

เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ : การจำแนกคุณลักษณะบางส่วน การผลิตโปรตีน
ไอโซเลตและสมบัติเชิงหน้าที่

INNER-LINING TISSUE OF CHICKEN GIZZARD : PARTIAL CHARACTERIZATION,
PRODUCTION OF PROTEIN ISOLATE AND ITS FUNCTIONALITIES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-053-264

เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ : การจำแนกคุณลักษณะบางส่วน การผลิตโปรตีน
ไอโซเลตและสมบัติเชิงหน้าที่

INNER-LINING TISSUE OF CHICKEN GIZZARD : PARTIAL CHARACTERIZATION,
PRODUCTION OF PROTEIN ISOLATE AND ITS FUNCTIONALITIES



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

KMITL-2016-AI-M-053-264

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

INNER-LINING TISSUE OF CHICKEN GIZZARD : PARTIAL CHARACTERIZATION,
PRODUCTION OF PROTEIN ISOLATE AND ITS FUNCTIONALITIES



PATCHAREE SAECHUA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN FOOD SCIENCE
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2016

KMITL-2016-AI-M-053-264

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2016

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ : การจำแนกคุณลักษณะบางส่วน การผลิตโปรตีนไฮโซเลต และสมบัติเชิงหน้าที่

INNER-LINING TISSUE OF CHICKEN GIZZARD : PARTIAL CHARACTERIZATION, PRODUCTION OF PROTEIN ISOLATE AND ITS FUNCTIONALITIES

ชื่อนักศึกษา

นางสาวพัชรี แซ่ฉั่ว

รหัสประจำตัว

56608007

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต




สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.สิทธิพงษ์ นลินานนท์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ดร.สิทธิพงษ์ นลินานนท์	
ผศ.ดร.ยุพร พิชกมุท	
ผศ.ดร.โสธยา เกิดพิบูลย์	
ดร.ศิริพร เรียบร้อย	

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 8 ธันวาคม 2559 เวลา 10.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรดม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 28 เดือน ต.ค. พ.ศ. 59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์

เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อ : การจำแนกคุณลักษณะบางส่วน การผลิต

โปรตีนไอโซเลตและหสมบัติเชิงหน้าที่

นักศึกษา

นางสาวพัชรี แซ่ลั่ว

รหัสประจำตัว

56608007

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

พ.ศ.

2559

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.สิทธิพงศ์ นลินานนท์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกคุณลักษณะขององค์ประกอบโปรตีนและเพื่อเตรียมโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อจากไก่อสายพันธุ์ *Arbor acres* (ILG) รวมทั้งมีการวิเคราะห์คุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีนไอโซเลตจาก ILG การวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณแสดงให้เห็นว่า ILG มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก (61.37% โดยน้ำหนักฐานแห้ง) โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน ILG ถูกแยกส่วน และนำไปตรวจสอบการละลาย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ILG ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ละลายด้วยด่าง (alkali-insoluble fraction : โปรตีนสไตรมา) เป็นองค์ประกอบหลัก และมีส่วนที่ละลายได้ด้วยด่าง (alkali-soluble fraction) และส่วนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือ (salt-soluble fraction : โปรตีนไมโอไฟบริล) เป็นองค์ประกอบรองลงมา SDS-PAGE เผยให้เห็นว่าโปรตีนหลักที่พบในส่วนที่ละลายและไม่ละลายด้วยด่าง มีน้ำหนักโมเลกุล (MW) สูง โดยแสดงแถบโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงที่มากกว่า 250 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนของโปรตีนที่ละลายได้ด้วยน้ำ (water-soluble protein) ประกอบไปด้วยองค์ประกอบโปรตีนหลายชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงระหว่างต่ำกว่า 20 กิโลดาลตัน ไปถึงสูงกว่า 250 กิโลดาลตัน ส่วนที่ไม่ละลายด้วยด่างพบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนต่ำ

(1.75 มก./100 กรัม ตัวอย่าง) โดยเปรียบเทียบกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่พบในเจลาตินเกรดอาหาร (134 มก./100 กรัม ตัวอย่าง) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ILG มีปริมาณคอลลาเจนต่ำ เมื่อนำ ILG มาศึกษาความสามารถในการละลายด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิด (S1- S5) พบว่า ILG มีปริมาณโปรตีนที่ละลายใน S1 และ S2 ต่ำ ซึ่งแสดงถึงการพบโปรตีนไมโอไฟบริลในปริมาณต่ำ โปรตีนใน ILG สามารถละลายได้ใน S3, S4 และ S5 ได้ในปริมาณสูง แสดงให้เห็นถึงการมีพันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก และพันธะไดซัลไฟด์ที่แข็งแรงในโครงสร้าง สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโซเลตจาก ILG คือการใช้ 0.5 M NaOH สกัดที่อุณหภูมิ 45°C ร่วมกับการเขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าโปรตีนไฮโซเลตที่ได้มีแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 250 กิโลดาลตัน โปรตีนไฮโซเลตจาก ILG มีค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวสูง ($SoANS = 8888.67 \pm 255.15$) ในขณะที่ปริมาณซัลไฮดริลรวมและปริมาณซัลไฮดริลบริเวณพื้นผิวน้อย การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าพบว่าโปรตีนไฮโซเลตมี pI เท่ากับ 4.75 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโซเลตมีค่าสูงในสภาวะพีเอชเป็นด่าง โดยพบค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (EAI) และค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) สูงสุดที่ pH9 ($95.34 \pm 3.25 \text{ m}^2/\text{s}$) และ pH7 (1152.38 ± 117.59 นาที) ตามลำดับ ($p < 0.05$) ที่สภาวะพีเอชเป็นกรด โปรตีนไฮโซเลตจาก ILG มีค่าการขยายตัวของโฟม (FE) สูง (81-118%) แต่มีค่าความคงตัวของโฟม (FS) ต่ำ (2.5-13.3%) ดังนั้น ILG ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปไก่สามารถใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบทางเลือกสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโซเลตเพื่อการประยุกต์ใช้ในอาหาร

คำสำคัญ : ไก่, ถิ่น, เนื้อเยื่อผนังกระเพาะ, โปรตีน, การจำแนกคุณลักษณะ, สมบัติเชิงหน้าที่

Thesis Inner-lining tissue of chicken gizzard : partial characterization,
production of protein isolate and its functionalities

Student Miss Patcharee Saechua

Student ID. 56608007

Degree Master of Science

Program Food Science

Year 2016

Thesis Advisor Dr.Sitthipong Nalinanon

ABSTRACT

The aims of this research were to characterize the protein composition and to prepare protein isolate from the inner lining tissue from the gizzard of *Arbor acres* chicken (ILG). Proximate analysis showed that protein (61.37% dry weight basis) was the major component in the ILG. The protein components in ILG were fractioned and its solubility was determined. The results showed that an alkaline-insoluble fraction (stroma) was the major protein component in ILG, while alkaline-soluble and salt-soluble (myofibrillar protein) fractions were the minor constituents. SDS-PAGE revealed that the major proteins in both alkaline-soluble and alkaline-insoluble fractions had high molecular weight (MW), showing high intensity of protein bands over 250 kDa. It was also found that water-soluble protein (sarcoplasmic proteins) fraction consisted of several protein components with MW ranging from lower 20 kDa to over 250 kDa. Alkaline-insoluble fraction contained relatively low content of hydroxyproline (1.75 mg/100 g sample), compared to food grade gelatin (134 mg/100 g sample). This

suggested that ILG had very low content of collagen. Based on solubility of ILG in five different solvents (S1-S5), ILG had low content of protein solubilized in S1 and S2, which were attributed to low content of myofibrillar proteins. High content of proteins solubilized in S3, S4 and S5 in ILG suggested contributions from hydrogen bonds, hydrophobic interactions and strong disulfide bonds to the structure. The extraction of protein isolate from ILG could be optimized by using 0.5 M NaOH at 45 °C with continuous shaking for 12 h. According to protein patterns on SDS-PAGE, the resultant protein isolate exhibited a distinctive band over 250 kDa. The protein isolate from ILG had high surface hydrophobicity ($SoANS = 8888.67 \pm 255.15$). Whereas total sulfhydryl content and surface-reactive sulfhydryl content was negligible. Base on zeta potential, pI of the protein isolate was estimated to be 4.75. Emulsifying properties of protein isolate form ILG was found to be greater in alkaline pH region. The highest emulsifying activity index (EAI) and emulsion stability index (ESI) were found at pH 9 ($95.34 \pm 3.25 \text{ m}^2/\text{s}$) and pH 7 ($1152.38 \pm 117.59 \text{ min}$), respectively ($p < 0.05$). At acidic pH, protein isolate form ILG exhibited greater foam expansion (FE) (81-118%) but low foam stability (FS) (2.5-13.3%) was noticeable. Therefore, ILG, a by-product from chicken processing industry, could be an alternative source of protein from the production of protein isolate used in food applications.

Keywords: Chicken, Gizzard, Inner lining tissue, Protein, Characterization, Functional properties

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.สิทธิพงษ์ นลินานนท์ ที่ได้
สละเวลาในการให้คำปรึกษาแนะนำ ให้ความอนุเคราะห์วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี ตลอดจนช่วย
ตรวจสอบ ปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

ผู้จัดทำขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทั้ง 3 ท่าน ประกอบด้วย ผศ.ดร.บุพร พิษกมฺพร
, ผศ.ดร.โสธยา เกิดพิบูลย์ และ ดร.ศิริพร เรียบร้อย ที่ได้กรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ ตรวจสอบให้
วิทยานิพนธ์นี้มีความถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณคุณโสภารรณ บุตรโสภ, คุณชัยทิตา ชาราสุข และ ดร.กัมปนาท ชิลวา ที่ได้ให้ความ
ช่วยเหลือและคำแนะนำในการทำการวิจัยตลอดมา

ขอบคุณคุณคุณลักขมณ อยู่ศิริ, คุณลลิตา เจตยะคามิน, คุณภูวคณ ตั้งษ์ชาติ, คุณชนากานต์ จันทร์ศิลา
และ คุณวสิษฐ วสิกรีรัตน์ รวมทั้งเพื่อนๆและน้องๆทั้งสาขาวิทยาศาสตร์การอาหารและสาขาเทคโนโลยี
การจัดและบริการอาหารสำหรับความช่วยเหลือและกำลังใจที่ดีเสมอมา

พัชรี แซ่ฉั่ว

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2559

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	X
สารบัญภาพ.....	XI
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ทางเดินอาหารของสัตว์ปีก.....	3
2.2 กระเพาะอาหารตอนท้ายหรือกระเพาะบดหรือกิน (gizzard).....	4
2.3 โปรตีนและโครงสร้างของโปรตีน.....	5
2.4 การจำแนกโปรตีนกล้ำมเนื้อสัตว์โดยอาศัยการละลาย.....	6
2.5 โปรตีนไอโซเลต.....	10
2.6 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลต.....	12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์.....	17
3.2 สารเคมี.....	18
3.3 วิธีการทดลอง	
3.3.1 วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ.....	20
3.3.2 การจำแนกคุณลักษณะโปรตีนของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่	
3.3.2.1 การตรวจสอบองค์ประกอบของโปรตีน (Protein composition).....	20
3.3.2.2 การศึกษาการละลายของโปรตีน (Protein solubility).....	23
3.3.3 การเตรียมโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่	
3.3.3.1 ผลของความเข้มข้นของ NaOH ต่อการละลายของโปรตีน.....	25
3.3.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีน.....	26
3.3.3.3 ผลของระยะเวลาต่อการละลายของโปรตีน.....	27
3.3.3.4 การผลิตโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่.....	27
3.3.4 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (surface hydrophobicity).....	27
3.3.5 วิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์ริลรวม (total sulfhydryl content) และ ปริมาณซัลไฟด์ริลบริเวณพื้นผิว (surface-reactive sulfhydryl content).....	28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.6 การตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional properties)	
ของโปรตีนไอโซเลต	
3.3.6.1 ค่าศักย์ซีต้า (Zeta (ζ)- potential).....	28
3.3.6.2 คุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying properties).....	28
3.3.6.3 คุณสมบัติการเกิดโฟม (Foaming properties).....	29
3.3.7 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	30
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่	
4.1.1 องค์ประกอบทางเคมี.....	31
4.1.2 องค์ประกอบของโปรตีน (Protein composition).....	33
4.1.3 ความสามารถในการละลายของโปรตีน (Protein solubility).....	35
4.2 การผลิตโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่	
4.2.1 ผลของความเข้มข้นของ NaOH ต่อการละลายของโปรตีน.....	37
4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีน.....	39
4.2.3 ผลของระยะเวลาต่อการละลายของโปรตีน.....	41
4.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลต	
4.3.1 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (surface hydrophobicity).....	42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.2 ปริมาณซัลไฟด์รวม (total sulfhydryl content) และ ปริมาณซัลไฟด์บริเวณพื้นผิว (surface-reactive sulfhydryl content).....	43
4.3.3 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (Zeta (ζ)- potential).....	44
4.3.4 สมบัติการเป็นอิมัลชันไฟเออร์ (Emulsifying properties) และคุณสมบัติการเกิดโฟม (Foaming properties) ของโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่.....	46
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	48
บรรณานุกรม.....	49
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis).....	58
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต.....	61
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน.....	63
ภาคผนวก ง การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970).....	65
ประวัติผู้เขียน.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 Functional properties of proteins in food.....	12
4.1 Chemical composition of inner lining tissue from chicken gizzard (ILG).....	32
4.2 Hydroxyproline content of commercial food grade gelatin, inner lining tissue from chicken gizzard and its stroma counterpart.....	33
4.3 Protein composition from inner lining tissue from chicken gizzard.....	34
4.4 Relative solubility (%) of inner lining tissue from chicken gizzard at different NaOH concentrations.....	38
4.5 Total protein content (mg) solubilized from inner lining tissue of chicken gizzard (10g) by extracting with 0.5M NaOH at different temperature.....	40
4.6 Total protein content (mg) solubilized from inner lining tissue of chicken gizzard (10g) by extracting with 0.5M NaOH at different time.....	41
4.7 SoANS of different Proteins.....	43
4.8 Total sulfhydryl content and surface-reactive sulfhydryl content of different Proteins.....	44
4.7 Emulsifying and foaming properties of protein isolate from solubilized of inner lining tissue from chicken gizzard at different pHs.....	47

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 Digestive tract of chicken.....	3
2.2 a) The front of proventriculus and gizzard.....	4
b) The back of proventriculus and gizzard.....	4
2.3 a) Inside proventriculus and gizzard not remove inner lining gizzard tissue.....	5
b) Inside proventriculus and gizzard removed inner lining gizzard tissue.....	5
2.4 The structure of proteins	6
2.5 Process diagram for the production of protein isolate.....	11
3.1 Fractionation procedure of Protein composition.....	22
3.2 Determination procedure of Protein solubility	24
3.3 Extraction procedure of protein of inner lining tissue from chicken gizzard using NaOH at different conditions.....	26
4.1 SDS-PAGE pattern of protein fractions obtained from inner lining tissue of chicken gizzard.....	35
4.2 Bars indicate the % solubility of chicken lining inner gizzard.....	37
4.3 SDS-PAGE patterns of proteins extracted from inner lining tissue of chicken gizzard by using NaOH at different concentrations for 24 h.....	39
4.4 Zeta (ζ)- potential of protein isolate from solubilized of inner lining tissue from chicken gizzard at different pHs.....	45

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากปัจจุบัน แนวโน้มการบริโภคสัตว์ปีกมีการเพิ่มมากขึ้น ดังจะเห็นได้จากอุตสาหกรรมไก่ในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง มีปริมาณการส่งออกที่เพิ่มมากขึ้น และมีแนวโน้มการเติบโตในอัตรา 4.50% ต่อปี (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2559) โดยตลาดส่งออกไก่แปรรูปที่สำคัญของประเทศไทยคือ ญี่ปุ่น และ สหราชอาณาจักร คิดเป็นมูลค่าการส่งออกรวมในปี พ.ศ. 2558 เท่ากับ 982.42 และ 547.09 ล้านดอลลาร์สหรัฐฯ (กระทรวงพาณิชย์, 2559) ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้น การบริโภคสัตว์ปีกมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นทั่วโลกเช่นกัน (Lasekan et al., 2013) โดยประเทศจีน สหรัฐอเมริกาและ สหภาพยุโรปเป็นประเทศที่มีการบริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีกปริมาณสูงสุด โดยในปี 2016 มีอัตราการบริโภคสูงถึง 18,403,010, 17,868,460 และ 13,381,350 ตัน ตามลำดับ (OECD, 2016) ในระหว่างการแปรรูปไก่จะก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือที่สำคัญอย่างหนึ่งคือเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่เป็นจำนวนมาก คิดเป็นปริมาณประมาณ 3,360 ตันต่อปี หรือประมาณ 0.24% ของน้ำหนักไก่เป็นทั้งตัว (บริษัท บีอาร์เอฟ (ไทยแลนด์) จำกัด, 2559) ซึ่งส่วนใหญ่โรงงานมักขายเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่อดังกล่าวให้กับเกษตรกรเพื่อนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ในราคาถูก โดยมีราคาประมาณ 0.20-0.25 บาท/กิโลกรัม (บริษัท บีอาร์เอฟ (ไทยแลนด์) จำกัด, 2559) แต่เนื่องจากเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีโปรตีนสูง ดังนั้นเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่อจึงเป็นวัสดุเศษเหลือที่มีศักยภาพ สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านต่างๆ เช่น การผลิตเป็นโปรตีนไอโซเลต โปรตีนไฮโดรไลเสต และ คอลลาเจน

โปรตีนไอโซเลต (Protein isolate) เป็นส่วนของโปรตีนที่เตรียมได้จากการกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนออก โดยสกัดด้วย น้ำ กรด หรือด่าง ขึ้นอยู่กับ pH ที่โปรตีนนั้นละลายได้ แล้วแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ปัจจุบัน โปรตีนไอโซเลตสามารถเตรียมได้จากวัตถุดิบหรือวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญ เช่น เวย์ (Martinez-Alvarenga et al., 2014) ถั่วชนิดต่างๆ (Liang และ Tang, 2013; Liu et al., 2014) และเนื้อปลาชนิดต่างๆ (Undeland et al., 2002; Romero et al., 2009; Tongnuanchan et al., 2011) เป็นต้น โปรตีนไอโซเลตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้รักสุขภาพ (Tahergorabi et al., 2015) หรือ นักกีฬาที่

ต้องการโปรตีนในปริมาณสูง เป็นสารต้านออกซิเดชัน (Ji et al., 2014) เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Joshi et al., 2012) นอกจากนี้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว โปรตีนไอโซเลตยังสามารถนำไปในอุตสาหกรรมอื่นๆ ได้ เช่น ผลิตเป็นวัสดุย่อยสลายได้ทางชีวภาพได้อีกด้วย เช่น เรซินที่สามารถย่อยสลายได้จากโปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลือง (Lodha และ Netravali, 2005) หรือพอลิเมอร์ชีวภาพซึ่งพบว่าสามารถเพิ่มความหนาและคุณสมบัติในการกักน้ำของ paperboard ที่เคลือบด้วยโปรตีนไอโซเลตจากถั่ว (Rhim et al., 2006) จากการศึกษาของ Joshi et al. (2012) พบว่าโปรตีนไอโซเลตจากเวย์และถั่ว lentil มีค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชันใกล้เคียงกับโซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate) แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไอโซเลตจากถั่วนี้สามารถเพิ่มขึ้นได้โดยการกำจัดพันธะไดซัลไฟด์ในโมเลกุล ดังนั้น การใช้เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนราคาถูกและมีปริมาณมากเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไอโซเลต จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปไก่ นอกจากนี้โปรตีนไอโซเลตที่ได้ยังเป็นโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากวัตถุดิบธรรมชาติที่มีความปลอดภัย รวมทั้งสามารถใช้เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกประการหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 จำแนกคุณลักษณะเบื้องต้นของโปรตีนเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่
- 1.2.2 ศึกษาการเตรียมโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่โดยวิธีการใช้ต่าง
- 1.2.3 ตรวจสอบสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลตที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

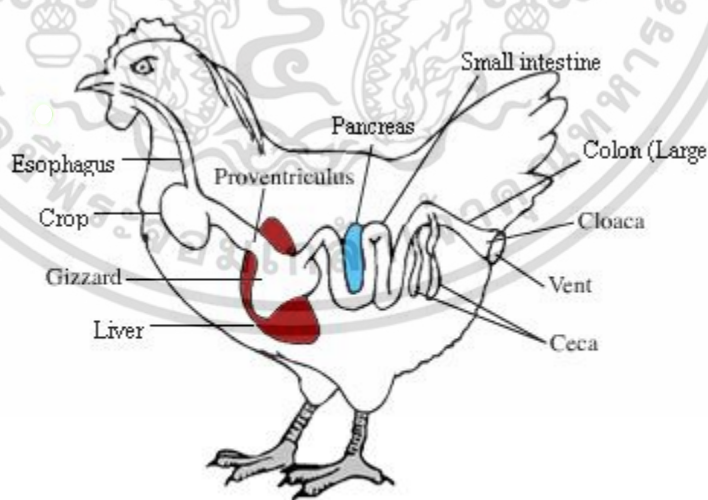
งานวิจัยนี้ทำการจำแนกคุณลักษณะของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่โดยทำการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี (proximate analysis) ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline content) วิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีน (protein composition) การละลายของโปรตีน (protein solubility) ของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ จากนั้นทำการศึกษาการเตรียมโปรตีนไอโซเลตด้วยวิธีการสกัดด้วยค่าที่ระยะเวลาและความเข้มข้นต่างๆและทำการวิเคราะห์ความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (surface hydrophobicity) ปริมาณซัลไฟดริลรวม (total sulfhydryl content) ปริมาณซัลไฟดริลบริเวณพื้นผิว (surface-reactive sulfhydryl content) และรูปแบบของโปรตีน รวมทั้งตรวจสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของโปรตีนไอโซเลตที่เตรียมได้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ทางเดินอาหารของสัตว์ปีก

สัตว์ปีก (aves) เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังจัดอยู่ในไฟลัมคอร์ดาตา (Phylum Chordata) ได้แก่ นก เป็ด ไก่ ฯลฯ ทางเดินอาหารประกอบด้วย ปาก ซึ่งไม่มีฟัน ต่อมน้ำลายเจริญไม่ดี แต่ก็สามารถสร้างเมือกสำหรับเคลือบอาหารและหล่อลื่นได้ มีคอหอยสั้น หลอดอาหารยาว มีถุงพักอาหาร (crop) ซึ่งทำหน้าที่เก็บอาหารสำรองอาหารไว้ย่อยภายหลัง กระเพาะอาหารหรือกระเพาะแท้ (proventriculus) ทำหน้าที่สร้างน้ำย่อย และกระเพาะบดหรือกิน (gizzard) (ภาพที่ 2.1) มีกล้ามเนื้อหนาแข็งแรงใช้ในการบดและตัดอาหาร ต่อจากกระเพาะบดเป็นลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ส่วนท้ายเป็น โคลเอกา (cloaca) ที่มีท่อไตและท่อของระบบสืบพันธุ์มาเปิดเข้าด้วยกัน และทวารหนักซึ่งเป็นส่วนท้ายสุดทางเดินอาหารของสัตว์ปีกเรียงตามลำดับดังนี้คือ ปาก—หลอดอาหาร—กระเพาะพักอาหาร—กิน—ลำไส้เล็ก—ลำไส้ใหญ่—ทวารหนัก (Jacob et al., 2011)



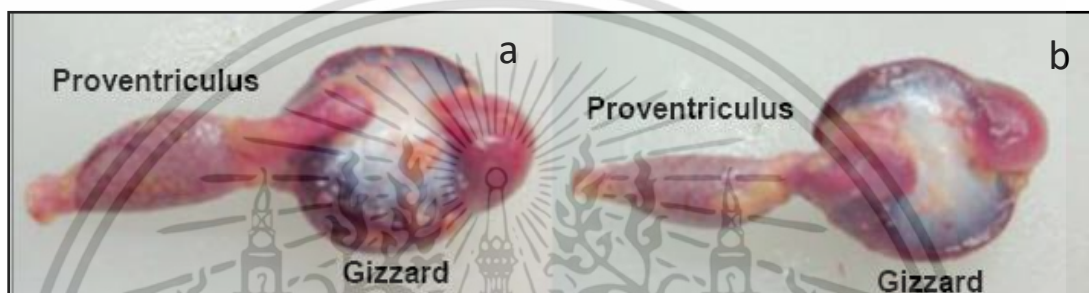
ภาพที่ 2.1 : Digestive tract of chicken.

ที่มา : Latour และ Williams (2014)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 กระเพาะอาหารตอนท้ายหรือกระเพาะบดหรือกิ้น (gizzard)

กิ้น (อังกฤษ: Gizzard หรือ Gastrolith) หรือ ventriculus คืออวัยวะในระบบทางเดินอาหารอย่างหนึ่งในสัตว์ปีก มีหน้าที่ในการย่อยเชิงกล (mechanical process) ประกอบขึ้นด้วยกล้ามเนื้อที่แข็งแรง 2 ชุด ทำหน้าที่คล้ายฟัน โดยบดย่อยอาหารให้แตกละเอียดโดยภายในมีกรวดที่ไก่อินเข้าไปสะสมอยู่เพื่อช่วยบดย่อยอาหาร (Jacob et al., 2011)

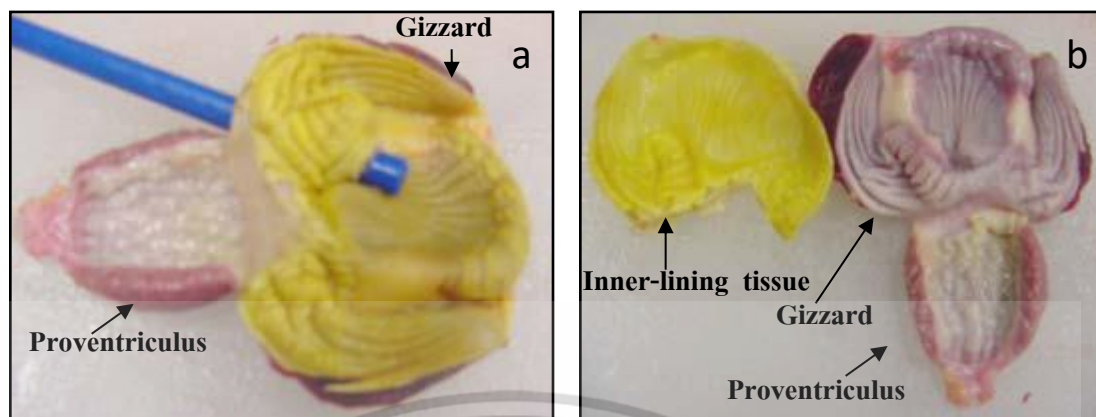


ภาพที่ 2.2 : a) The front of proventriculus and gizzard.

b) The back of proventriculus and gizzard.

ที่มา : Jacob et al. (2011)

เมื่อไก่อินอาหารลงไป จะตกลงกระเพาะที่หนึ่งซึ่งมนุษย์ไม่มี เรียกว่า "กระเพาะพัก" (Crop) อยู่ที่ต้นคอ อาหารจะพักอยู่ที่นี้ชั่วคราวก่อนที่จะลงสู่กระเพาะแท้ (Proventriculus) (ภาพที่ 2.2) เพื่อทำการย่อยให้เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย ถัดไปเป็นกระเพาะที่สามหลังกระเพาะแท้เรียกกันว่า "กิ้น" (Gizzard หรือ Ventriculus) กิ้นนี้มีชั้นกล้ามเนื้อ (Tunica muscularis) และมีเนื้อเยื่อผนังกระเพาะที่หนาและแข็งแรงมาก (Jacob et al., 2011) (ภาพที่ 2.3) ธรรมชาติสร้างกิ้นไว้ให้เพื่อจะได้ช่วยบดอาหารซึ่งเป็นเมล็ดข้าว เมล็ดข้าวโพด เหล่านี้มีเปลือกแข็งและย่อยอย่างปกติด้วยน้ำย่อยในกระเพาะจริงไม่ได้ กิ้นนี้จะทำหน้าที่แทนการบดเคี้ยวในปากเพราะไก่อไม่มีฟัน และก้อนกรวดเม็ดทรายซึ่งอยู่ภายในกิ้นก็เป็นเครื่องช่วยบดให้ได้ผลด้วย เมื่อบดละเอียดแล้วจะส่งไปยัง Proventriculus (กระเพาะแท้) เข้าสู่ขบวนการย่อยและดูดซึมอาหารต่อไป (Jacob et al., 2011) ดังนั้นจะเห็นว่าสัตว์ปีกที่กินเมล็ดข้าวกินอาหารค่อนข้างหยาบมากจะมีกิ้นที่แข็งแรง และมีขนาดค่อนข้างโต ถ้าไก่อินที่กินเฉพาะอาหารอ่อน อาหารปนหรือสัตว์ปีกที่กินอาหารเนื้อเป็นประจำวันกิ้นจะค่อนข้างเล็กเพราะไม่จำเป็นต้องใช้งานมาก (โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน, 2523)



ภาพที่ 2.3 : Inside of proventriculus and gizzard.

a) not remove inner lining gizzard tissue. b) removed inner lining gizzard tissue.

ที่มา : Jacob et al. (2011)

2.3 โพรตีนและโครงสร้างของโปรตีน

โมเลกุลโปรตีนเกิดจากกรดอะมิโนมาเรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ โดยที่หมู่อะมิโนของกรดอะมิโนชนิดหนึ่งจะเชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอีกชนิดหนึ่ง และมีน้ำ 1 โมเลกุลหลุดออกไป

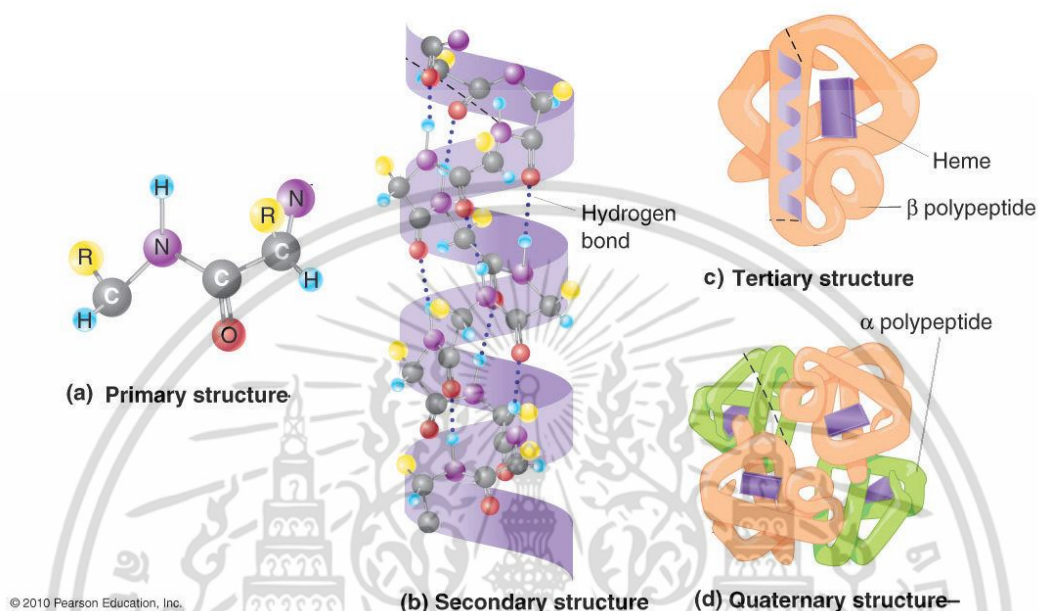
เนื่องจากโปรตีนทุกชนิดเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโน น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนแต่ละชนิดจะผันแปรตามจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล การที่โปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันเนื่องจากมีชนิด จำนวน และการเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายพอลิเพปไทด์แตกต่างกัน โปรตีนที่ในโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดโพลาร์เป็นจำนวนมากจะละลายน้ำได้ดี ในทางตรงกันข้ามโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดอะโพลาร์จะละลายน้ำได้น้อยหรือไม่ละลายน้ำ และเนื่องจากโปรตีนมีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่าน้ำตาลและไขมันมาก ดังนั้นเมื่อโปรตีนละลายน้ำจึงได้เป็นสารละลายคอลลอยด์ และไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2553)

เนื่องจากโปรตีนเป็นสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนที่มีขนาดของโมเลกุลผันแปรจากขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่มาก (complex macromolecules) ทำให้โปรตีนแต่ละชนิดมีลักษณะ โครงสร้างโมเลกุลแตกต่างกันและมีได้หลายแบบ (ภาพที่ 2.4) ได้แก่

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (Primary structure)
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (Secondary structure)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. โครงสร้างตติยภูมิ (Tertiary structure)
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (Quaternary structure)



ภาพที่ 2.4 (a-d) The structure of proteins.

- (a) : Primary structure, (b) : Secondary structure (α -Helix, or β -Plated sheet),
 (c) : Tertiary structure, (d) : Quaternary structure

ที่มา : Russell (2009)

2.4 การจำแนกโปรตีนกล้ามเนื้อสัตว์โดยอาศัยการละลาย (สุทรวัดน์ เบญจกุล, 2554)

2.4.1 โปรตีนไมโอไฟบริล (Myofibrillar protein)

โปรตีนชนิดนี้สามารถสกัดได้โดยสารละลายเกลือที่มีค่า ionic strength มากกว่า 0.15 (โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.3-1.0) สารละลายโปรตีนดังกล่าวสามารถตกตะกอนโดยการเจือจางด้วยน้ำกลั่นประมาณ 10 เท่า โดยทั่วไปเนื้อสัตว์ประกอบด้วยโปรตีนไมโอไฟบริล 40-60% โปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ โดยมีบทบาทสำคัญต่อการยึดหดของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อการอุ้มน้ำของเนื้อ และความสามารถในการเกิดเจล

2.4.1.1 ไมโอซิน และพาราไมโอซิน

ไมโอซิน

ไมโอซินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฟิลาเมนต์เส้นหนา (thick filament) โดยมีปริมาณ 45% ของโปรตีนไมโอไฟบริล ไมโอซินเป็นโปรตีนเส้นยาว มีความยาว 160 นาโนเมตร ประมาณ 480,000 ดัลตัน ประกอบด้วยโพลีเปปไทด์ 6 เส้น โดยมีเส้นหนัก (Heavy chain) 2 เส้น และมีเส้นเบา (light chain) 4 เส้น ประกอบด้วยส่วนหัว (head) และส่วนหาง (tail) ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงกลม (globular) และเป็นท่อน (rod)

พาราไมโอซิน

พาราไมโอซินมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่มีลักษณะจำเพาะ โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เป็นเบส และเอไมด์ (amide) สูง แต่มีโพรลีนปริมาณต่ำ โมเลกุลของพาราไมโอซินมีลักษณะเป็นท่อน (coiled-coil rod) ซึ่งเกิดจากสายโซ่ ชนิดแอลฟาเฮลิกซ์ที่แตกต่างกัน 2 สาย โมเลกุลประกอบด้วยซิสเทอีน 2 คู่ ซึ่งสามารถเกิดพันธะไดซัลไฟด์ โดยพบ 1 คู่ที่ N-Terminus และอีก 1 คู่ ที่ความยาว 1 ใน 3 ของความยาวนับจาก N-Terminus พาราไมโอซินประกอบด้วย 2 ซับยูนิต ที่มีความยาวประมาณ 120 นาโนเมตร โดยมีโมเลกุลของซับยูนิตประมาณ 95-125 กิโลดัลตัน

2.4.1.2 แอกติน (actin)

แอกติน เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของฟิลาเมนต์เส้นบาง (thin filament) โดยมีประมาณ 20% ของไมโอไฟบริล แอกตินมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว 2 เมล็ด ที่มีขนาดเท่ากันเรียงต่อกัน โมโนเมอร์ของแอกตินเรียกว่า globular actin หรือ G-actin โมโนเมอร์ดังกล่าวจะเรียงตัวกันแบบโครงสร้างแบบ double-helical structure เรียก fibrous actin หรือ F-actin ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของฟิลาเมนต์เส้นบาง G-actin ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 374-375 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุล 42,000-48,000 ดัลตันฟิลาเมนต์ ของ F-actin สามารถมีอันตรกิริยากับส่วนหัวของไมโอซิน

2.4.1.3 โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) และโทรโปนิน (troponin)

โทรโปไมโอซิน (tropomyosin)

โทรโปไมโอซินมีประมาณ 5% ของโปรตีนไมโอไฟบริล ประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ ชนิดแอลฟา-เฮลิคซ์ พันกันในลักษณะ two-standard , coiled-coil super secondary structure มีลักษณะคล้ายส่วนหางของไมโอซิน

โทรโปนิน (troponin)

โทรโปนินส่วนใหญ่มีอยู่ร่วมกับโทรโปไมโอซิน ประกอบด้วย 3 หน่วย คือ โทรโปนิน C (17,000-18,000 คัลตัน) โทรโปนิน I (20,000-24,000 คัลตัน) และ โทรโปนิน T (37,000-40,000 คัลตัน)

2.4.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Saroplasmic proteins)

เป็นโปรตีนที่ไม่ใช่องค์ประกอบของเส้นใยไมโอไฟบริล แต่จะแขวนลอยอยู่ในส่วนของซาร์โคพลาสซึม มีประมาณ 30% ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด ละลายได้ในน้ำ และสารละลายเกลืออ่อนๆ (ionic strength 0.06) โปรตีนเหล่านี้มีสารย่อยคาเทปซิน ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ยังสามารถทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์กับไขมันในการทำให้สักรอกประเภทอิมัลชัน แต่อิมัลชันที่ได้มักไม่คงทนเท่าไมโอไฟบริลลาร์ โปรตีน โปรตีนประเภทนี้ได้แก่ เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น phosphorylase และเม็คทีนเนื้อ เช่น ไมโอไกลบิน และเฮโมไกลบิน เป็นต้น

2.4.2.1 เอนไซม์

เอนไซม์สำคัญที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์มี 6 กลุ่ม คือ ไฮโดรเลส (hydrolase) ออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) ทรานกลูตามิเนส (protein-glutamine gamma-glutamyltransferase; EC 2.3.2.13) และเอนไซม์อื่นๆ กลุ่มที่สำคัญและมีบทบาทโดยตรงต่อคุณภาพ คือ ไฮโดรเลส (hydrolase) ออกซิโดรีดักเตส (oxidoreductase) และทรานส์เฟอเรส (transferase)

2.4.2.2 โปรตีนเม็ดสี

โปรตีนฮีม (heme proteins) เป็นแหล่งของเม็ดสีที่สำคัญ เม็ดสีชนิดนี้มีผลต่อลักษณะสีแดงของกล้ามเนื้อ เม็ดสีที่สำคัญในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย ออกซีไมโอโกลบิน (oxymyoglobin) และออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin)

2.4.2.3 พาร์วาลบูมิน (parvalbumin)

พาร์วาลบูมิน เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (~12 กิโลดัลตัน) เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำและทนร้อน และมีความสามารถในการจับกับแคลเซียมไอออน โดยมากมักพบพาร์วาลบูมินและคาลโมดูลิน (calmodulin) ในกล้ามเนื้อของสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ โปรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่เช่นเดียวกับโทรโปนิน และโทรโปไมโอซินในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง

2.4.2.4 โปรตีนที่ไม่แข็งตัว

สัตว์น้ำจากมหาสมุทรอาร์กติก และแอนตาร์กติก มีโปรตีนในเลือด ซึ่งสามารถลดจุดเยือกแข็ง โดยไม่มีผลต่อแรงดันออสโมติก โปรตีนดังกล่าวเป็น ไกลโคโปรตีน (antifreeze glycoproteins ; AFGP) ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของ $H_2N [Ala-Ala (\beta\text{-galactosyl } (1-3)\text{-}\alpha\text{-N-acetylgalactosamine})Thr]_n Ala-Ala-COOH$ AFGP 1-8 ประกอบด้วย n เท่ากับ 50,45,35,28,17,12 และ 6-4 ตามลำดับ โดย AFGP 1-8 มีประมาณ 80% ของโปรตีนทั้งหมด โปรตีนที่ไม่แข็งตัวบางชนิดไม่มีคาร์โบไฮเดรต โดยองค์ประกอบ 2 ใน 3 เป็นอะลานีน และมีกรดอะมิโนชนิดอื่นแทนที่คาร์โบไฮเดรต

2.4.3 สโตรมา (Stroma)

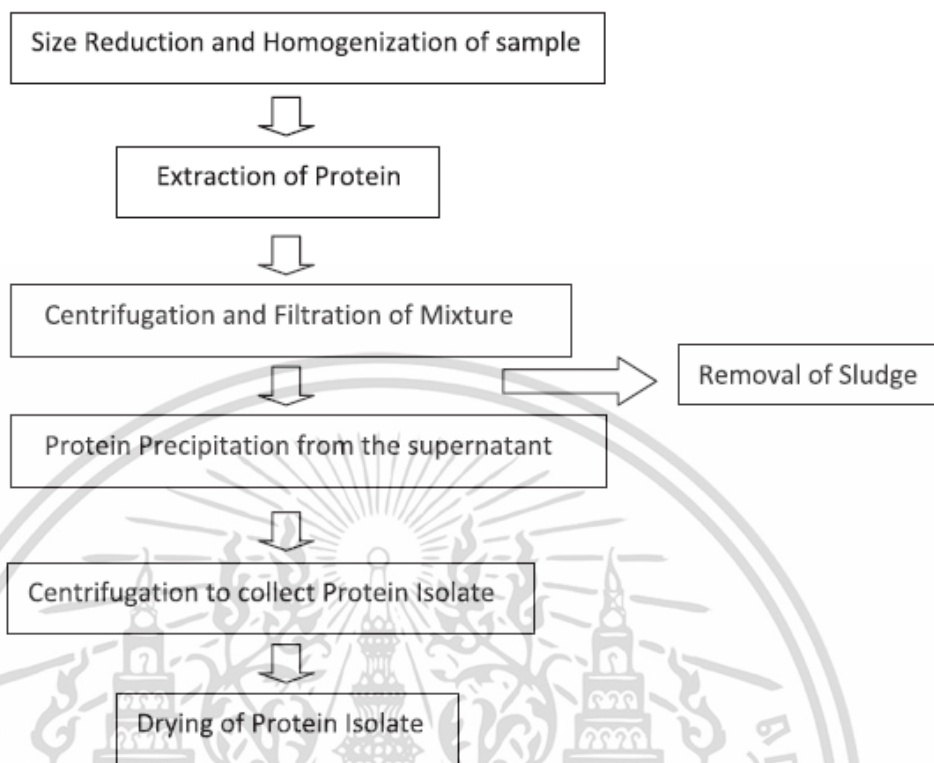
สโตรมาเป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและโปรตีนไมโอไฟบริล สโตรมาประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น คอลลาเจน (collagen) อีลาสติน (elastin) และเรติคิวลิน สโตรมามีคุณสมบัติคือ ไม่ละลายในสารละลายใด ๆ แต่อาจละลายได้บ้างในสารละลายเข้มข้นของกรดและเบส (ไม่ละลายในสารละลายไฮโดรคลอริก หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจาง)

2.5 โปรตีนไอโซเลต (Protein isolate)

2.5.1 การเตรียมโปรตีนไอโซเลต

โปรตีนไอโซเลต (Protein isolate) เป็นส่วนของโปรตีนที่เตรียมได้จากการกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนออก WSDA (2003) ได้ให้คำนิยามของ meat protein isolate ไว้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่แยกโปรตีนจากกระดูกซึ่งสด สะอาดและไม่เสื่อมสภาพจากกระบวนการแปรรูปที่ใช้ความร้อน หลังจากนั้นทำให้แห้งด้วยกระบวนการทำแห้งโดยใช้ความเย็นเพื่อรักษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่และคุณค่าทางอาหาร มีปริมาณโปรตีนอย่างน้อย 90% ปริมาณไขมันไม่เกิน 1% และปริมาณเถ้าไม่เกิน 2% ส่วน AAFCO (1990) ได้ให้นิยามของโปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลืองไว้ว่าเป็นส่วนของถั่วเหลืองที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก เตรียมได้จากถั่วเหลืองลอกเปลือกโดยกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนออก และต้องมีปริมาณโปรตีนไม่น้อยกว่า 90% ของน้ำหนักแห้ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อกำหนดมาตรฐานอย่างเป็นทางการของคำนิยามและข้อกำหนดของโปรตีนไอโซเลตที่ผลิตจากวัตถุดิบหลากหลายชนิด (FAO, 2014) โปรตีนไอโซเลตสามารถสกัดได้จากหลายแหล่ง แหล่งที่เป็นที่นิยมคือจากเวย์ (whey) ถั่วชนิดต่างๆ เช่น ถั่วเหลือง ซึ่งปัจจุบันมีการผลิตในเชิงการค้าอย่างแพร่หลาย หรือสกัดจากพืชชนิดอื่นๆ เช่น คาโนล่า canola meal (Wang et al., 2014) flaxseed (Silva et al., 2013) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดได้จากสัตว์น้ำ เช่น ส่วนกล้ามเนื้อของปลาทับทิม (red tilapia) (Tongnuanchan et al., 2011) เนื้อปลาข้างเหลือง (yellow stripe trevally) (Arfat et al., 2014)

การเตรียมโปรตีนไอโซเลตโดยทั่วไปมีขั้นตอนตามภาพที่ 2.5 โดยจะเริ่มต้นจากการสกัดโดยใช้ น้ำ กรด หรือ ด่าง ขึ้นอยู่กับ pH ที่โปรตีนนั้นสามารถละลายได้ สารละลายโปรตีนจะถูกนำมาแยกโปรตีนออกโดยการแยกส่วนที่ไม่ละลายออก จากนั้นจึงทำให้แห้ง



ภาพที่ 2.5 : Process diagram for the production of protein isolate.

ที่มา : ดัดแปลงจาก Lasekan et al. (2013)

การสกัดโปรตีนไอโซเลตจากพืชมักจะใช้สภาวะที่เป็นด่าง เช่น การสกัดโปรตีนไอโซเลตจาก defatted peanut flour โดยสกัดที่ pH 9 โดยใช้อุณหภูมิ 40°C เขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Ji และคณะ, 2014) การสกัดจาก flaxseed ด้วย pH 9 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Silva et al., 2013)

ในสัตว์มีการทดลองสกัดทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง Wang et al., (2013) ได้ทดลองสกัดโปรตีนไอโซเลตจากโครงไก่ spent hen โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ pH 2.0, 2.5 และ 11.5, 12.0 โดยโซโม่จีไนซ์ spent hen บดกับน้ำกลั่น/น้ำแข็ง ปรับ pH ให้ได้ตามสภาวะที่ต้องการจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแล้วนำชั้นกลางซึ่งเป็นส่วนของ soluble protein มาตกตะกอนกลับโดยปรับ pH เป็น 5.2 เก็บส่วนของโปรตีนโดยนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำตะกอนที่ได้มาละลายกลับแล้วโซโม่จีไนซ์ ปรับ pH 6.2 แล้วปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เพื่อเก็บโปรตีนไอโซเลต การสกัดโดยวิธีนี้ Omana et al. (2010) ได้ใช้ในการสกัดโปรตีนจากเนื้อส่วนที่เป็นสีเข้ม (chicken dark meat)

เช่นกันโดยใช้ pH 10.5, 11.0, 11.5 และ 12.0 ส่วน Song et al. (2014) สกัดโปรตีนจากขนไก่โดยปั่นผสมขนไก่กับน้ำในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติม 1M NaOH 300 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจิไนซ์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg 1 ชั่วโมง กรองด้วยผ้าขาวบางแล้วปรับให้เป็นกลางด้วย 1 N HCl นำไปโคอะไลซ์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงแล้วเก็บโดยทำให้แห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง (freeze dryer)

การสกัดโปรตีนไอโซเลตจากปลาจะสามารถสกัดโดยโฮโมจิไนซ์เนื้อปลาที่ผ่านการล้างแล้วด้วยน้ำกลั่นที่เย็น จากนั้นปรับ pH ด้วย NaOH แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง นำส่วนใสมาปรับ pH 5.5 กรองส่วนตะกอน แล้วปรับ pH 7.0 (Arfat et al., 2014)

การสกัดโปรตีนไอโซเลต นอกจาก pH แล้ว อีกปัจจัยหนึ่งที่ผลต่อปริมาณ โปรตีนที่สกัดได้คือเกลือ โดย Achouri et al. (2012) ได้สกัดโปรตีนไอโซเลตจากงา โดยใช้ sodium chloride และ ammonium sulfate พบว่าในสภาวะที่มีเกลือ 0.6–1 M NaCl ผลผลิตของ โปรตีน ไอโซเลตที่สกัดได้มีการเพิ่มขึ้นจาก 12.5% ในสภาวะที่ไม่มีเกลือเป็น 54.6% ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 1 M

2.5.2 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลต

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional properties) ของโปรตีน หมายถึง สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนในอาหารระหว่างการแปรรูป การเก็บรักษา การเตรียมอาหาร และการบริโภค สมบัติในการทำหน้าที่ต่างๆของโปรตีนในอาหาร (นิธิยา รัตนานพนธ์, 2553) แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 Functional properties of proteins in food.

สมบัติ	หน้าที่
ประสาทสัมผัส (organoleptic)	สี กลิ่น และรสชาติ
ความรู้สึกเมื่อปลายประสาทถูกกระตุ้น (kinaesthetic)	ลักษณะเนื้อสัมผัส ความรู้สึกมีอาหารอยู่ในปาก (mouthfeeling) ความนุ่ม และความชุ่ม
การจับกับน้ำ (hydration)	การละลาย ความชุ่มชื้น การคูดน้ำ การพองตัว ความข้น ความหนืด และการเกิดเจล
การเคลือบที่ผิวนอก (surface)	การเกิดอิมัลชัน การเกิดโฟม และการเกิดฟิล์ม
การเป็นตัวจับ (binding)	จับกับลิพิด (lipid-binding) และจับกับสารให้กลิ่นและรสชาติ (flavor-binding)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)สมบัติของโปรตีนในการทำหน้าที่ต่างๆในอาหาร

สมบัติ	หน้าที่
ลักษณะโครงสร้าง (structural) ของอาหาร	Elasticity, cohesiveness, chewiness, adhesion network, cross-binding, aggregation, dough formation, texturizability, fiber formation และ extrudability
ลักษณะทางกายภาพของเนื้ออาหาร (rheological)	ความหนืด และการเกิดเจล
การทำหน้าที่เป็นเอนไซม์	ทำให้โปรตีนนมตกตะกอนด้วยเอนไซม์เรนเนต ทำให้เนื้อสัตว์ไม่เหนียวด้วยเอนไซม์ปาเปน
การเป็นส่วนผสม (blendability)	ส่วนประกอบที่ผสมเข้ากัน เช่น แป้งข้าวสาลี-ถั่วเหลือง หรือโปรตีนกลูเตน-เคซีน
สารต้านออกซิเดชัน	ป้องกันไม่ให้เกิดกลิ่นผิดปกติ

ที่มา : นิธิยา รัตนานนท์ (2553)

สมบัติด้านหน้าที่ของโปรตีนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของโปรตีน กล่าวคือเกี่ยวข้องกับขนาดโมเลกุล ปริมาณและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์ การกระจายตัวของประจุบนโมเลกุลของโปรตีน นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างโปรตีนกับโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันของโปรตีนกับองค์ประกอบอาหารอื่นๆ เช่น ไขมัน น้ำ คาร์โบไฮเดรต สมบัติความไม่ชอบน้ำของโปรตีน (hydrophobicity of proteins) สมบัติด้านหน้าที่สำคัญของโปรตีนในอาหารแบ่งออกเป็นสามกลุ่มคือ

1. สมบัติที่เกี่ยวกับส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการละลายได้ของโปรตีน (solubility) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding capacity) ความสามารถในการเกิดฟอง (foam formation) ความสามารถในการพองตัว (swelling) และความสามารถในการเกิดเจล (gelation)
2. สมบัติที่เกี่ยวกับส่วนที่ชอบไขมัน (hydrophobic) ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการดูดซับไขมัน (fat binding capacity)

3. สมบัติที่เกี่ยวข้องกับส่วนที่ชอบน้ำและไขมัน (hydrophilic-hydrophobic) ของโปรตีน เช่น ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsifying properties) และความสามารถในการเกิดฟอง (foaming properties) (Zayas, 1997; ยุพร พีชกมฺุทร, 2557)

สมบัติในการเป็นอิมัลซิไฟอิงเอเจนต์และโฟมมิงเอเจนต์ของโปรตีน มีความสัมพันธ์กับการที่โปรตีนจะถูกดูดซับเข้าไปแทรกตัวเป็นฟิล์มบางๆ อยู่ระหว่างผิวของอนุภาคคอลลอยด์ทำให้อิมัลชันและโฟมคงตัวดีขึ้น สมบัติของโปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญมากในการทำให้อิมัลชันอาหารมีความคงตัวดี เช่น การทำไส้กรอกชนิดต่างๆ การทำน้ำสลัดหรือมายองเนส การทำไอศกรีม และ whipped topping (นิธิยา รัตนานพนธ์, 2553)

สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน คือความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดการรวมตัวเป็นอิมัลชันและทำให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นนั้นมีความคงตัวอยู่ได้ มีความสัมพันธ์กับหลายปัจจัย เช่น pH ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว ชนิดและองค์ประกอบของโปรตีน รูปร่าง และประจุของโปรตีน (Zayas, 1997) Taheri et al. (2014) ได้ศึกษาโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จากน้ำเกลือที่ใช้หมักปลาแฮร์ริ่ง (salted herring brine) ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากการผลิตปลาแฮร์ริ่งในน้ำซอส (marinated herring) พบว่าส่วน >50 kDa ซึ่งเป็นส่วนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ที่สุดมีค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsion activity index) ที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่นๆ และที่ pH 2 มีค่าสูงที่สุด ($100.8 \pm 2.16 \text{ m}^2/\text{g protein}$) และมีค่าต่ำที่สุดที่ pH 6 ($85.98 \pm 0.9 \text{ m}^2/\text{g protein}$) แต่ทุกส่วนมีค่าดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability index) ต่ำโดยมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อ pH มีการเพิ่มขึ้น Adebisi และ Aluko (2011) ศึกษาโปรตีนไอโซเลตจากถั่ว พบว่าค่า emulsifying capacity และ emulsion stability ของโปรตีนไอโซเลตมีค่าสูงที่สุดที่ pH 4.0 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ pH 7.0 และ pH 9.0 Liang และ Tang (2013) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไอโซเลตจากถั่ว *Pisum sativum* (L.) โดยเปรียบเทียบกับ purified legumin และ purified vicilin (PL and PV) ที่ pH ต่างๆ (3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0) พบว่าโปรตีนไอโซเลตจากถั่วมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่ำที่สุดที่ pH 5.0 ซึ่งใกล้เคียงกับจุด isoelectric point และมีความคงตัวน้อยที่สุดอีกด้วย ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไอโซเลตจากถั่วนี้ในสภาวะที่เป็นกรด (pH 3.0) จะมีค่าสูงกว่าในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง โดยเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนทั้ง 3 ชนิดนี้ PL จะมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ของ Espino-Sevilla (2013) ที่พบว่าโปรตีนไอโซเลตที่สกัดจาก *Ditaxis heterantha* (DhPI) มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชันต่ำที่ pH 5.0 ซึ่งใกล้เคียงกับจุด isoelectric point และมีค่าสูงขึ้นที่ pH 3.0 แต่ต่างจากผลการศึกษานี้ของ Achouri et al. (2012) ที่พบว่าคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟอิงเอเจนต์ (emulsifying activity, emulsion stability)

และโฟมมิงเอเจนต์ (foam expansion, foam stability) ของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดจากงา (Sesame protein isolate) ที่ pH 5.0 มีค่าสูงกว่าที่ pH 2.0 คุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนนอกจากจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโปรตีนและค่าความไม่ชอบน้ำแล้ว ยังเกี่ยวเนื่องกับการดูดซับของโปรตีนที่พื้นผิวและธรรมชาติของโปรตีนอีกด้วย นอกจากนี้ ความเข้มข้นของโปรตีนก็มีผลต่อสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์เช่นกัน โดย Kuhn et al. (2014) ได้ศึกษาการใช้ flaxseed protein isolate (FPI) และ flaxseed protein isolate (FPI) ร่วมกับ whey protein isolate (WPI) พบว่าเมื่อ flaxseed protein isolate มีความเข้มข้นสูงขึ้น (0.7% w/v) จะทำให้ความคงตัวของครีม (creaming stability) มีค่าสูงขึ้นด้วย แต่ที่ FPI มีความเข้มข้น 0.7% w/v ในอิมัลชันผสม WPI-FPI ค่า droplet size และ creaming stability จะลดลง

สำหรับสถานะที่ใช้ในการสกัด Omana et al. (2010) พบว่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจากเนื้อส่วนที่เป็นสีเข้ม (chicken dark meat) ของไก่มีค่าแตกต่างกันเล็กน้อยอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P < 0.0001$) เมื่อสกัดด้วย pH ที่ต่างกัน แต่มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ pH 11.0 ส่วน Achouri et al. (2012) พบว่าคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดจากงาที่สกัดในสถานะที่มีเกลือ 1 M (Ses-PI-1 M NaCl) เปรียบเทียบกับ soy protein isolate (Soy-PI) จะมีคุณสมบัติการละลาย (protein solubility), ความสามารถในการอุ้มน้ำ (water holding) และความสามารถในการจับกับไขมัน (fat binding) ต่ำกว่า soy protein isolate อย่างมีนัยสำคัญ แต่คุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying) และคุณสมบัติการเกิดโฟม (foaming properties) สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Soy-PI โดยเมื่อตรวจสอบรูปแบบโปรตีนของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดด้วยน้ำเปรียบเทียบกับโปรตีนไอโซเลตที่สกัดด้วยเกลือโดยใช้ Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าความเข้มข้นของเกลือไม่มีผลต่อรูปแบบโปรตีนที่สกัดได้

ความสามารถในการเกิดโฟมเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรตีนซึ่งมีความสามารถของโปรตีนในการเกิดฟิล์มที่ยืดหยุ่นได้และกักเก็บอากาศไว้ภายใน โปรตีนที่สามารถคลายตัวและดูดซับที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศและของเหลวได้รวดเร็วในระหว่างการเกิดโฟมจะมีค่าความสามารถในการเกิดโฟมสูง (Omana et al., 2010) สมบัติการเป็นโฟมมิงเอเจนต์ของโปรตีนมีผลมาจากหลายปัจจัย เช่น แหล่งที่มาของโปรตีน อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของโปรตีน (Zayas, 1997) Taheri et al. (2014) ได้ศึกษาโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จากน้ำเกลือที่ใช้หมักปลาเฮอริงริง (salted herring brine) พบว่าส่วนของ pH precipitated fraction มีความสามารถในการเกิดโฟม (foaming capacity) และความคงตัวของโฟม (foaming stability) สูงที่สุดที่ pH 10 ($92.5 \pm 3.5\%$) และต่ำที่สุดที่ pH 6 ($40.0 \pm 7.0\%$) Omana et al. (2010) พบว่าคุณสมบัติการขยายตัวของโฟม (foam expansion property) ของ myofibrillar

protein จากเนื้อส่วนที่เป็นสีเข้ม (chicken dark meat) ของไก่ในสภาวะที่เป็นด่าง (pH 10.5, 11.0, 11.5 และ 12.0) มีค่าเพิ่มขึ้นตาม pH โดยมีค่าสูงที่สุดที่ pH 11.5 นอกจากนี้ Rodríguez Patino et al. (2007) ยังได้ศึกษาคุณสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดจากทานตะวันบดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยเปรียบเทียบ foaming power และความคงตัวของโฟมของ sunflower protein isolate (SPI) และโปรตีนไอโซเลตที่ผ่านการย่อยที่ degrees of hydrolysis (DH) ต่างๆกัน (5.62%, 23.5% และ 46.3%) โดยใช้เคซีน (Caseinate) เป็นโปรตีนอ้างอิง พบว่า foam capacity, การเก็บก๊าซและของเหลวภายในโฟม และความหนาแน่นของโฟมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย โดย sunflower protein isolate (SPI) ไม่สามารถเกิดโฟมได้ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 1% เนื่องจากความสามารถในการละลายที่ต่ำ (27.9% ที่ pH 7.0) ซึ่งความสามารถในการละลายมักจะขึ้นอยู่กับค่า pH ของโปรตีน Yuliana et al. (2014) ศึกษาการสกัดและคุณลักษณะของโปรตีนไอโซเลตจากเปลือกเมล็ดมะม่วงหิมพานต์ (defatted cashew nut shell) พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จะมีค่าต่ำลงเมื่อ pH ลดลง และมีค่าการละลายต่ำที่สุดที่จุด isoelectric point (pH 3)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

3.1.1.2 เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ จากไก่สายพันธุ์ *Arbor Acres*

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.2.1 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (รุ่น New classic MF, Mettler Toledo, Germany)

3.1.2.2 เครื่อง Homogeniser (รุ่น T25 B, IKA, Malaysia)

3.1.2.3 ชุดกลั่นโปรตีน (Distillation Unit) (รุ่น Vapopdest 30, Gerhardt, Germany)

3.1.2.4 เครื่องย่อยโปรตีน (Kjeldathem Digestion block) (รุ่น KB (KB-8S), Gerhardt, Germany)

3.1.2.5 ชุดสกัดซอกซ์เล็ท (soxhlet apparatus) (รุ่น S306 AK, Gerhardt, Germany)

3.1.2.6 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) (รุ่น ED/FD, binder, Germany)

3.1.2.7 เตาเผาไฟฟ้า (muffle furnace) (รุ่น LT 40/11/B170, Nabortherm GmbH, Germany)

3.1.2.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (รุ่น V-1200, MAPADA, Chinese)

3.1.2.9 Hot plate stirrer (รุ่น C-MAG HS7, IKA, Germany)

3.1.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated Centrifuge) (รุ่น Legend Mach 1.6R, Thermo Fisher scientific, Germany)

3.1.2.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (รุ่น FEP 20/FG20, metler Toledo, Switzerland)

3.1.2.12 ชุดอุปกรณ์อิเล็กโตรโพรซิส (รุ่น AE-6450, ATTO, Japan)

3.1.2.13 โถดูดความชื้น (desiccator)

3.1.2.14 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (รุ่น WNB29, memmert, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.2.15 Thermometer
- 3.1.2.16 Vortex
- 3.1.2.17 ตู้เย็น ใซท์ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส
- 3.1.2.18 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 และ 4
- 3.1.2.19 ถ้วยอลูมิเนียม (aluminium can)
- 3.1.2.20 ถ้วยกระบืออง (crucible)
- 3.1.2.21 เครื่องแก้ว

3.2 สารเคมี

- 3.2.1 Conc. Sulfuric acid (QR&C, Netherland)
- 3.2.2 Boric acid (Merck, Germany)
- 3.2.3 Hydrochloric acid (HCl) (Abantor performance materials, USA)
- 3.2.4 Sodium hydroxide (NaOH) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.5 Copper (II) sulfate (CuSO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.6 Potassium sulfate (K_2SO_4) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.7 Petroleum ether ที่มีจุดเดือด 40-60 องศาเซลเซียส (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.8 Acetic acid (CH_3COOH) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.9 Ethanol (RCI labscan, Thailand)
- 3.2.10 Metanol (Fisher Scientific, UK)
- 3.2.11 Perchloric acid (HClO_4) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.12 Isopropanol (RCI labscan, Thailand)
- 3.2.13 Sodium acetate (CH_3COONa) (Merck, Germany)
- 3.2.14 Trisodium citrate ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.15 Citric acid ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) (Lobachemie, India)
- 3.2.16 Trichloroacetic acid (TCA) (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.17 Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Lobachemie, India)
- 3.2.18 Bovine serum albumin (BSA) (Sigma, USA)
- 3.2.19 Beta-Mercaptoethanol (β -ME) (Bio-rad, China)
- 3.2.20 Disodium phosphate (Na_2HPO_4) (Merck, Germany)
- 3.2.21 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4) (Carlo Erba, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.22 Potassium chloride (KCl) (Merck, Germany)
- 3.2.23 Tris (Fisher Scientific, UK)
- 3.2.24 Urea (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.25 Methylene blue
- 3.2.26 Methy red
- 3.2.27 Chloramine T
- 3.2.28 p- Dimethylamine- benzaldehyde (Fluka, Switzerland)
- 3.2.29 Anala R Isopropanol (RCI labscan, Thailand)
- 3.2.30 1- hydroxyproline
- 3.2.31 Coomassie Blue R-250 (Bio-rad, China)
- 3.2.32 Potassium Sodium Tartrate ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Ajax Finechem, Australia)
- 3.2.33 Potassium iodide (KI) (J.T Baker, USA)
- 3.2.34 Glycerol (Carlo Erba, Italy)
- 3.2.35 Activated carbon
- 3.2.36 Acetate buffer
- 3.2.37 30% Acrylamide/Bis solution, 29:1 (Bio-rad, China)
- 3.2.38 Ammonium persulfate (APS) (Bio-rad, China)
- 3.2.39 TEMED (Bio-rad, China)
- 3.2.40 Glycine (Merck, Germany)
- 3.2.41 Vegetable oil

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 วัตถุประสงค์และการเตรียมวัตถุดิบ

นำเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ จากไก่สายพันธุ์ *Arbor Acres* ที่มีน้ำหนักประมาณ 2.1-2.4 กิโลกรัม/ตัว จากบริษัทบีอาร์เอฟ (ไทยแลนด์) จำกัด จังหวัดปทุมธานี บรรจุในถุงพลาสติก เก็บในกล่องโฟมบรรจุ น้ำแข็งในอัตราส่วน 1:2 ขนส่งมาที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ภายในเวลา 1.5 ชม. เมื่อมาถึงนำเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำประปา ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ ตัดตัวอย่างให้มีขนาดประมาณ 5x5 มม². โดยใช้กรรไกร จากนั้นบรรจุในถุงพอลิเอทิลีน แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งาน (ตัวอย่างที่ใช้ เก็บไม่เกิน 2 เดือน)

นำเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่เตรียมไว้มาวิเคราะห์หาปริมาณ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น ตามวิธีของ AOAC (1999) และตรวจสอบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline content) ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)

3.3.2 การจำแนกคุณลักษณะโปรตีนของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

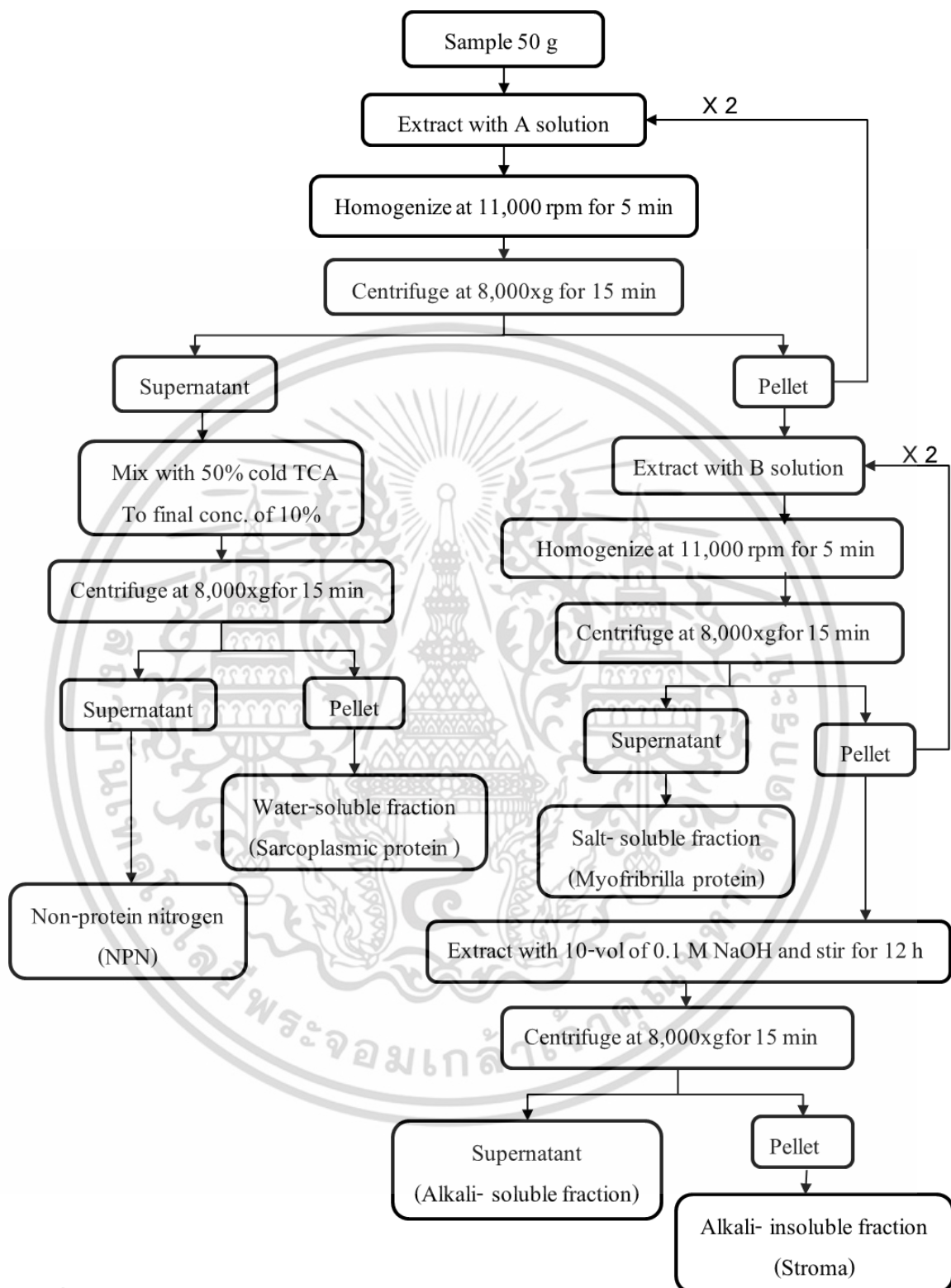
3.3.2.1 การตรวจสอบองค์ประกอบของโปรตีน (Protein composition)

ทำการตรวจสอบองค์ประกอบของโปรตีนภายในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่โดยดัดแปลงจากวิธีของ Hashimoto et al. (1979) และควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดทั้งกระบวนการ ดังแสดงขั้นตอนในภาพที่ 3.1 โดยนำตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มาปริมาณ 50 กรัม มาทำการสกัดด้วย สารละลาย A (สารละลาย A ประกอบด้วย 15.6 mM Na₂HPO₄ และ 3.5 mM KH₂PO₄, pH 7.5) จากนั้นนำไปโฮโมจีไนส์ ด้วยเครื่อง Ultra-Turrax homogenizer ที่ความเร็ว 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 8,000xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยง (Supernatant) ที่ได้ และนำส่วนที่เป็นตะกอน (Pellet) ไปสกัดด้วยสารละลาย A อีกครั้ง นำส่วนใสที่ได้จากการสกัดทั้งสองรอบมารวมกันแล้วผสมกับ Trichloroacetic acid (TCA) เย็น ความเข้มข้น 50% จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10% จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg เป็นเวลา 15 นาที จะได้ส่วนใส (Supernatant) เป็นส่วนของ non-protein nitrogen (NPN) ส่วนที่ตกตะกอนจากการปั่นเหวี่ยง (Pellet) จะเป็นส่วนของ water-soluble protein (Sarcoplasmic protein) นำส่วนตะกอนที่ได้จากการสกัดด้วยสารละลาย A ในขั้นต้นทั้งสองรอบมารวมกัน แล้วทำการสกัดด้วย สารละลาย B (สารละลาย B ประกอบด้วย 0.45 M KCl, 15.6 mM Na₂HPO₄, 3.5 mM KH₂PO₄, pH 7.5) นำไปโฮโมจีไนส์ด้วยเครื่อง Ultra-Turrax

homogenizer ที่ 11,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg เป็นเวลา 15 นาที ส่วน (Supernatant) ที่ได้จะเป็นส่วนของ salt-soluble fraction (Myofibrillar protein) ส่วนที่ตกตะกอนจากการปั่นเหวี่ยง นำไปสกัดด้วย 0.1 M NaOH ปริมาณ 10 เท่าของตะกอน พร้อมกับการ กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000xg เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใส (Supernatant) เป็นส่วนของ Alkali-soluble fraction ส่วนที่ตกตะกอนคือ Alkali-insoluble fraction (Stroma)

คำนวณหา Nitrogen content ของตัวอย่างโปรตีนทั้งหมด และ Non-protein fraction โดยใช้วิธี Kjeldahl method (AOAC, 1999) และ ตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ 4% stacking gel และ 10% separating gel ตามวิธีของ Laemmli (1970) นอกจากนี้นำส่วนสโตรมาไปวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน (Hydroxyproline content) ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963)





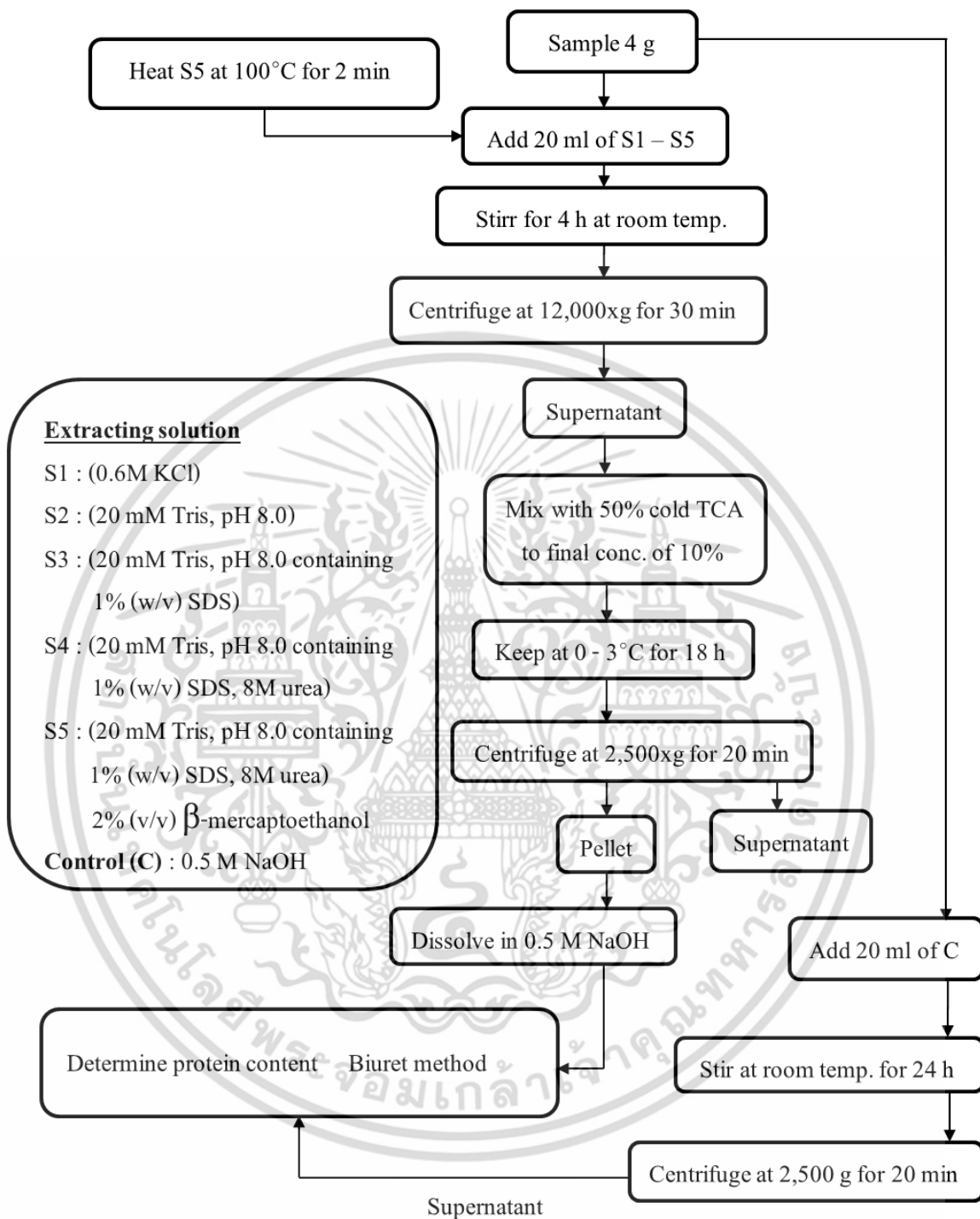
ภาพที่ 3.1 : Fractionation procedure of Protein composition.

ที่มา : Hashimoto et al. (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.2 การศึกษาการละลายของโปรตีน (Protein solubility)

ตรวจสอบการละลายของโปรตีน โดยดัดแปลงจากวิธีของ Roussel และ Cheftel (1990) ซึ่งแสดงในภาพที่ 3.2 ทำการแบ่งตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 4 กรัม นำมาเติมสารละลาย S1 (0.6M KCl), S2 (20 mM Tris, pH 8.0), S3 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS), S4 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS 8M and urea) และ S5 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS, 8M urea and 2% (v/v) β -mercaptoethanol) ปริมาตร 20 มล. จากนั้นนำไปกวน ด้วย เครื่อง magnetic stirrer อย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง (หมายเหตุ : นำ S5 ไปแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 100° C เป็นเวลา 2 นาทีก่อนการนำไปกวนสกัด) จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นเหวี่ยงที่ 12,000xg เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใส 4 มล. มาเติม 50% (w/v) TCA เย็น จนได้ TCA ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% แล้วนำไปเก็บไว้ที่ 4° C เป็นเวลา 18 ชม. ก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,500xg เป็นเวลา 20 นาที เก็บตะกอน (ทั้งส่วนใส) ที่ได้ไปละลายด้วย 0.5 M NaOH วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret method โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็น โปรตีนมาตรฐาน โดยเปอร์เซ็นต์การละลายของโปรตีนคำนวณเปรียบเทียบจากปริมาณ โปรตีนทั้งหมดของตัวอย่างชุดควบคุม (C) ที่ละลายด้วย 0.5 M NaOH เป็นเวลา 24 ชม.



ภาพที่ 3.2 : Determination procedure of Protein solubility.

ที่มา : คัดแปลงจาก Roussel และ Cheffel (1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.3 การเตรียมโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

3.3.3.1 ผลของความเข้มข้นของ NaOH ต่อการละลายของโปรตีน

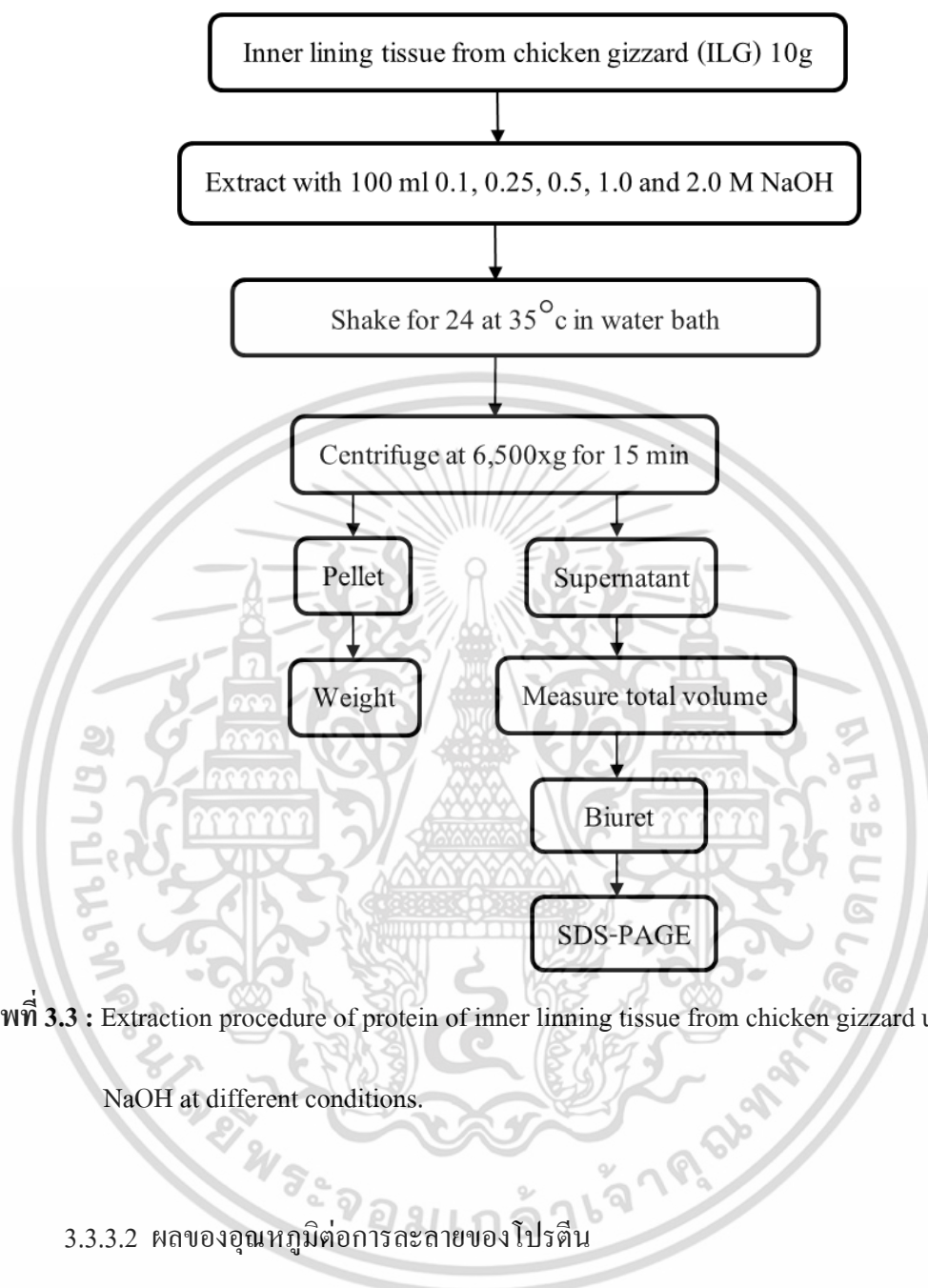
การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ด้วยวิธีใช้ต่าง แสดงดังภาพที่ 3.3 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มา 10 กรัม (บันทึกค่าน้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. เติมน้ำละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 และ 2.0 โมลาร์) ปริมาตร 100 มล. จากนั้นนำไปปั่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 35°C เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,500xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสพร้อมบันทึกปริมาตรส่วนใสทั้งหมด แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret เลือกสภาวะที่เหมาะสมซึ่งได้ปริมาณโปรตีนสูงที่สุดโดยใช้ความเข้มข้นของ NaOH ต่ำที่สุด กำหนดค่า Relative solubility โดยใช้สมการ

$$\text{Relative solubility (\%)} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A คือ ปริมาณ โปรตีนที่ละลายได้

B คือ ปริมาณ โปรตีนที่ความเข้มข้นที่ละลายได้สูงที่สุด

และตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE โดยใช้ 4% stacking gel และ 10% separating gel ตามวิธีของ Laemmli (1970)



ภาพที่ 3.3 : Extraction procedure of protein of inner lining tissue from chicken gizzard using NaOH at different conditions.

3.3.3.2 ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีน

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มา 10 กรัม (บันทึกค่าน้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.1 ปริมาตร 100 มล. จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 25, 35, 45, 60 และ 75°C เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 24 ชม. ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,500xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสพร้อมบันทึกปริมาตรส่วนใสทั้งหมด แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret

3.3.3.3 ผลของระยะเวลาต่อการละลายของโปรตีน

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อมา 10 กรัม (บันทึกค่าน้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.1 ปริมาตร 100 มล. จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.2 เชยอย่างต่อเนืองเป็นเวลา 3, 6, 12, 24 และ 48 ชม. ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,500xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสพร้อมบันทึกปริมาตรส่วนใสทั้งหมด แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret

3.3.3.4 การผลิตโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อ

นำตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อมา 100 กรัม (บันทึกค่าน้ำหนักแน่นอน) ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ เติมสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.3.1 ปริมาตร 1000 มล. จากนั้นนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ โดยควบคุมอุณหภูมิและเชยอย่างต่อเนื่องในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 3.3.3.2 และ 3.3.3.3 ตามลำดับ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 6,500xg เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสมาปรับ pH ให้เท่ากับ 7.0 ด้วย 6M HCl จากนั้น นำไปทำให้แห้งด้วยด้วยเครื่องทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) ส่วนที่ผลิตได้เรียกว่า โปรตีนไอโซเลต

3.3.4 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (surface hydrophobicity)

ตรวจสอบ surface hydrophobicity ของตัวอย่างโปรตีนไอโซเลตตามวิธีของ Benjakul et al. (1997) โดยใช้ 1-anilino-naphthalene-8-sulphonic acid (ANS) เป็น probe โดยละลายตัวอย่างโปรตีนไอโซเลตใน 10 mM phosphate buffer (pH 6.0) ที่มี 0.6M NaCl ให้มีความเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อปริมาตร 2 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 8 mM ANS (ใน 0.1M phosphate buffer, pH 7.0) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ทำการวัดค่า fluorescence intensity ของ ANS-protein conjugate โดยใช้ excitation wavelength ที่ความยาวคลื่น 374 นาโนเมตร และ emission wavelength ที่ 485 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrofluorometer ค่าความชันเริ่มต้นของกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า fluorescence intensity และ ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจะรายงานเป็นค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (SoANS)

3.3.5 วิเคราะห์ปริมาณซัลไฟด์รวม (total sulfhydryl content) และปริมาณซัลไฟด์บริเวณพื้นผิว (surface-reactive sulfhydryl content)

วิเคราะห์หาปริมาณ total sulfhydryl content ของตัวอย่างโปรตีนไอโซเลตโดยใช้ 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ตามวิธีของ Benjakul et al. (1997) โดยนำสารละลายตัวอย่างโปรตีนไอโซเลต (100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2M Tris-HCl buffer (containing 8M urea, 2% SDS and 10 mM EDTA; pH 6.8) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำสารละลายผสมที่เตรียมได้ 4 มิลลิลิตรมาเติม 0.1% DTNB (in 0.2 M Tris-HCl buffer, pH 6.8) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร เตรียม blank โดยใช้ 0.6M KCl, pH 7.0 แทนตัวอย่าง การหาปริมาณ surface-reactive sulfhydryl content ทำวิธีเดียวกัน แต่ไม่เติมยูเรีย การวิเคราะห์ total sulfhydryl content และ surface-reactive sulfhydryl content คำนวณโดยใช้ molar extinction coefficient เท่ากับ $13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

3.3.6 การตรวจสอบสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional properties) ของโปรตีนไอโซเลต

3.3.6.1 ค่าศักย์ซีต้า (Zeta (ζ)- potential)

ตรวจสอบค่าศักย์ซีต้าโดยคัดแปลงจากวิธีของ Nalinanon et al. (2010) โดยนำ Protein isolate ที่มีความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตรปริมาณ 20 มิลลิลิตรไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง zeta potential analyzer (ZetaPALS, Brookhaven Instruments Co., Holtsville, NY, USA) ปรับ pH ของตัวอย่างโดยใช้กรดในตริกความเข้มข้น 0.5 โมลาร์หรือสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 1.0 โมลาร์โดยใช้ autotitrator จุด isoelectric point (pI) จะประมาณได้จาก pH ที่แสดงค่า ζ - potential เป็นศูนย์

3.3.6.2 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying properties)

ตรวจสอบคุณสมบัติการเกิดอิมัลชันโดยทำตามวิธีของ Nalinanon et al. (2011b) โดยนำน้ำมันพืช 6 มิลลิลิตร และสารละลาย Protein isolate 0.2% ในน้ำกลั่นที่มี pH 1, 3, 5, 7 และ 9 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 20000 rpm เป็นเวลา 1 นาที เก็บส่วนผสมอิมัลชันจากส่วนกลางของภาชนะมา 50 ไมโครลิตรที่เวลา 0 และ 150 นาทีหลังจากโฮโมจีไนซ์ จากนั้นนำมาผสมกับสารละลาย Sodium dodecyl sulphate (SDS) 0.1% ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้

vortex 10 วินาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร โดยใช้สารละลาย SDS 0.1% เป็น blank

คำนวณค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying activity index (EAI)) และ ดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability index (ESI)) โดยใช้สมการ

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_{500}) / [0.25 \times \text{ปริมาณโปรตีน (กรัม)}]$$

โดย A_{500} คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

$$ESI (\text{นาที}) = A_0 \times \Delta t / \Delta A$$

เมื่อ $\Delta A = A_0 - A_{150}$ และ $\Delta t = 150$ นาที

A_{150} และ A_0 คือค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตรที่เวลา 150 และ 0 นาที ตามลำดับ

3.3.6.3 สมบัติการเกิดโฟม (Foaming properties)

ตรวจสอบคุณสมบัติการเกิดโฟมโดยดัดแปลงจากวิธีของ Liu et al. (2010) และ Nalinanon et al. (2011b) โดยนำสารละลายโปรตีน 0.5% ในน้ำ ที่มี pH 1, 3, 5, 7 และ 9 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 13400 rpm เป็นเวลา 1 นาที อ่านปริมาตรหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 0 และ 60 นาที คำนวณหา foam expansion (PE) และ Foam stability (FS) จะคำนวณโดยใช้สมการ

$$\text{Foaming expansion (\%)} = ((A_T - B) / B) \times 100$$

$$\text{Foam stability (\%)} = ((A_T - B) / B) \times 100$$

เมื่อ A_T คือ ปริมาตรที่อ่านได้หลังจากการตี

B คือ ปริมาตรของสารละลายก่อนการตี (มิลลิลิตร) และ

A_t คือ ปริมาตรที่อ่านได้หลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 60 นาที

3.3.7 การวางแผนการทดลอง และการวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) แต่ครั้งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล โดยใช้ Analysis of variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS Version 16



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมี

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่แสดงในตารางที่ 4.1 พบว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีโปรตีนและความชื้นเป็นองค์ประกอบหลัก คิดเป็นปริมาณ 61.37% และ 38.68% ตามลำดับ ส่วนไขมันและเถ้าพบในปริมาณน้อย (0.5-1.2 %) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lee (2013) ซึ่งตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่จาก silkie flow ไก่ดำไต้หวัน (Taiwan black-feather country chicken) ไก่แดง (red-feather country chicken) และเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่ผ่านการต้ม พบว่า ตัวอย่างมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก โดยพบเป็นปริมาณระหว่าง 42.32-48.97% ส่วน Webb และ Colvin (1964) รายงานว่าตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ของ domestic fowl (*Gallus domesticus*) พบไขมันในปริมาณน้อยและไม่พบคาร์โบไฮเดรต

องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อสัตว์ต่างๆมีความแตกต่างกัน โดยมีหลายปัจจัย เช่น ชนิดของสัตว์ ชนิดของเนื้อเยื่อ เช่น กล้ามเนื้อเรียบของก้น ไก่มีความชื้น และโปรตีนสูง (76.91% และ 19.86% ตามลำดับ) แต่มีไขมันในปริมาณต่ำกว่า และมีปริมาณเถ้าใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับกล้ามเนื้อหัวใจของแพะ (Maiti และ Ahlawat, 2011) ในปลาลิ้นหมามีความชื้น (76.72-77.29%) โปรตีน (14.99-15.28%) ไขมัน (3.62-4.03%) และเถ้า (3.65-3.78%) โดยไม่พบความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลานในแต่ละสูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง (Zhang et al., 2013)

ปริมาณโปรตีนที่พบสูงนี้แสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีศักยภาพในการนำมาใช้ประโยชน์จากโปรตีนในด้านต่างๆ เช่น โปรตีนไอโซเลต และโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นต้น

ตารางที่ 4.1 Chemical composition of inner lining tissue from chicken gizzard (ILG).

Composition	Content (% dry weight basis)
Protein	61.37±0.43
Moisture	38.68±0.13
Lipid	1.20±0.93
Ash	0.52±0.03

การวิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนจากตัวอย่าง 3 ชนิด ได้แก่ เจลาตินทางการค้า (Commercial Gelatin), เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ (Inner lining tissue from chicken gizzard) สโตรมา (Stroma) จากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ ตามวิธีของ Bergman และ Loxley (1963) แสดงผลดังตารางที่ 4.2 พบว่าส่วนของสโตรมามีปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนเท่ากับ (1.75 mg/100 g sample) โดยพบในปริมาณสูงกว่าในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ถึง 6 เท่า แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนที่พบในส่วนสโตรมามีปริมาณน้อย เมื่อเทียบกับเจลาตินทางการค้า (commercial food grade) (134 mg/100 g sample) ในขณะที่ Hrynets et al. (2010) ได้รายงานว่าตัวอย่างจากเนื้อไก่กังว (mechanically separated turkey meat) พบว่าปริมาณไฮดรอกซีโพรตีนเท่ากับ 1160 mg/100 g โดยน้ำหนักแห้ง ผลการทดลองจึงแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อมีปริมาณคอลลาเจนน้อยมาก อาจเนื่องจากองค์ประกอบของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่เป็น โครงสร้าง polysaccharide-protein complex ที่เรียกว่าโคอิลิน (Koilin) ซึ่งมีคุณลักษณะคล้ายกับเครตินที่พบในขนสัตว์ปีก (Akester, 1986; Cheeke และ Dierenfeld, 2010) การวิเคราะห์ปริมาณของไฮดรอกซีโพรตีนนี้เป็นตัวชี้วัดปริมาณของคอลลาเจน เนื่องจากกรดอะมิโนชนิดนี้เป็นองค์ประกอบหลักของคอลลาเจน (Marshall และ Bangert, 2008) ซึ่งไฮดรอกซีโพรตีนนี้จะไม่พบในโปรตีนชนิดอื่นนอกจากอิลาสตินซึ่งมีไฮดรอกซีโพรตีนประมาณ 1.5-2.3% ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของตัวอย่าง (Neuman และ Logan, 1950)

ตารางที่ 4.2 Hydroxyproline content of commercial food grade gelatin, inner lining tissue from chicken gizzard and its stroma counterpart.

Sample	Hydroxyproline content (mg/100g sample on dry basis)
Gelatin	134.01± 1.58
Chicken Inner lining tissue	0.27± 6.9x10 ⁻⁴
Stroma	1.75± 0.04

4.1.2 องค์ประกอบของโปรตีน (Protein composition)

ตารางที่ 4.3 แสดงองค์ประกอบของโปรตีน (Protein composition) ของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ในรูปเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน พบว่า Stroma เป็นส่วนที่มีปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุด ส่วน alkali-soluble proteins, myofibrillar proteins, non protein nitrogen (NPN) และ sarcoplasmic proteins มีปริมาณน้อยลงตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ส่วนของ alkaline-insoluble fraction (stroma) เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ ส่วน alkali-soluble proteins และ salt-soluble (myofibrillar protein) เป็นองค์ประกอบย่อยรองลงมา

ในโปรตีนในกล้ามเนื้อลายของสัตว์ปีกโดยทั่วไปจะมีส่วนของ Myofibrillar proteins เป็นองค์ประกอบหลัก (53.6%) ส่วน Sarcoplasmic proteins (21.4%) และ Stroma (6.0%) เป็นองค์ประกอบย่อยรองลงมา (Guerrero-Legarreta, 2010) ในเนื้อสัตว์ชนิดอื่น Kamal et al.(2000) รายงานว่าในกึ่งกล้ามเนื้อและกึ่งกระดูก พบ myofibrillar proteins เป็นองค์ประกอบหลัก คิดเป็นปริมาณ 44.63% และ 46.29% ตามลำดับ ส่วน sarcoplasmic proteins พบ 36.51% และ 35.32% ตามลำดับ และพบ Stroma และ alkali-soluble proteins เป็นองค์ประกอบย่อยรองลงมาตามลำดับ โปรตีนส่วนของ Stroma เป็นส่วนที่บ่งบอกถึงโปรตีนที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเป็นส่วนที่จับยึดและค้ำจุนโครงสร้างของกล้ามเนื้อ โดยทั่วไปจะมีประมาณ 3-6% ของปริมาณโปรตีนในกล้ามเนื้อของสัตว์ปีก (Owens, 2010)

เมื่อพิจารณาจากองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ พบว่าส่วนของ Stroma มีปริมาณสูงถึง 38.44±1.07% ซึ่งสูงกว่าในกล้ามเนื้อลายของสัตว์ปีกมาก ทำให้เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีลักษณะที่เหนียวและแข็งแรงมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆของสัตว์ปีก ทั้งนี้ผลการทดลองเป็นที่น่าประหลาดใจ

อย่างยิ่งเนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่พบ stroma เป็นองค์ประกอบหลักแต่กลับพบปริมาณไฮดรอกซีโพรตีน (ตารางที่ 4.2) ในปริมาณต่ำมาก ดังนั้นผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า เนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากผนังกระเพาะไก่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ไม่มีคอลลาเจนเป็นองค์ประกอบหลัก

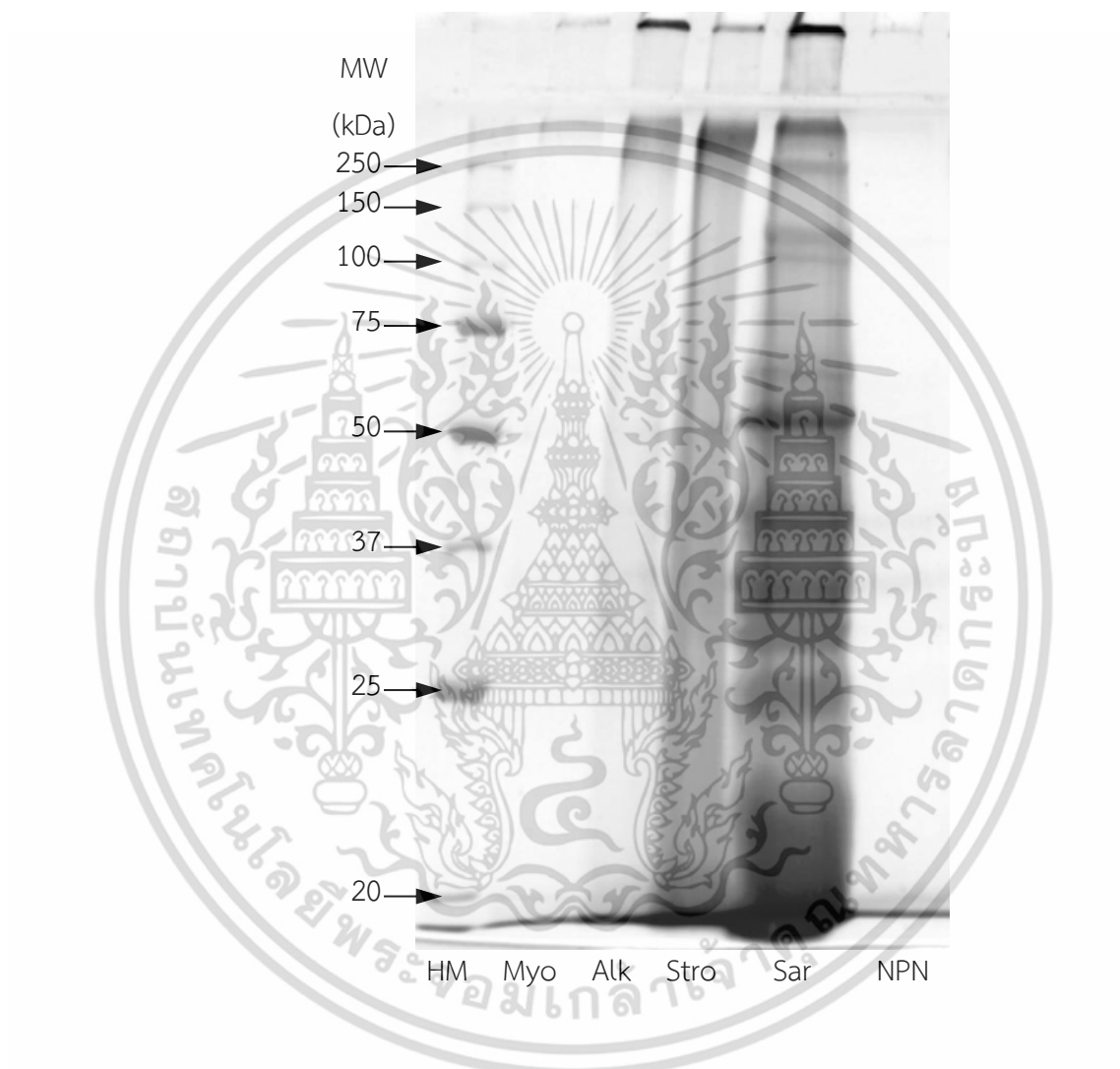
ตารางที่ 4.3 Protein composition from inner lining tissue from chicken gizzard.

Composition	Total nitrogen (% dry weight basis)*
Alkali – insoluble (Stroma)	76.85±2.14
Alkali soluble protein fraction	10.04±0.16
Salt- Soluble protein (Myofibrillar proteins)	9.09±0.47
Non- protein nitrogen (NPN)	3.86±0.64
Water soluble (Sarcoplasmic proteins)	1.14±0.03

* Total nitrogen was expressed as the percentage of total nitrogen from inner lining tissue from chicken gizzard.

การศึกษารูปแบบโปรตีนขององค์ประกอบที่ได้จากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่แสดงในภาพที่ 4.1 พบว่าโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักทั้งสองส่วนที่พบใน alkaline-soluble fraction และ alkaline-insoluble fractions มีขนาดโมเลกุลใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลสูงซึ่งแสดงให้เห็นจากความเข้มของแถบสีเข้มของโปรตีนที่บริเวณสูงกว่า 250 กิโลดาลตัน (kDa) นอกจากนี้ในส่วนของ water-soluble protein fraction พบการกระจายตัวของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วงต่ำกว่า 20 kDa จนถึงมากกว่า 250 kDa สอดคล้องกับ Babji และ Kee (1994) ซึ่งพบว่าส่วน sarcoplasmic proteins ของเนื้อไก่ spent hen พบการกระจายตัวของโปรตีนอยู่ระหว่างน้ำหนักโมเลกุล 230 ถึง 27.5 kDa แถบโปรตีนคู่น้ำหนักโมเลกุล 41-39 kDa คาดว่าเป็น creatine kinase และ aldolase (Ladrat et al., 2003) แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 60, 58 และ 34 kDa พบว่าเป็นโปรตีน Pyruvate kinase, Phosphoglucose isomerase

และ Lactate dehydrogenase ตามลำดับ ส่วน โปรตีนที่ 25 kDa พบว่าเป็นโปรตีน Phosphoglycerate mutase (Mudalal et al., 2014)

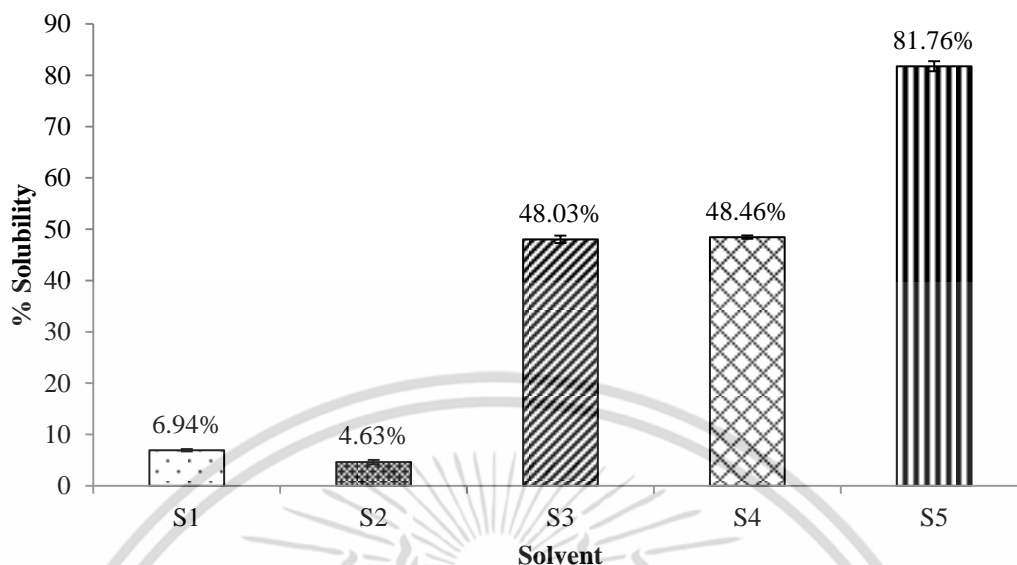


ภาพที่ 4.1 SDS-PAGE pattern of protein fractions obtained from inner lining tissue of chicken gizzard. HM designates molecular weight protein standards. Myo, Alk, Stro, Sar and NPN indicate myofibrillar fraction, alkaline-soluble fraction, alkaline-insoluble (stroma) fraction, sarcoplasmic fraction and non-protein nitrogen fraction, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1.3 ความสามารถในการละลายของโปรตีน (Protein solubility) ในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

การละลายของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ในสารละลายต่างๆแสดงในภาพที่ 4.2 ผลการทดลองพบว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีโปรตีนที่ละลายในสารละลาย S1 (0.6M KCl) และ S2 (20 mM Tris pH 8.0) ในปริมาณต่ำ คิดเป็น 6.94% และ 4.63% แสดงให้เห็นว่าในตัวอย่างเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ประกอบไปด้วยโปรตีนความคงตัวต่อการละลายในสารละลายเกลือและสภาวะ pH เป็นค่าเล็กน้อย ปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลาย S1 และ S2 ที่มีน้อยนี้สัมพันธ์กับการพบ myofibrillar proteins เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างในปริมาณต่ำเช่นกัน โปรตีนที่ละลายในสารละลาย S3 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS) พบประมาณ 48% สารละลาย S3 มี SDS เป็นส่วนประกอบซึ่งสามารถทำลายอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกและพันธะไอออนิกให้ความคงตัวของโครงสร้าง โปรตีนที่ละลายในสารละลาย S4 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS and 8M urea) พบประมาณ 48% ซึ่งไม่แตกต่างจากการละลายด้วยสารละลาย S3 แม้ว่าสารละลาย S4 มียูเรียเป็นองค์ประกอบซึ่งสามารถทำลายพันธะไฮโดรเจนในโครงสร้างโปรตีนได้ (Prodpran et al., 2007) การใช้สารละลาย S5 (20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS, 8M urea and 2% (v/v) β -mercaptoethanol) ทำให้ตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนละลายได้มากที่สุด คิดเป็น 81.76% ซึ่งสารละลาย S5 ประกอบด้วย β -mercaptoethanol ที่สามารถทำลายพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนต์ที่ให้ความแข็งแรงของโครงสร้างโปรตีน (Li et al., 2008) ดังนั้นผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าองค์ประกอบโปรตีนในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะหลักที่ทำให้โครงสร้างมีความคงตัว เช่นเดียวกับ Swamy et al. (1976) ซึ่งรายงานว่าเนื้อเยื่อผนังกระเพาะของนกสายพันธุ์ *Pelecanus phillipensis* มีพันธะไดซัลไฟด์ให้ความคงตัวของโครงสร้าง



ภาพที่ 4.2 Bars indicate the % solubility of chicken lining inner gizzard in difference solvents (S1-S5). S1 :0.6M KCl; S2 :20 mM Tris, pH 8.0; S3 :20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS; S4 :20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS and 8M urea; S5 :20 mM Tris, pH 8.0 containing 1% (w/v) SDS, 8M urea and 2% (v/v) β -mercaptoethanol. % Solubility was expressed as the percentage of total protein extracted by 0.5 M NaOH.

4.2 การผลิตโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

4.2.1 ผลของความเข้มข้นของ NaOH ต่อการละลายของโปรตีน

เนื่องจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีความแข็งแรงเป็นโครงสร้างสูง ทำให้การใช้ประโยชน์โปรตีนในตัวอย่างมีข้อจำกัด การนำโปรตีนในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ไปใช้ประโยชน์จึงต้องมีการศึกษาหาวิธีการละลายเพื่อสกัดโปรตีนเพื่อนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในขั้นต่อไป การศึกษาผลของการใช้สารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆต่อการละลายของโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่แสดงในตารางที่ 4.4 พบว่า การใช้สารละลาย NaOH มีประสิทธิภาพสูงในการละลายโปรตีนจากตัวอย่างและสามารถละลายได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย NaOH เพิ่มขึ้น โดยเมื่อความเข้มข้นของสารละลาย NaOH เพิ่มจาก 0.1 M เป็น 0.25 M และ 0.5 M ค่า Relative solubility ซึ่งเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลาย 2.0 M NaOH ของโปรตีนเพิ่มจาก 20.24% เป็น 29.83% และ 97.94% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารละลาย NaOH ที่ต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่า 0.5 M ไม่สามารถสกัดโปรตีนออกมาจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ได้อย่างสมบูรณ์ แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นจาก 0.5 M เป็น 1.0 M และ 2.0 M พบว่า การละลายของโปรตีนจากตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญ ($P>0.05$) สอดคล้องกับการรายงานของ Webb และ Colvin (1964) ที่แสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ทนต่อการละลายในสารละลายกรด แต่สามารถละลายได้ในสารละลายด่างแก่โดยเฉพาะการใช้ NaOH ที่ความเข้มข้นสูง ความสัมพันธ์เช่นนี้มิได้แสดงผลต่อเฉพาะโปรตีนที่มาจากสัตว์เท่านั้น (Lestari et al., 2010) ซึ่งทดลองสกัดโปรตีนจากเมล็ดสนูปดำก็พบว่าความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของ NaOH ก็ทำให้โปรตีนที่สกัดได้เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นที่ 0.5 M ในการเตรียมโปรตีนเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.4 Relative solubility (%) of inner lining tissue from chicken gizzard at different NaOH concentrations.

NaOH (M)	Relative solubility of protein (%)
0.1	20.24±0.25 ^{a†}
0.25	29.83±0.59 ^b
0.5	97.94±1.47 ^c
1.0	97.66±2.48 ^c
2.0	100.00±1.47 ^c

* Values are given as mean ± SD (n=3).

† Superscript letters indicate significant differences ($P<0.05$).

จากการศึกษารูปแบบของโปรตีนของ ILG ที่สกัดด้วยสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยเทคนิค SDS-PAGE แสดงในภาพที่ 4.3 รูปแบบของโปรตีนที่สกัดในทุกสถานะแสดงแถบสีเข้มที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 250 kDa เป็นองค์ประกอบหลักแสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มิขนาดโมเลกุลสูง ที่ความเข้มข้น 0.25 M NaOH โปรตีนมีการกระจายตัวอยู่ระหว่างต่ำกว่า 20 kDa จนถึงมากกว่า 250 kDa เมื่อความเข้มข้นของ NaOH สูงขึ้น โปรตีนจะมีรวมกันทั้งขนาดเล็ก (ต่ำกว่า 20 kDa) และใหญ่ (มากกว่า 250 kDa) โดยจะพบขนาดของโมเลกุลมีการกระจายตัวอย่าง

หลากหลายที่ความเข้มข้น 0.25 M และ 0.5 M NaOH สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือขนาดโมเลกุลต่ำ (ต่ำกว่า 20 kDa) และขนาดโมเลกุลสูง (มากกว่า 250 kDa)

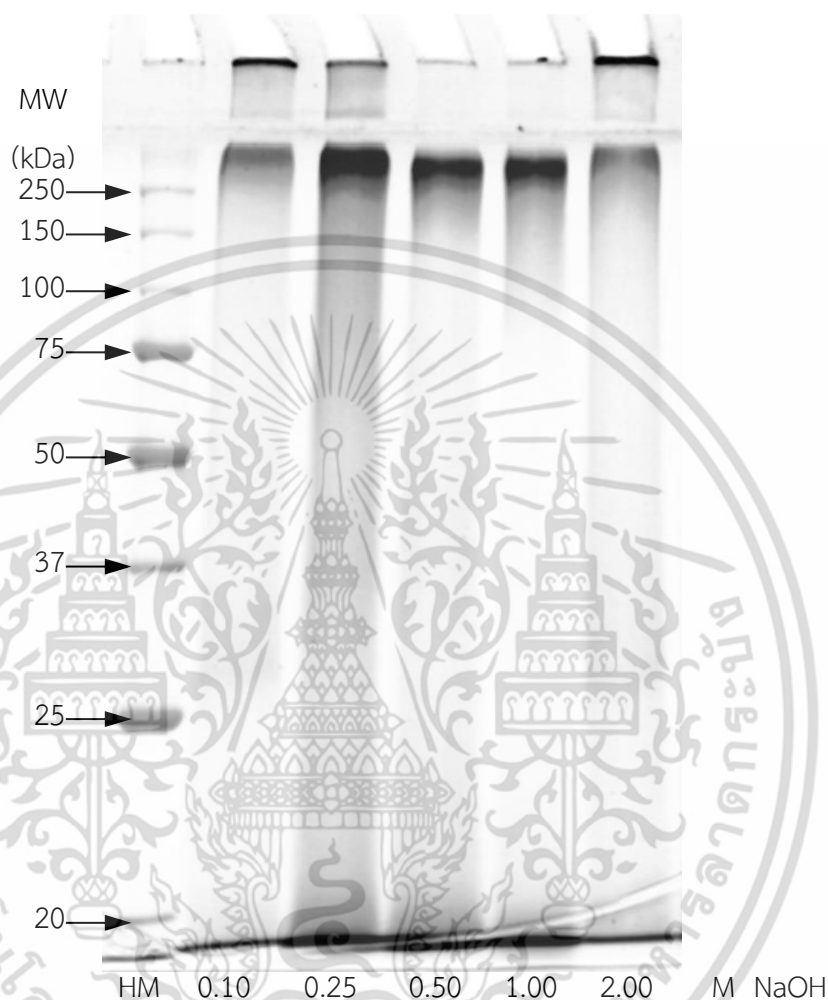


Figure 4.3 SDS-PAGE patterns of proteins extracted from inner lining tissue of chicken gizzard by using NaOH at different concentrations for 24 h.

4.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการละลายของโปรตีน

ปริมาณโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่ถูกสกัดและละลายได้ในสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 M ที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 4.5 ผลการทดลองแสดงให้เห็นได้ว่า เมื่ออุณหภูมิการสกัดเพิ่มสูงขึ้น โปรตีนจะสามารถละลายออกจากตัวอย่างได้มากขึ้น โดยเมื่อใช้สภาวะการสกัดที่อุณหภูมิ 25°C จะทำให้ได้สารละลายโปรตีนที่มีโปรตีนถูกสกัดออกมาได้รวมเท่ากับ 1270.29

มิลลิกรัม และเพิ่มขึ้นเป็น 4387.13 และ 5075.08 มิลลิกรัม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการสกัดเป็น 35 และ 45°C ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นเป็น 60 และ 75°C ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้มีปริมาณลดน้อยลง เป็น 4611.95 และ 4020.27 มิลลิกรัม ตามลำดับ เนื่องจากโปรตีนจะสามารถละลายได้เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิอยู่ระหว่าง 0 ถึง 40 -50°C แต่เมื่อให้อุณหภูมิสูงกว่าช่วงดังกล่าว โปรตีนจะเกิดการเสียสภาพเนื่องจากความร้อนและจับตัวกันเอง (aggregation) ทำให้เกิดการ ละลายได้น้อยลง (Hall, 1996) ซึ่งเห็นได้ชัดเจนจากปริมาณ โปรตีนที่ลดลงอย่างมีนัยยะสำคัญ ($P<0.05$) การที่โปรตีนสามารถละลายได้มากขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากเมื่อมีการเพิ่มอุณหภูมิ อัตราการสกัดโปรตีนจะมีการเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนจะเคลื่อนที่ได้เร็วมากขึ้น ทำให้อัตราการถ่ายเทมวลสาร (mass transfer) บริเวณผิวหน้าระหว่างของแข็งและของเหลวเพิ่มขึ้นตาม ดังนั้น การเพิ่มอุณหภูมิจึงสามารถเพิ่มการละลายและอัตราการละลายของโปรตีนได้ (Zhang et al., 2009) นอกจากนี้ ที่อุณหภูมิสูงยังส่งผลต่อสีของโปรตีนที่สกัดได้อีกด้วยโดยสีจะมีความเข้มขึ้นเมื่ออุณหภูมิที่ใช้สกัดเพิ่มสูงขึ้น จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 45°C ในการสกัดโปรตีนไอโซเลตต่อไป

ตารางที่ 4.5 Total protein content (mg) solubilized from inner lining tissue of chicken gizzard (10g) by extracting with 0.5M NaOH at different temperatures.

Temperature (°C)	Total protein content (mg) *
25	1270.29±272.69 ^{at}
35	4387.13±68.34 ^b
45	5075.08±282.73 ^c
60	4611.95±71.73 ^b
75	4020.27±86.81 ^d

* Values are given as mean ± SD (n=3).

† Superscript letters indicate significant differences ($P<0.05$).

4.2.3 ผลของระยะเวลาต่อการละลายของโปรตีน

ปริมาณโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่ถูกสกัดและละลายได้ในสารละลาย NaOH ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 M ที่อุณหภูมิ 45°C ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 6 ถึง 72 ชั่วโมง แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า เมื่อใช้ระยะเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 6 ถึง 12 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณโปรตีนที่ถูกสกัดเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ที่ระยะเวลาการสกัด 12 ชั่วโมง ทำให้สามารถสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ได้สูงที่สุดถึง 5179 mg จากตัวอย่าง ILG 10g หรือคิดเป็น 51.8% และคงที่ระหว่าง 12 ถึง 24 ชั่วโมง ($P > 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง โปรตีนที่สกัดได้จะมีปริมาณลดลงเล็กน้อย ($P < 0.05$) และคงที่ที่เวลาตั้งแต่ 48 ชั่วโมงเป็นต้นไป ($P > 0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhang et al. (2009) ที่มีการรายงานว่าอัตราการสกัดโปรตีนจากเมล็ดฝ้ายจะเพิ่มสูงขึ้นตามเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อถึงระยะเวลาหนึ่งอัตราการสกัดจะช้าลงจนเกือบคงที่ในที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการเกิด aggregation ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่สกัดออกมาได้และตกตะกอนไปบางส่วน ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาการสกัดที่ 12 ชั่วโมงในการสกัดโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.6 Total protein content (mg) solubilized from inner lining tissue of chicken gizzard (10g) by extracting with 0.5M NaOH at different time.

Time (h)	Total Protein content (mg)*
6	2571.25±165.91 ^{a†}
12	5179.11±184.30 ^b
24	5104.22±151.11 ^b
48	4788.27±92.37 ^c
60	4692.19±140.13 ^c
72	4606.38±122.23 ^c

* Values are given as mean ± SD (n=3).

† Superscript letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

4.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลต

4.3.1 การตรวจสอบความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (Surface hydrophobicity : SoANS)

ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว (SoANS) ของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อมีค่าเท่ากับ 8888.67 ± 255.15 ซึ่งถือว่ามีค่าสูง เมื่อเทียบกับ bovine serum albumin ซึ่งมีค่า SoANS ประมาณ 1600 และกลีมาเนื้อออกไก่ที่มีค่า SoANS เพียง 75 (Hall, 1996) การที่โปรตีนมีค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวที่สูงนี้ส่งผลทำให้โปรตีนละลายได้ยาก จึงต้องใช้เบสความเข้มข้นสูงในการทำละลาย Chan et al. (2011) รายงานว่าค่า SoANS ในโปรตีนไมโอไฟบริล (Myofibrillar proteins) จากเนื้อไก่วงมีค่าเท่ากับ 331 ส่วนของโปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins) มีค่าเท่ากับ 84.1 Joshi et al. (2012) ได้รายงานว่าค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวของโปรตีนอัลบูมินจากลูกวัว (Bovine serum albumin : BSA), โปรตีนไอโซเลต (protein isolate) จากถั่วลันเตา (LPI) และโปรตีนไอโซเลตจากเวย์ (whey protein isolate : WPI) พบว่ามีค่า 1935.0, 392.1 และ 56.8 ตามลำดับ

Benjakul et al. (1997) รายงานว่า ANS fluorescence probe สามารถจับกับกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ ซึ่งมี aromatic ring เช่น ฟีนอลานีน ไทโรซีน และทริปโตเฟนได้ ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวนอกจากจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) ที่ปรากฏบนพื้นผิวของโมเลกุลแล้ว ยังมีผลจากการที่โปรตีนเกิดการคลายตัวระหว่างการเสียสภาพอีกด้วย ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวของโปรตีนจึงเป็นปัจจัยสำคัญเนื่องจากปฏิกิริยาความไม่ชอบน้ำเป็นปัจจัยหลักในการดูดซับโปรตีนบนพื้นผิวของหยดไขมัน

ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิว เป็นหนึ่งในคุณสมบัติทางโครงสร้างสำคัญที่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยมีผลต่อคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ คุณสมบัติการเกิดโฟม และคุณสมบัติการเกิดเจล (Kato และ Nakai, 1980; Wang et al., 2014) โดยโปรตีนที่มีค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวสูงจะถูกดูดซับที่พื้นผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน (interface) โปรตีนที่ถูกดูดซับไว้นี้จะลดแรงตึงผิว ซึ่งเป็นการช่วยในการเกิดอิมัลชัน สารละลายโปรตีนจะมีแรงตึงผิวประมาณ 25 mN/m ซึ่งต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์ ความเข้มข้นของโปรตีนที่ผิวและแรงตึงผิวที่ลดลงนี้มีผลมาจากค่าความไม่ชอบน้ำของโปรตีน ค่าความไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวมีความสัมพันธ์ต่อการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และการลดแรงตึงผิว (Kato และ Nakai, 1980) แต่มีความสัมพันธ์น้อยต่อคุณสมบัติการเกิดโฟม

ตารางที่ 4.7 SoANS of different Proteins.

Proteins	SoANS
Protein isolate from ILG	8888.67±255.15
Bovine serum albumin : BSA ¹	1935.0
lentil protein isolate : LPI ¹	392.1
whey protein isolate : WPI ¹	56.8
Myofibrillar proteins from turkey meat ²	331

ที่มา : ¹Joshi และคณะ (2012); ²Chan และคณะ (2011)

4.3.2 ปริมาณซัลไฟด์รวม (total sulfhydryl content) และปริมาณซัลไฟด์บริเวณพื้นผิว (surface-reactive sulfhydryl content)

ปริมาณซัลไฟด์รวมของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่มีค่าเท่ากับ $1.78 \pm 0.02 \text{ mol}/10^7 \text{ g protein}$ ส่วนค่าปริมาณซัลไฟด์บริเวณพื้นผิวมีค่าน้อยมากจนไม่สามารถวัดได้ ผลการทดลองจึงชี้ให้เห็นว่าโปรตีนไอโซเลตมีปริมาณหมู่ซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบอยู่น้อย แม้ว่าเนื้อเยื่อหนังกระเพาะไก่มีพันธะไดซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบหลักของโครงสร้าง แต่การพบปริมาณซัลไฟด์ในโปรตีนไอโซเลตน้อยอาจเกิดจากการสกัดที่ใช้ภาวะที่มีความเป็นเบส ทำให้หมู่ซัลไฟด์เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (Sian และ Ishak, 1990) หมู่ซัลไฟด์เป็นหมู่ฟังก์ชันที่เกิดปฏิกิริยาได้ง่ายที่สุดหมู่หนึ่งของโปรตีน คุณสมบัตินี้มีความสำคัญยิ่งขึ้นในสภาวะที่เป็นด่าง เนื่องจากสภาวะนี้สามารถชักนำให้หมู่ซัลไฟด์เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลให้เกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งทำให้โปรตีนเกิดความเสถียรและเพิ่มคุณสมบัติทางกายภาพของโปรตีน (Lin และ Park, 1998; Omana et al., 2010) Valenzuela et al. (2013) ยังได้รายงานว่า pH ที่สูงขึ้นจะทำให้พบพันธะไดซัลไฟด์สูงขึ้นอีกด้วย ปริมาณซัลไฟด์ที่พบในโปรตีนไอโซเลตมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับโปรตีนในเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น ในเนื้อไก่ของ Chan et al. (2011) พบว่ามีปริมาณซัลไฟด์รวม $802 \text{ mol}/10^7 \text{ g protein}$ และปริมาณซัลไฟด์บริเวณพื้นผิว $386 \text{ mol}/10^7 \text{ g protein}$ ส่วนใน mechanically separated turkey meat ของเนื้อไก่ที่สกัดด้วยสารละลาย NaOH และ HCl ที่ pH 2.5 - 11.5 พบว่ามีปริมาณซัลไฟด์รวม 600

mol//10⁷g protein และมีค่าซัลไฟด์รีดริบบริเวณพื้นผิว 450 mol//10⁷g protein (Hrynets et al., 2010) ส่วนโปรตีนจากโครงไก่ spent hen ที่สกัดในสภาวะต่าง (pH 11.5 และ 12.0) มีปริมาณซัลไฟด์รีดริบรวม 280 และ 260 mol//10⁷g protein ตามลำดับ ส่วนค่าซัลไฟด์รีดริบบริเวณพื้นผิวมีปริมาณ 200 และ 170 mol//10⁷g protein ตามลำดับ (Wang et al., 2013) นอกจากนี้ Lin และ Park (1998) รายงานว่าพบปริมาณซัลไฟด์รีดริบรวมในโปรตีนไมโอซินจากเนื้อปลาแซลมอนเท่ากับ 650 mol//10⁷g protein และ carp myosin มีปริมาณซัลไฟด์รีดริบรวม 600 mol//10⁷g protein โปรตีนไอโซเลต โดยหากโมเลกุลของโปรตีนมีปริมาณซัลไฟด์รีดริบสูง มักมีแนวโน้มที่จะมีโครงสร้างที่แข็งแรง เนื่องจากการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ได้สูง (Hsu et al., 2007; Ko et al., 2007)

ตารางที่ 4.8 total sulfhydryl content and surface-reactive sulfhydryl content of different Proteins.

Proteins	surface-reactive sulfhydryl content (mol/107g protein)	total sulfhydryl content (mol/107g protein)
Protein isolate from ILG	ND	1.78±0.02
Turkey meat ¹	386	802
mechanically separated turkey meat ²	450	600
spent hen pH 11.5 ³	200	280
spent hen pH 12.0 ³	170	260

ND is not detectable

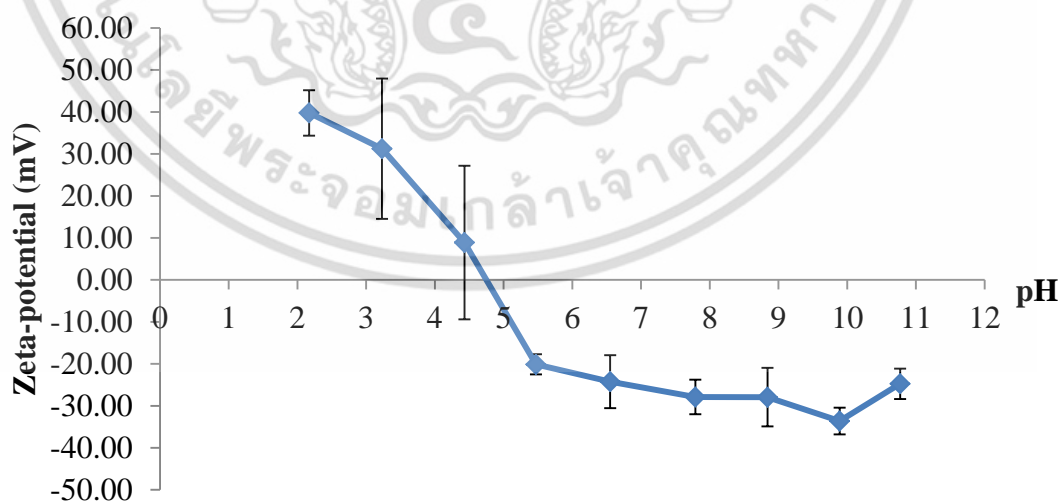
ที่มา : ¹Chan และคณะ (2011); ²Hrynets และคณะ (2010); ³Wang และคณะ, (2013)

4.2.3 การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้า (Zeta (ζ)- potential)

ค่าศักย์ซีต้าของโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่ pH ต่างๆแสดงในภาพที่ 4.4 โปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้มีค่าศักย์ไฟฟ้าเป็นศูนย์ที่ pH ประมาณ 4.75 ซึ่งแสดงถึงจุด isoelectric point ของโปรตีนไอโซเลต ทั้งนี้ที่ pH ระหว่าง 6-11 เป็น pH ที่สูงกว่า pI โปรตีนจะมีประจุเป็นลบ และที่ pH ต่ำกว่า pI (pH ~2-4) โปรตีนจะมีประจุเป็นบวก ซึ่งสามารถพิจารณาได้จากค่าศักย์ซีต้าที่แสดงค่าลบหรือบวก ตามลำดับ

การหาค่าศักย์ซีต้า เป็นหนึ่งในวิธีที่สามารถทำความเข้าใจเกี่ยวกับพฤติกรรมการตกตะกอนและสมบัติทางจลศาสตร์ไฟฟ้า (electro-kinetic characteristic) ของโปรตีนได้ ค่าศักย์ซีต้าเป็นการแสดงประจุทางไฟฟ้าซึ่งอยู่บนพื้นผิวของอนุภาค เมื่อประจุสุทธิมีค่าเหมือนกัน แรงผลักระหว่างโมเลกุลจะมีผลป้องกันการจับตัวกันของโมเลกุล ทำให้สามารถคงรูปอยู่เป็นสารละลายได้ ในทางกลับกัน เมื่อประจุสุทธิเป็นศูนย์ แรงผลักระหว่างโมเลกุลจะมีน้อยซึ่งจะทำให้โมเลกุลเกิดการจับตัวและตกตะกอน ซึ่งรู้จักกันในชื่อว่า การตกตะกอนที่จุด isoelectric point (Gerzhova, 2016)

Hrynets et al. (2010) วิเคราะห์การละลายของโปรตีน mechanically separated turkey meat พบว่ามีการละลายน้อยที่สุดที่ pH 5.5 ซึ่งอยู่ในช่วง isoelectric point ของโปรตีนกล้ามเนื้อ ส่วน Omana et al. (2010) พบว่าเนื้อไก่มีการละลายสูงที่ pH ที่มีความเป็นกรดหรือด่างสูงซึ่งเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของประจุบวกหรือลบของโปรตีนในเนื้อทำให้เกิดแรงผลักระหว่างโมเลกุลของโปรตีน Gerzhova et al. (2016) ได้ศึกษาค่าศักย์ซีต้าของคาโนล่าพบว่ามีค่าประจุที่ต่ำที่สุดที่ pH 4.3 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่บ่งชี้ว่าจุด isoelectric point อยู่ที่ pH ระหว่าง 4-5 และมีความสามารถในการตกตะกอนสูงที่สุดที่ pH ระหว่าง 4.5 และ 5.5 (Ghodsvali et al., 2005; Tan et al., 2011) นอกจากนี้ Pedroche et al. (2004) พบว่าค่า pI ของโปรตีนแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของตัวอย่างของโปรตีนที่นำมาทำการทดลองและอาจเป็นผลมาจากองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน



ภาพที่ 4.4 Zeta (ζ)- potential of protein isolate from solubilized of inner lining tissue from chicken gizzard at different pHs. Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

4.3.4 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying properties) และสมบัติการเกิดโฟม (Foaming properties) ของโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่

ค่าดัชนีกิจกรรมการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying activity index : EAI), ดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability index : ESI), การขยายตัวของโฟม (foam expansion : FE) และ ความคงตัวของโฟม (foam stability : FS) ของโปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่ที่สภาวะ pH ต่างๆแสดงในตารางที่ 4.7 ค่า EAI มีค่าต่ำที่สุดที่ pH 5 ($2.86 \pm 0.78 \text{ m}^2/\text{g}$) ซึ่งเป็นค่า pH ที่ใกล้เคียงกับ pI ของโปรตีนไอโซเลต (pI = 4.75) และจะมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อค่า pH ห่างจาก pI มากขึ้น เนื่องจากโปรตีนสามารถละลายได้ดีขึ้น อันเป็นผลมาจากค่าประจุไฟฟ้าของโมเลกุลซึ่งจะมีค่าต่ำที่สุดที่จุด isoelectric point ซึ่งการละลายของโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน โดยเมื่อโปรตีนสามารถละลายได้ดีขึ้นมักจะมีคุณสมบัติทั้งการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และให้ความคงตัวของอิมัลชันที่ดีขึ้นด้วย ค่าความไม่ชอบน้ำของโมเลกุลยังมีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยโปรตีนที่มีค่าความไม่ชอบน้ำสูงจะถูกดูดซับที่พื้นผิวระหว่างน้ำและน้ำมัน ทำให้แรงดึงผิวลดลงจึงทำให้เกิดเป็นอิมัลชันได้ง่าย (Zayas, 1997; Ganesh et al., 2006) นอกจากนี้ Townsend และ Nakai (1983) พบว่าเมื่อโปรตีนมีค่าความไม่ชอบน้ำ (Hydrophobicity) มากกว่า 700 มักจะส่งผลให้โปรตีนนั้นมีคุณสมบัติการเกิดโฟมที่ดีด้วย

อิมัลชันจะมีความคงตัวสูงขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โดย ESI มีค่าสูงสุดที่ pH 7 (1152.38 ± 117.59) โดยทั่วไป โปรตีนที่มีขนาดเล็กจะมีความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) ต่ำเนื่องจากฟิล์มรอบเม็ดอิมัลชัน (emulsion droplet) ไม่แข็งแรง (Galla et al., 2012) นอกจากนี้ ประจุที่ผิวของโปรตีนยังเป็นปัจจัยที่ดีในการวัดแรงผลักระหว่างอนุภาคของคอลลอยด์ ซึ่งเป็นหนึ่งในปัจจัยที่บ่งบอกความคงตัวของอิมัลชันที่เกิดขึ้นได้ โดยโปรตีนที่มีค่าศักย์ซีต้ามักจะเพิ่มขึ้นจะมีแรงผลักระหว่างอนุภาคสูงขึ้น ซึ่งจะให้อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความคงตัวสูงมากยิ่งขึ้น (Joshi et al., 2012)

ค่าการขยายตัวของโฟม (foam expansion : FE) ของโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่มีค่าสูงที่สุดที่ pH 1 (118.33 ± 2.89) และมีค่าต่ำลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น โดยมีค่าต่ำที่สุดที่ pH 7 (39.17 ± 1.44) ($p < 0.05$) อาจเป็นผลมาจากประจุรวมที่เป็นบวกของโปรตีนมีผลต่อการดูดซับของโปรตีนบริเวณระหว่างเฟสของน้ำและอากาศโดยเมื่อประจุเป็นบวกมากขึ้น ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนก็จะมากขึ้นตามไปด้วย (Cherry และ McWatters, 1981 อ้างโดย Zayas, 1997; Siddique et al., 2016) นอกจากนี้ความสามารถในการเกิดโฟมจะสูงขึ้นตามความสามารถในการละลายของโปรตีน เนื่องจาก

การละลายของโปรตีนจะทำให้โปรตีนเกิดการคลายตัวและเกิดเป็นแผ่นฟิล์มที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำและอากาศซึ่งก่อให้เกิดเป็น air bubbles (Adebiyi และ Aluko, 2011) Chavan et al. (2001) ได้รายงานเช่นกันว่าความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไอโซเลตอาจเป็นผลมาจากโปรตีนสามารถละลายได้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โปรตีนคลายตัวบริเวณระหว่างเฟสของน้ำและอากาศได้เร็วขึ้น โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวประสานกันอย่างจำกัดและมีความยืดหยุ่นของโปรตีนที่ผิวหน้าในการเป็นโมเลกุลที่สามารถลดแรงตึงผิวได้ นอกจากนี้ ส่วนความคงตัวของโฟม (Foam stability : FS) จะมีค่าต่ำสุดที่ pH 1 (2.50 ± 2.50) และเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลจากโปรตีนมีประจุเพิ่มขึ้นซึ่งสามารถป้องกันมิให้โฟมที่เกิดขึ้นกลับมารวมตัวกันได้อย่างรวดเร็ว การเพิ่มขึ้นของประจุสามารถเพิ่มความคงตัวของโฟมได้โดยการเพิ่มแรงผลักทางไฟฟ้า (electrostatic repulsions) ซึ่งทำให้อัตราการรวมตัวกันของโฟมลดลง (Adebiyi และ Aluko, 2011) นอกจากนี้ Benelhadj et al. (2016) ยังพบว่า ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไอโซเลตที่ได้จากสารถายสไปรูลิน่าเพิ่มขึ้นเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลจากการละลายของโปรตีนและความว่องไวทางปฏิกิริยาของพื้นผิว (surface activity) ของสารละลายโปรตีนสูงขึ้น ดังนั้น คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่จะเปลี่ยนแปลงไปตามค่า pH ของสารละลาย

ตารางที่ 4.9 Emulsifying and foaming properties of protein isolate from solubilized of inner lining tissue from chicken gizzard at different pHs.

pH of protein isolate	EAI (m ² /g)	ESI (min)	FE (%)	FS (%)*
1	10.04 ± 0.25 ^b	306.34 ± 43.88 ^a	118.33 ± 2.89 ^d	2.50 ± 2.50 [†]
3	15.28 ± 1.64 ^c	317.38 ± 58.02 ^a	110.00 ± 10.00 ^d	13.33 ± 1.44 ^b
5	2.86 ± 0.78 ^a	573.38 ± 142.08 ^b	81.67 ± 7.22 ^c	13.33 ± 1.44 ^b
7	77.25 ± 1.38 ^d	1152.38 ± 117.59 ^c	39.17 ± 1.44 ^a	24.17 ± 8.04 ^c
9	95.34 ± 3.25 ^e	777.51 ± 126.07 ^b	64.17 ± 5.20 ^b	45.83 ± 7.22 ^d

* Values are given as mean ± SD (n=3).

† Superscript letters indicate significant differences (P<0.05).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อมีองค์ประกอบหลักคือโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย alkali-insoluble (stroma) เป็นองค์ประกอบหลัก โดยส่วน alkali-insoluble (stroma) นี้มีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนต่ำ โครงสร้างของโปรตีนในเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจนอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่สำคัญในการให้ความแข็งแรงของโครงสร้าง สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดโปรตีนไอโซเลตจากเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อคือ NaOH 0.5 M อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งจะได้โปรตีนไอโซเลตสูงถึง 51.8% โปรตีนไอโซเลตที่สกัดได้มีค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) สูง ในขณะที่ปริมาณซัลไฮดริลรวมมีค่าต่ำและปริมาณซัลไฮดริลบริเวณพื้นผิวมีค่าต่ำจนไม่สามารถวัดได้ การวิเคราะห์ค่าศักย์ซีต้าของโปรตีนไอโซเลตทำให้ทราบว่าค่า pI เท่ากับ pH 4.75 คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไอโซเลตแตกต่างกันตาม pH ที่เปลี่ยนไป โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่ำที่สุดที่ pH 5 ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pI ของโปรตีนไอโซเลตและมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อค่า pH ห่างจาก pI มากขึ้น ความคงตัวของอิมัลชันจะสูงขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โดยมีค่าสูงสุดที่ pH 7 ส่วนความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไอโซเลตมีค่าสูงที่สุดที่ pH 1 และมีค่าต่ำลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น และความคงตัวของโฟมจะมีค่าต่ำสุดที่ pH 1 และเพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มสูงขึ้น ดังนั้น เนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อสามารถนำไปใช้เป็นแหล่งของโปรตีนและประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ในสภาวะเป็นกลางถึงด่างต่อไปได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาคุณสมบัติของเนื้อเยื่อผนังกระเพาะไก่อและโปรตีนไอโซเลตเพิ่มเติมเพื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นแหล่งของโปรตีนต่อไป
2. หากจะนำไปประยุกต์ใช้ในอาหาร ควรมีการศึกษาด้านความปลอดภัยอาหาร เช่น การตรวจด้านจุลินทรีย์ เพิ่มเติม

บรรณานุกรม

- กระทรวงพาณิชย์. 2559. โครงสร้างสินค้าส่งออกไก่แปรรูป. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://www.ops3.moc.go.th> [24 พฤศจิกายน 2559]
- โครงการสารานุกรมไทยสำหรับเยาวชน. 2523. สารานุกรมไทยฉบับเยาวชน เล่มที่ 5 บทที่ 7 เปิดไก่. [ออนไลน์]. สืบค้นจาก : <http://kanchanapisek.or.th> [4 กรกฎาคม 2557]
- นิธิยารัตนาปนนท์. 2553. เคมีอาหาร. โอเดียนสโตร์. พิมพ์ครั้งที่ 4 . กรุงเทพฯ.
- บริษัท ปีอาร์เอฟ (ไทยแลนด์) จำกัด. 2559. ราคาซื้อขายไก่ชำแหละและชิ้นส่วนหน้าโรงงาน. บริษัท ปีอาร์เอฟ (ไทยแลนด์) จำกัด. ปทุมธานี. ประเทศไทย.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2554. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. โอเดียนสโตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.
- AAFCO. 1990. **Soya Bluebook**. Bar Harbor, Maine: Soyatech Inc.
- Achouri, A., Nail, V. and Boye, J. I. 2012. "Sesame Protein Isolate: Fractionation, Secondary Structure and Functional Properties." **Food Research International**. 46:360-69.
- Adebiyi, A. P. and Aluko, R. E. 2011. "Functional Properties of Protein Fractions Obtained from Commercial Yellow Field Pea (*Pisum Sativum* L.) Seed Protein Isolate." **Food Chemistry**. 128:902-08.
- Akester, A. R. 1986. "Structure of the Glandular Layer and Koilin Membrane in the Gizzard of the Adult Domestic Fowl (*Gallus Gallus Domesticus*)." **Journal of Anatomy**. 147:1-25.
- AOAC. 1999. **Official Method of the Association of Official Analytical Chemists**. 16th ed. Arlington, Virginia.
- Arfat, Y. A., Benjakul, S., Prodpran, T. and Osako, K. 2014. "Development and Characterisation of Blend Films Based on Fish Protein Isolate and Fish Skin Gelatin." **Food Hydrocolloids**. 39:58-67.
- Babji, A. S. and Kee, G. S. 1994. "Changes in Sarcoplasmic and Myofibrillar Proteins of Spent Hen and Broiler Meat During the Processing of Surimi-Like Material (Ayami)." **Pertanika J. Agric. Sci**. 17:117-23.
- Benelhadj, S., Gharsallaoui, A., Degraeve, P., Attia, H. and Ghorbel, D. 2016. "Effect of Ph on the Functional Properties of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* Protein Isolate." **Food Chemistry**. 194:1056-63.

- Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T. and An, H. 1997. "Physicochemical Changes in Pacific Whiting Muscle Proteins During Iced Storage." **Journal of Food Science**. 62:729-33.
- Bergman, I. and Loxley, R. 1963. "Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline." **Analytical Chemistry**. 35:1961-65.
- Chan, J. T. Y., Omana, D. A. and Betti, M. 2011. "Application of High Pressure Processing to Improve the Functional Properties of Pale, Soft, and Exudative (Pse)-Like Turkey Meat." **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 12:216-25.
- Chavan, U. D., McKenzie, D. B. and Shahidi, F. 2001. "Functional Properties of Protein Isolates from Beach Pea (*Lathyrus Maritimus* L.)." **Food Chemistry**. 74:177-87.
- Cheeke, P. R. and Dierenfeld, E. S. 2010. **Comparative Animal Nutrition and Metabolism**. Cambridge: Cambridge University Press.
- Cherry, J. P. and McWatters, K. H. 1981. "Whippability and Aeration." in *Protein Functionality in Foods*. Washington, D. C.
- Espino-Sevilla, M. T., Jaramillo-Flores, M. E., Hernández-Gutiérrez, R., Mateos-Díaz, J. C., Espinosa-Andrews, H., Barba de la Rosa, A. P., Rodiles-López, J. O., Villanueva-Rodríguez, S. and Lugo-Cervantes, E. C. 2013. "Functional Properties of *Ditaxis Heterantha* Proteins." **Food Science & Nutrition**. 1:254-65.
- FAO. 2014. **Isolated Soybean Protein (Isp)**. [online]. Available: <http://www.fao.org>. [4 July 2014]
- Galla, N. R., Pamidighantam, P. R., Akula, S. and Karakala, B. 2012. "Functional Properties and in Vitro Antioxidant Activity of Roe Protein Hydrolysates of *Channa Striatus* and *Labeo Rohita*." **Food Chemistry**. 135:1479-84.
- Ganesh, A., Dileep, A. O., Shamasundar, B. A. and Singh, U. 2006. "Gel-Forming Ability of Common Carp Fish (*Cyprinus Carpio*) Meat: Effect of Freezing and Frozen Storage." **Journal of Food Biochemistry**. 30:342-61.
- Gerzhova, A., Mondor, M., Benali, M. and Aider, M. 2016. "Study of Total Dry Matter and Protein Extraction from Canola Meal as Affected by the Ph, Salt Addition and Use of Zeta-Potential/Turbidimetry Analysis to Optimize the Extraction Conditions." **Food Chemistry**. 201:243-52.

- Ghodsvali, A., Khodaparast, M. H. H., Vosoughi, M. and Diosady, L. L. 2005. "Preparation of Canola Protein Materials Using Membrane Technology and Evaluation of Meals Functional Properties." **Food Research International**. 38:223-31.
- Guerrero-Legarreta, I., Hui, Y. H., Alarcón-Rojo, A. D., Alvarado, C., Bawa, A. S., Guerrero-Avendaño, F., Lundén, J., McKee, L., Pérez-Ivarez, J. and Mine, Y. 2010. **Handbook of Poultry Science and Technology, Secondary Processing**. Wiley.
- Hall, G. M., editor. 1996. **Methods of Testing Protein Functionality**. London: Blackie Academic & Professional.
- Hashimoto, K., Watabe, S., Kono, M. and Shiro, K. 1979. "Muscle Protein Composition of Sardine and Mackerel." **NIPPON SUISAN GAKKAISHI**. 45:1435-41.
- Hrynets, Y., Omana, D. A., Xu, Y. and Betti, M. 2010. "Effect of Acid- and Alkaline-Aided Extractions on Functional and Rheological Properties of Proteins Recovered from Mechanically Separated Turkey Meat (Mstm)." **Journal of Food Science**. 75:477-86.
- Hsu, K.-C., Hwang, J.-S., Yu, C.-C. and Jao, C.-L. 2007. "Changes in Conformation and in Sulfhydryl Groups of Actomyosin of Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) on Hydrostatic Pressure Treatment." **Food Chemistry**. 103:560-64.
- Jacob, J., Pescatore, T. and Cantor, A. 2011. **Avian Digestive System. Collage of Agricultural, University of Kentucky**. [online]. Available: <http://afspoultry.ca.uky.edu>. [4 July 2014]
- Ji, N., Sun, C., Zhao, Y., Xiong, L. and Sun, Q. 2014. "Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Peanut Protein Isolate Hydrolysates Using UH-Q-ToF Mass Spectrometer." **Food Chemistry**. 161:148-54.
- Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S. and Barrow, C. J. 2012. "Interfacial and Emulsifying Properties of Lentil Protein Isolate." **Food Chemistry**. 134:1343-53.
- Karnik, D., Jung, J., Hawking, S. and Wicker, L. 2016. "Sugar Beet Pectin Fractionated Using Isopropanol Differs in Galacturonic Acid, Protein, Ferulic Acid and Surface Hydrophobicity." **Food Hydrocolloids**. 60:179-85.
- Kato, A. and Nakai, S. 1980. "Hydrophobicity Determined by a Fluorescence Probe Method and Its Correlation with Surface Properties of Proteins." **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**. 624:13-20.

- Ko, W.-C., Yu, C.-C. and Hsu, K.-C. 2007. "Changes in Conformation and Sulfhydryl Groups of Tilapia Actomyosin by Thermal Treatment." **LWT - Food Science and Technology**. 40:1316-20.
- Kuhn, K. R., Silva, F. G. D. e., Netto, F. M. and Cunha, R. L. d. 2014. "Assessing the Potential of Flaxseed Protein as an Emulsifier Combined with Whey Protein Isolate." **Food Research International**. 58:89-97.
- Ladrat, C., Verrez-Bagnis, V., Noël, J. and Fleurence, J. 2003. "In Vitro Proteolysis of Myofibrillar and Sarcoplasmic Proteins of White Muscle of Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax* L.): Effects of Cathepsins B, D and L." **Food Chemistry**. 81:517-25.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." **Nature**. 227(5259):680-85.
- Lasekan, A., Abu Bakar, F. and Hashim, D. 2013. "Potential of Chicken by-Products as Sources of Useful Biological Resources." **Waste Management**. 33:552-65.
- Latour, A. M. and Williams, B. 2014. **Ansc 101 : Introduction to Animal Sciences. Purdue University**. [online]. Available: <http://web.ics.purdue.edu>. [4 July 2014]
- Lee, C.-S. 2013. "A Study on the Proteome of Gizzard Inner Lining from Commercial Silkie Fowl, Taiwan Black-Feathered Country Chickens, Red-Feather Country Chickens, and Broilers." Department of Animal Science, National Chung Hsing University Institutional Repository.
- Lestari, D., Mulder, W. and Sanders, J. 2010. "Improving *Jatropha Curcas* Seed Protein Recovery by Using Counter Current Multistage Extraction." **Biochemical Engineering Journal**. 50:16-23.
- Li, D. K., Lin, H. and Kim, S. M. 2008. "Effect of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Plasma Protein on the Gelation of Alaska Pollock (*Theragra Chalcogramma*) Surimi." **Journal of Food Science**. 73:C227-C34.
- Liang, H.-N. and Tang, C.-H. 2013. "Ph-Dependent Emulsifying Properties of Pea [*Pisum Sativum* (L.)] Proteins." **Food Hydrocolloids**. 33:309-19.
- Lin, T. M. and Park, J. W. 1998. "Solubility of Salmon Myosin as Affected by Conformational Changes at Various Ionic Strengths and Ph." **Journal of Food Science**. 63:215-18.

- Liu, F., Chen, Z. and Tang, C.-H. 2014. "Microencapsulation Properties of Protein Isolates from Three Selected Phaseolus Legumes in Comparison with Soy Protein Isolate." **LWT - Food Science and Technology**. 55:74-82.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L. and Xia, X. 2010. "Antioxidant Activity and Functional Properties of Porcine Plasma Protein Hydrolysate as Influenced by the Degree of Hydrolysis." **Food Chemistry**. 118:403-10.
- Lodha, P. and Netravali, A. N. 2005. "Effect of Soy Protein Isolate Resin Modifications on Their Biodegradation in a Compost Medium." **Polymer Degradation and Stability**. 87:465-77.
- Maiti, A. K. and Ahlawat, S. S. 2011. "Effect of Natural Tenderizers on Physico-Chemical Properties of Chicken Gizzard and Goat Heart." **American Journal of Food Technology**. 6:80-86.
- Marshall, W. J. and Bangert, S. K. 2008. **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects**. Churchill Livingstone/Elsevier.
- Martinez-Alvarenga, M. S., Martinez-Rodriguez, E. Y., Garcia-Amezquita, L. E., Olivas, G. I., Zamudio-Flores, P. B., Acosta-Muniz, C. H. and Sepulveda, D. R. 2014. "Effect of Maillard Reaction Conditions on the Degree of Glycation and Functional Properties of Whey Protein Isolate - Maltodextrin Conjugates." **Food Hydrocolloids**.38:110-18.
- Mudalal, S., Babini, E., Cavani, C. and Petracci, M. 2014. "Quantity and Functionality of Protein Fractions in Chicken Breast Fillets Affected by White Striping." **Poultry Science**. 93:2108-16.
- Nalinanon, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2010. "Collagens from the Skin of Arabesque Greenling (Pleurogrammus Azonus) Solubilized with the Aid of Acetic Acid and Pepsin from Albacore Tuna (Thunnus Alalunga) Stomach." **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 90:1492-500.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Osako, K. 2011a. "Type I Collagen from the Skin of Ornate Threadfin Bream (Nemipterus Hexodon): Characteristics and Effect of Pepsin Hydrolysis." **Food Chemistry**. 125:500-07.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011b. "Functionalities and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates from the Muscle of Ornate Threadfin Bream Treated with Pepsin from Skipjack Tuna." **Food Chemistry**. 124:1354-62.

- Neuman, R. E. and Logan, M. A. 1950. "The Determination of Collagen and Elastin in Tissues." **Journal of Biological Chemistry**. 186:549-56.
- OECD. 2016. **Meat consumption (indicator)**. [online]. Available : <https://data.oecd.org>. [24 November 2016]
- Omana, D. A., Moayedi, V., Xu, Y. and Betti, M. 2010. "Alkali-Aided Protein Extraction from Chicken Dark Meat: Textural Properties and Color Characteristics of Recovered Proteins." **Poultry Science**. 89:1056-64.
- Owens, C. M. 2010. **Poultry Meat Processing, Second Edition**. CRC Press.
- Pedroche, J., Yust, M. M., Lqari, H., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. and Millán, F. 2004. "Brassica Carinata Protein Isolates: Chemical Composition, Protein Characterization and Improvement of Functional Properties by Protein Hydrolysis." **Food Chemistry**. 88:337-46.
- Prodpran, T., Benjakul, S. and Artharn, A. 2007. "Properties and Microstructure of Protein-Based Film from Round Scad (*Decapterus Maruadsi*) Muscle as Affected by Palm Oil and Chitosan Incorporation." **International Journal of Biological Macromolecules**. 41:605-14.
- Rhim, J.-W., Lee, J.-H. and Hong, S.-I. 2006. "Water Resistance and Mechanical Properties of Biopolymer (Alginate and Soy Protein) Coated Paperboards." **LWT - Food Science and Technology**. 39:806-13.
- Rodríguez Patino, J. M., Minones Conde, J., Linares, H. M., Pedroche Jiménez, J. J., Carrera Sánchez, C., Pizones, V. and Rodríguez, F. M. 2007. "Interfacial and Foaming Properties of Enzyme-Induced Hydrolysis of Sunflower Protein Isolate." **Food Hydrocolloids**. 21:782-93.
- Romero, A., Cordobés, F., Puppo, M. C., Villanueva, Á., Pedroche, J. and Guerrero, A. 2009. "Linear Viscoelasticity and Microstructure of Heat-Induced Crayfish Protein Isolate Gels." **Food Hydrocolloids**. 23:964-72.
- Roussel, H. and Cheftel, J. C. 1990. "Mechanisms of Gelation of Sardine Proteins: Influence of Thermal Processing and of Various Additives on the Texture and Protein Solubility of Kamaboko Gels." **International Journal of Food Science & Technology**. 25:260-80.
- Russell, P. J. 2009. **Igenetics : A Molecular Approach**. 3rd ed. San Francisco: Pearson Education, Inc.

- Sian, N. and Ishak, S. 1990. "Effect of Ph of Yield, Chemical Composition, and Boiling Resistance of Soybean Protein-Lipid Film." **Cereal Foods World**. 35:748-52.
- Siddique, M. A. B., Maresca, P., Pataro, G. and Ferrari, G. 2016. "Effect of Pulsed Light Treatment on Structural and Functional Properties of Whey Protein Isolate." **Food Research International**. 87:189-96.
- Silva, F. G. D., O' Callaghan, Y., O' Brien, N. M. and Netto, F. M. 2013. "Antioxidant Capacity of Flaxseed Products: The Effect of in Vitro Digestion." **Plant Foods for Human Nutrition**. 68:24-30.
- Song, N.-B., Lee, J.-H., Al Mijan, M. and Song, K. B. 2014. "Development of a Chicken Feather Protein Film Containing Clove Oil and Its Application in Smoked Salmon Packaging." **LWT - Food Science and Technology**. 57:453-60.
- Swamy, S. A., Kandaswamy, C. K. and Rajulu, G. S. 1976. "An Investigation of the Nature of the Inner Lining of the Gizzard of a Fish-Eating Bird *Pelecanus Phillipensis*." **Acta Histochemica**. 56:188-99.
- Tahergorabi, R., Matak, K. E. and Jaczynski, J. 2015. "Fish Protein Isolate: Development of Functional Foods with Nutraceutical Ingredients." **Journal of Functional Foods**. 18:746-56.
- Taheri, A., Sabeena Farvin, K. H., Jacobsen, C. and Baron, C. P. 2014. "Antioxidant Activities and Functional Properties of Protein and Peptide Fractions Isolated from Salted Herring Brine." **Food Chemistry**. 142:318-26.
- Tan, S. H., Mailer, R. J., Blanchard, C. L. and Agboola, S. O. 2011. "Canola Proteins for Human Consumption: Extraction, Profile, and Functional Properties." **Journal of Food Science**. 76:R16-R28.
- Tongnuanchan, P., Benjakul, S., Prodpran, T. and Songtipya, P. 2011. "Characteristics of Film Based on Protein Isolate from Red Tilapia Muscle with Negligible Yellow Discoloration." **International Journal of Biological Macromolecules**. 48:758-67.
- Townsend, A.-A. and Nakai, S. 1983. "Relationships between Hydrophobicity and Foaming Characteristics of Food Proteins." **Journal of Food Science**. 48:588-94.

- Undeland, I., Kelleher, S. D. and Hultin, H. O. 2002. "Recovery of Functional Proteins from Herring (*Clupea Harengus*) Light Muscle by an Acid or Alkaline Solubilization Process." **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50:7371-79.
- Valenzuela, C., Abugoch, L., Tapia, C. and Gamboa, A. 2013. "Effect of Alkaline Extraction on the Structure of the Protein of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) and Its Influence on Film Formation." **International Journal of Food Science & Technology**. 48:843-49.
- Wang, C., Wu, J. and Bernard, G. M. 2014. "Preparation and Characterization of Canola Protein Isolate–Poly(Glycidyl Methacrylate) Conjugates: A Bio-Based Adhesive." **Industrial Crops and Products**. 57:124-31.
- Wang, H., Wu, J. and Betti, M. 2013. "Chemical, Rheological and Surface Morphologic Characterisation of Spent Hen Proteins Extracted by Ph-Shift Processing with or without the Presence of Cryoprotectants." **Food Chemistry**. 139:710-19.
- Webb, T. E. and Colvin, J. R. 1964. "The Composition, Structure, and Mechanism of Formation of the Lining of the Gizzard of the Chicken." **Canadian Journal of Biochemistry**. 42:59-70.
- WSDA. 2003. **Prohibited Ruminant Feed Ingredients Defined**. [online]. Available: <http://agr.wa.gov> [4 July 2014]
- Yuliana, M., Truong, C. T., Huynh, L. H., Ho, Q. P. and Ju, Y.-H. 2014. "Isolation and Characterization of Protein Isolated from Defatted Cashew Nut Shell: Influence of Ph and Nacl on Solubility and Functional Properties." **LWT - Food Science and Technology**. **LWT - Food Science and Technology**.55:621-26.
- Zayas, J. F. 1997. **Functionality of Proteins in Food**. New York: Springer.
- Zhang, B., Cui, Y., Yin, G., Li, X. and Zhou, X. 2009. "Alkaline Extraction Method of Cottonseed Protein Isolate." **Modern Applied Science**. 3:77.
- Zhang, K., Ai, Q., Mai, K., Xu, W., Liufu, Z., Zhang, Y. and Peng, M. 2013. "Effects of Dietary Hydroxyproline on Growth Performance, Body Composition, Hydroxyproline and Collagen Concentrations in Tissues in Relation to Prolyl 4-Hydroxylase **A(I)** Gene Expression of Juvenile Turbot, *Scophthalmus Maximus* L. Fed High Plant Protein Diets." **Aquaculture**. 404–405:77-84.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis)

1 การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC, 1999)

วิธีการ

- 1.1 นำ aluminium can ออบใน ตู้อบร้อน ที่อุณหภูมิ 120 ± 3 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่
- 1.2 ชั่งตัวอย่าง 3-5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด ใส่ใน aluminium can
- 1.3 นำไปอบใน ตู้อบร้อน ที่อุณหภูมิ 120 ± 3 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- 1.4 ชั่งน้ำหนักนำไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่หรือ ± 0.01 กรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (\%)} = \frac{(W_1 - W_2)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}} \times 100$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักของตัวอย่างและภาชนะหาความชื้นก่อนอบ (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างและภาชนะหาความชื้นหลังอบ (กรัม)

2 การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 1999)

วิธีการ

- 2.1 อบบีกเกอร์สำหรับหาไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 150 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นใน โถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
- 2.2 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิด แล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีให้สารละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
- 2.3 นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในชอกเลต
- 2.4 เติมนิโตรเจนอีเทอร์ ลงในบีกเกอร์หาไขมันปริมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางลงบนเตาให้ความร้อน

- 2.5 ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 45 นาที โดยปรับความร้อนให้หยดของสารละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตราส่วน 150 หยดต่อนาที
- 2.6 ระเหยจนเหลือสารละลายในบีกเกอร์เพียงเล็กน้อยด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย
- 2.7 นำบีกเกอร์ไปอบในตู้ที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น
- 2.8 ชั่งน้ำหนัก แล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}}$$

3 การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนใช้วิธีเจลดาล (AOAC, 1999)

วิธีการ

- 3.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างบนกระดาษกรอง ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงไปในหลอดย่อยโปรตีน (ขวด Kjeldahl)
- 3.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา 1 กรัม และกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร
- 3.3 นำไปย่อยบนเตาไฟในตู้ดูดควันจนกระทั่งได้สารละลายใส ปล่อยให้เย็น
- 3.4 นำไปกลั่นโดยเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 32% กรัม ปริมาตร 80 มิลลิลิตร
- 3.5 รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ที่บรรจุกรดบอริกเข้มข้น 2%
- 3.6 เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด
- 3.7 กลั่นจนได้สารละลายในรูปก๊าซประมาณ 250 มิลลิลิตร
- 3.8 กลั่นประมาณ 10 นาที ล้างปลายอุปกรณ์ควบแน่นด้วยน้ำกลั่นลงในขวดรองรับ
- 3.9 ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือ ที่มีความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล จะได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน
- 3.10 ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.2-3.10

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(a-b) \times N \times 14 \times \text{factor}}{W}$$

โดยที่ a = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็นมิลลิกรัม

b = ปริมาณสารละลายกรดเกลือที่ใช้เป็นblank เป็นมิลลิกรัม

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือเป็นนอร์มัล

W = น้ำหนักตัวอย่างเป็นกรัม

Factor = 6.25

(น้ำหนักกรัมสมมูลของไนโตรเจน = 14.007)

4 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (AOAC, 1999)**วิธีการ**

4.1 เเผาด้วยกระบี่เบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิทซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผา ลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่โถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

4.2 เเผาซ้ำอีก ครั้งละประมาณ 30 นาที และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 4.2 จนได้ผลต่างของ น้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

4.3 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ในถ้วยกระบี่เบื้องเคลือบที่ ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ดูดควัน แล้วจึงเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 600 องศา เซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1-4.2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรต

1 สารเคมี

1.1 สารละลายไบยูเรต

เตรียมโดยใช้คอปเปอร์ซัลเฟต ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 1.50 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทเรต 6.00 กรัม จากนั้นทำการละลายด้วยน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร โดยทำการกวนผสมจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 10% โดยน้ำหนักต่อปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

1.2 น้ำกลั่น

1.3 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน โดยใช้ BSA (Bovine serum albumin) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2. วิธีการวิเคราะห์

2.1 ปิเปตอย่างที่ได้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.2 ปิเปตสารละลายไบยูเรตที่เตรียมไว้ 2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

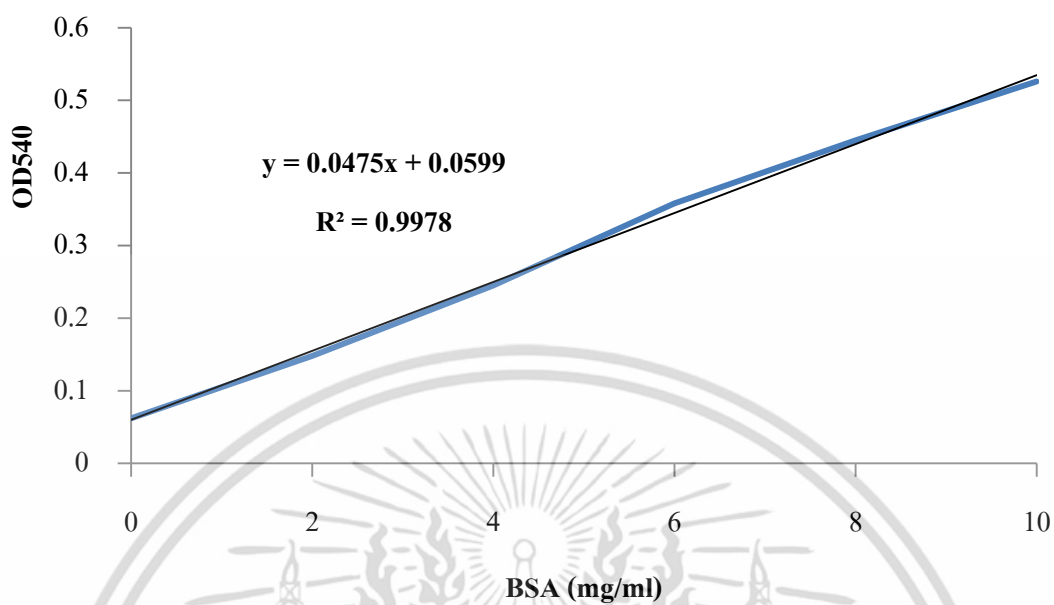
2.3 ทำการผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer

2.4 ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30-45 นาที

2.5 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.6 เตรียมสารละลายมาตรฐานของโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ BSA (ความเข้มข้นที่ 0 2 4 6 8 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จัดทำกราฟมาตรฐาน

2.7 นำค่าที่ได้จากข้อ 2.5 มาทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีน จากสมการของกราฟมาตรฐานที่ได้จากข้อ 2.6 (ภาพ ข-1)



ภาพ ข-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD540) กับปริมาณ BSA (mg/ml)

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์หาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีน

1 สารเคมี

1.1 สารละลายออกซิเดชัน (oxidant solution)

(a) สารละลายคอลลาเจนที่ความเข้มข้น 7% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (เตรียมก่อนใช้)

(b) เตรียม acetate/ citrate buffer pH 6.0 โดยละลาย Sodium acetate•(3H₂O)

ปริมาณ 57 กรัม tri-sodiumcitrate•(2H₂O) ปริมาณ 37.5 กรัม acetic acid ปริมาณ 5.5 กรัม และ iso-propanol ปริมาตร 385 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันด้วยน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ผสมสารละลายออกซิเดชันโดยใช้สารละลาย a 1 ส่วน ต่อ สารละลาย b 4 ส่วน โดยเตรียมก่อนการวิเคราะห์

1.2 สารละลายเออร์ลิช (Ehrlich's reagent)

(a) ละลาย p-Dimethylamine-benzoldehyde ด้วย perchloric acid ความเข้มข้น 60% โดยปริมาตร ในอัตราส่วน 2 ต่อ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เก็บสารละลายในขวดแก้วสีชา

(b) สารละลาย iso-propanol

เตรียมสารละลายเออร์ลิช โดยใช้สารละลาย a 3 ส่วน ต่อ สารละลาย b 13 ส่วน โดยเตรียมก่อนการวิเคราะห์

2 การเตรียมตัวอย่าง

2.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่าง โดยตัวอย่างสดชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.5-1.0 กรัม ตัวอย่างเจลาตินผงชั่งน้ำหนักให้ได้ 0.1 กรัม นำตัวอย่างมาทำการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 โมลาร์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

2.2 นำตัวอย่างที่เติมกรดไฮโดรคลอริกแล้วมาทำการย่อยโดยการให้ความร้อนในอ่าง

น้ำมันเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 เมื่อครบระยะเวลา ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วใส่ผงถ่านกัมมัน (activated carbon)

นำไปผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex mixer

2.4 กรองด้วยกระดาษกรอง What man No.4 ใส่ใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับให้ เป็นกลาง (พีเอช 6.0-6.5) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 โมลาร์

2.5 นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น ในขวดปรับปริมาตร

3 การวิเคราะห์

3.1 ปิเปตตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมมาตัวอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว เติมสารละลาย iso-propanol ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรนำมาผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง

Vortex mixer

3.2 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.1 มาเติมสารละลายออกซิเดชัน 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 นาที

3.3 เมื่อครบระยะเวลา เติมสารละลาย Ehrlich ทันทที แล้วผสมให้เข้ากัน

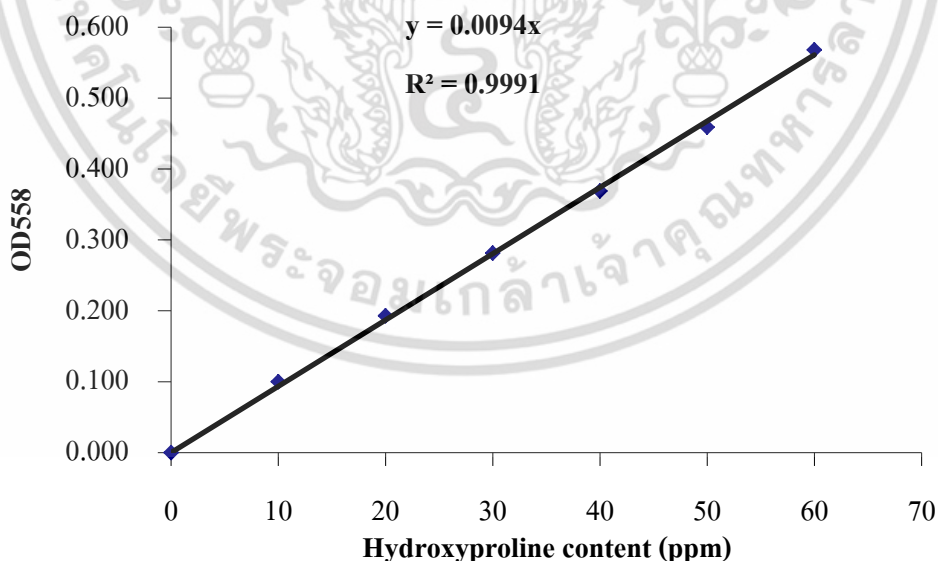
3.4 นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยใช้น้ำประปาไหลผ่านด้านข้างหลอดทดลองเป็นเวลา 2-3 นาที

3.5 นำมาเจือจางด้วยสารละลาย iso-propanol ปริมาตร 3.3 มิลลิลิตร

3.6 นำสารละลายที่ได้ข้างต้นมาทำการวัดค่าดูดกลืนแสงทันทีที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

3.7 ทำ blank ตามข้อ 3.1-3.5 โดยเปลี่ยนจากตัวอย่างเป็นน้ำกลั่นแทน

3.8 นำค่าที่ได้จากการวัดค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณปริมาณ ไฮดรอกซีโพลีน จากสมการกราฟมาตรฐาน



ภาพ ค-1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD558) กับปริมาณ Hydroxyproline content (ppm)

ภาคผนวก ง

การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

1. การเตรียมตัวอย่าง

- กรณีที่ตัวอย่างเป็นของแข็ง หรือเจล

นำตัวอย่างมา 10 g ผสมกับ SSB (0.5 M NaOH, 8M urea และ 2% β -ME) 10 ml จากนั้นกวนข้ามคืน ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำตัวอย่างไปทำการ Dialysis โดยการนำตัวอย่างใส่ถุง Dialysis มัดหัวและท้าย แล้วแช่ไว้ใน Dialysis buffer (1% SDS และ 0.2 M Disodium hydrogen phosphate แล้วปรับ pH 7.0 แล้วจึงปรับปริมาตร) เปลี่ยน Dialysis ทุกๆ 12 ชั่วโมง 4 ครั้ง

- กรณีตัวอย่างเป็นของเหลว

นำตัวอย่างมาทำการ dialysis โดยดูดสารที่เป็นของเหลวมาใส่ในถุง dialysis แล้วแช่ใน Dialysis buffer (1% SDS และ 0.2 M Disodium hydrogen phosphate แล้วปรับ pH 7.0 แล้วจึงปรับปริมาตร) เปลี่ยน Dialysis ทุกๆ 12 ชั่วโมง 4 ครั้ง

2. วิธีการวิเคราะห์

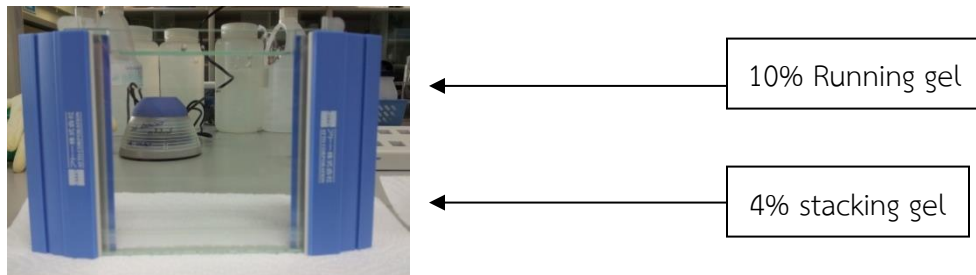
นำตัวอย่างมาทำการ dialysis แล้ว นำส่วนที่เป็นของเหลวที่ผ่านการ dialysis ซึ่งอยู่ภายในถุง มาวิเคราะห์ Protein content ตามวิธีของ biuret เพื่อหาความเข้มข้น และปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้ได้เท่ากับ 3 μ g/ μ L และนำส่วนที่เป็นของเหลวที่ได้ มาผสมกับ SDS-Page sample buffer ในสัดส่วน 1:1 (v/v) และต้มเป็นเวลา 3 นาที และนำมา 20 μ g โหลดใส่ gel ที่ทำจาก 4 % stacking และ 10% Running gel จากนั้นป้อนกระแสที่มีค่าความต่างศักย์ที่สม่ำเสมอ 200 V เข้าสู่ electrophoresis จนกระทั่งตัวอย่างเคลื่อนมาจนถึงด้านต่าง หลังจาก electrophoresis แล้วนำเจลออก แล้วย้อมให้ขึ้นแถบด้วย 0.125% Coomassie Brilliant Blue R-250 ใน 25% ethanol และ 10% acetic acid แล้วล้างออกด้วย 25% ethanol และ 10% acetic acid

3. การเซทเจล (SDS- PAGE gel set up)

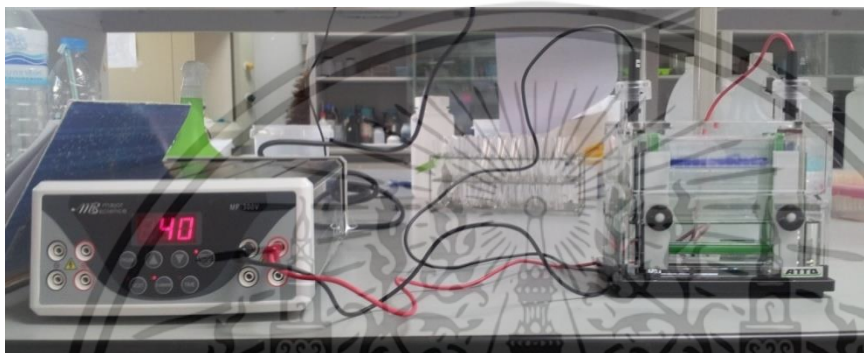
เตรียมเจล 10% Running gel โดยเติมส่วนผสมตามลำดับ โดยผสมให้เข้ากันก่อนที่จะเติม Reagent ถัดไป จากนั้นเติมลงในชุดเซทเจล ทั้งไว้จนกระทั่งเจลเซทตัว (ประมาณ 45 นาที) แล้วทำการฉีดน้ำกลั่นบริเวณผิวหน้าเจล เพื่อให้ผิวหน้าเจลเสมอกัน แล้วเอียงให้น้ำไหลออก แล้วจึงทำการเติม 4% stacking gel และเสียบหัว เพื่อให้เกิดช่องในการโหลดตัวอย่าง จากนั้นปล่อยให้เจลเซทตัว (ประมาณ 45 นาที) เมื่อเจลเซทตัวแล้วสามารถดึงหัวออกได้

Table 5 Reagents and mixing step of gel preparation for SDS- PAGE

Step	Reagent	10% Running gel	4% stacking gel
1	DI – H ₂ O	5.95 mL	4.5 mL
2	1.5 M Tris , pH 8.8	3.75 mL	-
	0.5 M Tris , pH 6.8	-	1.875 mL
3	30% Acrylamide	5 mL	1.00 mL
4	10% SDS	150 μL	75 μL
5	10% APS	75 μL	37.5 μL
6	TEMED	7.5 μL	4.5 μL
	Total	15 mL	7.5 mL

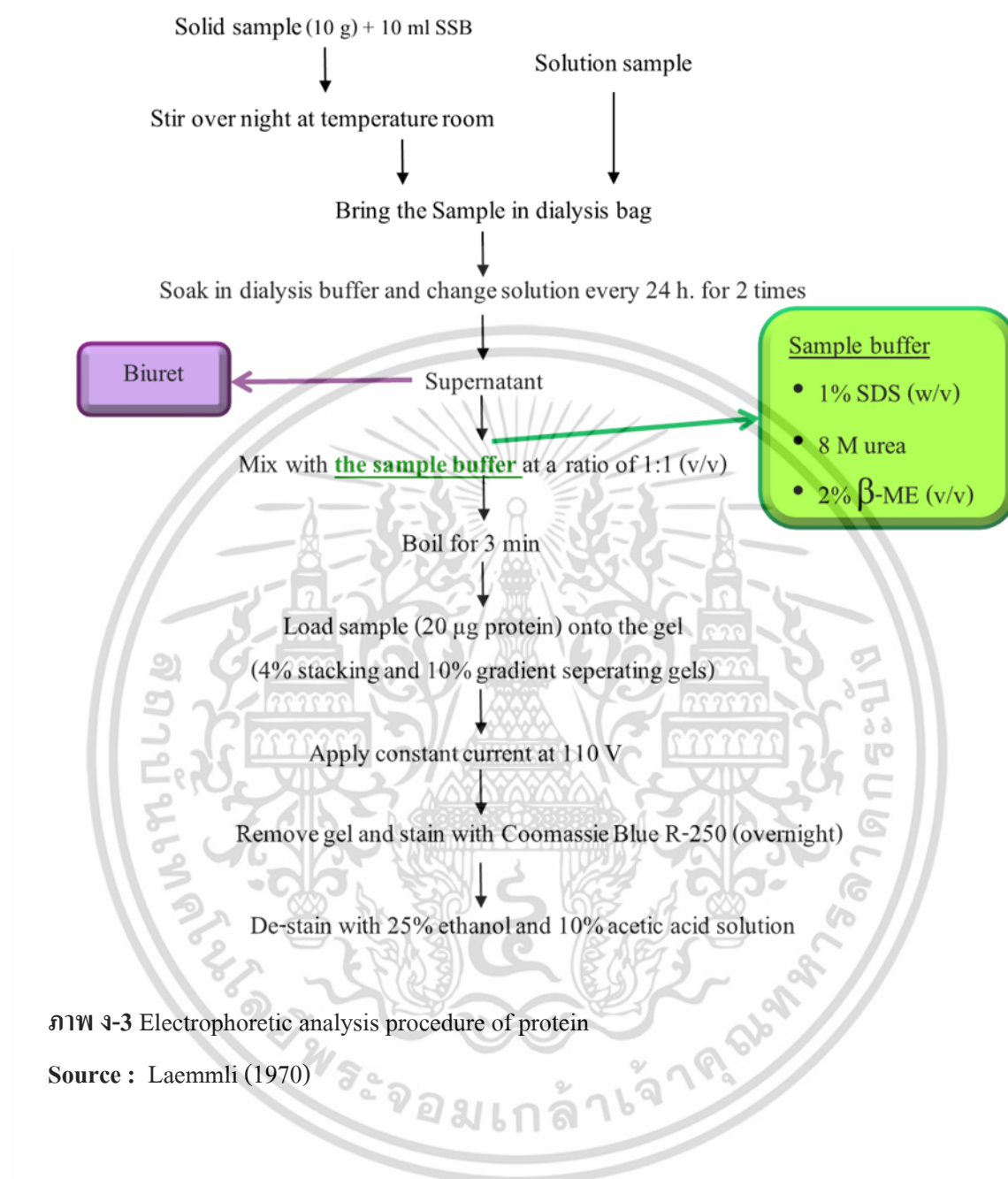


ภาพ ง-1 Gel preparation for SDS- PAGE



ภาพ ง-2 Equipment for SDS- PAGE

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพ ๓-3 Electrophoretic analysis procedure of protein

Source : Laemmli (1970)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาวพัชรี แซ่ฉั่ว
 วัน เดือน ปีเกิด 6 มิถุนายน 2528 ที่นครราชสีมา
 ที่อยู่ 116 ถ.โพธิ์กลาง ตำบลในเมือง อำเภอเมืองนครราชสีมา
 จังหวัดนครราชสีมา 30000 โทร 086-348-9229

ประวัติการศึกษา 2552 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ.2552-2553 ตำแหน่งผู้ประสานงานขายบริษัท เอ็ม.ที.9999 จำกัด

พ.ศ.2553-2556 ตำแหน่งผู้ช่วยนักวิจัย สังกัดฝ่ายวิจัยและพัฒนานิวเคลียร์
 สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน)

ผลงานวิจัย

Ruengwilysup, C., Areerat, K., **Saechua, P.** and Kampangkam, S. 2007. "Lactic Acid Production from Whey by Lactic Acid Bacteria." Page 220-225 in **The 19th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, TSB2007: Biotechnology for Gross National Happiness.** Thammasat University, Pathum Thani, Thailand.

Saechua, P., Bousopha, S., Tarasook, T. and Nalinanon, S. 2015. "Characterization of Inner Lining Tissue from Chicken Gizzard." in **The 14th ASEAN Food Conference : The bigger picture : one ASEAN through food technology.** Pasay City, Philippines.