค่าสูงสุด (65.18 U/ml) เมื่อเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* B13 ที่ความเข้มข้นของเจลาติน 19 กรัม/ลิตร และค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเท่ากับ 6.16 ด้วยเวลาบ่ม 59 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะเริ่มต้นก่อนการหาสภาวะที่เหมาะสม (15 U/ml) พบว่ามีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้น 4.36 เท่า

ผลการศึกษาจากการนำคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์จาก *B. subtilis* B13 ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์สแต็กเนื้อโคชูวี พบว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 สามารถทำให้สแต็กเนื้อโคชูวีมีค่าดัชนีที่บ่งบอกถึงการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยวิธี TCA-Soluble peptide พบว่าสามารถย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม และพบว่าค่าการสูญเสียน้ำภายหลังการชวูรต่ำกว่าตัวอย่างกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังทำให้ผลด้านค่าเค้าโครงเนื้อสัมผัสที่แสดงถึงความนุ่มเนื้อ และค่าแรงตัดผ่านเนื้อมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์บรอมีเลน พบว่าคอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 สามารถเป็นทางเลือกที่จะนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์สแต็กเนื้อโคชูวีที่ดีกว่าเนื่องจากเอนไซม์บรอมีเลนทำให้ผลิตภัณฑ์นุ่มและมากเกินไป ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์บรอมีเลนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยพบว่าเมื่อทำการชวูรรวมกับการใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ B13 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถทำให้ตัวอย่างมีความนุ่มเทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมที่เวลา 12 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

สามารถศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการอื่นที่ใช้ร่วมกับการใช้คอลลาจีโนไลติกซ์เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และเพื่อปรับปรุงความนุ่มเนื้อของผลิตภัณฑ์ให้เร็วขึ้น เช่น การแปรรูปผลิตภัณฑ์ในวิธีการต่างๆ ที่มีการให้ความร้อนในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

บรรณานุกรม

- ปรารธนา พุกกะศรี. 2548. **สารานุกรมเกี่ยวกับโคเนื้อ: ชุดที่ 3 พันธุ์และการคัดเลือกโคพันธุ์.** กรุงเทพมหานคร. นีออน บุ๊ค มีเดีย
- Aaslyng, M. 2002. "Quality indicators for raw meat." 157-174. in Kerry, J., Kerry, J. and Ledward, D. **Meat Processing: Improving Quality.** Cambridge : Woodhead.
- Akiyama, K., Mori, K. and Takata, R. 1999. "Identification of collagenase produce by *Bacillus cereus* R75E isolated from human colostrum." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 87 : 231-233.
- 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.
- Baldwin, D.E. 2012. "Sous vide cooking: A review." **International Journal of Gastronomy and Food Science.** 1 : 15-30.
- Becker, A., Boulaaba, A., Pinggen, S., Röhner, A. and Klein, G. 2015. "Low temperature, long time treatment of porcine *M. longissimus thoracis et lumborum* in a combisteamer under commercial conditions." **Journal of Meat Science.** 110 : 230-235.
- Beg, Q.K. and Gupta, R. 2003. "Purification and characterization of an oxidation stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*." **Enzyme and Microbial Technology.** 32 : 294-304.
- 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.
- Bemlohr, R.W. 1964. "Post Logarithmic phase metabolism of sporulating microorganisms." **Journal of Biological Chemistry.** 239 : 538-543.
- Bemlohr, R.W. and Clark, V. 1971. "Characterization and regulation of protease synthesis and activity in *Bacillus licheniformis*." **Journal of Bacteriology.** 105 : 276-283.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., Riebroy, S., Ishizaki S. and Tanaka, M. 2002. "Gel-Forming properties of surimi produced from bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *P. macracanthus*, stored in ice." **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 82 : 1442- 1451.

- Boland, M. 2013. "Kiwifruit proteins and enzymes: actinidin and other significant proteins." **Advances in Food and Nutrition Research.** 68 : 59-80.
- Bolumar, T., Enneking, M., Toepfl, S., and Heinz, V. 2013. "New developments in shockwave technology intended for meat tenderization: Opportunities and challenges. A review." **Journal of Meat science.** 95 : 931-939.
- Botinestean, C., Keenan, D. F., Kerry, J. P. and Hamil, R. M. 2016. "The effect of thermal treatments including sous-vide, blast freezing and their combinations on beef tenderness of *M. semitendinosus* steaks targeted at elderly consumers." **LWT-Food Science Technology.** 74 : 154–159.
- Boyes, S., Strubi, P. and Marsh, H. 1997. "Actinidin levels in fruit of Actinidia species and some Actinidia arguta rootstockscion combinations." **LWT-Food Science Technology.** 30 : 379-389.
- Brevie, L.C.U.R. 2007. "Biochemical aspects of meat tenderness: a brief review." **Archiva zootechnica.** 56 : 1-8.
- Brown, A. 2014. **Understanding food: principles and preparation.** 6th ed. Canada : Nelson Education.
- Burghagen, M. 1999. "Collagen." 540-547. In Belitz, H.D. and Grosch, W. **Journal of Food chemistry.** 2nd ed. Berlin : Springer-verlag.
- Çalık, P., Çalık, G. and Özdamar, T. H. 2001. "Bioprocess development for serine alkaline protease production: A Review." **Reviews in Chemical Engineering.** 17 : 1-62.
- Chan, J.H. and Han, J.A. 2020. "Synergistic effect of sous-vide and fruit-extracted enzymes
- Charley, H., Weaver, C. 1998. **Foods : A Scientific Approach.** 3rd ed. new jersey : Prentice-Hall.
- Christensen, L., Ertbjerg, P., Aaslyng, M. D. and Christensen, M. 2011. "Effect of prolonged heat treatment from 48°C to 63°C on toughness, cooking loss and color of pork." **Meat Science.** 88 : 280-285.
- Chu, I.M., Lee, C. and Li, T.S. 1992. "Production and degradation of alkaline protease in batch cultures of *Bacillus subtilis* ATCC 14416." **Enzyme and Microbial Technology.** 14 : 755-761.

- Church, I. 1998. "The sensory quality, microbiological safety and shelf life of packaged foods." 190-205. in Ghazala, S. **Sous Vide and Cook–Chill Processing for the Food Industry.** Gaithersburg : Aspen.
- Church, I.J. and Parsons, A.L. 2000. "The sensory quality of chicken and potato products prepared using cook-chill and sous vide methods." **International Food Science and Technology.** 35 : 155-162.
- Covington, A. D. and Covington, T. 2009. **Tanning chemistry: the science of leather.** Cambridge : Royal Society of Chemistry.
- Creed, P.G. 1998. "Sensory and nutritional aspects of sous vide processed foods." 57-88. in Ghazala S. **Sous Vide and Cook–Chill Processing for the Food Industry.** Gaithersburg : Aspen.
- Dalling, M. 1986. **Plant Proteolytic Enzyme.** Florida : CRC Press.
- Davey, C. L. and Gilbert, K. V. 1976. "Temperature-dependent cooking toughness in beef." **Journal of the Science of Food and Agriculture.** 25 : 931-938.
- Dean, A., Voss, D. and Draguljic, D. **Design and analysis of experiments.** New York : Springer International. 2000
- Deutscher, J. 2008. "The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria." **Current Opinion in Microbiology.** 11 : 87-93.
- Doi, R.H. 1972. "Role of Protease in sporulation." **Current Topics in Cellular Regulation.** 6 : 1-20.
- Elzo, M.A., Johnson, D.D., Wasdin, J.G. and Driver, J.D. 2012. "Carcass and meat palatability breed differences and heterosis effects in an Angus–Brahman multibreed population." **Journal of Meat Science.** 90 : 87-92.
- Fareh, A. 2018. "The Characterisation of key Processes In Sous Vide Meat Cooking." A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Masters in Engineering at Massey University, Manawatu, New Zealand
- Faustman, C. and Suman S.P. 2017, "The eating quality of meat." Toldra, **F. Lawrie's Meat Science.** pages. 329–356.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C. and Hutin, H.O. 1996. "Characteristic of Edible Muscle Tissue." 902-906. in Fennema, O.R. **Journal of Food Chemistry.** 3rd ed. New york : Marcel Dekker.

- García-Linares, M.C., Gonzalez-Fandos, E., García-Fernández, M.C. and García-Arias M.T. 2004. "Microbiological and nutritional quality of sous vide or traditionally processed fish: influence of fat content." **Journal of Food Quality**. 27 : 371-387.
- García-Segovia, P., Andrés-Bello, A. and Martínez-Monzó, J. 2007. "Effect of cooking method on mechanical properties, color and structure of beef muscle (*M. pectoralis*)."
Journal of Food Engineering. 80 : 813-821.
- Gerrard, D.E., and Grant, A.L. 2003. **Principles of animal growth and development**. USA : Kendall Hunt.
- Gök, V., Obuz, E. and Akkaya, L. 2008. "Effects of packaging method and storage time on the chemical, microbiological, and sensory properties of Turkish pastirma: a dry cured beef product." **Journal of Meat Science**. 80 : 335-344.
- Griffin, P.T. and Forgarty, W.M. 1973. "Production and Purification of the MetalloProtease of *Bacillus polymyxa*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 26 : 185-190.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Khan, S. and Chauhan, B. 2002b. "An overview on fermentation, downstream processing and properties of microbial alkaline proteases." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60 : 381-395.
- Gupta, R., Beg, Q.K. and Lorenz, P. 2002a. "Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 59 : 15-32.
- Ha, M., Bekhit, A.E.-D.A., Carne, A. and Hopkins, D.L. 2012. "Characterization of commercial papain bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins." **Journal of Food Chemistry**. 134 : 95-105.
- Ha, M., Bekhit, A.E.-D.A., Carne, A. and Hopkins, D.L. 2013. "Comparison of the proteolytic activities of new commercially available bacterial and fungal proteases toward meat proteins." **Journal of Food Science**. 78 : 170-177.
- Harrington, D.J. 1996. "Bacterial collagenases and collagen-degrading enzymes and their potential role in human disease." **Infection and Immunity**. 64 : 1885-1891.
- Harris, E.L. and Angal, S. 1989. **Protein purification methods: a practical approach**. Oxford University : IRL Press.
- Herring, H.K., Cassens, R.G., and Risky, E.J. 1965. "Further Studies on Bovine Muscle Tenderness as Influenced by Carcass Position, Sarcomere Length, and Fiber Diameter." **Journal of Food Science**. 30 : 1049-1054.

- Huang, G.L., Gosschalk, J.E., Kim, Y.S., Ogorzalek, Loo, R.R. and Clubb, R.T. 2018. “Stabilizing displayed proteins on vegetative *Bacillus subtilis* cells.” **Applied Microbiology and Biotechnology**. 102 : 6547-6565.
- Huerta-Montauti, D., Miller, R., Pfeiffer, C.S., Pfeiffer, K., Nicholson, K., Osburn, W. and Savell, J. 2008. “Identifying muscle and processing combinations suitable for use as beef for fajitas.” **Journal of Meat Science**. 80 : 259-271.
- Ismail, I., Hwang, Y.H. and Joo, S.T. 2019. “Interventions of two-stage thermal sous-vide cooking on the toughness of beef semitendinosus.” **Journal of Meat Science**. 157 : 107882.
- 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.” **Journal of Meat Science**. 75 : 628-639.
- John, D.H. and David, G.C. 1991. “The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous -phase growth.” **Applied Microbiology and Biotechnology**. 35 : 72-76.
- Johnvesly, B. and Naik, G. R. 2001. “Studies on production of thermostable alkaline protease from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus* sp. JB-99 in a chemically defined medium.” **Process Biochemistry**. 37 : 139-144.
- Juárez, M., Aldai, N., López-Campos, O., Dugan, M.E.R., Uttaro, B. and Aalhus, J.L. 2011. **Handbook of Meat and Meat Processing**. Canada: Minister of Agriculture and Agri-Foods.
- 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.
- 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.
- 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kerry, J. and Ledward, D. 2009. **Improving the Sensory and Nutritional Quality of Fresh Meat**. India : Woodhead.
- Kraemer, W.J., Fleck, S.J. and Deschenes, M.R. 2011. **Exercise physiology: integrating theory and application**. Philadelphia : Lippincott Williams and Wilkins.
- Kramer, D.E. and Whitaker, J.R. 1964. "Ficus enzymes II. Properties of the proteolytic enzymes from the latex of *Ficus carica* variety Kadota." **Journal of Biochemical**. 239 : 2178-2183.
- Laakkonen, E., Wellington, G. and Sherbon, J. 1970. "Low-temperature, longtime heating of bovine muscle 1. Changes in Tenderness, Water-Binding Capacity, pH and Amount of Water-Soluble Components." **Journal of Food Science**. 35 : 175-177.
- Lagerstedt, Å., Enfält, L., Johansson, L., and Lundström, K. 2008. "Effect of freezing on sensory quality, shear force and water loss in beef *M. longissimus dorsi*." **Journal of Meat Science**. 80 : 457-461.
- Lama, L., Romano, I., Calandrelli, V., Nicolaus, B. and Gambacorta, A. 2005. "Purification and characterization of a protease produced by an aerobic haloalkaliphilic species belonging to the *Salinivibrio* genus." **Research in Microbiology**. 156 : 478-484.
- Ledward, D. 1978. "Scanning calorimetric studies of some protein-protein interactions involving myoglobin." **Journal of Meat science**. 2 : 241-249.
- Lesky, J., Lesky, T. and Lesky J. 2001. "Method and apparatus for food marinating." **US Patent No. 6,242,025B1**.
- Leygonie, C., Britz, T.J., and Hoffman, L.C. 2012. "Impact of freezing and thawing on the quality of meat: Review." **Journal of Meat Science**. 91 : 93-98.
- Liu, F., Meng, L., Gao, X., Li, X., Luo, H. and Dai, R. 2013. "Effect of end point temperature on cooking losses, shear force, color, protein solubility and microstructure of goat meat." **Journal of Food Processing and Preservation**. 37 : 275-283.
- Liu, S., Fang, Y., Lv, M., Wang, S. and Chen, L. 2010. "Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology." **Journal of Bioresource Technology**. 101 : 7924-7929.
- Mabrouk, S.S., Hashem, A.M., El-Shayeb, N.M.A., Ismail, M.S. and Abdel-Fattah, A.F. 1999. "Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415." **Journal of Bioresource Technology**. 69 : 155-159.

- Marsh, B.T., and Leet, N.G. 1966. "Studies in meat tenderness. III. The effects of cold shortening on tenderness." **Journal of Food Science.** 31 : 450-459.
- Matsushita, O., Jung, C.M., Katayama, S., Minami, J., Takahashi, Y. and Okabe, A. 1999. "Gene duplication and multiplicity of collagenases in *Clostridium histolyticum*." **Journal of Bacteriology.** 181 : 923-933.
- McGee, H. 1984. **On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen.** New York : Scribner.
- McKeith, F.K., Savell, J.W., Smith, G.C., Dutson, T.R. and Carpenter, Z.L. 1985. "Tenderness of major muscles from three breed-types of cattle at different times-on feed." **Journal of Meat Science.** 13 : 151-166.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. 1991. "A parametric study of protease production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus firmus*." **Journal of Biotechnology and Bioengineering.** 37 : 467-483.
- Moon, S.H. and Parulekar, S.J. 1993. "Some observations on protease production in continuous suspension cultures of *Bacillus firmus*." **Journal of Biotechnology and Bioengineering.** 41 : 43-54.
- Moore, S. and Stein, W.H. 1948. "Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids." **Journal of Biological Chemistry.** 176 : 367-388.
- 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.
- Nielsen, J. and Villadsen, J. Bioreaction engineering principles. 2nd ED. New York : Plenum Press. 1994.
- Nishimura, T. 2010. "The role of intramuscular connective tissue in meat texture." **Journal of Animal Science.** 81 : 21-7.
- Nishimura, T., Hattori, A., and Takahashi, K. 1995. "Structural weakening of intramuscular connective tissue during conditioning of beef." **Journal of Meat Science.** 39 : 127-133.
- Offer, G., Knight, P., Jeacocke, R., Almond, R., Cousins, T., Elsey, J., Parsons, N., Sharp, A., Starr, R. and Purslow, P. 1989. "The structural basis of the water-holding, appearance and toughness of meat and meat products." **Journal of Food structure.** 8 : 17.
- on pork tenderization." **Journal of Food Science and Biotechnology.** 29 : 1213-1222.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Oskouie, S.F.G, Tabandeh, F., Yakhchali, B. and Eftekhari, F. 2008. "Response surface optimization of medium composition for alkaline protease production by *Bacillus clausii*." **Biochemical Engineering Journal**. 39 : 37-42.
- Ouali, A. 1990. "Meat tenderization: Possible causes and mechanisms. A review." **Journal of Muscle Foods**. 1 : 129-165.
- Outtrup, H. and Boyce, C.O., 1990. "Microbial Protease and Biotechnology." 227-254. In Forgary, W.M. and Kelly, C.T. **Microbial Enzyme and Biotechnology**, 2nd. Dordrecht : Springer Netherlands.
- Pal, G.K and Suresh, P.V. 2016. "Microbial collagenases: challenges and prospects in production and potential applications in food and nutrition." **Royal Society of Chemistry**. 6 : 33763-33780.
- Palka, K. and Daun, H. 1999. "Changes in texture, cooking losses, and myofibrillar structure of bovine *M. semitendinosus* during heating." **Journal of Meat Science**. 51 : 237-243.
- Patel, R., Dodia, M. and Singh, S.P. 2005. "Extracellular alkaline protease from a newly isolated haloalkaliphilic *Bacillus* sp.: production and optimization." **Journal of Process Biochemistry**. 40 : 3569-3575.
- Powell, T. H., Hunt, M. C. and Dikeman, M. E. 2000. "Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization." **Journal of Meat Science**. 54 : 307-311.
- Preetha, S. and Boompathy, R. 1997. "Purification and characterization of a milk clotting protease from *Rhizomucor miehei*." **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 13 : 573-578.
- Priest, F.G. 1977. "Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*." **Bacteriological Reviews**. 41 : 711-753.
- Priya, P.P., Mandge, S. and Archana, G. 2011. "Statistical optimization of production and tannery applications of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* P13." **Process Biochemistry**. 46 : 1110-1117.
- Purslow, P.P. 2005. "Intramuscular connective tissue and its role in meat quality." **Journal of Meat Science**. 70 : 435-447.
- Raja, N.Z., Che, N.R. and Kama, A. 1994. "Purification and characterization of a heat -stable alkaline protease from *Bacillus stearothermophilus* F1." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 40 : 822-827.

- Rawdkuen, S., Jaimakreu, M. and Benjakul, S. 2013. "Physicochemical properties and tenderness of meat samples using proteolytic extract from *Calotropis procera* latex." **Journal of Food Chemistry**. 136 : 909-916.
- Reddy, L.V.A., Wee, Y.J., Yun, J.S. and Ryu, H.W. 2008. "Optimization of alkaline protease production by batch culture of *Bacillus* sp. RKY3 through Plackett–Burman and response surface methodological approaches." **Journal of Bioresource Technology**. 99 : 2242-2249.
- Reo, M.B., Tanksale, A.M. Ghatge, M.S. and Deshpande, V.V. 1998. "Molecular and biotechnological aspect of microbial protease." **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 62 : 597-635.
- Rui, R., Zhiqiang, L. and Min, C. 2009. "Isolation and purification of caseinase and collagenase from commercial *Bacillus subtilis* AS1.398 enzyme by affinity chromatography." **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**. 93 : 8-11.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P. and Kishimura, H. 2014. "Optimization of gelatinolytic enzyme production by *B. amyloliquefaciens* sp. H11 through Plackett–Burman design and response surface methodology." **Journal of Food Science and Biotechnology**. 22 : 2008-4935.
- Schellekens, M. 1996. "New research issues in sous-vide cooking." **Food Science and Technology**. 7 : 256-262.
- Schwimmer, S. "Applied enzymology of meat texture optimization." **Source book of food enzymology**. USA : AVI, 1981.
- Sela, S., Schickler, H., Chet, I. and Spiegel, Y. 1998. "Purification and characterization of a *Bacillus cereus* collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on Meloidogyne Javanica Cuticular Proteins." **European Journal of Plant Pathology**. 104 : 59-67.
- Smith, J. and Hong-Shum, L. 2003. "Enzymes." **Food additive data book**. Oxford, UK : Blackwell Science. pp.389-462.
- Smith, S. and Judge, M. 1991. "Relationship between pyridinoline concentration and thermal stability of bovine intramuscular collagen." **Journal of Animal Science**. 69 : 1989-1993.
- Sorapukdee, S, Tangwatcharin, P. and Sampavapol, P. 2019. "Screening of collagenase-producing bacteria for tenderization of goat meat." **Research project** (2562-02-04-002)

- granted by Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.
- Sorapukdee, S., Sumpavapol, P., Benjakul, S. and Tangwatcharin, P. 2020. “Collagenolytic proteases from *Bacillus subtilis* B13 and *B. siamensis* S6 and their specificity toward collagen with low hydrolysis of myofibrils.” **LWT-Food Science and Technology**. 126 : 109307.
- Sullivan, G.A. and Calkins, C. 2010. “Application of exogenous enzymes to beef muscle of high and low-connective tissue.” **Journal of Meat Science**. 85 : 730-734.
- Suphatharaprateep, W., Cheirsilp, B. and Jongjareonrak, A. 2011. “Production and properties of two collagenases from bacteria and their application for collagen extraction.” **New Biotechnology**. 28 : 649-655.
- Toohy, E., Kerr, M., van de Ven, R. and Hopkins, D. 2011. “The effect of a kiwi fruit based solution on meat traits in beef m. semimembranosus (topside).” **Journal of Meat Science**. 88 : 468-471.
- Tornberg, E. 2005. “Effect of heat on meat proteins—3implications on structure and quality of meat products.” **Journal of Meat Science**. 70 : 493–508.
- Tornberg, E., Andersson, K. and Josell, A. 1997. “The rheological properties of whole and minced meat during cooking as related to sensory and structural characteristics.” 16-20. **Proceedings of the 1st international symposium on food rheology and structure**. Switzerland : Zurich.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Giménez, B., Roncalés, P., and Beltrán, J.A. 2003. “Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics.” **Journal of Meat Science**. 64 : 85-91.
- Tran, I.H. and Nagano, H. 2002. “Isolation and characteristic of *Bacillus subtilis* CN2 and its collagenase production.” **Journal of Food Science**. 67 : 1184-1187.
- Tsuruoka, N., Nakayama, T., Ashida, M., Hemmi, H., Nakao, M., Minakata, H., Oyama, H., Oda, K. and Nishino, T. 2003. “Collagenolytic serine-carboxyl proteinase from *Alicyclobacillus sendaiensis* strain NTAP-1: purification, characterization, gene cloning and heterologous expression.” **Applied and Environmental Microbiology**. 69 : 162-169.

- Weiseth, E., Shackelford, S., Wheeler, T., and Koohmaraie, M. 2004. "Factors regulating lamb longissimus tenderness are affected by age at slaughter." **Journal of Meat Science**. 68 : 635-640.
- Vogel, A. and Venugopalan, V. 2003. "Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues." **Journal of Chemical review**. 103 : 577-644.
- Wabb, M. 1949. "The influence of magnesium on cell division of various bacterial species in complex media." **The Journal of General Microbiology**. 3 : 410-417.
- Watanabe, K. 2004. "Collagenolytic protease from bacteria." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 63 : 520-526.
- Wise, S.G. and Weiss, A.S. 2009. "Tropoelastin." **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**. 41 : 494-497.
- Wright, N. T. and Humphrey, J. D. 2002. "Denaturation of collagen via heating: an irreversible rate process." **Annual Review of Biomedical Engineering**. 4 : 109-28.
- Wu, Q., Li, C., Li, C., Chen, H. and Shuliang, L. 2010. "Purification and Characterization of a Novel Collagenase from *Bacillus pumilus* CoI-J." **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 160 : 129-139.
- Yamashita, T., Tonouchi, N., Uozumi, T. and Beppu, T. 1987. "Secretion of Mucor rennin, a fungal aspartic protease of *Mucor pusillus*, by recombinant yeast cell." **Molecular Genetics and Genomics**. 210 : 462-467
- Yang, F., Long, L., Sun, X., Wu, H., Li, T. and Xiang, W. 2014. "Optimization of medium using response surface methodology for lipid production by *Scenedesmus* sp." **Marine Drugs**. 12 : 1245-1257.
- Zhu, X.J. 2017. "Actinidin treatment and sous vide cooking: effects on tenderness and in vitro protein digestibility of beef brisket." A thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Food Technology at Massey University, Manawatu, New Zealand.
- Zhu, X.J., Kaur, L., Staincliffe, M. and Boland, M. 2018. "Actinidin pretreatment and sous vide cooking of beef brisket: effects on meat microstructure, texture and *in vitro* protein digestibility." **Journal of Meat Science**. 145 : 256-265.



ภาคผนวก

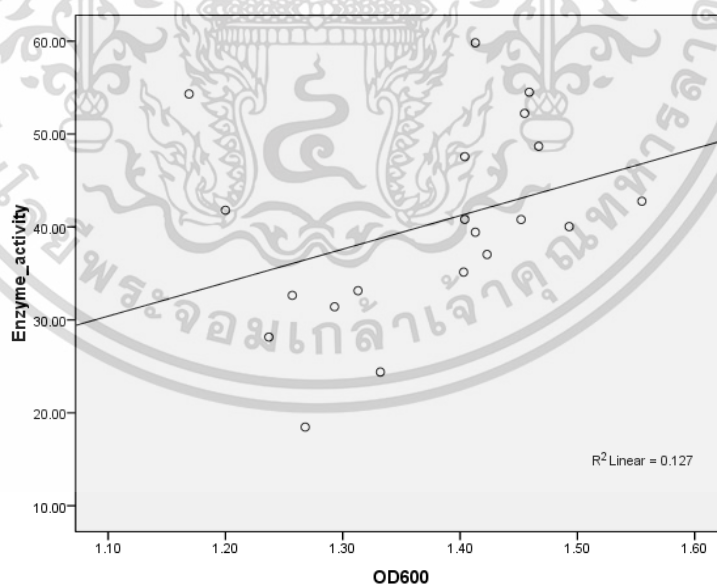
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจิโนไลติกเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Pearson Correlation)

		Cell growth (OD600)	Collagenolytic activity (U/ml)
Cell growth	Pearson Correlation	1	.357
	Sig. (2-tailed)		.123
	N	20	20
Collagenolytic activity	Pearson Correlation	.357	1
	Sig. (2-tailed)	.123	
	N	20	20

กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียและกิจกรรมของคอลลาจิโนไลติกเอนไซม์ด้วยการวิเคราะห์สหสัมพันธ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางคุณภาพทางเคมี-กายภาพของผลิตภัณฑ์สเต็มเนื้อโคซูวี

ลักษณะที่ศึกษา	กลุ่มการทดลอง				ระยะเวลาซูวี (ชั่วโมง)							P-value		
	ควบคุม	เอนไซม์ บรอมิเลน	คอลลาจิโนไลติกส์ เอนไซม์ B13	SEM	0	3	6	12	24	48	SEM	กลุ่ม ทดลอง	ระยะเวลา ซูวี	Interaction
ค่า TCA-Soluble peptide หลังการซูวี	2.78 ^{1,c}	3.71 ^a	3.62 ^b	0.04	2.21 ^f	3.26 ^c	3.67 ^c	3.42 ^d	3.71 ^b	3.91 ^a	0.04	0.000	0.000	0.000
ค่า TCA-Soluble peptide หลังการปรุงสุก	2.56 ^c	3.35 ^a	3.08 ^b	0.04	1.60 ^e	2.89 ^d	3.44 ^b	3.10 ^c	3.41 ^b	3.55 ^a	0.04	0.000	0.000	0.000
ค่าการสูญเสียน้ำหลังการซูวี	24.24 ^{ab}	24.60 ^a	23.83 ^b	0.50	21.72 ^d	23.36 ^c	25.41 ^{ab}	24.68 ^b	24.90 ^{ab}	25.79 ^a	0.50	0.000	0.000	0.009
ค่าการสูญเสียน้ำหลังการปรุงสุก	19.51 ^b	20.54 ^a	20.21 ^b	0.31	16.37 ^c	18.98 ^d	21.19 ^{bc}	21.08 ^c	21.75 ^{ab}	22.32 ^a	0.31	0.000	0.000	0.000
ค่าสี หลังการซูวี														
- ค่าความสว่าง	42.13 ^b	43.51 ^a	41.28 ^c	0.34	42.00 ^c	42.71 ^b	43.56 ^a	42.73 ^b	40.35 ^d	40.00 ^d	0.34	0.000	0.000	0.062
- ค่าสีแดง	5.21 ^b	6.30 ^a	5.49 ^b	0.21	6.75 ^a	6.49 ^a	6.06 ^b	4.98 ^c	4.41 ^d	3.21 ^e	0.21	0.037	0.000	0.028
- ค่าสีเหลือง	17.27 ^a	15.25 ^c	16.82 ^b	0.27	14.25 ^a	15.09 ^b	16.29 ^c	16.32 ^c	19.81 ^d	20.58 ^e	0.27	0.022	0.000	0.000
ค่าสี หลังการปรุงสุก														
- ค่าความสว่าง	41.69 ^b	43.98 ^a	41.54 ^b	0.24	44.94 ^a	43.10 ^b	42.06 ^c	40.65 ^d	40.51 ^d	39.34 ^e	0.24	0.000	0.000	0.010
- ค่าสีแดง	4.46	5.29	4.54	0.24	5.64 ^a	5.36 ^{ab}	5.10 ^b	4.15 ^c	3.43 ^d	3.23 ^d	0.24	0.669	0.000	0.371
- ค่าสีเหลือง	17.03 ^a	15.10 ^c	15.79 ^b	0.37	15.24 ^d	15.30 ^d	15.65 ^{cd}	16.41 ^{bc}	16.24 ^b	19.14 ^a	0.37	0.000	0.000	0.020

¹ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางคุณภาพทางเคมี-กายภาพของผลิตภัณฑ์สเต็มเนื้อโคชวี (ต่อ)

ลักษณะที่ศึกษา	กลุ่มการทดลอง				ระยะเวลาชวี (ชั่วโมง)							P-value		
	ควบคุม	เอนไซม์ บรอมิเลน	คอลลาจีโนไลด์ ดิกซ์เอนไซม์ B13	SEM	0	3	6	12	24	48	SEM	กลุ่ม ทดลอง	ระยะเวลา ชวี	Interaction
ค่าเค็วโครงเนื้อสัฒพัส หลังการชวี														
- ค่าความแข็ง (N)	7.97 ^a	5.07 ^c	6.27 ^b	0.45	10.14 ^a	6.67 ^b	5.92 ^{bc}	6.35 ^{bc}	5.64 ^c	4.60 ^d	0.45	0.000	0.000	0.000
- ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัว (ratio)	0.47 ^a	0.42 ^b	0.43 ^b	0.02	0.52 ^a	0.45 ^b	0.43 ^b	0.44 ^b	0.42 ^b	0.37 ^c	0.02	0.000	0.000	0.085
- ค่าความเหนียว (N)	3.29 ^a	3.11 ^{ab}	3.06 ^b	0.16	5.36 ^a	3.24 ^b	2.74 ^c	2.72 ^c	2.13 ^d	1.87 ^d	0.16	0.000	0.000	0.000
- ค่าความยืดหยุ่น (ratio)	0.51 ^b	0.49 ^c	0.56 ^a	0.02	0.55 ^a	0.52 ^{ab}	0.49 ^b	0.53 ^a	0.54 ^a	0.53 ^a	0.02	0.000	0.007	0.000
- ค่าความยากในการเคี้ยว (N)	1.74 ^a	1.60 ^c	1.69 ^b	0.11	2.97 ^a	1.71 ^b	1.38 ^c	1.51 ^{bc}	1.08 ^d	1.01 ^d	0.11	0.000	0.000	0.000
ค่าเค็วโครงเนื้อสัฒพัส หลังการปรุงสุก														
- ค่าความแข็ง (N)	15.94 ^a	10.83 ^c	14.47 ^b	0.42	18.35 ^a	14.15 ^b	13.08 ^c	14.32 ^b	13.16 ^c	12.50 ^c	0.42	0.000	0.000	0.000
- ค่าความสามารถในการเกาะรวมตัว (ratio)	0.55 ^a	0.50 ^b	0.51 ^b	0.02	0.58 ^a	0.54 ^b	0.51 ^b	0.52 ^b	0.50 ^{bc}	0.47 ^c	0.02	0.000	0.000	0.097
- ค่าความเหนียว (N)	9.26 ^a	7.49 ^c	8.50 ^b	0.33	10.52 ^a	8.39 ^{bc}	8.18 ^{bcd}	8.58 ^b	7.85 ^{cd}	7.58 ^d	0.33	0.000	0.000	0.000
- ค่าความยืดหยุ่น (ratio)	0.60 ^{ab}	0.58 ^b	0.62 ^a	0.03	0.63	0.60	0.58	0.60	0.61	0.60	0.03	0.035	0.353	0.662
- ค่าความยากในการเคี้ยว (N)	5.54 ^a	4.39 ^b	5.31 ^a	0.24	6.60 ^a	5.14 ^b	4.81 ^{bc}	5.12 ^b	4.66 ^{bc}	4.55 ^c	0.24	0.000	0.000	0.000
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (N) หลังการชวี	43.01 ^a	31.17 ^c	36.36 ^b	0.43	56.64 ^a	35.49 ^b	33.10 ^c	36.22 ^b	33.32 ^c	26.82 ^d	0.43	0.000	0.000	0.000
ค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (N) หลังการปรุงสุก	45.56 ^a	32.29 ^c	40.19 ^b	0.37	58.97 ^a	37.85 ^c	37.73 ^c	38.89 ^b	35.71 ^d	30.22 ^e	0.37	0.000	0.000	0.000

¹ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอภิญา คำสอน
วัน เดือน ปีเกิด	เกิด 21 กันยายน 2538
ที่อยู่	12/126 หมู่บ้านนารมย์ ซอยฉลองกรุง 24 ถนนฉลองกรุง แขวงทับยาว เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2556 มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนพรตพิทยพยัต จังหวัดกรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2560 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ และประมง สาขาวิชาสัตวศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2) คณะ เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ ทหารลาดกระบัง พ.ศ. 2564 หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิต สัตว์และประมง สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ “Optimization of microbial collagenolytic enzyme production by <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Subtilis</i> S13 using Plackett-Burman and response surface methodology” The 8 th International Conference on Integration of Science and Technology for Sustainable Development (8 th ICIST)
ทุนที่ได้รับ	ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากทุนอุดหนุนงานวิจัยประเภทเงินรายได้ประจำปี งบประมาณ พ.ศ. 2563 จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ตลอดระยะเวลา 4 ภาคการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้