# ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมี-กายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ

ธนัญญา สายโอ๊ะ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

# ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมี-กายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ

ธนัญญา สายโอ๊ะ

วิทยานิพนธ์เสนอบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยนเรศวร
เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
ปีการศึกษา 2565
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยนเรศวร

วิทยานิพนธ์ เรื่อง "ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมี-กายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ"

ของ ธนัญญา สายโอ๊ะ

ได้รับการพิจารณาให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

**คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์**

..... ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แดนชัย เครื่องเงิน)

..... ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา รุตรัตนมงคล)

..... กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา)

..... กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายใน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศศิวิมล จิตรากร)

**อนุมัติ**

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

**ชื่อเรื่อง** ผลของการปรับสภาพและเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสมบัติทางเคมี-กายภาพและกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ

**ผู้วิจัย** ธนัญญา สายโอ๊ะ

**ประธานที่ปรึกษา** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ขนิษฐา รุตรัตนมงคล

**กรรมการที่ปรึกษา** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรสิทธิ์ โทจำปา

**ประเภทสารนิพนธ์** วิทยานิพนธ์ วท.ม. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, มหาวิทยาลัยนเรศวร, 2565

**คำสำคัญ** ไข่น้ำ, โปรตีโอไลซิส, พรีทรีทเมนท์, อัลตราโซนิก, เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

## บทคัดย่อ

ไข่น้ำหรือผำ *(Wolffia globosa)* เป็นพืชน้ำขนาดเล็กที่สุดอุดมไปด้วยโปรตีนรวมถึงเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้วยขนาดที่เล็กยากต่อการที่จะดึงองค์ประกอบภายในเซลล์ไข่น้ำออกมาได้ทั้งหมด โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์ต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด และเพื่อศึกษากระบวนการโปรตีโอไลซิสต่อองค์ประกอบกรดอะมิโน สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของไข่น้ำที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ โดยทำการศึกษาผลของการใช้คลื่นอัลตราโซนิก กำลัง 280 วัตต์ คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เวลาให้คลื่น 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ได้แก่ เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ และศึกษาผลการทำงานของอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

ผลการทดลองพบว่าเวลาการให้คลื่นความถี่อัลตราโซนิกช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนจากไข่น้ำและเวลาการให้คลื่นความถี่ 30 นาที พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ โดยเกิดการฉีกขาดของเยื่อเซลล์และความเสียหายของผนังเซลล์ทำให้สามารถสกัดปริมาณโปรตีนร้อยละ 65.74±0.02 ของซูเปอร์เนเทน ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP 1189.7±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 163.6±3.11 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม และผลของการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส พบว่าร้อยละความเข้มข้น

และเวลาการย่อยของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการสกัดโปรตีนได้ช่วงร้อยละ 30 ถึง 49 เป็นปริมาณน้อยกว่ากระบวนการด้วยอัลตราโซนิก (ร้อยละ 50 ถึง 65) และไม่มีแตกต่างตัวอย่างควบคุม (ร้อยละ 49) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 อย่างไรก็ตามผลการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ย่อยเวลา 30 นาที มีความสามารถในการสกัดปริมาณโปรตีนได้สูงเท่ากับร้อยละ 78.15±0.03 เทียบเท่ากับกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่เวลา 30 นาที ร้อยละ 65.74±0.02 โดยเอนไซม์เพคติเนสสามารถทำให้ผนังเซลล์ไข่น้ำฉีกขาดและมีรูพรุนมากกว่าไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ และเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนซูเปอร์เนเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ พบว่า การทำงานของอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที มีความสามารถช่วยปลดปล่อยโปรตีน เท่ากับร้อยละ 53.88±0.02 และการทำงานของอัลตราโซนิกสกัด 30 นาที ก่อนย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไซลาเนส เท่ากับร้อยละ 48.10±0.03 และเซลลูเลส ร้อยละ 46.98±0.05 มีความสามารถสกัดโปรตีนไม่แตกต่างตัวอย่างควบคุม (ร้อยละ 49.81±2.75) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผลการทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ สามารถช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลได้ 105 ถึง 146 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลิกต่อกรัม อีกทั้งสามารถบ่งชี้ว่ากระบวนการทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกและเอนไซม์เป็นวิธีการสกัดที่ใช้เวลาน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมและวิธีการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชถึง 30 นาที และตรวจพบโปรตีนและฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลงเหลือในส่วนเพลเลส งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกจากกระบวนการพรีทรีทเมนท์ร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชด้วยการใช้ส่วนฟูดิสเพอร์ชันเป็นส่วนที่มีทั้งเพลเลสและซูเปอร์เนเทนรวมกัน โดยจะถูกนำมาโปรติไลซิส

ผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิส พบว่าการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ต่อปริมาณโปรตีน เวลาย่อย 30 นาที ให้ระดับการย่อยสลายโดยกระบวนการ US:P:F สูงถึงร้อยละ 96.83±0.28 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 59.88±5.22 ถูกคัดเลือกนำมาทำให้แห้งด้วยวิธีทำพ่นฝอยด้วยการใช้สารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 3 ต่อน้ำหนัก

ของแข็งทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างควบคุม และร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างจากกระบวนการ US:P:F ซึ่งผงของสารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F มีความละเอียดเนื้อสัมผัสเนียน และไม่จับตัวเป็นก้อน ปริมาณโปรตีน ร้อยละ 36.52±0.48 สูงกว่าร้อยละ 4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของตัวอย่างควบคุม และมีความสามารถในการละลาย ร้อยละ 93.75±3.80 ความสามารถในการเกิดโฟม ร้อยละ 96.61±1.02 และความคงตัวของโฟม ร้อยละ 14.00±2.83 สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จำนวนยีสต์และราทั้งหมดมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $1x10^1$ ซึ่งจำนวนยีสต์และราเป็นไปตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 3 ทั้งนี้สารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการโปรติโอไลซิสประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิก และกรดแอสปาร์ติก 4,280 และ 5,104 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ สูงกว่าวัตถุดิบเริ่มต้น 1,568 และ 1,815 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และอาร์จีนีน 1,892 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูงกว่าสารสกัดตัวอย่างควบคุมถึง 438 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม มีคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด 665.10±7.99 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC50) 0.34±0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ร้อยละ 98.58±0.05 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 1.20±0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลเอ 11.22±0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 1117.40±4.96 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม ผลลัพธ์ดังกล่าวมีค่าสูงกว่าสารสกัดตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

จากผลลัพธ์โดยรวมของงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการพรีทรีทเมนท์ก่อนกระบวนการโปรตีโอไลซิสมีความสามารถสกัดสารสกัดจากไข่น้ำและเกิดผลพลอยได้จากกระบวนการที่สามารถนำไปใช้เป็นองค์ประกอบจากธรรมชาติที่สำคัญในการผลิตอาหารจากพืชได้

**Title** EFFECTS OF PRETREATMENTS AND PROTEOLYTIC ENZYMES ON PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES AND BIOACTIVITIES OF WOLFFIA GLOBOSA EXTRACTS

**Author** Tananya Sai-o

**Advisor** Assistant Professor Khanitta Ruttarattanamongkol, Ph.D.

**Co-Advisor** Assistant Professor Worasit Tochampa, Ph.D.

**Academic Paper** M.S. Thesis in Food Science and Technology - (Type A 2), Naresuan University, 2022

**Keywords** Pretreatments, Ultrasonic, Enzymes, Proteolysis, Wolffia globosa

## ABSTRACT

*Wolffia globose* is the smallest aquatic plants, one of the richest sources of proteins and bioactive peptides, which function as antioxidants. This makes it difficult to distinguish all components of the cell due to their small size. This research project aims to study the pretreatments process with the use of ultrasonic waves and enzymes digest plant cell walls for proteins, antioxidative, and total phenolic compounds efficiency, and to study the effect of proteolysis processes on the composition of amino acids, chemical-physical properties, functional properties, and biological activity. Study the effects of pretreatments used ultrasonic waves with a power of 280 W, frequency of 37 kHz, and temperature of 30±2 °C were discovered from the experimental data pretreat at 15, 30, 45, and 60 min, respectively. Enzymes degrade plant cell walls; cellules, pectinase, and xylanase concentrations of 0.5% and 2.0% per sample dry weight, decomposed for 15, 30, 45, and 60 min, respectively. Plant cell wall sub-enzymes were combined in the ultrasonic interaction, which also included ultrasonic waves with a selected duration before being digested with plant cell wall sub-enzymes at concentration and time selected, and ultrasonic pretreatment processes combined with plant cell wall sub-enzymes at concentration and time selected.

Results showed that ultrasonic frequency at 30 minutes, which showed changes in cell walls by cell membrane teared and cell wall damage, improved the efficiencies of protein extraction from WF, this led to the extraction of 65.74% of supernatant. The ability to reduce ferric antioxidants by FRAP method 1189.7±0.02 mg Fe2+/g, total phenolic content 163.6±3.11 mg GAE/g. Effects of pretreatments with cellulase, pectinase, and xylanase. The protein extraction was found to be influenced by enzyme concentration percentage and digestion time in the range of 30-49%, which is less than ultrasonic processes (50-65%), and there was not statistically significant at $p<0.05$ difference in the control sample (49%). However, the hydrolyzed by pectinase enzyme concentration of 0.5% per sample dry weight, digestion time 30 min, had the highest extraction capacity of protein equal to 78.15±0.03%, equivalent to the pretreatments with ultrasonic waves at 30 min (65.74±0.02%). The discovery of the ability of pectinase to extracted proteins at such high doses was also based on the cell wall characteristics in which the WF cell wall was torn and more porous than the WF pretreatment with cellulase and xylanase enzymes, respectively. The pretreatments with cellulase, pectinase, and xylanase at concentrations of 0.5% per sample dry weight at 30 min were effective in enhanced antioxidant activity and total phenolic content of the supernatant with a statistical significance at $p<0.05$.

The study results of ultrasonic pretreatments combined with xylanase hydrolyzed 0.5% concentration per dry sample, 30 min digestion time, 53.88±0.02% high protein and the 30 min ultrasonic extraction before hydrolyzed by xylanase (48.10±0.03%) and cellulase (46.98±0.05%), which had no protein extraction efficiency different from the control sample (49.81±2.75%) with a statistical significance at $p<0.05$. The synergistic effected of ultrasonic with plant cell wall digesting enzymes was effective in the extraction of total phenolic contents of 105-146 mg GAE/g. It could also indicate that the combined ultrasonic and enzymatic process is a less time-consuming extraction method than control samples and pretreatments with ultrasonic before hydrolyzed of plant cell walls for 30 min and residual proteins and bioactivities were detected in the pellet. Therefore, this

research was selected from the combined pretreatments of ultrasonic and plant cell wall digesting enzymes by used the Full dispersion contained both pellet and supernatant, it will be brought to proteolysis.

The results of the proteolysis study showed that the ultrasonic pretreatments with pectinase concentration of 0.5% per dry sample at 30 min, the resulted of degree of hydrolysis were 96.83±0.28% and the protein extraction efficiency was 59.88±5.22%, close to the ultrasonic pretreatments, the extracted time was 30 min (65.74±0.02%) and 45 min (53.19±0.07%). The selected Pellet was freeze dried and Supernatant were spray dried used maltodextrin solution of 3% per weight of total solids in the control sample extract and 1% per weight of total solids in the proteolysis process sample extract. It was found that the powder of WF extracted from proteolysis process the texture was smooth and not clumpy, the protein content was 36.52±0.48%, higher than the control sample 4%, and the solubility was 93.75±3.80%, foaming ability was 96.61±1.02%, and the stability of foam 14.00±2.83%, significantly higher than the control sample at $p<0.05$. The total number of yeasts and molds is less than $1x10^1$, the number of yeasts and molds is in accordance with the notification of the department of medical sciences No. 3, and found that it contains amino acids; glutamates and aspartic acid at 4,280 and 5,104 mg/100g, respectively, higher than the starting raw material at 1,568 and 1,815 mg/100g, respectively, and arginine 1,892 mg/100g higher 438 mg/100g than the control sample. Total phenolic content of 665.10±7.99 mg GAE/g, antioxidant inhibition by DPPH method (IC50) 0.34±0.11 mg/g, the ability to compete with heavy metals 98.58±0.05%, total carotenoid content 1.20±0.00 µg/ml, chlorophyll-a content 11.22±0.07 µg/ml, the ability to reduce ferric antioxidant by FRAP method 1117.40±4.96. mg Fe2+/g, the results were significantly higher than the control sample extract at $p<0.05$.

This research showed that pretreatments prior to the proteolysis process can extracts from WF and have process byproducts that can be used as crucial natural components in plant food products.

# ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับเงินทุนอุดหนุนการทำกิจกรรมส่งเสริมและสนับสนุนการวิจัยและนวัตกรรมจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ แผนงานพัฒนาบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2565 ระดับปริญญาโท วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความกรุณาของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา รุตรัตนมงคล ประธานที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรสิทธิ์ โทจำปา กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้เสียสละเวลาอันมีค่าให้ความรู้ และคำแนะนำตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างไ ด้วยความใส่ใจอย่างยิ่งจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบรูณ์ได้ ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศศิวิมล จิตรากร กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แดนชัย เครื่องเงิน ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ท่านได้ให้ข้อเสนอแนะ แก้ไข และปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบรูณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ฝ่ายปฏิบัติการวิเคราะห์ ภาควิชอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่กรุณาช่วยให้คำแนะนำและสนับสนุนอุปกรณ์ในการทำการวิจัย อีกทั้งเพื่อนนิสิตและนิสิตรุ่นพี่สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร นางสาวคณารักษ์ หีบทอง นางสาววลัยภรณ์ โท้นพราห์ม นางสาวสกุลรัตน์ บุญจริง นางสาวณัฐนันท์ บุญมี นางสาวกุลปริยา ทิมเครือจีน นายอธิปพัฒน์ ธนรัชต์กุลเจริญที่ได้ให้คำแนะนำ ช่วยเหลือ และส่งเสริมกำลังใจกันตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้ จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณครอบครัว บิดา มารดา ญาติพี่น้องทุกท่านที่ได้ให้การสนับสนุนช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์นี้ ขอมอบเป็นกตัญญุตาบูชาแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ ตลอดจนผู้มีพระคุณที่มิอาจระบุนามได้หมดในที่นี้

ธนัญญา สายโอ๊ะ

# สารบัญ

หน้า


บทคัดย่อภาษาไทย ..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ฉ

ประกาศคุณูปการ ..... ญ

สารบัญ ..... ฎ

สารบัญตาราง ..... ณ

สารบัญภาพ ..... ท

บทที่ 1 บทนำ ..... 1

ความเป็นมาของปัญหา ..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย ..... 3

ขอบเขตของงานวิจัย ..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ ..... 4

สมมติฐานของการวิจัย ..... 4

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ..... 5

ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไข่น้ำ ..... 5

1. ชีววิทยาและระบบนิเวศวิทยาของไข่น้ำ ..... 5

2. คุณค่าทางโภชนาการของไข่น้ำ ..... 6

การผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนสาหร่ายขนาดเล็ก ..... 8

คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิก ..... 15

1. ปรากฏการณ์คาวิเทชัน ..... 18

2. ผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และโปรตีน .....20
3. การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร.....21
การสกัดด้วยเอนไซม์.....21
1. เอนไซม์.....22
2. การเลือกเอนไซม์สกัดโปรตีน.....25
โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน.....26
การปรับสภาพ.....27
การดัดแปรโปรตีน.....29
1. การดัดแปรทางกายภาพ.....29
2. การดัดแปรทางเคมี.....30
3. การดัดแปรโปรตีนด้วยเอนไซม์.....30
การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท.....31
1. การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี.....31
2. การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์.....33
ระดับการย่อยโปรตีน หรือ Degree of hydrolysis, DH .....38
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารให้กลิ่นรสจากการย่อยสลายโปรตีนจากพืช.....40
1. อุณหภูมิ.....40
2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH).....41
3. ระยะเวลา.....41
4. เอนไซม์และความเข้มข้นความเอนไซม์.....41
สารประกอบที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์.....42
สารต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก.....42

การใช้เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็กในอาหาร .....42
การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท.....43
1. ABTS free radical scavenging method .....43
2. DPPH radical scavenging method .....43
ฤทธิ์ต้านจุลชีพ.....44
สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน.....44
การทำแห้ง .....46
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย .....47
วัตถุดิบ.....47
เอนไซม์ .....47
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย.....47
อุปกรณ์และเครื่องเมือที่ใช้ในการทำวิจัย.....48
ขั้นตอนและวิธีการดำเนินวิจัย.....49
1. ศึกษากระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์.....49
2. การวิเคราะห์.....50
3. ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์.....52
4. การวิเคราะห์.....59
ศึกษาผลกระบวนการโปรตีโอไลซิส.....59
1. การวิเคราะห์ 1 .....62
2. การวิเคราะห์ 2 .....62
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....64
ผลการทดลองกระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์.....64

ผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก ....70
1. ผลการวิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ...70
2. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีน ....73
3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ....76
4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ....79
ผลการย่อยสลายผนังเซลล์ของไข่น้ำด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....81
1. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด ....81
2. ผลการวิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ...84
3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ....86
4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ....88
ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....95
1. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีน ....95
2. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ....98
3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก ....99
ผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิส .... 104
1. ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย .... 104
2. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด .... 107
3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ .... 109
4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก .... 113
5. ผลการวิเคราะห์ไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F .... 116
บทที่ 5 บทสรุป .... 129

ข้อเสนอแนะ ..... 131

บรรณานุกรม ..... 132

ภาคผนวก ..... 150

ประวัติผู้วิจัย ..... 180

# สารบัญตาราง

**หน้า**

ตาราง 1 คุณค่าทางโภชนาการสารประกอบหลักของไข่น้ำ (ส่วนที่กินได้ 100 กรัม) ..... 9

ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการวิตามินและแร่ธาตุของไข่น้ำ (ส่วนที่กินได้ 100 กรัม) ..... 9

ตาราง 3 องค์ประกอบทางเคมี กายภาพของไข่น้ำสด ไข่น้ำแห้ง และไข่น้ำแช่เยือกแข็งหลังการละลายน้ำแข็ง ..... 10

ตาราง 4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นที่มีในเมล็ดพืชและใบพืชบางชนิด[a] ..... 11

ตาราง 5 องค์ประกอบทางโภชนาการของเมล็ดพืชและพืชใบบางชนิด[a] ..... 12

ตาราง 6 คุณค่าทางโภชนาการของไข่น้ำ 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง ..... 14

ตาราง 7 ค่าสีของไข่น้ำที่อบแห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน ..... 15

ตาราง 8 บทบาทของโปรตีนในอาหารบางชนิด ..... 46

ตาราง 9 แผนการทดลองศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ..52

ตาราง 10 แผนการทดลองศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ..... 54

ตาราง 11 แผนการทดลองศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช ..... 57

ตาราง 12 แผนการทดลองศึกษาผลกระบวนการโปรตีโอไลซิส ..... 60

ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่น้ำอบแห้ง ..... 67

ตาราง 14 การทดลองสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่น้ำอบแห้ง ..... 67

ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีวภาพของไข่น้ำอบแห้ง ..... 68

ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของไข่น้ำอบแห้ง (วัตถุดิบเริ่มต้น) ..... 69

ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดและร้อยละความชื้นของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ..... 75

ตาราง 18 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก....76

ตาราง 19 ผลร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก....77

ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก....78

ตาราง 21 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ....79

ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ....80

ตาราง 23 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ยิวของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....82

ตาราง 24 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชันผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....83

ตาราง 25 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยไข่น้ำต่ออิทธิพลการปลดปล่อยปริมาณโปรตีนจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน ....84

ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....89

ตาราง 27 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....90

ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ....91

ตาราง 29 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช....93

ตาราง 30 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลย่อยไข่น้ำต่อสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน .....94

ตาราง 31 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยน้ำหนักแห้ง และ %Yield ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช .....97

ตาราง 32 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช .....98

ตาราง 33 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช..... 100

ตาราง 34 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช..... 101

ตาราง 35 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ..... 102

ตาราง 36 ผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ..... 103

ตาราง 37 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของไข่น้ำผ่านกาโปรตีโอไลซิส ..... 106

ตาราง 38 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส ..... 108

ตาราง 39 ผลร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส ..... 110

ตาราง 40 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส ..... 111

ตาราง 41 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักของไข่น้ำที่ผ่านการโปรติโอไลซิส..... 112

ตาราง 42 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำที่ผ่านการโปรตีโอไลซิส .... 114

ตาราง 43 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยไข่น้ำต่อสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน ..... 115

ตาราง 44 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ความชื้น และปริมาณน้ำอิสระของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิสด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ส่วนเพลเลสและทำแห้งแบบพ่นฝอยส่วนซูเปอร์เนเทน..... 121

ตาราง 45 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิสด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งส่วนเพลเลสและทำแห้งแบบพ่นฝอยส่วนซูเปอร์เนเทน..... 123

ตาราง 46 ผลการวิเคราะห์จุลชีวะทั้งหมด ยีสต์และราทั้งหมด ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส ..... 124

ตาราง 47 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด และปริมาณแทนนินทั้งหมด ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส..... 125

ตาราง 48 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส..... 128

ตาราง 49 ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด ของไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช..... 151

ตาราง 50 ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมดของไข่น้ำที่ผ่านการโปรตีโอไลซิส..... 152

# สารบัญภาพ

**หน้า**

ภาพ 1 ลักษณะของไข่น้ำหรือผำ ..... 8

ภาพ 2 การใช้ประโยชน์จากคลื่นความถี่อัลตราซาวด์ ..... 16

ภาพ 3 อัลตราโซนิกแบบอ่าง ..... 17

ภาพ 4 หลักการเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์ ..... 18

ภาพ 5 ภาพของการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ในสาหร่ายขนาดเล็กและเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย ..... 19

ภาพ 6 การสกัดด้วยเอนไซม์ตามด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย ..... 22

ภาพ 7 ลักษณะผนังเซลล์พืช ..... 25

ภาพ 8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรดในระดับอุตสาหกรรม ..... 33

ภาพ 9 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์ ..... 36

ภาพ 10 ร้อยละของปริมาณเปปไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสต่าง ๆ ..... 37

ภาพ 11 แผนภาพการศึกษากระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์ ..... 50

ภาพ 12 แผนภาพการศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ..... 53

ภาพ 13 แผนภาพศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ..... 55

ภาพ 14 แผนภาพการทดลองผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช ..... 58

ภาพ 15 แผนภาพการศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ก่อนการโปรตีโอไลซิส ..... 61

ภาพ 16 ลักษณะไข่น้ำแช่แข็งจากบริษัท แอดวานซ์ กรีนฟาร์ม จำกัด ..... 64

ภาพ 17 ลักษณะไข่น้ำหลังการละลายที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส) ..... 65

ภาพ 18 ลักษณะไข่น้ำแห้งผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง ความชื้นร้อยละ 11.44 และบดเกือบเป็นผง ขนาด 40 ถึง 180 เมท.....65

ภาพ 19 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำแห้งบดเกือบเป็นผง วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X.....66

ภาพ 20 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์หรือตัวอย่างควบคุม วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X.....71

ภาพ 21 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ระยะเวลา 15 (US1) 30 (US2) 45 (US3) และ 60 (US4) นาที ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X.....73

ภาพ 22 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (C0.5) เพคติเนส (P0.5) และไซลาเนส (X0.5) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X ..86

ภาพ 23 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำตัวอย่างควบคุมผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 1 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย ..... 117

ภาพ 24 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำตัวอย่างควบคุมผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 3 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย ..... 118

ภาพ 25 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F ผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 1 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย..... 119

ภาพ 26 ลักษณะไข่น้ำส่วนเพลเลสของตัวอย่างควบคุม ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง..... 120

ภาพ 27 ลักษณะไข่น้ำส่วนเพลเลสจากกระบวนการ US:P:F ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง120

ภาพ 28 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก..... 153

ภาพ 29 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช..... 155

ภาพ 30 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ... 157

ภาพ 31 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 30 นาที..... 159

ภาพ 32 ขั้นตอนกระบวนการโปรตีโอไลซิส..... 162

# บทที่ 1

# บทนำ

**ความเป็นมาของปัญหา**

ปัจจุบันมีแนวโน้มของผู้บริโภคที่นิยมรักสุขภาพและรักษ์โลกเพิ่มมากขึ้นมีความสนใจการบริโภคแหล่งอาหารที่มาจากพืชเพื่อทดแทนเนื้อสัตว์กลายเป็นกลไกสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของตลาดโลกรวมถึงการเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุที่ทำให้แรงงานภาคเกษตรลดลงแต่ความต้องการบริโภคโปรตีนเพิ่มขึ้นมีผลต่อปัจจัยแรงงานมนุษย์ที่ไม่เพียงพอต่อการผลิตแหล่งอาหารโปรตีน เพื่อสร้างความยั่งยืนของแหล่งโปรตีนและตอบโจทย์โภชนาการของมนุษย์ในอนาคตได้เพียงพอกลายเป็นปัจจัยผลักดันการหาแหล่งโปรตีนแห่งอนาคต โดยเฉพาะโปรตีนจากพืชและโปรตีนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งแหล่งโปรตีนที่ถูกปฏิเสธในการบริโภคในอดีตได้รับความสนใจจากผู้บริโภคปัจจุบันมากขึ้นและบางพื้นที่มีวัฒนธรรมการบริโภคกันมาช้านาน เช่น ไข่น้ำหรือผำ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Wolffia globose* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์แหน จัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae เป็นพืชน้ำชนิดหนึ่งที่เล็กที่สุด มีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ สีเขียว รูปร่างกลมหรือเกือบกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 มิลลิเมตร ไม่มีราก (กันย์สินี พันธ์วนิชดำรง, 2552) มีโปรตีนมากถึงร้อยละ 45 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 20 เยื่อใยร้อยละ 25 ไขมันร้อยละ 5 และอื่น ๆ ร้อยละ 5 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนโดยน้ำหนักแห้งสูงเทียบเท่ากับถั่ว ธัญพืช และมีโปรไฟล์ของกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงที่คล้ายกับเนื้อสัตว์ (Klaus-J et al., 2018) มีสารอาหารที่จำเป็นอื่น ๆ ที่เทียบเท่ากับผักใบเขียว เช่น เยื่อใย แคลเซียม เหล็ก สังกะสีและวิตามินหลายชนิด อีกทั้งยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ (Marvin et al., 2016) นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ สารพฤกษเคมี เช่น ฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง (Szamrej, & Czerpak., 2004) ซึ่งการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชน้ำแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี พื้นที่เพาะปลูก ฤดูกาลการเพาะปลูกและเก็บเกี่ยว รวมถึงการดัดแปลงโครงสร้างของโมเลกุลในระหว่างกระบวนการสกัด (M. Garcia-Vaquero et al., 2017) และได้รับการรับรองจากนักวิจัยและนักโภชนาการทั่วโลกว่าไข่น้ำเป็นสุดยอดอาหารที่ได้รับความนิยมในขณะนี้ เป็นพืชน้ำที่สามารถเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่เพาะเลี้ยงน้อย เจริญเติบโตได้รวดเร็วในน้ำสะอาด พบมากในภาคอีสานและภาคเหนือของประเทศไทย (ศิริภาวี ศรีเจริญ และคณะ, 2545) โปรตีนและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไข่น้ำถือเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่จะสามารถเป็นแหล่งโปรตีนแห่งอนาคตได้ แต่การนั้นเป็นสิ่งที่ทำได้ยากที่จะทำให้องค์ประกอบที่มีประโยชน์ทั้งหมดในเซลล์ออกจากพืชน้ำขนาดเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Morris et al., 2008) ดังนั้นการพรีทรีทเมนท์เพื่อให้เกิดความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของวัตถุดิบและเกิดความเสียหายของผนังเซลล์เพื่อให้โปรตีนที่ถูกจับยึดภายในเซลล์ถูก

ปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ให้มีความสามารถการย่อยสลายได้ดีขึ้น การนำคลื่นอัลตราโซนิกมาประยุกต์ใช้ในการพรีทรีทเมนท์โดยคลื่นความถี่จะช่วยทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัตถุดิบที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้นสูง ถูกนำมาใช้ในการสกัดโปรตีนจากแหล่งต่าง ๆ รวมทั้งสาหร่ายขนาดเล็ก (Parniakov et al., 2015a) นอกจากนั้นคลื่นอัลตราโซนิกยังสามารถทำลายพื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น การทำงานของคลื่นความถี่ที่สูงมีความแรงที่สามารถทำลายผนังเซลล์พืชได้เทียบเท่ากับความดันบรรยากาศทำให้เกิดการยุบตัวของฟองอากาศในเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังเซลล์ (Zheng et al., 2011) และจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะเดิม (Suslick, 1973)

การใช้เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช เช่น เซลลูเลส เพกติเนส เฮมิเซลลูเลส และไซลาเนส เป็นต้น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ โดยโครงสร้างของผนังเซลล์จะถูกทำลายทำให้โปรตีนที่ถูกจับยึดอยู่ภายในเซลล์ละลายออกมาในสารละลายสกัดได้มากขึ้น (ทิพวรรณ ทองสุข, 2559) สำหรับการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสามารถรักษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไว้ได้และปลอดภัยต่อผู้บริโภค โดยเมื่อทำการย่อยสลายจะได้กรดอะมิโนอิสระตั้งแต่ 2 ถึง 30 ตัว หรือเปปไทด์สายสั้นจำนวนมากรวมทั้งกลุ่มของสารประกอบคาร์โบไฮเดรท ฟอสเฟต และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น (M. Garcia-Vaquero et al., 2019) จัดอยู่ในรูปแบบของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่แสดงคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงการช่วยดูดซึมสารอาหารและลดความดันโลหิต ตลอดจนการช่วยลดคอเลสเตอรอลที่แตกต่างกัน (M. Garcia-Vaquero et al., 2016) (M. Garcia-Vaquero et al., 2017) โดยมีงานวิจัยพบว่าการสกัดโปรตีนจากสาหร่ายสีแดงด้วยการใช้เอนไซม์อัลคาเลสให้อัตราส่วนของปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสาหร่ายสีแดงที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ (Alireza et al., 2020)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำ และเพื่อศึกษากระบวนการโปรตีโอไลซิสด้วยเอนไซม์โปรติเอสต่อองค์ประกอบของกรดอะมิโน สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของไข่น้ำที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

**วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1. เพื่อศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำ

2. เพื่อศึกษาผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิสต่อองค์ประกอบของกรดอะมิโน สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของไข่น้ำที่ผ่านและไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

**ขอบเขตของงานวิจัย**

กระบวนการเตรียมไข่น้ำแช่แข็งจากบริษัท แอดวานซ์ กรีนฟาร์ม จำกัด ปริมาณ 30 กิโลกรัม อบแห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 11 ถึง 12 ศึกษาสมบัติเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ต่อไป จากนั้นศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำจากกระบวนการดังกล่าวด้วยการผสมกับน้ำในอัตราส่วนของวัตถุดิบ 2 กรัมต่อน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร นำผ่านคลื่นอัลตราโซนิกที่กำลัง 280 วัตต์ ความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาให้คลื่น 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ และเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส pH 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพคติเนส pH 3.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไซลาเนส pH 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ เวลา 30 นาที ตัวอย่างฟลูดิสเพอร์ชัน เพลเลส และซูเปอร์เนเทน วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำเพื่อให้เกิดความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีน โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการพรีทรีทเมนท์จากร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด ลักษณะการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก และสารพฤกษเคมี ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในซูเปอร์เนเทนหรือสารสกัดไข่น้ำ เพื่อคัดเลือกสภาวะการพรีทรีทเมนท์ที่สามารถนำไปใช้ศึกษาต่อในกระบวนการโปรตีโอไลซิส

ศึกษาผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิสจากไข่น้ำด้วยสภาวะที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพเหมาะสมของคลื่นอัลตราโซนิกกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชที่ผ่านการคัดเลือกดังกล่าวร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

และ 2.0 ต่อปริมาณโปรตีน ย่อยเป็นระยะเวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ วิเคราะห์สมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1. สามารถผลิตสารกัดจากไข่น้ำที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพและสามารถเป็นแหล่งโปรตีนทางเลือกที่สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารได้หลากหลาย

2. สามารถนำเทคโนโลยีคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์มาประยุกต์ใช้สกัดโปรตีนจากไข่น้ำ

3. ผู้ประกอบการด้านอาหารเพื่อสุขภาพ กลุ่มวิสาหกิจชุมชน นักวิชาการและผู้ที่สนใจทั่วไป สามารถนำงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ได้

**สมมติฐานของการวิจัย**

1. สภาวะที่เหมาะสมของการพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทำให้เกิดการฉีกขาดของผนังเซลล์สามารถปลดปล่อยโปรตีนที่จับยึดภายในเซลล์และช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนที่สกัด ประสิทธิภาพของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ประกอบด้วย ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก และสารพฤกษเคมี ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดได้สูงสุด

2. สภาวะที่ผ่านการคัดเลือกจากขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืชร่วมกับการใช้เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีน สามารถให้สารสกัดจากไข่น้ำที่มีสมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และมีกิจกรรมทางชีวภาพ เช่น สารพฤกษเคมี กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ กรดอะมิโน เป็นต้น

# บทที่ 2

# เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

**ลักษณะทางพฤษศาสตร์ของไข่น้ำ**

ไข่น้ำหรือผำ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Wolffia globosa* เป็นหนึ่งในสายพันธุ์แหนหรือ Duckweedจัดอยู่ในวงศ์ Lemnaceae มีการเรียกชื่อแตกต่างไปตามการเรียกชื่อของชาวท้องถิ่นในประเทศไทย ไข่น้ำเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กที่สุดในโลก จัดเป็นพืชชั้นสูง ล้มลุก ใบเลี้ยงเดี่ยว และไม่มีระบบท่อลำเลียง พบมากทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ปัจจุบันไข่น้ำที่พบในสกุล Wolffia ทั้งหมด 16 ชนิด ดังนี้ *W. angusta W. arrhiza*, *W. borealis W. brasiliensis W. Columbiana W. denticulate W. oblonga W. reanda W. roanda* และ *W. welwitschii* ปรากฏในประเทศไทยมี 2 ชนิด ได้แก่ *Wolffia arrhiza* (L.) wimm และ *Wolffia globosa* (L.) wimm (วิลาสินี ดีปัญญา, 2555) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็ก ๆ สีเขียว รูปร่างกลมหรือเกือบกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 มิลลิเมตร ขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ แต่ส่วนใหญ่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกแผนใบใหม่ สามารถเลี้ยงได้ง่าย นิยมนำมาประกอบอาหาร ได้แก่ แกงคั่วไข่น้ำ ห่อหมกไข่น้ำ แกงอ่อมไข่น้ำ เป็นต้น (นิศานาถ ละอองพันธ์ และคณะ, 2549) (Anut et al., 2011) (กันย์สินี พันธ์วนิชดำรง, 2552) และเป็นพืชชนิดเดียวในวงศ์ Lemnaceae ที่ใช้เป็นอาหารมนุษย์ (Landolt, 1986)

**1. ชีววิทยาและระบบนิเวศวิทยาของไข่น้ำ**

ไข่น้ำพบได้ในบริเวณแหล่งน้ำนิ่งตามธรรมชาติ สภาพแวดล้อมในการเจริญเติบโตไข่น้ำจะเจริญเติบโตได้ดีที่อากาศร้อน มีแสงแดดช่วยในการสังเคราะห์แสงเพื่อเสริมสร้างการเจริญเติบโตมากขึ้น การเจริญเติบโตของไข่น้ำขึ้นอยู่กับธาตุอาหารและปุ๋ยที่มีสารอาหารที่ไข่น้ำต้องการ ธาตุอาหารที่ไข่น้ำต้องการจะมีลักษณะเช่นเดียวกับพืชทั่วไป เช่น ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม อีกทั้งจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วงฤดูหนาวต่อกับช่วงฤดูร้อนและจะลดการเจริญเติบโตลงในฤดูฝน เนื่องจากความเข้มข้นของธาตุอาหารในฤดูฝนมีความเจือจางกว่า ไข่น้ำมีลักษณะทัลลัส (Thallus) หรือฟรอนด์ (Frond) ลักษณะเป็นเม็ดเล็ก รูปร่างกลมพอง มีสีเขียวสม่ำเสมอตลอดทั้งทัลลัส เป็นพืชไม่มีเนื้อเยื่อท่อลำเลียง ส่วนใหญ่เป็นเนื้อเยื่อพาเรนไคมา (Parenchyme) ที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีชีวิต ในลำต้นที่มีสีเขียวจะมีคลอโรพลาสต์ทำหน้าที่สังเคราะห์แสง มีช่องอากาศแทรกอยู่ระหว่างเซลล์ จึงทำให้เห็นคล้ายกับลักษณะฟองน้ำ ความแตกต่างของไข่น้ำทั้ง 2 ชนิด ที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *W. arrhiza* จะมีขนาดใหญ่กว่า ผิวด้านบนค่อนข้างจะมีสีเขียวเข้ม ลำต้น

มีลักษณะทึบแสงส่วน *W. globosa* จัดได้ว่าเป็นพืชดอกที่มีขนาดเล็กมากที่สุด มีขนาดเล็กกว่า *W. arrhiza* มีรูปร่างทรงกระบอก และลำต้นโปร่งแสง (วิลาสินี ดีปัญญา, 2555)

**2. คุณค่าทางโภชนาการของไข่น้ำ**

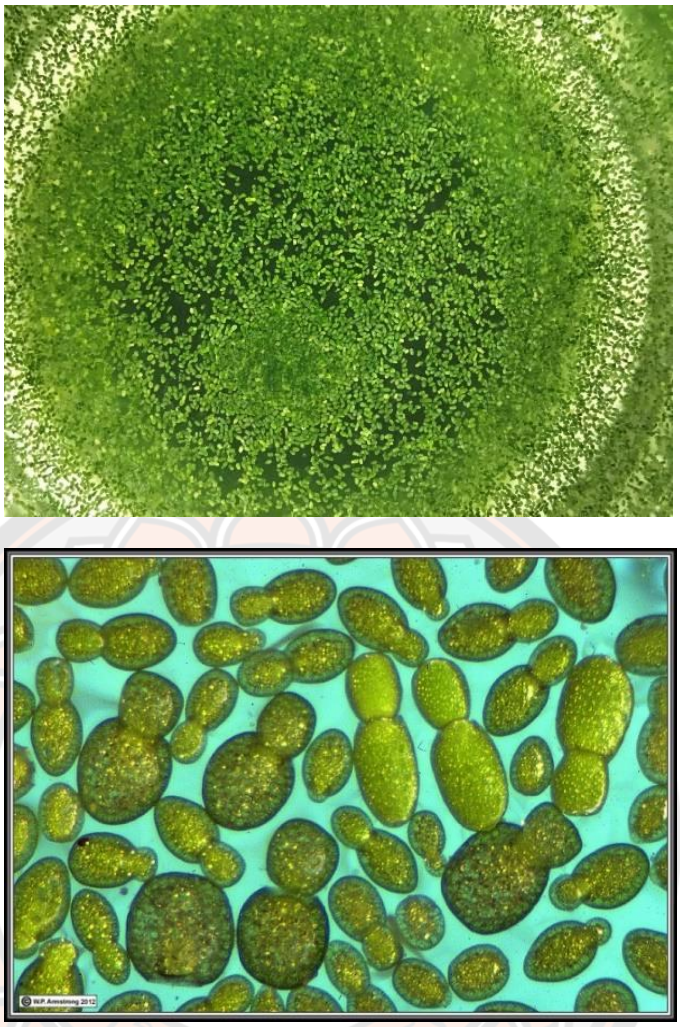
กองโภชนาการ, 2544 วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำ พบว่ามีโปรตีนร้อยละ 6.8 ถึง 45.0 ไขมันร้อยละ 1.8 ถึง 9.2 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 14.1 ถึง 43.6 และเยื่อใยร้อยละ 5.7 ถึง 16.2 รายงานของ (Klaus-J et al., 2018) พบว่าโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำมีโปรตีนมากถึงร้อยละ 45 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 20 เยื่อใยร้อยละ 25 ไขมันร้อยละ 5 และอื่น ๆ ร้อยละ 5 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนโดยน้ำหนักแห้งสูงเทียบเท่ากับถั่ว ธัญพืช และมีโปรไฟล์ของกรดอะมิโนที่ให้โปรตีนคุณภาพสูงที่คล้ายกับเนื้อสัตว์

Marvin Edelman et al (2016) รายงานว่ามีสารอาหารที่จำเป็นอื่น ๆ ที่เทียบเท่ากับผักใบเขียว เช่น เยื่อใย แคลเซียม เหล็ก สังกะสีและวิตามินหลายชนิด เช่น A B-complex C E โฟเลต ลูทีน และซีแซนทีน อีกทั้งยังอุดมไปด้วยสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ เช่น คลอโรฟิลล์ แคโรทีนอยด์ สารพฤกษเคมี เช่น ฟลาโวนอยด์ในปริมาณสูง (Szamrej, & Czerpak., 2004) นอกจากนี้ไข่น้ำ มีองค์ประกอบทางเคมีอื่น ๆ ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ปริมาณกรดอะมิโนพบ 17 ชนิด ประกอบด้วย อะลานีน อาร์จินีน กรดแอสพาร์ติก ซีสเทน กรดกลูทามิก ไกลซีน ฮิสทีดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ฟีนีลอะลานีน โพรลีน ซีรีน ทรีโอนิน ทริปโตเฟน และวารีน (Appenroth et al., 2018) อีกทั้งไข่น้ำยังมีเบต้าแคโรทีนสูงมาก คลอโรฟิลล์ในไข่น้ำเป็นสารสีเขียวที่พบในพืช โครงสร้างมีลักษณะคล้ายฮีมที่อยู่ในฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในเลือด มีรายงานการวิจัยถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รักษาอาการท้องผูก ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อ ช่วยปรับสภาพร่างการให้เป็นด่างในคนที่มีสภาวะเครียดหรือร่างกายมีความเป็นกรดจากอาหาร และช่วยรักษาภาวะซีดในคนที่เป็นโรคโลหิตจาง จึงจัดได้ว่ามีคุณค่าทางอาหารสูง (Ruekaewma et al., 2015) (Kaplan et al., 2019)

วรรณิณี จันทร์แก้ว และคณะ (2562) ศึกษาการเปรียบเทียบองค์ประกอบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำจากธรรมชาติและจากการเลี้ยง ทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วยคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ส่วนการศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระเพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งทำการสกัดด้วยตัวทำละลายที่ต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่ เอทิลอะซิเตท เอทานอล และเมทานอล พบว่า ไข่น้ำจากธรรมชาติและจากการเลี้ยงมีคุณค่าทางโภชนาการ ปริมาณแคโรทีนอยด์ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบปริมาณแคโรทีนอยด์รวมของไข่น้ำจากธรรมชาติสูงกว่าไข่น้ำจากการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 1.981±0.06 และ 1.353±0.16 มิลลิกรัมต่อกรัมเซลล์ โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

กันย์สินี พันธ์วนิชดำรง (2552) ทำการทดลองเลี้ยงไข่น้ำในห้องปฏิบัติการ พบว่าไข่น้ำมีอัตราการเจริญเติบโตสูง เมื่อทดลองเลี้ยงเป็นระยะ 30 วัน มีปริมาณบีตา-แคโรทีนในไข่น้ำสูงสุดที่อายุการเลี้ยง 24 วัน พบเฉลี่ยประมาณ 6000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ไข่น้ำมีคลอโรฟิลล์เป็นสารสีเขียวพบในพืชทำหน้าที่สังเคราะห์แสง โครงสร้างมีลักษณะเป็น Cyclic tetrapyrrole คล้ายคลึงกับฮีมที่อยู่ในฮีโมโกบิน ซึ่งเป็นสารประกอบในเลือด มีศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวขององค์ประกอบและกิจกรรมในการต้านออกซิเดชันของไข่น้ำด้วยการนำไข่น้ำสดมาทำแห้งแบบถาดด้วยลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง และการแช่เยือกแข็งด้วยลมเย็น -37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง เพื่อศึกษาผลของกระบวนการทำแห้งและการแช่เยือกแข็งต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางกายภาพ-เคมี และปริมาณจุลินทรีย์ของไข่น้ำ พบว่าไข่น้ำแห้งและไข่น้ำแช่เยือกแข็งมีปริมาณคลอโรฟิลล์ทั้งหมด ไรโบฟลาวิน เบต้าแคโรทีน เส้นใยที่ละลายน้ำ สารฟีนอลิคทั้งหมด กิจกรรมในการต้านออกซิเดชันวิธี ABTS และวิธี DPPH ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับไข่น้ำสด ไข่น้ำแห้งมีปริมาณเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำเพิ่มขึ้น ไข่น้ำแช่เยือกแข็งมีปริมาณไรโบฟลาวินลดลง แต่การทำแห้งและการแช่เยือกแข็งไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเส้นใยทั้งหมด และปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (อุมาพร นิยะนุช และรัชฎา ตั้งวงศ์ไชย, 2553)

วัฒนี บุญวิทยา และคณะ, 2559 ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมไข่น้ำต่อคุณภาพของช็อกโกแลตมัฟฟิน โดยเสริมไข่น้ำ 7 ระดับ 0 5 10 15 20 25 และ30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักแป้ง พบว่าช็อกโกแลตชิฟมัฟฟินสูตรเสริมไข่น้ำ 20 เปอร์เซ็นต์ (โปรตีนร้อยละ 21.31+0.51) มีผลต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสในด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบรวมมากที่สุด



**ภาพ 1 ลักษณะของไข่น้ำหรือผำ**

**ที่มา:** 1) ภาพถ่ายจากผู้วิจัย และ 2) © W.P. Amstrong., 2012

**การผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนสาหร่ายขนาดเล็ก**

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากโปรตีนสาหร่ายขนาดเล็กถูกสำรวจว่าเป็นส่วนผสมที่ทำหน้าที่ส่วนใหญ่สำหรับการจัดการความดันโลหิตสูงและความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เปปไทด์เหล่านี้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็กและยังคงไม่ทำงานจนกว่าจะถูกปลดปล่อยโดย (Samarakoon, & Jeon, 2011) (Udenigwe, & Aluko, 2012)

กระบวนการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ผ่านการทำงานของโปรตีเอส

การย่อยด้วยเอนไซม์ของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก

กระบวนการสลายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์จากภายนอก

มีข้อมูลที่จำกัดเกี่ยวกับโปรไฟล์โดยละเอียดและลำดับเบื้องต้นของโปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็ก ทำให้ยากเป็นพิเศษที่จะใช้เครื่องมือ Bioinformatic tools ในการทำนายรูปแบบของเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เข้ารหัสภายในโปรตีนก่อนการวิเคราะห์เชิงทดลองและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม

**ตาราง 1 คุณค่าทางโภชนาการสารประกอบหลักของไข่น้ำ (ส่วนที่กินได้ 100 กรัม)**

| สารประกอบหลัก | น้ำหนักสด (กรัม) |
|---|---|
| โปรตีน | 0.6 |
| ความชื้น | 97.1 |
| ไขมัน | 0.1 |
| คาร์โบไฮเดรต | 1.5 |
| เถ้า | 0.7 |
| เยื่อใย | 0.3 |

**ที่มา**: กองโภชนาการ, 2544

**ตาราง 2 คุณค่าทางโภชนาการวิตามินและแร่ธาตุของไข่น้ำ (ส่วนที่กินได้ 100 กรัม)**

| สารประกอบหลัก | น้ำหนักสด (มิลลิกรัม) |
|---|---|
| แคลเซียม | 59 |
| ฟอสฟอรัส | 25 |
| เหล็ก | 6.6 |
| วิตามิน A | 535 |
| ไทอะมีน (วิตามิน B1) | 0.03 |
| ไรโบฟลาวิน (วิตามิน B2) | 0.09 |
| ไนอะซีน (วิตามิน B3) | 0.4 |
| วิตามินซี | 11 |

**ที่มา**: กองโภชนาการ, 2544

**ตาราง 3 องค์ประกอบทางเคมี กายภาพของไข่น้ำสด ไข่น้ำแห้ง และไข่น้ำแช่เยือกแข็งหลังการละลายน้ำแข็ง**

| องค์ประกอบ | ไข่น้ำสด | ไข่น้ำแห้ง | ไข่น้ำแช่เยือกแข็งหลังการละลายน้ำแข็ง |
|---|---|---|---|
| **ทางเคมี** | | | |
| ความเป็นกรด-ด่าง (pH) | 6.13±0.01 | 6.39±0.01 | 6.22±0.03 |
| คลอโรฟิลล์ทั้งหมด* (มก./100ก.) | 30.17±0.00 | 13.96±0.08 (46.27) | 13.98±0.71 (46.34) |
| เบต้าแคโรทีน* (มก./100ก.) | 3.43±0.16 | 0.52±0.01 (15.16) | 1.73±0.01 (50.44) |
| เส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ* (ร้อยละ) | 11.05±0.24 | 13.04±0.03 (118.01) | 10.58±0.35 (95.75) |
| เส้นใยที่ละลายน้ำ* (ร้อยละ) | 3.82±0.01 | 2.11±0.10 (55.24) | 1.97±0.04 (51.57) |
| เส้นใยทั้งหมด* (ร้อยละ) | 14.87±0.25 | 15.15±0.07 (101.95) | 12.55±0.39 (84.45) |
| สารฟีนอลิคทั้งหมด* (มก./ก.) | 21.14±0.54 | 13.02±0.18 (61.59) | 14.50±0.15 (68.59) |
| กิจกรรมในการต้านออกซิเดชัน* ($IC_{50}$; มก/มล.) | | | |
| วิธี ABTS | 4.39±0.04 | 6.50±0.06 | 5.82±0.06 |
| วิธี DPPH | 13.91±0.10 | 14.70±0.11 | 14.08±0.08 |
| **ทางกายภาพ** | | | |
| ค่าความสว่าง (L*) | 48.07±0.03 | 32.52±0.20 | 29.69±0.21 |
| ความเป็นสีเขียว (a*) | -7.55±0.32 | -4.72±0.01 | -2.85±0.06 |
| ความเป็นสีเหลือง(b*) | 22.81±0.72 | 11.48±0.01 | 6.75±0.08 |

**หมายเหตุ:** *ผลจากการวิเคราะห์คิดเทียบจากน้ำหนักแห้ง ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย (±SD) ที่ได้จากการวิเคราะห์ 6 ซ้ำ (2 ซ้ำการทดลอง x3 ซ้ำการวิเคราะห์) ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง ร้อยละการเกิดซ้ำเมื่อเทียบกับไข่น้ำสด

**ที่มา**: อุมาพร นิยะนุช, และรัชฎา ตั้งวงศ์ไชย, 2553

**ตาราง 4 องค์ประกอบของกรดอะมิโนจำเป็นที่มีในเมล็ดพืชและใบพืชบางชนิด[a]**

| เปอร์เซ็นต์ (%) | เมล็ด | | | | | | ใบ | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Grain | | Legume | | | | | | |
| | Wheat | Corn | Rice | Soy | Chickpea | Lentil | Spinach | Broccoli | Duckweed |
| Tryptophan | 1.3 | 0.1 | 1.2 | 1.4 | 1.0 | 1.0 | 1.6 | 1.8 | 2.0 |
| Threonine | 2.7 | 3.8 | 3.6 | 4.1 | 3.8 | 3.9 | 4.9 | 3.9 | 5.0 |
| Isoleucine | 3.9 | 3.6 | 4.3 | 4.6 | 4.5 | 4.7 | 5.9 | 3.9 | 4.5 |
| Leucine | 6.8 | 12.3 | 8.3 | 7.7 | 7.4 | 7.9 | 8.9 | 6.3 | 9.0 |
| Lysine | 2.2 | 2.8 | 3.6 | 6.3 | 6.9 | 7.6 | 7.0 | 7.4 | 6.5 |
| Methionine | 1.6 | 2.1 | 2.3 | 1.3 | 1.4 | 0.9 | 2.1 | 1.8 | 2.1 |
| Phenylalanine | 5.0 | 4.9 | 5.3 | 4.9 | 5.6 | 5.4 | 5.2 | 4.8 | 5.8 |
| Valine | 4.4 | 5.1 | 6.1 | 4.7 | 4.3 | 5.4 | 6.5 | 5.7 | 5.9 |
| Histidine | 2.4 | 3.1 | 2.3 | 2.6 | 2.9 | 3.1 | 2.6 | 2.5 | 2.2 |

**หมายเหตุ:** a คือค่าที่คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของกรดอะมิโนทั้งหมด โดยข้อมูลของ Duckweed แบบแห้ง กำหนดโดย Eurofins USA สำหรับ *Wolffia sp.* ที่แยกได้ในประเทศอิสราเอล ส่วนข้อมูลสำหรับพืชชนิดอื่น ๆ ถูกคัดแยกจาก http://nutritiondata.self.com และอ้างอิงตามมาตรฐานข้อมูลสารอาหารแห่งชาติของ USDA (http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods) b คือค่าที่แสดงในตารางเป็นปริมาณขั้นต่ำของกรดอะมิโนที่จำเป็นตามข้อกำหนดของ WHO/FAO (WHO technical Report Series 935, 2007 ยกเว้นตัวเลขสีแดง

**ที่มา**: Marvin et al., 2016

**ตาราง 5 องค์ประกอบทางโภชนาการของเมล็ดพืชและพืชใบบางชนิด[a]**

| | เมล็ด | | | ใบ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Wheat | Corn | Rice | Soy | Lentil | Kale | Spinach | Duck- weed |
| **VITAMIN CONCENTRATIONS[b]** | | | | | | | | |
| Vitamin A, IU (beta-carotene) | 9 | 167 | 0 | 114 | 68 | 130,000 | 85,500 | 77,900 |
| Vitamin B1, mg (thiamine) | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.6 | 0.6 | 0.9 | 0.9 | 1.1 |
| Vitamin B2, mg (riboflavin) | 0.2 | 0.1 | 0 | 1.1 | 1.3 | 0.9 | 1.8 | 2.8 |
| Vitamin B5, mg (pantothenate) | 1 | 0.5 | 1.5 | 1.5 | 0.4 | 0.9 | 0.9 | 2.1 |
| Vitamin B6, mg (pyridoxal) | 0.3 | 0.3 | 0.8 | 0.5 | 0.5 | 2.5 | 1.8 | 1 |
| Vitamin C, mg (ascorbic acid) | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1014 | 256 | 94 |
| Vitamin E, mg (tocopherols) | 0.8 | 0.3 | 0.2 | 1.8 | - | 9.3 | 18.2 | 45.7 |
| Vitamin K1, µg (phylloquinone) | 1.9 | 0.2 | 0 | 67 | - | 6900 | 4400 | 51 |
| **MINERAL CONCENTRATIONS[b]** | | | | | | | | |
| Calcium, mg | 34 | 6.4 | 10 | 195 | 34 | 846 | 1036 | 607 |
| Iron, mg | 3.8 | 2.2 | 0.4 | 6 | 6.4 | 8.3 | 28.4 | 25.7 |
| Magnesium, mg | 120 | 85 | 36 | 407 | 46 | 265 | 827 | 231 |
| Phosphorus, mg | 332 | 250 | 100 | 469 | 276 | 519 | 513 | 1741 |
| Potassium, mg | 405 | 289 | 78 | 2387 | 664 | 2769 | 5840 | 5319 |
| Sodium, mg | 3.1 | 4.6 | 0 | 12.3 | 5.9 | 214 | 827 | 132 |
| Zinc, mg | 3 | 1.6 | 0.8 | 3.7 | 3.2 | 3.2 | 5.5 | 15 |
| **OMEGA-6/OMEGA-3 FATTY ACID RATIO** | | | | | | | | |
| **ω**-6/**ω**-3 | 19.4 | 32.2 | 4.7 | 7.5 | 3.7 | 0.8 | 0.2 | 0.3 |

**หมายเหตุ:** a คือ ฐานข้อมูลสารอาหารแห่งชาติของ USDA (http://nutritiondata.self.com) สำหรับ: Wheat flour whole grain; corn flour whole grain yellow; rice flour white unenriched; soy flour full-fat raw; chickpea mature seeds raw; lentil pink raw; spinach raw; broccoli raw; kale raw ส่วนข้อมูลสำหรับ Duckweed แบบแห้ง กำหนดโดย Eurofins USA สำหรับ *Wolffia sp.* ที่แยกได้ในท้องถิ่นของอิสราเอล

b คือ ค่าต่อตัวอย่าง 100 กรัม โดยตัวอย่างทั้งหมดปรับความชื้นให้เป็น 10%

“–” หมายถึงค่าที่ไม่พบ

**ที่มา**: Marvin et al., 2016

**ตาราง 6 คุณค่าทางโภชนาการของไข่น้ำ 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง**

| **กรดอะมิโน** (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) | **ปริมาณ** |
|---|---|
| **กรดอะมิโนจำเป็น** | |
| Histidine | 335 |
| Isoleucine | 524 |
| Leucine | 1,222 |
| Lysine | 1,094 |
| Methionine | 176 |
| Phenylalanine | 728 |
| Valine | 774 |
| **กรดอะมิโนไม่จำเป็น** | |
| Alanine | 1,386 |
| Aspartic acid | 1,576 |
| Cystine | 339 |
| Glutamic acid | 1,723 |
| Glycine | 756 |
| Proline | 820 |
| Serine | 710 |
| Threonine | 636 |
| Tpytophan | 1,272 |
| Tyrosine | 1,095 |
| **Total amino acid** | 16,211 |
| **Total essential acids** | 7,860 |

**ที่มา:** ประโชติ เปล่งวิทยา, 2544

**ตาราง 7 ค่าสีของไข่น้ำที่อบแห้งด้วยเตาอบที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน**

| อุณหภูมิอบแห้ง (องศาเซลเซียส) | เวลาในการอบแห้ง (ชั่วโมง) | ค่าสี | | |
|---|---|---|---|---|
| | | *L** | *a** | *b** |
| 0 0 | | 64.57±1.13[a] | -0.56±0.12[d] | 2.49±0.83[c] |
| 50 | 25 | 49.78±0.22[b] | -1.65±0.07[c] | 8.18±0.17[b] |
| 60 | 20 | 48.26±0.02[c] | -2.93±0.01[b] | 10.28±0.35[a] |
| 70 | 15 | 48.18±0.40[c] | -4.17±0.09[a] | 11.05±0.49[a] |

**หมายเหตุ:** [a-d] ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงค่าเฉลี่ยมีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

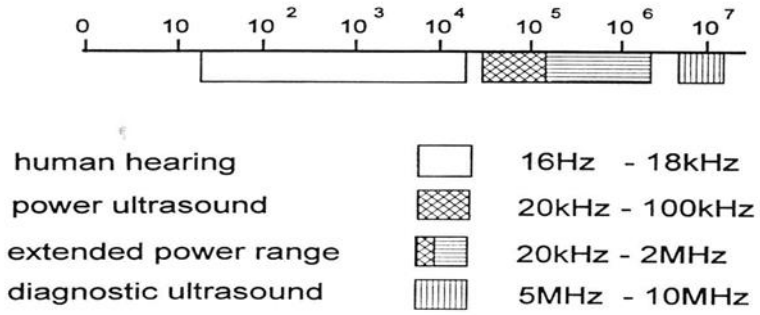
**ที่มา:** ภาชณุมาศ ทองคำ, 2562

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (Kose and Oncel, 2015) และเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากโปรตีนสาหร่ายขนาดเล็กโดยวิธีการ Hit-and-miss approach การประมวลผลของเปปไทด์ได้รวมเทคนิคการแยกส่วนและการทำให้บริสุทธิ์ทั่วไปหลายเทคนิค โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เมมเบรนอัลตราฟิลเตรชัน และเทคนิคโครมาโตกราฟี โดยใช้แพลตฟอร์ม Lonexchange Affinity และ Gel-permeation ทางเลือกของเทคนิคการประมวลผลขึ้นอยู่กับลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ที่น่าสนใจเป็นส่วนใหญ่ แต่ควรพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการขยายขนาดของอุตสาหกรรมเทคโนโลยีการแปรรูป ผลผลิตของเปปไทด์ที่เป็นผลลัพธ์ และตลาดปลายทางที่ต้องการ (Chukwunonso et al., 2016)

**คลื่นอัลตราซาวด์หรือคลื่นอัลตราโซนิก**

คลื่นเสียงที่มีการสั่นของคลื่นประมาณ 20,000 เฮิร์ตหรือสูงกว่า (Hoover, 2000) ส่วนคำว่าอัลตราโซนิกหรือโซนิเคชั่น หมายถึง การศึกษาเกี่ยวกับคลื่นเสียงหรืออัลตราซาวด์ในช่วงความถี่ดังกล่าว ซึ่งมนุษย์ไม่สามารถได้ยิน (ธีรพร กงบังเกิด, 2547)

การใช้ประโยชน์จากอัลตราซาวด์ตั้งแต่ต้นจนปัจจุบันมีการนำอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ได้แก่ การใช้อัลตราซาวด์กำลังต่ำและความถี่สูง ซึ่งใช้ในด้าน Diagnostic ultrasound เป็นส่วนใหญ่ และการใช้อัลตราซาวด์กำลังสูงและความถี่ต่ำใช้ในกระบวนการต่าง ๆ (Mason, 1998)




**ภาพ 2 การใช้ประโยชน์จากคลื่นความถี่อัลตราซาวด์**

**ที่มา**: Mason, 1998

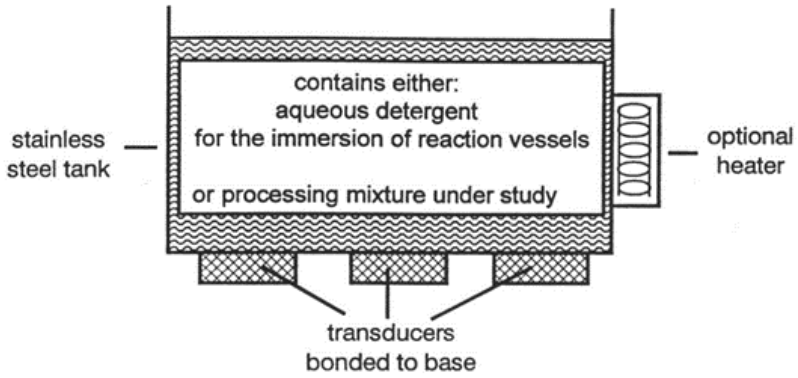
ระบบอัลตราซาวด์มีอุปกรณ์ที่สำคัญและจำเป็นอยู่ 3 ส่วน ได้แก่

เครื่องกำเนิดกระแสไฟฟ้าหรือ Generator โดยการเปลี่ยนไฟฟ้ากระแสตรงไปเป็นไฟฟ้ากระแสสลับที่ความถี่ที่ต้องการและผ่านเข้าสู่ทรานสดิวเซอร์

ทรานส์ดิวเซอร์ ทำหน้าที่เปลี่ยนไฟฟ้ากระแสสลับความถี่สูงไปเป็นการสั่นเนื่องจากพลังงาน กลทรานส์ดิวเซอร์ที่นิยมในปัจจุบัน คือชนิดที่ใช้เทคโนโลยีพีโซอิเล็คตริก ตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่ติดกับบูสเตอร์ หรือฮอร์น ด้านบนและเชื่อมต่อกับระบบส่งถ่ายพลังงาน

ระบบส่งถ่ายพลังงานหรือ Delivery systems ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งถ่ายพลังงานการสั่นสะเทือนไปยังของเหลว ในกรณีที่เป็นอ่างอัลตราโซนิก ตัวทรานส์ดิวเซอร์จะอยู่บริเวณตรงฐานด้านล่างของตัวอ่างหรือถังและส่งถ่ายพลังงานโดยตรงไปยังของเหลวที่อยู่ภายในอ่าง ส่วนระบบที่ต้องการพลังงานที่สูงกว่านี้จะใช้วิธีขยายสัญญาณหรือพลังงานไปยังของเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่าฮอร์น ซึ่งเป็นแท่งโลหะที่มีรูปร่างแตกต่างกันติดกับทรานส์ดิวเซอร์ นิยมใช้ส่วนปลายฮอร์นชนิดที่ถอดเข้าออกได้และเป็นเกลียวซึ่งสามารถเปลี่ยนได้ง่าย

เครื่องอัลตราโซนิกที่ใช้อยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีความแตกต่างกันตรงที่การออกแบบแหล่งกำเนิดไฟฟ้าแหล่งกำเนิดคลื่นและตัวเครื่องหรือเซลล์ที่ใช้ร่วมกับแหล่งกำเนิดคลื่นโดยสามารถแบ่งเป็นชนิดต่าง ๆ ได้หลายแบบ เช่น อ่างอัลตราโซนิก เป็นอุปกรณ์ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาไม่แพงเมื่อเปรียบเทียบกับเครื่องที่ใช้ระบบโพรบ โดยทั่วไปทรานส์ดิวเซอร์จะติดอยู่กับบริเวณฐานด้านล่างของอ่างและความถี่ที่ใช้งานส่วนใหญ่ประมาณ 40 เฮิร์ต

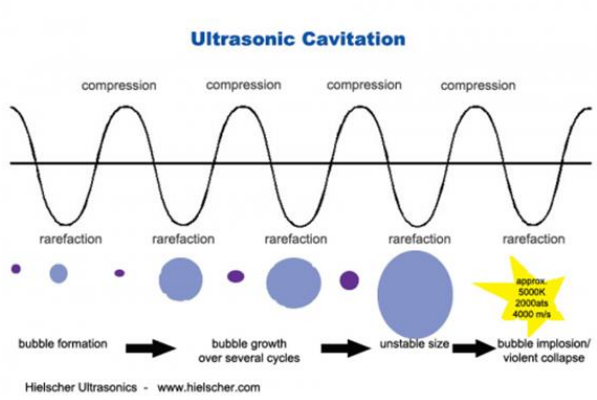



**ภาพ 3 อัลตราโซนิกแบบอ่าง**

**ที่มา**: Mason, 1998

สำหรับอ่างอัลตราโซนิกนั้นพลังงานสูงสุดที่สร้างได้อยู่ตรงบริเวณระดับความสูงค่าหนึ่งตลอดความลึกของอ่าง ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดคลื่นจากการสะท้อนของคลื่นอัลตราซาวด์ที่ถูกสร้างขึ้นตรงบริเวณรอยต่อระหว่างอากาศและของเหลว ดังนั้นถ้าระดับน้ำในอ่างลดลงต่ำกว่าความยาวคลื่นจะทำให้เกิดคลื่นเสียงที่มีพลังงานสูงได้ อ่างอัลตราโซนิกนั้นมีอุปกรณ์เสริมประเภทต่าง ๆ ที่นำมาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานให้ดีขึ้น เช่น อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติ อุปกรณ์กระจายคลื่นที่ทำให้คาวิเทชันเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอ อุปกรณ์ปรับระดับพลังงาน สวิทช์เปิดปิดแบบจังหวะหรือนาฬิกาจับเวลา เป็นต้น

อ่างอัลตราโซนิกทั่วไปมักใช้พลังงานต่ำเพื่อหลีกเลี่ยงความเสียหายจากคาวิเทชันที่เกิดขึ้นบริเวณผนังด้านในของอ่าง นอกจากนั้นของเหลวที่เติมในอ่างมักมีปริมาณมากทำให้ปริมาณพลังงานมีค่าลดลง




**ภาพ 4 หลักการเกิดฟองอากาศในตัวกลางเนื่องจากคลื่นอัลตราซาวด์**

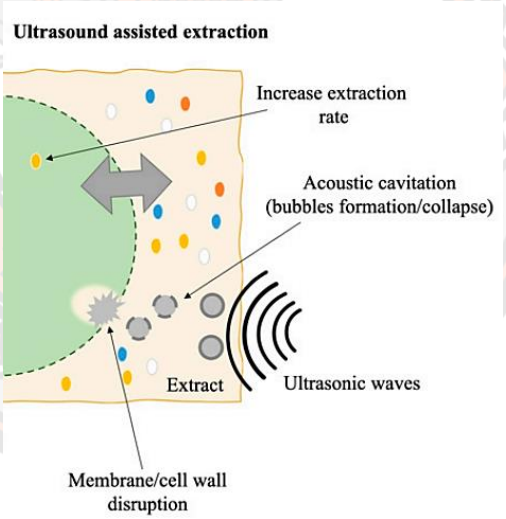
**ที่มา**: Suslick, 1988

**1. ปรากฏการณ์คาวิเทชัน**

กระบวนการที่เกิดขึ้นได้ในตัวกลางหรือสารละลายที่ได้รับคลื่นเสียงอัลตราซาวด์ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมีและทางกายภาพจากแรงกล เนื่องจากฟองอากาศที่เกิดขึ้น ซึ่งการที่ฟองอากาศเกิดขึ้นได้นั้นเนื่องจากโครงสร้างของของเหลวที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์จะถูกบีบอัดและคลายตัวซ้ำไปมาเป็นจำนวนหลายพันรอบทำให้เกิดโพรงช่องว่างขึ้น โดยจะสัมผัสกับแรงสั่นที่เกิดจากคลื่นอัลตราซาวด์เป็นระยะและเกิดการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างกันเป็นผลให้เกิดฟองอากาศมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งไม่เสถียรและแตกในที่สุด

Frizzel et al. (1988) รายงานว่าคาวิเทชันสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ได้แก่ Stable cavitation และ Transient cavitation ซึ่งแต่ละแบบจะมีผลทำให้ลักษณะของฟองแก๊สที่ได้รับคลื่นอัลตราซาวด์แตกต่างออกไป โดยคาวิเทชันแบบถาวรจะเกิดขึ้นเมื่อฟองอากาศหรือฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่งหรือ Oscillate เมื่อได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นจำนวนหลายรอบของการสั่นแต่ไม่เกิดการแตกของฟองอากาศหรือฟองแก๊ส ซึ่งฟองอากาศหรือฟองแก๊สนี้อาจจะเพิ่มขนาดขึ้นจนถึงขนาดเรโซแนนซ์หรือเป็นขนาดของฟองแก๊สที่มีความถี่ธรรมชาติเท่ากันกับความถี่ในการสั่นส่วนคาวิเทชันแบบชั่วคราวนั้นเกิดขึ้นในระยะการบีบอัดของฟองแก๊สในของเหลวที่ได้รับความเครียดที่เกิดขึ้นขณะเริ่มเกิดการขยายตัวของฟองแก๊สทำให้การแตกของฟองแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหรืออาจเกิดจากฟองแก๊สเกิดการสั่นแกว่งและขยายขนาดเพิ่มขึ้นในลักษณะคงที่ในระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะแตกออกอย่างรวดเร็วเมื่อฟองแก๊สนั่นขยายขนาดขึ้นเมื่อถึงขนาดที่จำเพาะ

Sala et al. (1995) สภาวะที่ฟองอากาศแตกนั้นพบว่าอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 5,000 เคลวินและความดันสูงถึง 2,000 บรรยากาศ ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างเกิดการขยายและหดตัวของฟองอากาศขณะขยายตัวจะมีมากกว่าพื้นที่ผิวของฟองแก๊สขณะหดตัว จึงเป็นผลให้การซึมผ่านของแก๊สในขณะที่ขยายตัวเกิดขึ้นได้มากกว่าและฟองแก๊สนี้ขยายตัวเพิ่มขึ้นเมื่อจำนวนรอบความถี่เพิ่มขึ้น โดยอัตราส่วนของอัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะขยายตัวต่ออัตราการซึมผ่านของแก๊สในขณะถูกอัดจะเพิ่มมากขึ้นในแต่ละรอบจนกระทั่งฟองแก๊สมีขนาดเรโซแนนซ์ ทำให้ช่องว่างภายในฟองแก๊สมีขนาดโตขึ้นอย่างรวดเร็วภายในหนึ่งรอบของการสั่นและเนื่องจากพลังงานที่ได้รับจากคลื่นอัลตราซาวด์ไม่เพียงพอในการคงสภาวะของแก๊สหรือไอจึงทำให้เกิดการควบแน่นขึ้นโดยโมเลกุลที่ควบแน่นนั้นจะชนซึ่งกันและกันอย่างรุนแรง ทำให้เกิดคลื่นกระแทกขึ้นและเกิดจุดหรือบริเวณเล็ก ๆ ที่มีอุณหภูมิและความดันที่สูงมาก Suslick, 1988 และเป็นที่เชื่อกันว่าปรากฏการณ์นี้เป็นปรากฏการณ์ที่สำคัญที่เกิดในระหว่างที่ของเหลวได้รับคลื่นอัลตราซาวด์ ซึ่งทันทีที่ฟองแก๊สแตกจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาเคมีหรือทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่แตกต่างไปจากปฏิกิริยาเดิมจากสภาวะเดิม




**ภาพ 5 ภาพของการสกัดด้วยอัลตราซาวนด์ในสาหร่ายขนาดเล็กและเซลล์ของไซยาโนแบคทีเรีย**

**ที่มา**: Fernando Pagels et al., 2021

Dey et al. (2012) ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดด้วยการใช้อัลตราซาวนด์สำหรับการสกัดเบต้า-แคโรทีนจากสาหร่าย *A. platensis* พบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยใช้เฮปเทนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และความเข้มของคลื่นที่ 167 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตรนานกว่า 8 นาที การใช้ระบบต่อเนื่องของอัลตราซาวนด์ ได้รับการเสนอโดย Natarajan et al., 2014 สำหรับการสกัดไขมันจากสาหร่าย *Chlorella sp.* และสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดแอสตาแซนธินจากสาหร่าย *H. pluvialis* ด้วยสภาวะที่เหมาะสม 200 วัตต์ และความถี่ 40 กิโลเฮิร์ต ที่ 41.1 องศาเซลเซียส ระหว่าง 16 นาที โดยให้ผลผลิต ร้อยละ 35 สูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายแบบมาตรฐาน

**2. ผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และโปรตีน**

Sala et al. (1995) รายงานว่ามีการรวบรวมผลการศึกษาในเรื่องผลของคลื่นอัลตราซาวด์ต่อเอนไซม์และองค์ประกอบอื่น ๆ นั้นมีมานานแล้วโดยประมาณ 70 ปีที่ผ่านมา ซึ่งต่อมาในภายหลังพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์สามารถทำให้โมเลกุลขนาดใหญ่เกิดปฏิกิริยา Depolymerization ขึ้นได้ ตัวอย่างเช่น พบว่าทำให้ความหนืดของสารละลายสตาร์ช กัมอะราบิก เจลาติน และโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ชนิดอื่น ๆ มีค่าลดลงหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโพลีเมอ์ของสตาร์ชและเด็กซ์แตรนให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีขนาดใหญ่ โมเลกุลใหญ่ขึ้น รวมทั้งทำให้ DNA แตกสลายแต่ยังคงโครงสร้างขององค์ประกอบย่อยไว้ได้ เป็นต้น และภายหลังยังมีการค้นพบว่าคลื่นอัลตราซาวด์นั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะแตกต่างกันออกไป ซึ่งขึ้นอยู่กับธรรมชาติของแก๊สที่ละลายหรือมีอยู่ในสารละลายที่นำมาสัมผัสกับคลื่น เช่น ถ้าแทนที่แก๊สออกซิเจนด้วยไฮโดนเจนจะทำให้น้ำหนักโมเลกุลของโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่หลายชนิดเพิ่มขึ้นได้

ในส่วนของผลคลื่นอัลตราซาวด์ต่อโปรตีน พบว่ามีความซับซ้อนในการเกิดปฏิกิริยาเมื่อสัมผัสกับคลื่นอัลตราซาวด์ เช่น โพลีเมอร์ของโปรตีนทรงกลมจะเกิดการแตกตัวทำให้มีขนาดเล็กลงเป็นหน่วยย่อยและถ้าในสารละลายตัวกลางนั้นแก๊สออกซิเจน อาจมีผลทำให้โครงสร้างจตุรภูมิ โดยอาจทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติได้ ในส่วนของไลโปโปรตีน คลื่นอัลตราซาวด์อาจทำให้ไขมันบางส่วนแยกออกจากโครงสร้าง และในฮีโมโปรตีน อาจทำให้เกิดการแยกตัวของฮีมออกจากโกลบิน และในกรณีที่สารละลายโปรตีนได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลานานมากขึ้นอาจมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยสายโซ่โพลีเปปไตด์อาจแตกออกทำให้เกิดชิ้นส่วนของโมเลกุลย่อยที่มีขนาดเล็กลง เป็นต้น เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการยังยั้งเอนไซม์และจุลินทรีย์นั้น พบว่ามีการนำเทคนิคหรือกระบวนการอื่น ๆ ใช้ร่วมกับการให้คลื่นอัลตราซาวด์ซึ่งมีรายงานศึกษาที่แตกต่างกันออกไป

**3. การประยุกต์ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร**

การนำคลื่นอัลตราซาวด์มาประยุกต์ใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารนั้นมีความหลากหลายและแตกต่างกันไปตามชนิดหรือประเภทของอาหารและวัตถุประสงค์ของการนำไปใช้ (Mason, 1998) รายงานการประยุกต์ใช้คลื่นอัลตร้าซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหารโดยแบ่งได้เป็นหลายแบบ เช่น

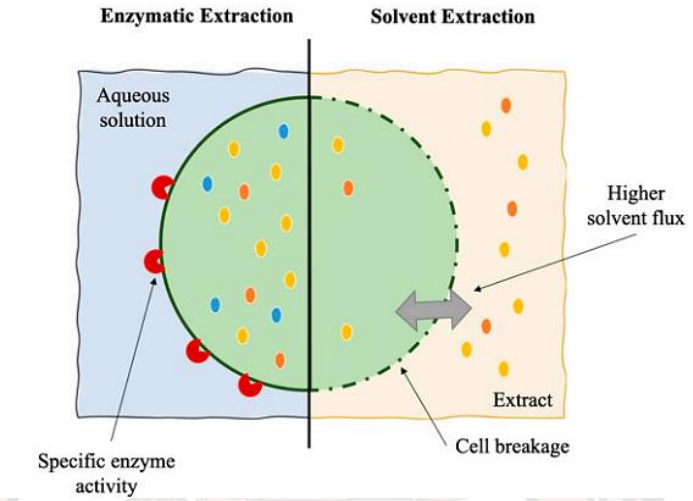
การสกัดด้วยคลื่นอัลตราซาวด์จะช่วยทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัสดุที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสารเพิ่มขึ้นสูง นอกจากนั้นคลื่นอัลตราซาวด์ยังไปทำลายพื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์ทำให้สารที่ต้องการสกัดสามารถออกมาได้ง่ายขึ้น ตัวอย่างเช่น การสกัดน้ำตาลออกจากหัวบีท การสกัดโปรตีนจากสาหร่ายและจากถั่วเหลืองที่สกัดไขมัน การสกัดสารในชาออกจากใบชาในการผลิตชาสำเร็จรูปละลายได้ทันที เป็นต้น

การใช้คลื่นอัลตราซาวด์ช่วยในการกรองช่วยทำให้อัตราการกรองของของเหลวเพิ่มขึ้น โดยทำให้เกิดผลที่สำคัญต่อการกรองสองประการได้แก่ทำให้เกิดการรวมตัวกันของอนุภาคที่มีขนาดเล็กทำให้การกรองเกิดขึ้นได้รวดเร็วและอีกประการหนึ่งคือคลื่นอัลตราซาวด์จะให้พลังงานบางส่วนที่เกิดขึ้นจากการสั่นของวัตถุแก่ของเหลวมีผลทำให้อนุภาคบางส่วนยังคงแขวนลอยอยู่ได้และทำให้สามารถแยกตัวทำละลายออกมาได้เพิ่มขึ้น ตัวอย่างเช่น ใช้คลื่นอัลตราซาวด์ในการช่วยกรองน้ำแอปเปิ้ลทำให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น เป็นต้น

**การสกัดด้วยเอนไซม์**

ประโยชน์หลักของการใช้เอนไซม์สกัดคือความจำเพาะของเอนไซม์สำหรับการสลายผนังเซลล์ เช่นเดียวกับในกรณีของเซลลูเลส เมื่อเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักในผนังเซลล์ส่วนใหญ่ (Salinas-Salazar et al., 2019; Kim et al., 2012) ข้อดีอื่น ๆ เช่น การใช้สภาพปฏิกิริยาที่ไม่รุนแรงในแง่ของ pH และอุณหภูมิ ไม่มีการกัดกร่อน และอัตราการสกัดที่สูงขึ้นและความจริงที่ว่าการสกัดชนิดนี้ไม่ต้องการขั้นตอนการทำให้แห้ง (Sierra et al., 2017) ในทางกลับกัน มีข้อจำกัดบางประการและขัดขวางการใช้กระบวนการสกัดนี้ เช่น เอนไซม์ที่มีราคาสูง และความจำเป็นในการสร้างความมั่นใจในสภาวะที่เสถียรในระหว่างกระบวนการ (Vernès et al., 2019) เมื่อเอนไซม์มีความอ่อนไหวมากในแง่ของอุณหภูมิและ pH การเปลี่ยนแปลง นอกจากนี้ ปฏิกิริยาของเอนไซม์อาจใช้เวลานาน ทำให้มีเสน่ห์น้อยลงสำหรับงานอุตสาหกรรม (Gong et al., 2016) การสกัดด้วยเอนไซม์ส่วนใหญ่ในสาหร่ายขนาดเล็กและไซยาโนแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับการสกัดสารประกอบลิปิดรวมถึงแคโรทีนอยด์ มักใช้เป็นการบำบัดล่วงหน้าซึ่งต้องการการสกัดด้วยตัวทำละลายในภายหลัง

โดยเฉพาะสำหรับการสกัดเม็ดสี (Tavanandi et al., 2019) การสกัดด้วยเอนไซม์สกัดอัลโลไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *A. platensis*




**ภาพ 6 การสกัดด้วยเอนไซม์ตามด้วยการสกัดด้วยตัวทำละลาย**

**ที่มา**: Fernando Pagels et al., 2021

**1. เอนไซม์**

เอนไซม์เป็นสารประกอบโปรตีนและอาจรวมถึงสารชีวโมเลกุลชนิดอื่นที่สามารถเร่งปฏิกิริยาในลักษณะค่อนข้างจำเพาะ เอนไซม์ทุกชนิดจะมีส่วนที่เรียกว่า Active site ซึ่งมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นและชนิดของปฏิกิริยา จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ตามที่ ต้องการ การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงมาก เร่งปฏิกิริยาได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้ปริมาณน้อยและไม่สูญสลายไปในระหว่างการเร่งปฏิกิริยา

1.1 เอนไซม์เซลลูเลส

เป็นเอนไซม์ที่ทำให้เกิดสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส มีกลไกการทำงาน 2 ขั้นตอน ขั้นแรกเป็น prohydrolytic step โดยสายโซ Anhydroglucose ถูกทำให้บวมขึ้น ขั้นที่สองเกิด Hydrolytic cleavage ของสายโพลิเมอร์ (ชฎาพร หัตถบูรณ์, 2556) การทำงานของกลไกเริ่มจากเซลลูโลสเกิดการบวมตัวพร้อมกับมีการสลายพันธะไฮโดรเจน การทำงานเกิดรวมกันของ Endoglucanase และ Exoglucanase จะย่อยสลายเซลลูโลสได้ปลายอิสระส่วน Exoglucannase

จะดึงโมเลกุลของ cellobiose ออกจากปลาย ซึ่งจะถูกย่อยสลายต่อไป โดย β-glucosidase จนได้น้ำตาลกลูโคสอิสระ (Fan et al., 1987)

เอนไซม์เซลลูเลส ทำหน้าที่ในการย่อยเซลลูโลสเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสและอินเทอร์มีเดียต โดยทั่วไปเซลลูเลสที่ใช้เป็น เอนไซม์ผสม ซึ่งจะประกอยด้วยเอนไซม์หลัก 3 ชนิด คือ Endo-β-glucanase, Exo-β-glucanase และ β-glucosidase

1.1.1 Endo-β-glucanase (1,4-β-D-glucan glucanohydrolase, EC 3.2.1.4), Cx: จะสลายพันธะ บีตา-ไกลโคไซด์ โดย random hydrolysis ทำให้ความหนืดลดลงอย่างรวดเร็วและมีหมู่รีดิวซิงเพิ่มขึ้นผลิตผลจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและโอลิโกเมอร์

1.1.2 Exo-β-glucanase (1,4-β-D-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), Ci: เป็น exosplitting-enzyme จะไฮโดรไลซ์เซลลูโลสส่วนที่ไม่เป็นผลึก โดยจะตัดพันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิ่งของโมเลกุลเซลลูโลสได้ผลผลิตเป็นเซลโลไบโอส

1.1.3 β-glucosidase (β-D-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21), Cellobiase: จะไฮโดรไลซ์ โมเลกุลของเซลโลไบโอสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และไฮโดรไลซ์พันธะจากปลายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซิงของเซลโลเดกซ์ทรินที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก โดยอัตราการไฮโดรไลซิสของเอนไซม์บีตากลูโคซิเคสจะเพิ่มขึ้นเมื่อความยาวของสายสับสเตรทสั้นลง และไฮโดรไลซ์เซลโลไบโอสได้รวดเร็วที่สุด

1.2 เอนไซม์ไซลาเนส

ไซแลนเป็นองค์ประกอบที่พบส่วนใหญ่ในเฮมิเซลลูโลสซึ่งอยู่ในโครงสร้างของเซลล์พืชในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษนั้นไซแลนมีผลกระทบเป็นอย่างมากในกระบวนการฟอกสี (Dekker and Linder, 1979) (Chen et al., 1997) (Lee et al., 1998) ดังนั้นจึงได้มีการนำเอนไซม์ในกลุ่มไซลาโนไลติกมาใช้ในการกำจัดไซแลนที่มีในเยื่อกระดาษ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการฟอกสี ซึ่งคุณสมบัติของไซลาเนสในการนำมา ประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษต้องประกอบด้วย (Nichaus et al., 1999)

1.2.1 ปราศจากการทำงานของเอนไซม์ ในกลุ่มเซลลูโลไลติก เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการย่อยของเยื่อเซลลูโลส

1.2.2 ต้องการไซลาเนสที่มีมวลโมเลกุลต่ำเพื่อให้ง่ายต่อการแพร่เข้าไปในเยื่อไม้

1.1.3 ผลผลิตที่ได้จากการใช้เอนไซม์สูงทั้งนี้เพื่อเป็นการลดต้นทุนการผลิตให้น้อยลงซึ่งถือเป็นปัจจัยสำคัญที่สุด

มีหน้าที่ย่อยแกนหลักของเฮมิเซลลูโลส มีด้วยกัน 2 ชนิด คือ ชนิด endo-1,4-β เร่งปฏิกิริยาการย่อยแบบสุ่มในสายพอลิเมอร์ของไซแลนที่มีแกนหลักเป็นน้ำตาลไซโลสต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 ทำให้ได้ไซโลโอลิโกแซ็กคาไรด์และชนิด exo-1,4 -β ซึ่งย่อยโอลิโกแซ็กคาไรด์จากปลาย

แต่ไม่รีดิวซ์ให้สายสั้นลง เอนไซม์ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์หลั่งออกมานอกเซลล์ เพื่อย่อยไซแลนที่เป็นสารโมเลกุลใหญ่ซึ่งจุลินทรีย์ไม่น่าสามารถนำเข้าสู่เซลล์ได้ (Pastor et al., 2007)

เอนไซม์ไซลาเนสเกี่ยวข้องในการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลส ถูกเรียกรวม ๆ กันว่า เฮมิเซลลูโลส หรือ กลูแคนไฮโดรเลส ซึ่งแบ่งออกเป็นเอนไซมที่ทำหน้าที่ตัดอย่างจำเพาะตามชนิดของสารตั้งต้น คือ L- arabinose ออกมา เอนไซม์กาแลก-กาเนส หรือ D-galactanaseย่อยสลายเฉพาะการแลกแทนและน้ำตาลอะราบิโนกาแลกแทน เอนไซม์แมนนาเนสเป็นเอนไซมที่สามารถย่อยสลายพันธะ β-(1,4)-D-mannanopyranosyl ของน้ำตาล D-mannanและเอนไซม์ไซลาเนสตัดพันธะ β-(1,4)-D-xylopyranosyl ของไซแลน

ไซลาเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารจำพวกไซเลนและอยู่ในกลุ่ม xylanolytic enzyme ที่มีความสำคัญที่สุดในการทำหน้าที่ย่อยสลายโครงสร้างหลักของไซลาเนสได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะที่พันธะ β-1,4-xylosidic linkage

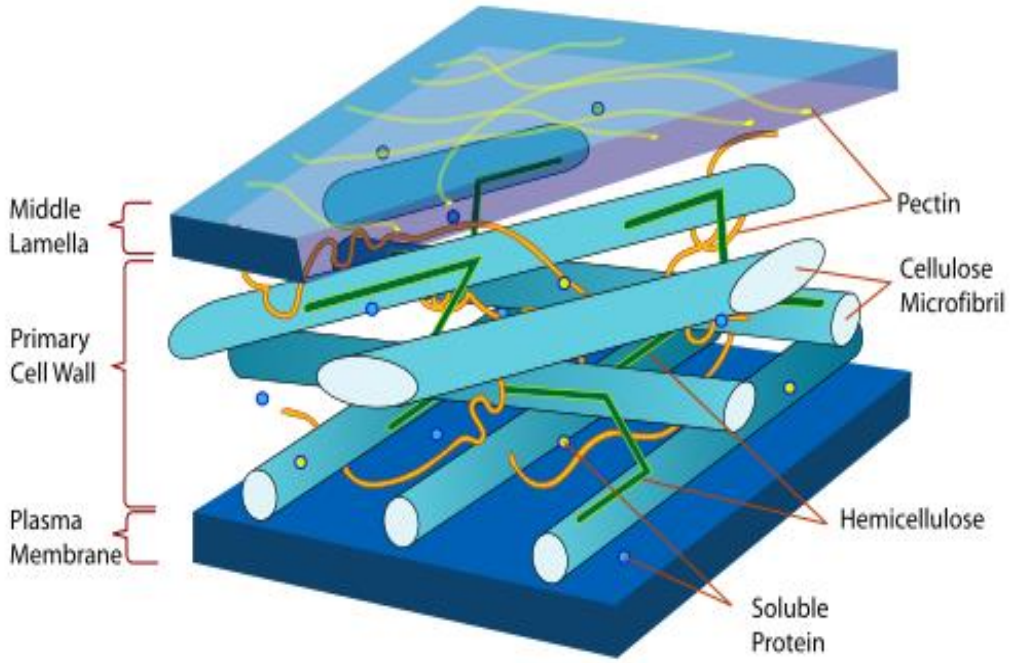
1.3 เอนไซม์เพคติเนส

เพคตินเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งเป็นองค์ประกอบในผนังเซลล์พืชโดยเฉพาะในผลไม้ชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าผนังเซลล์ของ citrus และแอปเปิ้ลมีพอลิเมอร์ของเพ็กตินในปริมาณครึ่งหนึ่งของทั้งหมด (Brummell, 2006) โครงสร้างของเพ็กตินประกอบด้วยสายหลักที่ประกอบด้วยบริเวณที่เชื่อมต่อของกรดกาแลกตูโลนิกเพียงชนิดเดียว และบริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างน้ำตาลแรมโนสและกรดกาแลกตูโลนิก และโซ่กิ่งที่ประกอบด้วยน้ำตาลแรมโนส น้ำตาลอะราบิโนส น้ำตาลกาแลกโตส และน้ำตาลไซโลส (Kashyap et al., 2001)

เอนไซม์เพคติเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเพคตินที่ผนังเซลล์พืช มีผลทำให้สารประกอบเพคตินมีขนาดโมเลกุลสั้นลง ส่งผลให้เนื้อสัมผัสที่แน่นมีความอ่อนตัวช่วยเพิ่มปริมาณน้ำผลไม้ที่สกัดได้ (สมฤดี ไทพาณิชย์, 2555) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสามารถในการตัดย่อยสารประกอบเพคติน พบได้ทั้งพืชชั้นสูง และในจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และราแต่เนื่องจากสารประกอบเพคตินเป็นส่วนประกอบ ของพืชเกือบทุกชนิดทั่วโลก และสมบัติของสารประกอบเพคตินเหล่านั้นแตกต่างกัน มีผลให้ชนิด และกลไกการทำงานของเอนไซม์นั้นแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจะกล่าวโดยทั่วไปแล้ว สมบัติของเพคติเนสคือ เอนไซม์ที่สามารถตัดย่อยสารประกอบเพคติน กรดเพคติกหรือสารประกอบ oligo-Dgalacturonate ได้ด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ กันเช่น เกิดปฏิกิริยา translimination ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มี พันธะคู่และบางชนิดเกิดปฏิกิริยา hydrolysis ตัดย่อยได้ผลิตภัณฑ์ที่มีหมู่รีดิวซิ่ง ซึ่งปฏิกิริยาการตัดย่อยเกิดขึ้นได้ทั้งแบบสุ่ม จัดเป็นกลุ่ม endo-enzyme หรือปฏิกิริยาการคัดย่อยจากปลายซึ่งจัดเป็นกลุ่ม exo-enzyme

**2. การเลือกเอนไซม์สกัดโปรตีน**

การเลือกเอนไซม์สกัดโปรตีนให้เหมาะสมต้องอาศัยความเข้าใจในโครงสร้างของผนังเซลล์พืช องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส เพกทิน โปรตีน ในผนังเซลล์ปฐมภูมิ ประกอบด้วยไมโครไฟบริลเซลลูโลสที่ฝังตัวอยู่ในเมตริกที่มีลักษณะชุ่มน้ำที่ประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์สองกลุ่มหลัก คือ เฮมิเซลลูโลสและเพกทิน โดยมีโปรตีนที่เป็นโครงสร้างจำนวนเล็กน้อย แต่ละไมโครไฟบริลเซลลูโลสเชื่อมต่อกัน โดยการเชื่อมต่อแบบร่างแหของโมเลกุลเฮมิเซลลูโลสสร้างเป็นโครงข่ายเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลส ในขณะที่โครงข่ายพอลิเมอร์ของเพกทินซึ่งฝังตัวในโครงข่ายเซลลูโลส-เฮมิเซลลูโลสเป็นตัวสร้างเมตริกที่อุ้มน้ำ เพื่อต้านทานแรงกดและแรงเฉือน มีความสำคัญต่อการควบคุมการยอมให้สารผ่านของผนังเซลล์ ส่วนในบริเวณผนังเชื่อมยึดระหว่างเซลล์เพกทินสร้างโครงสร้างต่อกันคล้ายตะแกรง ซึ่งเกิดจากสายระหว่างโฮโมกาแล็กทูโรแนนซึ่งเชื่อมต่อระหว่างกันโดยสะพานแคลเซียม




**ภาพ 7 ลักษณะผนังเซลล์พืช**

**ที่มา**: Ladyofhats, 2007

เฮมิเซลลูโลส เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทเฮทเทอโรพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมโนแซ็กคาไรด์หลายชนิดประกอบอยู่ในโมเลกุลเดียวกัน โดยเฮมิเซลลูโลสจะแตกต่างกับเซลลูโลสซึ่งเป็นสารประเภทโฮโมพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสประเภทเดียวประกอบอยู่ในโมเลกุล เฮมิเซลลูโลสเป็นโมเลกุลที่มีค่ามวล โมเลกุลน้อยกว่ามวลโมเลกุลของเซลลูโลส และมีค่า Degree of polymerization ไม่เกิน 200 สามารถแบ่งออกได้เป็นชนิดต่าง ๆ ได้หลากหลายดังนี้คือ กาแลกโตกลูโคแมนแนน อะราบิโนกลูคูโรโนไซแลน อะราบิโนกาแลกแทน กลูคูโรโนไซแลน และกลูโคแมนแนน โมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส สามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่ายโดยสารละลายกรด แล้วให้โมเลกุลของน้ำตาลที่มีขนาดเล็กลงคือ โมเลกุลเดียวของน้ำตาลกลูโคส แมนโนส ไซโลส และอะราบิโนส ซึ่งส่วนใหญ่จะได้น้ำตาลไซโลสเป็นองค์ประกอบหลัก (Dhillon et al., 2000) (Kosugi et al., 2002) โดยน้ำตาลไซโลสที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 8-14 linkage จะได้พอลิเมอร์ที่เรียกว่าไซแลนมีโครงสร้างรองเป็นน้ำตาลเห็นโตส เฮ็กโซส และกรดยูโรนิกในอัตราส่วนที่แตกต่างกันขึ้นกับแหล่งที่มาของไซแลนนั้น ๆ พืชต่างชนิดกันมีโครงสร้างหลักเป็นไซแลนเหมือนกันแต่จะแตกต่างกันเฉพาะชนิด จำนวน และตำแหน่งของหน่วยข้างเคียงองค์ประกอบที่แตกต่างกันทั้งความยาวและหมู่แทนที่ทำให้ไซแลนมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป

ไซแลนในพืชตระกูลหญ้าหรือธัญพืชมีโครงสร้างหลักเป็น O-acetyl-arabino-4-0-methylglucuronoxylan มีค่า DP ประมาณ 70 โดยไซแลนในพืชตระกูลหญ้ามี 4-0-methyl-a-D-glucuronic acid ในปริมาณที่น้อยกว่าไซแลนในไม้เนื้อแข็ง แต่มี L-arabinofuranose จำนวนมาก นอกจากนี้พบว่ามี O-acetyl group ประมาณร้อยละ 2-5 โดยน้ำหนัก

**โครงสร้างทางเคมีของโปรตีน**

เกิดจากกรดอะมิโนเรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ โดยที่หมู่อะมิโน หรือ -NH2 ตัวที่หนึ่งเชื่อมต่อกับหมู่คาร์บอกซิล หรือ -COOH ของกรดอะมิโนตัวถัดมาและมีน้ำหลุดออกไปหนึ่งโมเลกุล โดยกรดอะมิโนสองโมเลกุลต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์หนึ่งพันธะ

เนื่องจากโปรตีนเป็นพอลิเมอร์ของกรดอะมิโนทำให้โปรตีนแต่ละชนิดแตกต่างกันที่ชนิด จำนวน การจัดเรียงตัว และน้ำหนักโมเลกุล โปรตีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีขนาดโมเลกุลผันแปรจากขนาดเล็กถึงขนาดใหญ่ ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนมากถูกยึดเหนี่ยวด้วยพันธะเพปไทด์และพันธะชนิดอื่นทำให้โปรตีนมีโครงสร้าง 4 ระดับ ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ อาจส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่แตกต่างกัน ซึ่งโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดที่มีขั้วมากกว่าอาจมีสมบัติด้านการละลายน้ำได้ดีกว่าหรือโปรตีนที่มีโครงสร้างที่มีช่องว่างอยู่ภายในโครงสร้าง ทำให้โมเลกุลของน้ำสามารถแทรกตัวเข้าไปอยู่ภายในโมเลกุลของโปรตีนและยึดเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีนมีความสามารถในการอุ้มน้ำและการกระจายตัวได้ดีในน้ำ ในขณะที่

กลุ่มของโปรตีนที่โครงสร้างของโมเลกุลเป็นสายตรงและสายพอลิเพปไทด์เชื่อมต่อขนานกันหรือเป็นเกรียวจะยืดหยุ่นได้ดี (นิธิยา, 2545)

1. การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การที่โครงสร้างในรูป 3 มิติของโปรตีนถูกรบกวนจนเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยที่จะไม่ทำให้เกิดการสลายพันธะเปปไทด์ขึ้นเลย เช่น การทำให้เกลียวของโปรตีนคลายออกเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของโปรตีนไปด้วย ซึ่งการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมหรือการใช้รีเอเจนท์ชนิดต่าง ๆ

การปรับสภาพด้วยความร้อนแห้งเป็นการปรับสภาพด้วยความร้อนอุณหภูมิ กับวัตถุดิบแห้ง เพื่อทำลายเอนไซม์และจุลินทรีย์

การปรับสภาพด้วยความร้อนชื้นเป็นการให้ความร้อนวัตถุดิบที่มีความชื้นในสภาวะปิดสนิทก่อนนำมาทำแห้งต่อไป

**การปรับสภาพ**

แบ่งออกเป็น 5 วิธี คือ

การปรับสภาพด้วยคลื่นความถี่สูงและปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการสกัดวัตถุดิบสามารถส่งเสริมผลผลิตของสารประกอบกรดอะมิโนโดยเฉพาะกลูตาเมส (Glutamic acid) ได้สูง สามารถพบได้ที่ pH 5 ถึง pH 7 หรือที่ช่วง pH 5 ถึง pH 8 Soldo et al., 2003 โดยกลูตาเมสอิสระเป็นกรดอะมิโนที่ไม่จำเป็นจะเกิดขึ้นในระหว่างการสลายโมเลกุลของโปรตีน ในสาหร่ายพบ Glutamic acid สูงถึง 2,240 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ของสาหร่ายแห้ง (Cepoi et al., 2009) มีความสำคัญในการให้รสชาติอูมามิในอาหาร ซึ่งเกิดจากการรวมกันของกลูตาเมส และ แอสพาร์เทต (Aspartate) (Mouritsen, 2015) และการผลิตกลูตาเมสจากธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสูงได้รับความสนใจมากขึ้น (Eko et al., 2016) ไข่น้ำอาจเป็นพืชที่สามารถเป็นแหล่งผลผลิตกลูตาเมสได้ เนื่องจากอุดมไปด้วยปริมาณโปรตีนมากถึงร้อยละ 45 ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนไม่จำเป็น

**1. กระบวนการปรับสภาพเชิงกล** คือ วิธีการที่ทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กลง โดยการหั่น สับ หรือทุบ เพื่อให้วัตถุดิบมีความเหมาะสมในการทำปฏิกิริยาและยังช่วยลดปริมาณการใช้เอนไซม์ ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานานแต่มีข้อดีคือต้นทุนต่ำ

**2. กระบวนการปรับสภาพทางกายภาพ** คือวิธีการที่ใช้การเพิ่มอุณหภูมิและการแผ่รังสี ซึ่งในขั้นตอนการเพิ่มอุณหภูมิจะเป็นการเพิ่มอุณหภูมิ 1,100 เควิน ภายใต้สภาวะทั้งที่มีก๊าซเฉื่อยและตัวออกซิแดนท์สามารถทำให้เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินย่อยสลายได้ดี

Morris et al. (2008) รายงานว่ายังคงเป็นเรื่องยากที่จะทำให้องค์ประกอบทั้งหมดในเซลล์ออกจากสาหร่ายขนาดเล็กได้อย่างมีประสิทธิภาพ การแก้ปัญหาดังกล่าวต้องทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้เกิดความเสียหายและองค์ประกอบภายในเซลล์ถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น โดยเฉพาะการสกัดโปรตีน

Zheng et al. (2011) จึงศึกษาการนำอัลตร้าโซนิกมาใช้ในการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มของสาหร่าย คลื่นความถี่สูงของอัลตร้าโซนิกมีความแรงที่สามารถทำลายผนังเซลล์พืชได้เทียบเท่ากับความดันบรรยากาศได้หลายพันเท่า เพื่อให้เกิดการยุบตัวของฟองอากาศในเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาดในที่สุด

การสกัดโปรตีนด้วยการใช้อัลตร้าซาวด์เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการแลกเปลี่ยนไอออน ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนถึง ร้อยละ 70 ในสาหร่าย *Ulva sp*. และร้อยละ 86 ในสาหร่าย *Gracilaria sp.* และยังสามารถปรับขนาดที่เหมาะสมเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในอาหารได้ (Kazir et al., 2019) และการใช้อัลตร้าซาวด์ ในสาหร่ายสีน้ำตาล *A. nodosum* สามารถเอื้อต่อการย่อยสลายของเมทริกซ์ทางชีวภาพได้ (Kadam et al., 2013)

**3. กระบวนการปรับสภาพทางชีวเคมี** คือการรวมกันระหว่างวิธีทางเคมีและทางกายภาพมีส่วนสำคัญในการละลายน้ำของเฮมิเซลลูโลสและลิกนินที่ถูกแปลงโครงสร้างแล้วเป็นผลทำให้การแตกตัวของเซลลูโลสในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น การรีคัฟเวอรี่ร้อยละ 71 และร้อยละ 74 ของวัตถุดิบเริ่มต้นที่สามารถละลายน้ำได้ อุดมไปด้วยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโนและเกลือ ทำได้โดยการสกัดด้วยอัลตร้าซาวด์และเอนไซม์ในสาหร่าย *G. turuturu* เมื่อรวม 2 กระบวนการนี้ทำให้วัตถุดิบที่ละลายน้ำได้มากถึง ร้อยละ 91 (Le Guillard et al., 2016)

**4. การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ** เป็นการปรับสภาพที่ต้องพึ่งพาจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่เป็นแบคทีเรียและเชื้อรารวมทั้งเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ เชื้อราทั้งชนิดที่เป็น White-rot Brown-rod และ Soft-rot สามารถย่อยสลายเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนินได้

เอนไซม์ถูกนำมาใช้เพื่อช่วยในการสกัดและย่อยโปรตีนจากสาหร่าย (Denis et al., 2009) (Fleurence et al., 1995) การสกัดโปรตีนจากสาหร่าย *Chondracanthus chamissoi* และ *Macrocystis pyrifera* ด้วยเอนไซม์เซลลูเลสแบบผสม ซึ่งได้ผลผลิตโปรตีน 452 และ 616 มิลลิกรัม อีกทั้งยังมีกิจกรรมในการย่อยผลังเซลล์หลายชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเบต้ากลูโคซิเดช นอกจากนี้ไม่แสดงฤทธิ์ในการย่อยโปรตีน (Vàsquez et al., 2019)

**5. การปรับสภาพด้วยสารเคมี**

5.1 การปรับสภาพด้วยด่าง เช่น การปรับสภาพโดยใช้ โซเดียมไฮดรอกไซด์

5.2 การปรับสภาพด้วยสารละลายกรดเป็นการปรับสภาพที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายด้วยเอนไซม์และยังสามารถละลายโลหะหนักที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบออก การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางจะใช้ความเข้มข้นกรดต่ำและอุณหภูมิสูง

**การดัดแปรโปรตีน**

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีโครงสร้างหลากหลายรูปแบบ โดยโครงสร้างปกติของโปรตีนอาจไม่เหมาะสมกับการใช้งานในอาหารบางประเภท เช่น ไม่ทนต่อความเป็นกรดและความร้อน การละลายของโปรตีนต่ำ เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพได้จากความร้อนสูง และความเป็นกรดและด่างที่จุดไอโซอิเลกทริกทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนมีเนื้อสัมผัสที่แข็งและแห้ง สูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำได้ จึงมีการปรับปรุงโครงสร้างและคุณสมบัติบางประการเพื่อให้เหมาะสมกับการใช้งาน สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนบางครั้งอาจมีข้อจำกัดในการนำไปใช้โดยเฉพาะด้านความสามารถในการละลายและอาจเป็นอุปสรรคต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารเป็นอย่างมาก จึงนำไปสู่การดัดแปรสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ

**1. การดัดแปรทางกายภาพ**

1.1 การอบแห้งด้วยลมร้อน

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากความร้อนในโครงสร้างจุลภาคของโปรตีนจากพืชที่ผ่านการทำแห้งด้วยสเปรย์ไดย์และผลกระทบต่อการย่อยในหลอดทดลอง พบว่าการให้ความร้อนไม่มีผลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติต่อความสามารถในการย่อยโดยรวมของการกระจายตัวโปรตีนไอโซเลทอย่างไรก็ตามการให้ความร้อนทำให้โครงสร้างของอนุภาคโปรตีนที่ผ่านการทำแห้งด้วยสเปรย์ดรายมีขนาดเล็กลงและสามารถย่อยได้ดีขึ้น (Andrea et al., 2020)

ผลของการอบแห้งโดยลักษณะธรรมชาติของโปรตีนถ้าได้รับความร้อนสูงนาน ๆ จะทำให้เสียสภาพทางธรรมชาติไป คุณค่าทางอาหารของโปรตีนจะเหลืออยู่มากหรือน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับวิธีการทำแห้ง ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมสำหรับเครื่องทำแห้งแต่ละประเภทจะช่วยให้คุณค่าของโปรตีนคงอยู่มากขึ้น

**2. การดัดแปรทางเคมี**

2.1 การลวกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์

วัณเพ็ญ แสงทองพินิจ และคณะ, 2560 ศึกษาผลของการลวกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ *Wolffia globosa* พบว่าการลวกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่ 100 องศาเซลเซียส 2 นาที พบว่าไข่น้ำสดมีปริมาณเถ้าและโปรตีนลดลงร้อยละ 75.7 และร้อยละ 19.5

2.2 การดัดแปรด้วยกรดซักซินิก กรดอะซิติกและโซเดียมซัลไฟด์

การดัดแปรทางเคมี เช่น การใช้กรดและด่าง ทำให้โปรตีนมีคุณภาพไม่ดีนัก อาจมีกลิ่นแปลกปลอมหรือมีรสชาติที่ขม และเกิดสารพิษปนเปื้อน เช่น สาร 3-monocholoropropane-1, 2 diol เกิดจากการใช้กรดย่อยสลายโปรตีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (Mannheim et al., 1992) วิธีที่มีการศึกษาวิจัยมากในปัจจุบัน คือ วิธีการใช้เอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาเคมีได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง สามารถควบคุมทิศทางของปฏิกิริยา ทำให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติตามต้องการ สามารถลดการเกิดสารอื่นที่ไม่พึงประสงค์

**3. การดัดแปรโปรตีนด้วยเอนไซม์**

อาศัยปฏิกิริยาไฮโดรไลเสทภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรงและสามารถเลือกใช้เอนไซม์ที่มีความเฉพาะเพื่อให้โปรตีนที่เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ต่อการนำไปใช้ แต่ในบางกรณีการดัดแปรคุณสมบัติเชิงหน้าที่โปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์ อาจทำให้เกิดกลิ่นหรือรสชาติที่ไม่พึงประสงค์ จึงต้องมีการควบคุมสภาวะในการย่อยสลาย ได้แก่ pH อุณหภูมิ ระยะเวลา และระดับการย่อยสลายให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้มีความยาวของสายเพปไทด์ตรงตามที่ต้องการ (Yin et al., 2008)

3.1 การดัดแปรด้วยเอนไซม์โบรมิเลน

อรพรรณ เสลามาศสกุล และคณะ (2555) ศึกษาการผลิตเพปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยย่อยสลายสาหร่าย *Gracilaria sp.* ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ความเข้มข้นร้อยละ 0 10 15 และ 20 น้ำหนักเอนไซม์ต่อน้ำหนักสาหร่ายที่เวลาการย่อยสลาย 3 ชั่วโมง enzymatic bromelain seaweed protein hydrolysate (eb-SWPH) ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยโบรมิเลนร้อยละ 10 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพในการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ สูงที่สุด ถึงแม้ว่าประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ eb-SWPH ไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิก แต่สอดคล้องกับขนาดของเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 21kDa เมื่อวิเคราะห์ด้วย sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis และกรดอะมิโนที่พบใน eb-SWPH แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทสาหร่ายสามารถใช้เป็นองค์ประกอบทางธรรมชาติที่สำคัญในการผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ

3.2 การดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์

ไพลิน เพ็ชรทวีพรเดช (2548) พบว่าเมื่อใช้ปริมาณของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ร้อยละ 24 ย่อยสลายเป็นเวลา 12 ชั่วโมง มีร้อยละการย่อยสลายและเกลือสูงสุด คือ ร้อยละ 1.70 และ 4.80 ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ ร้อยละ 1 ย่อยสลายเป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีร้อยละการย่อยสลายและปริมาณเกลือต่ำสุด ร้อยละ 0.53 และ 1.40 ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อปริมาณของเอนไซม์เพิ่มขึ้นโอกาสที่เอนไซม์จะจับกับโมเลกุลของโปรตีนย่อมมีมากขึ้น จึงเกิดการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้ร้อยละการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์มากขึ้นจนกระทั่งปริมาณของเอนไซม์ที่ใช้เพียงพอกับปริมาณของโปรตีนที่มีอยู่ร้อยละการย่อยสลายจะคงที่

3.3 การดัดแปรด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และอัลคาเลส

Aaslyng et al. (1998) กล่าวว่าการใช้เอนไซม์ผสมเช่น ฟลาโวไซม์ และอัลคาเลส จะสามารถลดความขมในโปรตีนไฮโดรไลเซทได้มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซท จากการย่อยด้วยกรด เนื่องจากมีปริมาณเปปไทด์ที่ยึดเกาะกับลิวซีนน้อยกว่า และร้อยละการย่อยสลายของการย่อยด้วยเอนไซม์แบบผสมที่ประกอบไปด้วยเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดสจะมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอกโซเปปติเดสเพียงอย่างเดียว แต่ก็ยังคงต่ำกว่าการย่อยด้วยกรด เช่นเดียวกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระเมื่อเทียบเป็นร้อยละของโปรตีนที่พบในการย่อยเอนไซม์จะน้อยกว่าการย่อยด้วยกรด ในขณะที่ขนาดเปปไทด์และมวลโมเลกุลของเปปไทด์ในการย่อยด้วยเอนไซม์สูงกว่าการย่อยด้วยกรด

**การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท**

ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนโดยการตัดสายพอลิเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้น ๆ ด้วยการใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการเกิดเจล สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ สมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น (Kristinsson, & Rasco., 2000)

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยทั่วไปแบ่งออกได้ 2 วิธี ได้แก่

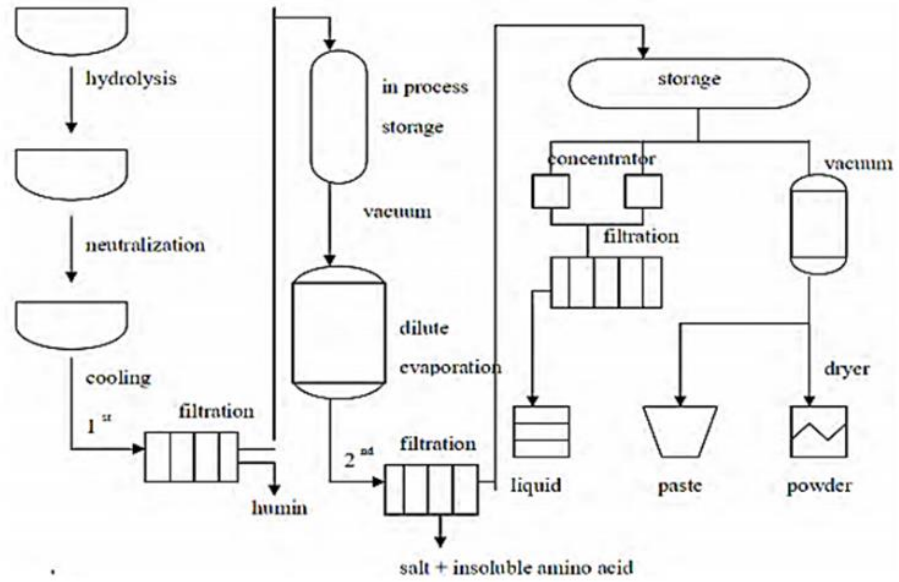
**1. การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี**

เป็นการทำให้พันธะเปปไทด์แตกออกโดยการใช้สารละลายกรดหรือด่าง เป็นวิธีที่มีต้นทุนต่ำแต่ควบคุมระดับการย่อยได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร การย่อยโปรตีนด้วยกรดสามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดีแต่ทำให้ทริปโตเฟน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย สารละลายกรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริกและกรดไฮโดรคลอริก โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยกรดจะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลางเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย ในการย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟตและการย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์

หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยโปรตีนเนื่องจากเกลือที่ได้ในกระบวนการเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไป

ย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หากย่อยในสภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาราซิไมเซชั่นของกรดอะมิโน โยจะทำให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ เกิดเป็นสารประกอบหลายชนิด เช่น Lysinoalanine และ Lanthionine เป็นต้น ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญและสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย (Kristinsson, & Rosco., 2000)

โดยกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทในระดับอุตสาหกรรมจะนำโปรตีนจากพืชมาทำปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยกรดที่อุณหภูมิ 100-125 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันปกติหรือความสูง เวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและความดัน หลังจากปฏิกิริยาเสร็จสิ้นลงนำของผสมที่ได้ไปทำให้เย็น แล้วจึงเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไปเพื่อปรับให้มี pH 5-6 ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนและกลิ่นรสที่ต้องการ นำของผสมที่ได้เข้าเครื่องกรองเพื่อจำกัดสาร Humin ซึ่งเป็นโพลิเมอร์ของกรดอะมิโนและคาร์โบไฮเดรตที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายและขั้นตอนการปรับ pH โดยทริปโตเฟนไทโรซีน ซิสทิน ฟีนิลอะลานีน เมทไธโอนีน และอาร์จินีน เป็นกรดอะมิโนที่มีส่วนสำคัญในการเกิดสาร Humin หลังจากนั้นนำของผสมที่ได้มาทำให้เข้มข้นมากขึ้น จะทำให้เกลือและกรดอะมิโนที่ไม่ละลายตกตะกอนออกมา นำเข้าเครื่องกรองอีกครั้งแล้วนำส่วนใสที่ได้ไปรวมกับสารให้กลิ่นรสอื่น ๆ หลังจากนั้นผ่านเข้าขั้นตอนการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีจำหน่ายทั่วไป ส่วนมากจะอยู่ในรูปผง นอกจากนี้อาจจะผลิตในรูปของเหลวหรือกึ่งแข็งกึ่งเหลว ของแข็งทั้งหมดร้อยละ 82-89 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความต้องการของตลาด (Manley and Fagerson, 1971) ข้อได้เปรียบของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรด คือ ต้นทุนในการผลิตต่ำระยะเวลาในการผลิตสั้น ได้กลิ่นรสที่ดีและเข้มข้น แต่ข้อเสีย คือ มีปริมาณเกลือสูงประมาณร้อยละ 40 (Aaslyng et al., 1998) และเกิดสาร 3-monochloropropanediols ซึ่งจัดเป็นสารพิษที่อาจก่อให้เกิดมะเร็งในร่างกาย




**ภาพ 8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรดในระดับอุตสาหกรรม**

**ที่มา**: Manley, & Fagerson, 1971

Jantawat et al. (1998) รายงานว่ากรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในสัดส่วนที่ต่ำจะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนอิสระและเกิดการสะสมของกรดอะมิโน แต่ทว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกในสัดส่วนที่มากขึ้นจะทำให้กรดอะมิโนบางส่วนถูกดึงหมู่อะมิโนจากโมเลกุลออก และเป็นผลให้เกิดการลดลงของระดับอะมิโนไนโตรเจนทั้งหมด เช่นเดียวกับสัดส่วนอะมิโนไนโตรเจนกับไนโตรเจนทั้งหมด ซึ่งส่งผลให้ได้รับคะแนนด้านกลิ่นรสที่ดีกว่าและนอกจากนี้แอมโมเนียซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายจากการทำลายโครงสร้างกรดอะมิโนจะทำให้เกิดกลิ่นคุณภาพต่ำลง ในขณะเดียวกันการใช้อุณหภูมิที่สูงร่วมกับการย่อยด้วยกรดจะทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของกรดอะมิโนด้วย

มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตเพื่อลดการปนเปื้อนของสารดังกล่าว โดยมีหลายแนวทาง คือ การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้ด่างร่วมในกระบวนการผลิต การใช้วัตถุดิบที่มีไขมันน้อย เช่น การใช้แป้งถั่วเหลืองที่มีการสกัดไขมันออกแล้ว การปรับลดปริมาณกรด อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิต ปรับเปลี่ยนวิธีการผลิตโดยใช้เอนไซม์แทนกรดเกลือ

**2. การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์**

ใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลงและกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูงจึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมากและสามารถย่อยโปรตีนในสภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้

การใช้เอนไซม์มีอัตราการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลโปรตีน เช่น Isoleucine Phenylalanine Tryptophan Tyrosine และ Valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้จะเกิดน้อยลง เพราะสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจะเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้รสขมจึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยโปรตีน (Kristinsson, & Rosco., 2000)

กระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นเทคนิคที่ใช้สภาวะการย่อยที่อ่อนกว่ากรด โดยการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 5-7 ขึ้นอยู่กับสภาวะที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ที่จะแตกพันธะเปปไทด์ของแหล่งโปรตีน ด้วยการใช้เอนไซม์โปรติเอสที่มีขายทางการค้า เช่น ฟลาโวไซม์ อัลคาเลส ทริปซิน และโบมีเลน นอกจากนี้การย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ได้มีข้อดีเพียงการลดการผลิตสารก่อมะเร็งให้น้อยลงเมื่อเทียบกับวิธีการที่ใช้สารเคมี แต่ยังให้ความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาและเกิดการกำจัดหมู่อะมิโนได้ในสภาวะที่ต่ำลงด้วย pH ที่เป็นกลางและที่อุณหภูมิห้อง (Sonklin et al., 2011)

หลักการสำคัญของการย่อยสลายโปรตีน คือ เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติหน้าที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ความคงตัวและกลิ่นรส ดังนั้นจึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ สภาวะในการย่อยสลาย ได้แก่ pH อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ เป็นต้น

เอนไซม์เป็นกลุ่มโปรตีนที่ทำหน้าที่พิเศษแตกต่างจากโปรตีนและชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ มีความสามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงกว่าตัวเร่งสังเคราะห์หลายล้านเท่า ด้วยปริมาณเอนไซม์ระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรง ซึ่งเหมาะสมอย่างยิ่งกับภาวะภายในเซลล์และเนื้อเยื่อ ของสิ่งมีชีวิตโดยทั่วไป เอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท โดยเอนไซม์ชนิดที่เป็นโปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลท ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยจะตัดพันธะเปปไทด์ได้เป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งประเภทได้หลายแบบ เช่น แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเปปไทด์และการแบ่งตาลกลไกการทำงาน

การแบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวพอลิเปปไทด์ แบ่งได้ 2 ประเภท ดังนี้

**2.1 เอกซ์โซเปปติเดส หรือ Exopeptidases** เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโน เรียกว่า อะมิโนเปปติเดส ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า คาร์บอกซีเปปติเดส

**2.2 เอนโดเปปติเดส หรือ Endopeptidase** เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่ของโมเลกุลโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ เอนโดเปปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถ

ย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) เอนโดเปปติเดสจะย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากด้านใน ส่วนเอกโซเปปติเดสย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้านนอก (Adler-Nissen, 1986) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น ตลอดทั้งเอนไซม์จะเพิ่มอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นปฏิกิริยา (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

กลไกการทำงานแบ่งได้ 4 ประเภท ดังนี้

1) ซีรีนโปรติเอส เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นอัลคาไลน์โปรติเอส มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 7.0-11.0 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซีรีล และหมู่อิมิดาโซล อยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยไดไอโซโพรพิลฟอสโฟฟลูออไรด์ ซึ่งทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ อิเลสเตรต ทรอมบิน และทริปซิน เป็นต้น

2) ซัลไฮดริลโปรติเอส หรือซีสเตอีนโปรติเอส เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอส มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.0-7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยสารซัลไฮดริล ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและอาจสูญเสียแอคติวิตี้ไปในที่สุด เอนไซม์กลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น โบรมิเลน และปาเปน เป็นต้น

3) เมทัลโลโปรติเอส เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นนิวทรอลโปรติเอสมี pH ที่เหมาะสมคือ 7.8 เป็นพวกเอกซ์โซเปปติเดส เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอิออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน โดยจะอยู่ในลักษณะโคแฟกเตอร์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ เช่น 1,10 - Phenanthroline และ Ethylenediaminetetraacetic acid เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ เช่น Carboxypeptidase A Carboxypeptidase B Carnosinase และ Prolidase เป็นต้น

4) แอสปาติกโปรติเอส เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็นคาร์บอกซิลโปรติเอส และเอซิดโปติเอส มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 2.0-4.0 มีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาติค 2 อนุมูลอยู่ในบริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยเปปสะเตติน เอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ เช่น เปปซิน และเลนนิน เป็นต้น (Whitaker, 1994 อ้างถึงใน ธันยพร จันทร์แสนโรจน์, 2550)

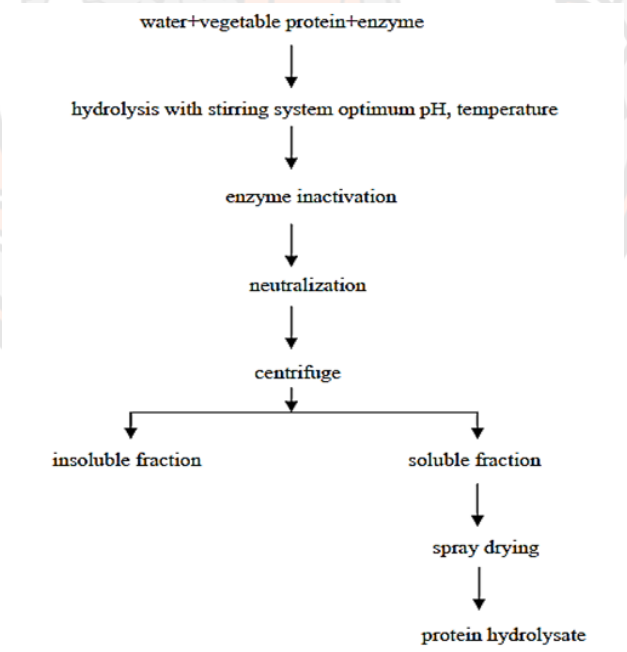
ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนแตกต่างกัน เช่น

1) อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60 องศาเซลเซียสและมี pH ที่เหมาะสมในช่วง 8-8.5 (Anonymous, 2000)

2) ฟลาโวไซม์เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Aspergillus oryzae* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสและเอกโเปปติเดส ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50 องศาเซลเซียส ที่ pH ในช่วง 5-7 (Anonymous, 2000)

3) นิวเตรตเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55 องศาเซลเซียส ที่ pH ในช่วง 5.5-7 (Anonymous, 2000)

การย่อยสลายโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่นำมาใช้ในการย่อยสลายคือโปรติเอส ซึ่งมีชื่อทางการค้าได้แก่ ฟลาโวไซม์ อัลคาเลส โนโวไซม์ ทริปซิน ปาเปน และโบรมิเลน (Kong et al., 2008) ซึ่งมีข้อดีคือไม่ก่อให้เกิดสารก่อมะเร็งและให้สารให้กลิ่นรสที่หลากหลาย แต่พบว่ามีข้อเสียคือโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้อาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค (สุปราณี, 2539) โดยเมื่อทำการย่อยสลายแล้วจะได้กรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้นจำนวนมาก ซึ่งในปฏิกิริยาเมลลาร์ด กรดอะมิโนและเปปไทด์จะก่อให้เกิดสารให้กลิ่นรส ซึ่งกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยเอนไซม์ดังภาพ 9

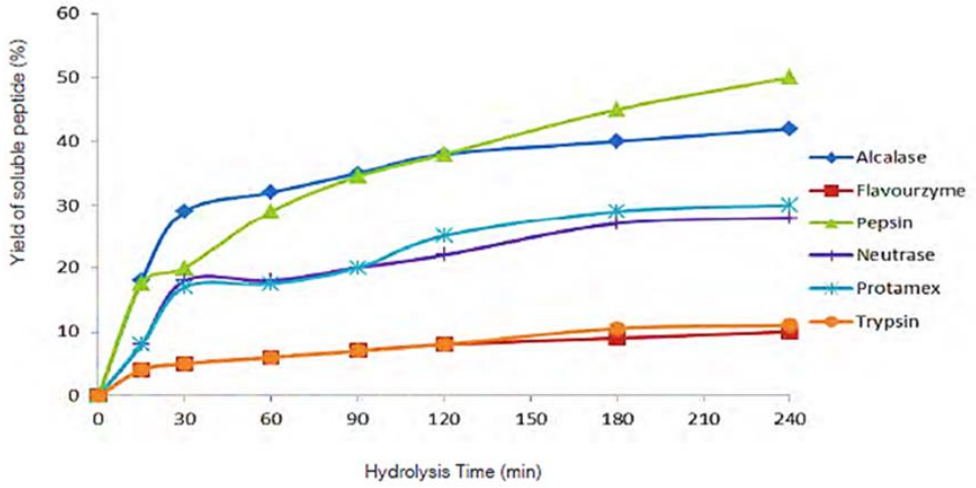



**ภาพ 9 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์**

**ที่มา**: Yu, & Tan, 1990

เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน จะพบว่า ผลผลิตที่ได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระรวมทั้งกลุ่มของสารประกอบคาร์โบไฮเดรท ฟอสเฟต และกรดนิวคลีอิก เป็นต้น (Whitaker, 1994) เอนไซม์ที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทมีหลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะแตกต่างกัน

Chuan et al. (2009) พบว่าหากใช้เอนไซม์ต่างชนิดกันจะส่งผลต่อปริมาณเปปไทด์ที่ผลิตได้ โดยทดสอบจากการนำเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มาทำการย่อยสลายโปรตีนจากป่านเพื่อผลิตโปรตีนไอโซเลท ดังแสดงดังภาพ 10 ซึ่งพบว่าร้อยละการย่อยสลาย จะสูงมากใน 2 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะเริ่มมีร้อยละการย่อยสลายลดลง โดยพบว่าเอนไซม์ Alcalase และ Pepsin ปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 2 ชั่วโมงแรก และตามมาด้วยเอนไซม์ Protamex และ Neutrase และเอนไซม์ Flavourzyme และ Trypsin จะเพิ่มขึ้นช้าที่สุด และเมื่อเวลาในการย่อยสลายผ่านไป 2-4 ชั่วโมงพบว่าร้อยละการย่อยสลายจะลดลง อีกทั้งการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดจะทำให้รสชาติของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้มีรสชาติแตกต่างกัน




**ภาพ 10 ร้อยละของปริมาณเปปไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับเวลาที่ใช้ในการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสต่าง ๆ**

**ที่มา**: Chuan et al., 2009

ปุณณาณี สัมภวะผล, และธรรมรัตน์ แก้วมณี (2554) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่งหรั่ง พบว่า ผลของระยะเวลาต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลสหรือเอนไซม์ฟลาโวไซม์ภายใต้สภาวะที่

กำหนด การย่อยสลาย BPC ในระยะเวลาการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจาก 60 นาทีเป็น 180 นาที ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 ของเอนไซม์อัลคาเลสและที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ของเอนไซม์ฟลาโวไซม์ มีระดับการย่อยสลายโปรตีนสูงและมีอัตราการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนที่ระยะนานกว่า 180 นาที พบว่าโปรตีนมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยและมีแนวโน้มคงที่ อย่างไรก็ตามพบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนมีระดับการย่อยสูงสุดเมื่อทำการย่อยสลายโปรตีนที่ระยะเวลา 360 นาที สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Zhu et al., 2006) เมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาการย่อยสลายเดียวกัน พบว่าการย่อยสลาย BPC ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์และพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นเพียงร้อยละ 1 มีระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซมีฟลาโวไซม์ในทุกระดับความเข้มข้นที่ทดสอบ

**ระดับการย่อยโปรตีน หรือ Degree of hydrolysis, DH**

เป็นดัชนีที่ใช้บ่งชี้ระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับความสะดวก ความเหมาะสม และระดับความละเอียดและเที่ยงตรงที่ต้องการ การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดการวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระและการไตเตรทโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา (Silvestre, 1997)

1. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ในโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสทด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธี Kjeldhal การวัดการดูดกลืนแสงในช่วงอัลตราไวโอเลตของเปปไทด์ที่มีหมู่วงแหวนและการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-700 นาโนเมตร หลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยาไบยูเรต โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (1) (Silvestre, 1997 อ้างถึงใน ธันยพร, 2550)

DH = (ปริมาณโปรตีนหลังการตกตะกอนด้วย TCA x 100)/ปริมาณโปรตีนทั้งหมด -------- (1)

2. การวิเคราะห์กลุ่มแอลฟาอะมิโนอิสระ โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธีไตเตรท ซึ่งจะใช้สารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ทำปฏิกิริยากบกรดอะมิโนแล้วไตเตรทด้วยสารละลายเบส โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ เปลี่ยนสีที่ pH 9.2 อัตราส่วนระหว่างแอลฟาอะมิโนไนโตรเจนอิสระกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์สามารถประมาณค่าระดับการย่อยโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้สารประกอบที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่อะมิโน เช่น Ninhydrine Trinitrobenzen

Sulfonic acid Polychroniadou Fluorescamin และ Orthiphtaldehyde ก็สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน โดยวิธีเก่าแก่ที่สุดคือการใช้ Ninhydrine เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะได้สารประกอบสีน้ำเงินเข้ม โดยวิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูงแต่มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น สารเคมีที่ใช้ไต่อออกซิเจน มีการรบกวนจากแอมโมเนีย ค่าที่ได้จากแบลงค์สูงและใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Moore and Stein, 1948) ส่วน TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ Primary amino group ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับโปรตีนไฮโดรไลเสทแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นานสารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย Picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก Blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ Proline และ Hydroxyproline และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มอะมิโนของ Lysine ได้ (ธันยพร, 2550) สารประกอบอีกสองชนิด คือ Fluorescamin และ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี Fluoromrtry ซึ่งวิธีจะให้ความไวสูง แต่มีข้อเสีย คือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียรต่ำ (Church et al, 1985) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (2)

$$DH = (Lt-L0) \times 100/Lmax-L0 \quad \text{---------- (2)}$$

Lt= ปริมาณ $\alpha$-amino acid ที่เวลา t

L0= ปริมาณ $\alpha$-amino acid เริ่มต้น

Lmax= ปริมาณ $\alpha$-amino acid หลังจากการย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

3. การไตเตรทโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เรียกว่าเทคนิค pH-stat ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย ซึ่งทำให้หมู่อะมิโนหลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งทำให้ pH ของโปรตีนไอโดรไลเสทลดลง ดังนั้นจึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วย Sodium hydroxide หรือ Calcium hydroxide โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา (3) (ธันยพร จันทร์แสนโรจน์, 2550)

$$DH= B \times Nb \times 1/Mb \times 1/\alpha \times 100/h_{tot} \quad \text{---------- (3)}$$

B = ปริมาณเบสที่ใช้ (มิลลิลิตร)

Nb= ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)

Mb= มวลของโปรตีน (กรัม)

1/$\alpha$ = ค่า Calibration สำหรับ pH-stat

htot = จำนวนพันธะเปปไทด์ในโปรตีน

วิธีการนี้จะใช้ในการวัดระดับการย่อยโปรตีนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพแต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะเป็นค่าสัมพัทธ์และหากต้องการความถูกต้องแม่นยำจะต้องตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น TNBS หรือ OPA (Silvestre, 1997 อ้างถึงใน ธันยพร, 2550)

**ปัจจัยที่ส่งผลต่อการผลิตสารให้กลิ่นรสจากการย่อยสลายโปรตีนจากพืช**

ในการเกิดกลิ่นรสเนื้อของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้น ปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการเกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสสามารถแบ่งได้เป็น 3 ปฏิกิริยาหลัก ๆ ได้แก่ ปฏิกิริยาการแตกสลายของวิตามิน โดยเฉพาะไทอามีน การแตกสลายด้วยความร้อนของคาร์โบไฮเดรทและเอมีน การเกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด

การผลิต HVP จากการใช้เอนไซม์ร่วมในการผลิตนั้น จะมีปัจจัยที่หลากหลายส่งผลต่อโปรตีนไฮโดรไลเสทที่จะได้รับเป็นผลิตภัณฑ์และสำหรับการนำไปใช้ต่อ โดยจะกล่าวถึงปัจจัยที่น่าสนใจที่ส่งผลต่อโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากกระบวนการผลิตด้วยเอนไซม์

**1. อุณหภูมิ**

โดยพบว่าเมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มมากขึ้น และที่อุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้นจากในตอนเริ่มการย่อยสลายร้อยละ 26.34 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Patel and Borchardt, 1990) ที่กล่าวว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นทำให้ปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้น แต่ในปฏิกิริยาเมลลาร์ด พบว่า ปริมาณกรดอะมิโนอิสระลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นอาจเนื่องจากเกิดปฏิสัมพันธ์ระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาล

โปรตีนไฮโดรไลเสทจากเอนไซม์เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับระบบทำให้สารที่ถูกกระตุ้นมีพลังงานสูงปฏิกิริยาเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่การเพิ่มอุณหภูมินั้นมีขีดจำกัดกล่าวคือถ้าอุณหภูมิสูงมาก จะส่งผลให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติทำให้โครงรูปสามมิติเกิดการหักงอ และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ในที่สุด (พัชรา, 2543)

Cigic, & Zelenik-Blatnik (2004) รายงานว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อร้อยละการย่อยสลายอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเร่งของปฏิกิริยาโดยเอนไซม์เพิ่มขึ้น แต่อุณหภูมิที่เพิ่มสูงมากเกินไปอาจมีผลให้เกิดการสูญเสียธรรมชาติของเอนไซม์

**2. ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)**

pH มีผลต่อค่าร้อยละการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสท เนื่องจากเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งดังนั้นเมื่อค่า pH สูงหรือต่ำเกินไปทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายและสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้ โดยเอนไซม์แต่ละชนิดมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานแตกต่างกัน (Eskin, & Henderson, 1971)

**3. ระยะเวลา**

เมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ปริมาณของอะมิโนไนโตรเจนที่ถูกย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นด้วยนั่นคือ โปรตีนจะถูกย่อยมากขึ้น ได้เป็นกรดอะมิโนและไดเปปไทด์ โดยไดเปปไทด์บางชนิดมีความคงตัว จึงไม่ถูกย่อยสลายต่อไป ซึ่งกรดอะมิโนและไดเปปไทด์เหล่านี้เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อการให้กลิ่นรสของโปรตีนไฮโดรไลเสท ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีกลิ่นรสที่ดี ทั้งนี้หากในวัตถุดิบมีปริมาณของโปรตีนสูงระยะเวลาที่ใช้ย่อยควรนานขึ้น เนื่องจากระยะเวลาในการย่อยสลายนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนในวัตถุดิบที่ใช้ย่อยสลาย (Manley and Fagerson, 1971)

Chanikan et al. (2011) ทำการย่อยสลายถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โบรมิเลนพบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการย่อยสลายและเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้นพบว่า ร้อยละของผลผลิตและร้อยละการย่อยสลายก็จะเพิ่มขึ้น

**4. เอนไซม์และความเข้มข้นความเอนไซม์**

ความแตกต่างในความจำเพาะระหว่างเอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดนั้นเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งที่จะต้องนำมาพิจารณา เพื่อเป็นแนวทางในคัดเลือกชนิดของเอนไซม์ที่จะใช้ ขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งโปรตีนที่จะนำมาใช้หรือผลิตภัณฑ์ที่คาดหวังว่าจะได้ ซึ่งโปรตีนสายเดียวกันนั้นอาจผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทได้แตกต่างกันจากการใช้เอนไซม์ต่างชนิดกัน (Tavano, 2013)

Sonklin et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนถั่วเขียวด้วยเอนไซม์โบรมิเลนซึ่งเป็นเอนโดเปปติเดส พบว่าความเข้มข้นของสารที่จะได้รับขึ้นอยู่กับค่าร้อยละการย่อยสลายและความจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส นอกจากนี้การเพิ่มของค่าร้อยละการย่อยสลาย และกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟรบิกที่มากขึ้น สามารถก่อให้เกิดการรวมตัวภายในสายเปปไทด์ ส่งผลให้มีความขมเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟรบิกเป็นตัวแทนสำหรับความขม จะถูกปลดปล่อยโดยเอนโดเปปติเดส โดยการใช้เอนไซม์โบรมิเลนจะทำให้เกิดกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟรบิกสูงกว่าไฮโดรฟิลิก

Tarky et al. (1973) รายงานว่า กลไกการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์นั้นเริ่มจากการที่เอนไซม์แข่งขันกันดูดซับที่บริเวณผิวของสารตั้งต้นแล้วเข้าไปทำให้พันธะเพปไทด์ของโปรตีนเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยกรดอะมิโนหรือเพปไทด์ที่ละลายได้สู่สารละลาย ดังนั้นเมื่อความเข้มข้นของ

เอนไซม์มากขึ้นจะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายมากขึ้น ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จึงมีค่ามากขึ้น

**สารประกอบที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากพืชด้วยเอนไซม์**

สารให้รสชาติอาหารที่นิยมใช้ส่วนใหญ่นิยมใช้สารที่ให้รสชาติอาหารธรรมชาติ ประเภทของสารที่ใช้จัดอยู่ในกลุ่มกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนนั่นเอง กรดอะมิโนแต่ละตัวจะมีรสชาติเฉพาะแตกต่างกันไป เช่น อะลานีน ไกลซีน โปรลีน และซีลีน เป็นตัวแทนของรสหวาน อาร์จินีน ฟีนิลอะลานีน ฮีสทิดีน วาลีนและทริปโตเฟนเป็นตัวแทนของรสขม กรดกลูตามิกและแอสปาร์ติกเป็นตัวแทนของรสเปรี้ยว

**สารต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์จากสาหร่ายขนาดเล็ก**

เปปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็ก ได้รับการตรวจสอบอย่างกว้างขวางถึงความสามารถในการบรรเทาความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันและโรคแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้อง ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น น้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ องค์ประกอบของกรดอะมิโน ความไม่ชอบน้ำของโมเลกุลและพื้นผิว และประเภทของ ROS/ Free radical (Samaranayaka, & Li-Chan, 2011) (Udenigwe, & Aluko, 2012) (Garcia et al., 2014)

เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ได้รับการตรวจสอบคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การทดสอบในหลอดทดลองและจากเซลล์ ตัวอย่างเช่น ความสามารถของเปปไทด์ในการจับอนุมูลอิสระ เช่น **α**,**α**-diphenyl-**β**-picrylhydrazyl [DPPH] และOxygen radical absorbance capacity [ORAC] assays การลดเฟอร์ริกไอออน เช่น Ferric reducing ability of plasma [FRAP] assay และการยับยั้งเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน เช่น Thiobarbituric acid reactive substances [TBARS] assay ถูกนำมาใช้เพื่อประเมินความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Garcia et al., 2013)

**การใช้เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็กในอาหาร**

ศักยภาพในการผลิตอาหารที่มีประโยชน์ใช้สอยโดยใช้เปปไทด์ที่ได้จากสาหร่ายขนาดเล็กนั้นมีมากมายมหาศาล สิ่งมีชีวิตต่อหน่วยพื้นที่สูง การผลิตง่าย โปรตีนในระดับสูงและสารประกอบออกฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ตลาดปัจจุบันสำหรับสาหร่ายขนาดเล็กมุ่งเน้นไปที่การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเฉพาะกลุ่ม แอลจิเนตในอาหาร และอาหารปลา การเพาะปลูกสาหร่ายขนาดเล็กเป็นส่วนผสมที่ใช้งานได้สำหรับอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องสำอาง และเภสัชกรรม คาดว่าจะขยายตัวเพิ่มขึ้น การผลิตอาหารที่มีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งได้มาจากสาหร่ายขนาดเล็ก ซึ่งมีสาร

ต้านอนุมูลอิสระและคุณสมบัติลดความดันโลหิต สามารถนำไปสู่ความพยายามอย่างต่อเนื่องในการลดโรคหัวใจและหลอดเลือดทั่วโลก (Chukwunonso et al., 2016)

**การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท**

ฤทธิ์การต้านอนุมูอิสระโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนแหล่งต่าง ๆ เช่น โปรตีนเคซีนในนม โปรตีนข้าวโพด โปรตีนไข่แดง โปรตีนกล้ามเนื้อปลา โปรตีนจากกล้ามเนื้อหมู โปรตีนซีรัมอัลบูมินจากเลือดวัว คอลลาเจน โปรตีนเวย์ โปรตีนกลูเตนจากแป้งสาลี และโปรตีนจากถั่วหลายชนิด มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Zhang et al., 2009) โดยพบว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น สภาวะในขั้นตอนการสกัดแยกโปรตีน ชนิดของโปรตีน ระดับการย่อย องค์ประกอบของกรดอะมิโนและเปปไทด์

การวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีปัจจัยหลายประเภทที่มีอิทธิพลต่อการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร เช่น สภาวะการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและสภาวะทางกายภาพของสารตั้งต้นของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เป็นต้น เนื่องจากอิทธิพลดังกล่าวทำให้ไม่สามารถใช้วิธีทดสอบเพียงวิธีเดียวในการตรวจสอบสมบัติการต้านออกซิเดชั่นของสารใด ๆ ได้ วิธีที่ใช้การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นหรือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมีหลายวิธี แต่ที่นิยมใช้ทดสอบมีดังนี้

**1. ABTS free radical scavenging method**

ABTS+ เป็นอนุมูลอิสระที่มีประจุบวกเกิดจากสาร ABTS (2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic) ถูกออกซิไดส์ด้วยโพแทสเซียมเปอรซัลเฟตให้กลายเป็น ABTS+• ซึ่งเป็นอนุมูลที่มีสีน้ำเงินแกมเขียวที่สามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ใช้ทดสอบมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ABTS+ อัตราการเกิดสารละลายสีน้ำเงินแกมเขียวจะช้าลงปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้ (Landrault et al., 2001)

$$ABTS^{+} + \text{metmyoglobin (ไม่มีสี)} \xrightarrow{H_2O_2} ABTS^{+\bullet} \text{ (สีเขียวแกมน้ำเงิน)}$$

$$ABTS^{+\bullet} \xrightarrow{\text{Protein hydrolysate}} ABTS^{+} \text{ (ไม่มีสี)}$$

**2. DPPH radical scavenging method**

DPPH (2,2-Diphenyl-1-pieryl-hydrozyl) เป็นอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจวัดความสามารถในการต้านออกซิชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทมีหลักการ คือ เมื่ออนุมูลอิสระ DPPH ทำปฏิกิริยากับสารที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันจะมีผลทำให้อนุมูลอิสระ DPPH

มีความเสถียร เนื่องจากได้รับไฮโดรเจนอะตอมจากโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน และจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีม่วงแดงไปเป็นไม่มีสีหรือมีสีจางลงซึ่งตรวจวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร (Maisuthisakul et al., 2007) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังนี้

$$DPPH^{\bullet}\text{ (สีม่วงแดง)} + AH\text{ (antioxidant)} \longrightarrow DPPH\text{ - H (ไม่มีสี)} + A^{\bullet}$$

$$DPPH^{\bullet}\text{ (สีม่วงแดง)} + R^{\bullet}\text{ (radical species)} \longrightarrow DPPH\text{-R (ไม่มีสี)}$$

สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูลย์, 2550 ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ย่อยด้วยวิธีทางเคมีและเอนไซม์ พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยเอนไซม์ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ไม่ผ่านการย่อยและจะมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยและความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พบว่าโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีแนวโน้มให้ความสามารถในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันลิโนเลอิกสูงกว่าโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

**ฤทธิ์ต้านจุลชีพ**

งานวิจัยที่เกี่ยวกับฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของโปรตีนไฮโดรไลเสทนั้นพบน้อยกว่า งานวิจัยที่ศึกษาถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยจากการรายงานพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากโปรตีนบางชนิด เช่น โปรตีนนมและโปรตีนไข่มีความสามารถในการต้านจุลชีพได้

**สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน**

**การเกิดโฟมหรือฟอง** โปรตีนมีสมบัติในการเป็นสารเกิดฟอง เกิดจากการลดแรงตึงผิวของของเหลวเกิดการแผ่เป็นเยื่อบาง ๆ หุ้มอากาศรอบ ๆ ได้ การเกิดฟองทำให้เนื้อสัมผัสของอาหารเบา เช่น ไข่ขาว เคซีน เจลาติน ซึ่งนิยมใช้ในการผลิตขนมอบ ครีมแต่งหน้าเค้ก เนื่องจากโครงสร้างของโปรตีนมีหมู่ไฮโดรโฟบิกและไฮโดรฟิลิกจึงเกิดการดูดซับที่ผิวของอากาศและน้ำได้ การเกิดฟองของโปรตีนในสภาพธรรมชาติเกิดได้ยาก เนื่องจากมีโครงสร้างที่หนาแน่น ขนาดโมเลกุลใหญ่ จึงเกิดการถูกดูดซับที่ผิวของน้ำและอากาศมีน้อย จึงมีการปรับปรุงโดยย่อยโปรตีนเพื่อให้สามารถเกิดฟองได้ดี

ขึ้น โดยโปรตีนที่มีความสามารถในการเกิดฟองได้ดีและมีความคงตัวสูงจะต้องมีสมบัติในการละลายดี การยึดเกาะระหว่างผิวของอากาศและน้ำแน่น เกิดการคลายเกลียวและเรียงตัวได้ตลอด รับแรงอัดได้ดี หรือมีความยืดหยุ่น

**สมบัติการละลาย** โปรตีนสามารถละลายหรือแขวนลอยในน้ำได้ในสภาวะที่ค่า pH ห่างจากค่า pI เนื่องจากเป็นจุดที่โปรตีนมีประจุบวกและลบเท่ากันและเกิดการรวมตัวกัน ทำให้ความหนืดสูงขึ้น โกลบูลาโปรตีนมีการละลายสูงที่ความเป็นกรดด่าง 4.0–5.0 โปรตีนจากถั่วเหลืองมีการละลายสูงในช่วงความเป็นกรดด่าง 11-12 สารละลายเกลือความเข้มข้นต่ำ เมื่อแตกตัวจะให้ประจุลบและประจุบวก จับกับโปรตีน และช่วยให้การละลายของโปรตีนเพิ่มขึ้น ในขณะที่สารละลายเกลือความเข้มข้นสูงมีผลให้การละลายของโปรตีนต่ำลง และเกิดการตกตะกอนได้ สมบัติการละลายของโปรตีนจะวัดอยู่ในรูปดัชนีการละลายของไนโตรเจน

**สมบัติการเกิดอิมัลชั่น** สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีน เป็นความสามารถในการสารตัวกลางในการจับกับพื้นผิวของน้ำและไขมันทำให้สามารถรวมอยู่ด้วยกันได้ หรือที่เรียกว่า “อิมัลชั่น” เช่น น้ำสลัด ไอศกรีม อิมัลซิไฟเออร์ที่ดีต้องทำให้อิมัลชั่นสามารถคงตัวได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่เกิดการแยกชั้น โปรตีนมีสมบัตินี้เนื่องจากมีสมบัติในการเป็นไฮโดรโฟบิกทำให้สามารถรวมตัวกับน้ำมันได้ และไฮโดรฟิลิกทำให้รวมตัวกับน้ำได้ โดยโปรตีนที่มีกรดอะมิโนไม่มีขั้วสูงจะเกิดการรวมตัวกับไขมันได้ดี และต้องละลายน้ำได้

**สมบัติการจับกับน้ำและไขมัน** ความสามารถในการจับกับน้ำหรือความอุ้มน้ำ หมายถึงสมบัติของโปรตีนที่สามารถดูดซับน้ำโดยไม่ละลาย ซึ่งเป็นสมบัติที่มีความสำคัญในอาหารหลายชนิด เช่น ขนมปัง เนื้อสัตว์ที่ต้องการความชุ่มชื้น ส่วนความสามารถในการจับน้ำมันเป็นสมบัติที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของอาหารที่มีส่วนประกอบของน้ำมันสูง เช่น อาหารทอด โดนัท ไส้กรอก ซึ่งเมื่อมีความสามารถในการจับน้ำมันต่ำจะทำให้น้ำมันออกมาที่บริเวณผิวหน้าของอาหารได้ง่าย

**สมบัติการเกิดเจล** โปรตีนสามารถเกิดเจลได้จากการเสียสภาพธรรมชาติและเกิดการสร้างพันธะใหม่ โดยการเกิดเจลของโปรตีนแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันตามพันธะที่เชื่อมระหว่างโครงสร้างเจล เช่น การเกิดเจลด้วยพันธะไฮโดรเจนจะได้เจลแบบอ่อน สามารถย้อนกลับได้ด้วยความร้อน แต่เมื่อเกิดการครอสลิงก์ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ เจลจะไม่สามารถย้อนกลับได้ เช่น การเกิดเจลของไข่ขาวเมื่อได้รับความร้อน ในกระบวนการผลิตอาหารหลายชนิดใช้การเกิดเจลของโปรตีนในการขึ้นรูป

**การทำแห้ง**

การทำแห้งเป็นวิถีการถนอมอาหารด้วยการดึงน้ำออก โดยอาศัยหลักการลดความชื้นของอาหารด้วยหลักการระเหยน้ำออกจากเนื้ออาหารด้วยการอบแห้ง การทอด หรือการระเหิดน้ำในอาหารออกไป ซึ่งมีวัตถุประสงค์ช่วยยืดอายุการเก็บรักษา สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด เช่น รา ยีสต์ แบคทีเรีย ที่เป็นสาเหตุหลักทำให้อาหารเสื่อมเสีย ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ช่วยชะลอปฏิกิริยาต่าง ๆ ทั้งทางเคมีและทางชีวเคมีซึ่งมีน้ำเป็นส่วนร่วมและเป็นสาเหตุให้อาหารเสื่อมเสีย อาหารมีค่าวอเตอร์แอคทิวิตี้น้อยกว่า 0.6 ซึ่งเป็นระดับที่ปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรครวมทั้งยับยั้งการสร้างสารพิษของเชื้อรา เช่น Aflatoxin และยังทำให้อาหารมีน้ำหนักเบาลดปริมาตรลง สะดวกต่อการขนส่งหรือการโภค รวมถึงการนำไปเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปต่อเนื่องด้วยวิธีอื่น ๆ

**ตาราง 8 บทบาทของโปรตีนในอาหารบางชนิด**

| หน้าที่ | บทบาทของโปรตีน | ตัวอย่างอาหาร |
|---|---|---|
| **การละลาย** | Protein solvation | เครื่องดื่ม |
| **ดูดซับน้ำ** | เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลของน้ำ ทำให้น้ำถูกจับไว้ในโมเลกุลของโปรตีน | อาหารประเภทเนื้อ ไส้กรอก ขนมปังและเค้ก |
| **ความหนืด** | ทำให้ข้นหนืด และจับกับน้ำ | ซุป เกรวี สลัดครีม และขนมหวานบางชนิด |
| **การเกิดเจล** | ทำหน้าที่เป็นตัวเชื่อมแบบร่างแห | อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไส้กรอก ชีส และขนมอบ |
| **ความยืดหยุ่น** | เป็น hydrophobic bonding เช่น โปรตีนกลูเตน และเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในเจล | อาหารประเภทเนื้อ และผลิตภัณฑ์ขนมอบ |
| **การเกิดอิมัลชั่น** | ทำให้อิมัลชั่นคงตัว โดยการเกิดฟลิ้มที่ผิวรอยต่อระหว่างเฟส | ไส้กรอก ซุปและเค้ก |
| **การจับกับไขมัน** | ช่วยดูดจับไขมันอิสระด้วย hydrophobic bonding | อาหารประเภทเนื้อสัตว์ ไส้กรอก และโดนัท |
| **ตัวจับสารให้กลิ่น** | ช่วยดูดซับสารให้กลิ่นด้วย hydrophobic bonding | เนื้อเทียม และ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ |
| **ทำให้เกิดโฟม** | ห่อหุ้มฟองอากาศไว้ ช่วยให้โฟมคงตัว | ไอศกรีม วิปครีม ซิฟฟ่อน และเค้ก |

**ที่มา**: นิธิยา รัตนาปนนท์, 2545; Damodaran et al., 2008

# บทที่ 3

# วิธีดำเนินงานวิจัย

## วัตถุดิบ

ไข่น้ำแช่แข็ง จากบริษัท แอดวานซ์ กรีนฟาร์ม จำกัด

## เอนไซม์

**1. เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช** จากบริษัท แวลู อินดัสเตรียล โปรดักส์ จำกัด

เพคติเนส กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 20,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดสรรจากการหมักแบบ liquid submerged มีแอกติวีตีของ Esterase Hydrolases และ Lyases สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 3.5 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณแนะนำร้อยละ 0.01-0.05 ต่อวัตถุดิบ

เซลลูเลส กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 20,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลิตจากเชื้อรา *Trichoderma reesi* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณแนะนำร้อยละ 0.01-0.1 ต่อวัตถุดิบ

ไซลาเนส กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 20,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ผลิตจากสายพันธุ์ที่คัดสรรจากการหมักแบบ Liquid submerged สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 5.0 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ปริมาณแนะนำร้อยละ 0.01-0.05 ต่อวัตถุดิบ

**2. เอนไซม์โปรติเอสย่อยโปรตีน** จาก Xingtai Sinobest Biotech Co., Ltd.

อัลคาเลส กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 100,000 ถึง 400,000 ยูนิตต่อกรัม ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 7.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

ฟลาโวไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ เท่ากับ 60,000 ยูนิตต่อกรัม ผลิตจาก *Aspergillus oryzae* สภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

## สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

1. Sodium hydroxide, AR grade, RCI Labscan, Australia
2. Folin-ciocalteu, AR grade, Fluka, Germany
3. Sodium carbonate, AR grade, RCI Labscan, Australia

4. Gallic acid, AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
5. Sodium nitrite, AR grade, RCI Labscan, Australia
6. Aluminiumchloride, AR grade, RCI Labscan, Australia
7. Quercertin, AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
8. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
9. Methanol, AR grade, RCI Labscan, Australia
10. Sodium acetate, AR grade, RCI Labscan, Australia
11. Acetic acid glacial, AR grade, RCI Labscan, Australia
12. 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ), AR grade, Sigma-Aldrich
13. Hydrogen chloride, AR grade, RCI Labscan, Australia
14. Ferric chlorside, AR grade, RCI Labscan, Australia
15. Potassium persulphate, AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
16. Ethanol, AR grade, RCI Labscan, Australia
17. 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Tolox), AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
18. Potassium dihydrogen phosphate, AR grade, Sigma-Aldrich, Germany
19. Acetone, AR grade, RCI Labscan, Australia
20. Sulfuric acid, AR grade, RCI Labscan, Australia
21. Boric acid, AR grade, RCI Labscan, Australia
22. Petroleum ether, AR grade, RCI Labscan, Australia
23. Potassium hydroxide, AR grade, RCI Labscan, Australia
24. Dichloran Rose Bengal Chloramphenical Agar (DRBC), Merck, Germany
25. Plate count agar, Merck, Germany
26. Peptone water, Merck, Germany

**อุปกรณ์และเครื่องเมือที่ใช้ในการทำวิจัย**

1. เครื่องชั่ง ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius, ED2244S, Japan)
2. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดย pH meter (Model: LAQUAtwin-pH-11, LAQUAtwin-pH-22, LAQUAtwin-pH-33, Japan)
3. เครื่องวัดสี (Hunter Lab, DP 9000, Champaign city)
4. เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (Gerhardt, SOX 414, Germany)

5. เครื่องวิเคราะห์โปรตีน (Gerhardt, VAP 500 Carousel, Germany)

6. เครื่องวิเคราะห์เยื่อใย (LABCONCO, 266853, Missouri)

7. เครื่องวิเคราะห์เถ้า (Fisher, 10-650-126, San Jose, California)

8. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Metash, no: Al1807005, Shanghai)

9. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Cryste, model: VARISPIN15, Korea)

10. ตู้อบลมร้อน (JSR, AC110/220V, Korea)

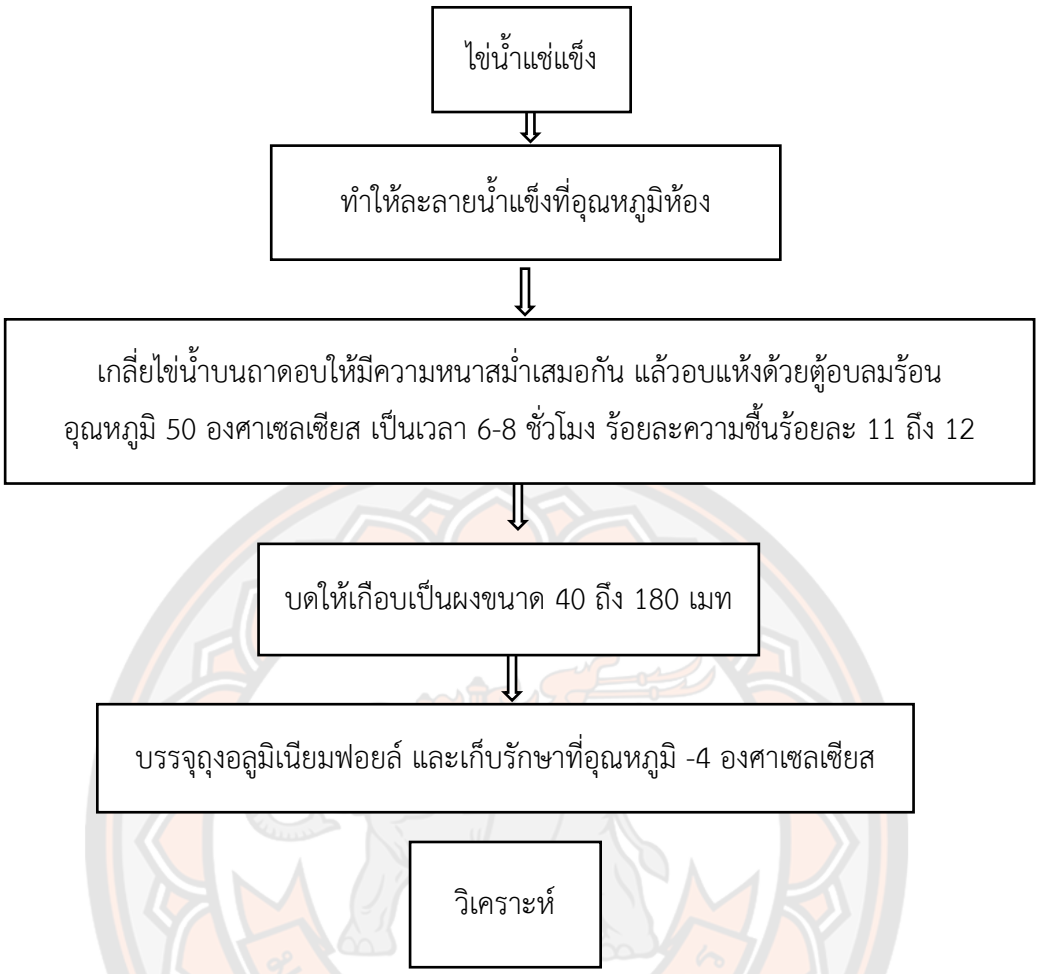
11. เครื่องอัลตราโซนิกแบบอ่าง (Elma Schmidbauer GmbH, Gottlleb-Daimler-Str.17/D-78224 Singen, Elmasonic S30H, 50/60 Hz, 280W, Germany )

12. เครื่องบดละเอียดขนาดกลาง (DXFILL MACHINE : DXM-2000;220V;3800W, China)

**ขั้นตอนและวิธีการดำเนินวิจัย**

**1. ศึกษากระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์**

นำไข่น้ำแช่แข็ง 30 กิโลกรัม ถูกบรรจุในถุงไฮเดน ถุงละ 1-2 กิโลกรัม และบรรจุใส่กล่องกระดาษลูกฟูก ขนาด 40x50x30 เซนติเมตร ขนส่งแบบควบคุมอุณหภูมิ -15 องศาเซลเซียส จากบริษัท แอดวานซ์ กรีนฟาร์ม จำกัด จากนั้นทำให้ละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง เมื่อน้ำแข็งละลายจนหมดนำมาเกลี่ยบนถาดอบให้มีความหนาสม่ำเสมอกันแล้วอบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง ความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 11 ถึง 12 ไข่น้ำที่ผ่านการอบแห้งมีลักษณะเป็นแผ่นแห้งจะต้องนำมาผ่านการบดเกือบเป็นผงขนาด 40 ถึง 180 เมท บรรจุตัวอย่างหลังบดด้วยถุงอลูมิเนียมฟอยล์และเก็บรักษาไข่น้ำผงที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไป




**ภาพ 11 แผนภาพการศึกษากระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์**

**2. การวิเคราะห์**

1. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

1.1 ดัชนีการละลายน้ำและดัชนีการดูดซับน้ำ ตามวิธีของ Anderson et al., 1969

1.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชันดัดแปลงจากวิธีของ Pearce, & Kinsella, 1978

1.3 ความสามารถการเกิดโฟม ดัดแปลงจาก Sze-Tao and Sathe, 2000

1.4 วิเคราะห์ค่าสี (L* a* b*) Hunter lab ดัดแปลงจากวิธีของ Valencia rodriguez et al., 2003

1.5 วิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด ดัดแปลงจากวิธีของตุลวิทย์ สถาปนจารุ และคณะ, 2555

2. ศึกษาสมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ

2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

2.1.1 ความชื้น จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.2 ไขมัน จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.3 โปรตีน จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.4 เยื่อใย จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.5 เถ้า จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.6 คาร์โบไฮเดรต [คำนวณจาก 100–(ความชื้น+ไขมัน+โปรตีน+เถ้า)]

2.2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand et al., 1955

2.2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) จากวิธีของ Benzie, & Strain, 1996

2.2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ดัดแปลงจากวิธีของ Dinisetal, 1994

2.2.4 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu method และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม จากวิธีของ Gong et al., 2012

2.2.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Pourmorad et al., 2006

2.2.6 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและปริมาณคลอโรฟิล ดัดแปลงจากวิธีของ Borowitzka, 1988

2.2.7 ปริมาณแทนนินทั้งหมด จากวิธีของ Hou et al., 2003

3. ศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา

3.1 จำนวนจุลชีวะทั้งหมด จากวิธีของ FDA BAM, 2001

3.2 จำนวนยีสต์และราทั้งหมด จากวิธีของ FDA BAM, 2001

4. ปริมาณกรดอะมิโน ด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี ดัดแปลงจากวิธีของ Alireza et al., 2020 *อ้างอิงจากมาตรฐานอาหาร FAO/WHO

**3. ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์**

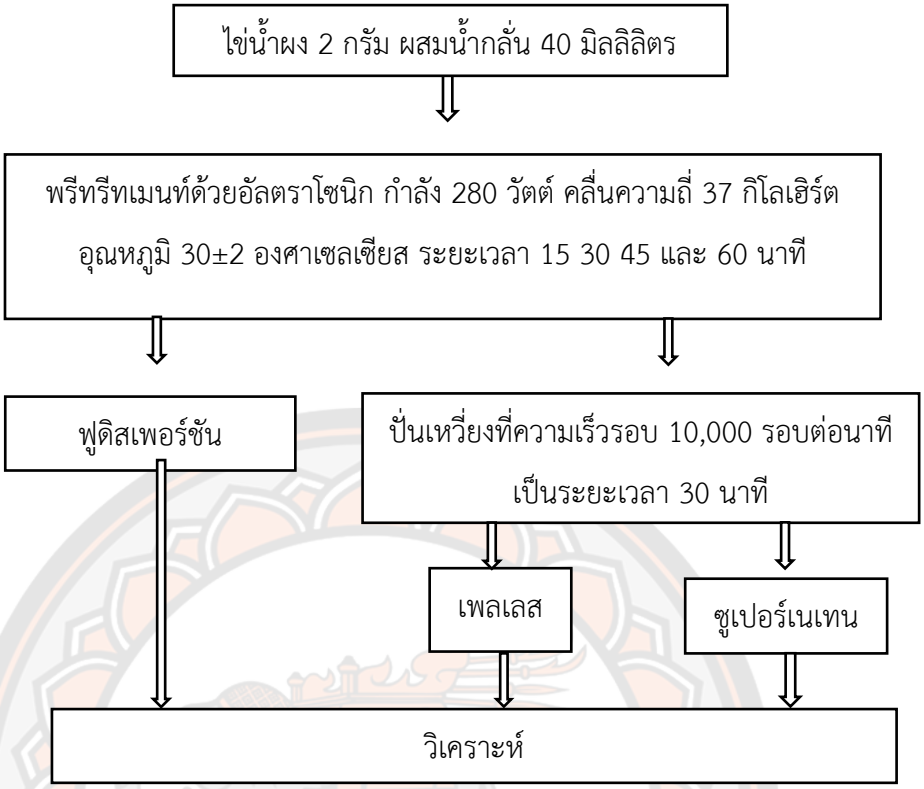
3.1 ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ก่อนการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก การศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ โดยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชเป็นกระบวนการที่ช่วยปรับสภาพเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการสกัดสารสกัดจากไข่น้ำในกระบวนการโปรตีโอไลซิสเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม โดยมีวิธีการดังนี้

ชั่งไข่น้ำผง 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน สำหรับตัวอย่างควบคุมให้อุณหภูมิและกวนส่วนผสมด้วยเตาแม่เหล็กไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที และนำมาทำปรับสภาพผนังเซลล์ไข่น้ำ โดยใช้ความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต กำลัง 280 วัตต์ ที่อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการให้คลื่น 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 30 นาที จะได้ตัวอย่างเพลเลส ฟูดิสเพอร์ชัน และซูเปอร์เนเทน นำมาวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสภาวะที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในสารสกัดไข่น้ำ

**ตาราง 9 แผนการทดลองศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | กำลัง (วัตต์) | ความถี่ (กิโลเฮิร์ต) | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) |
|---|---|---|---|---|
| ตัวอย่างควบคุม | - | - | 30±2 | 60 |
| 2 | 280 | 37 | 30±2 | 15 |
| 3 | 280 | 37 | 30±2 | 30 |
| 4 | 280 | 37 | 30±2 | 45 |
| 5 | 280 | 37 | 30±2 | 60 |

ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์




**ภาพ 12 แผนภาพการศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

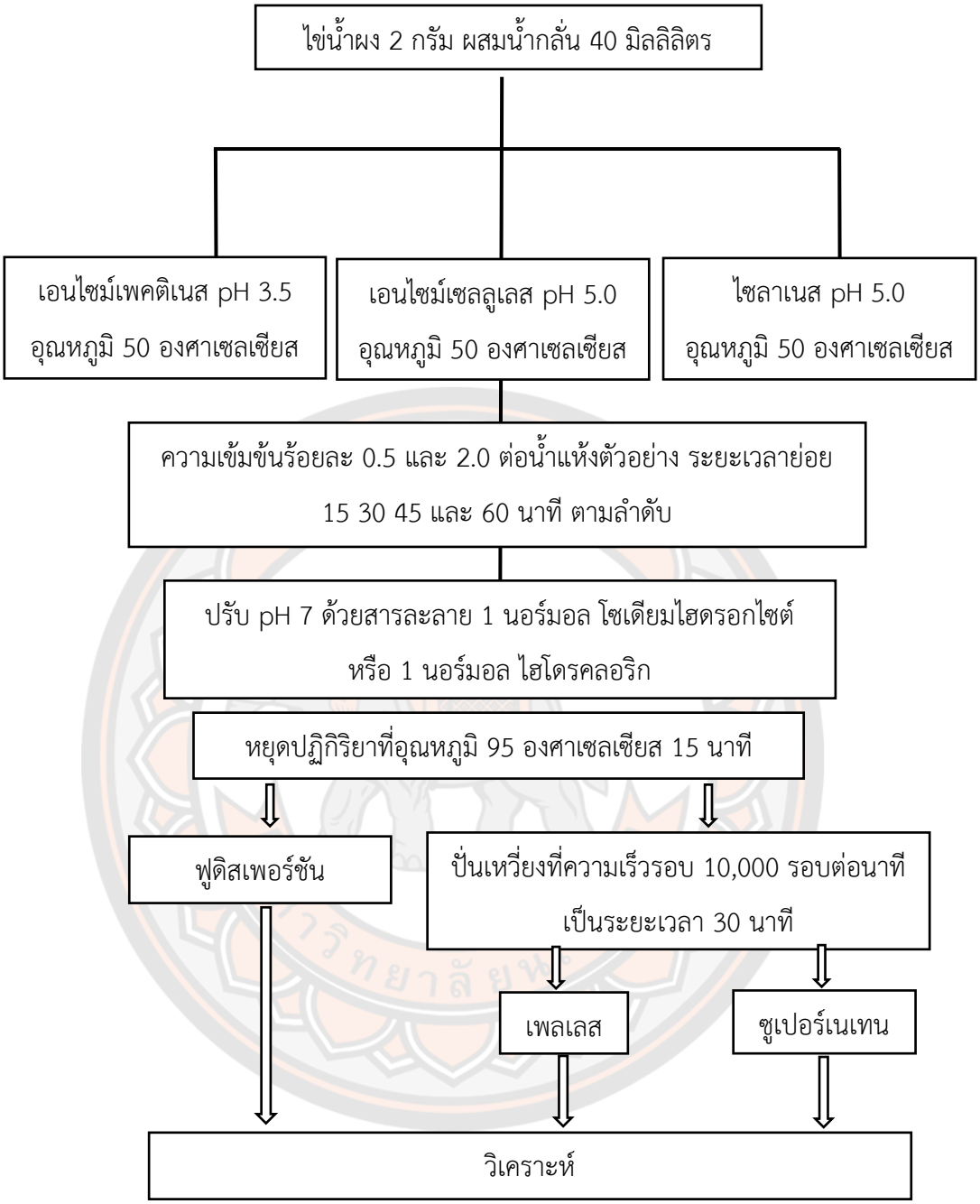
3.2 ศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ก่อนการสกัดด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

ไข่น้ำผง 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับสภาพผนังเซลล์ของไข่น้ำด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เพคติเนส มีสภาวะการทำงานที่ pH 3.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์เซลลูเลส มีสภาวะการทำงานที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ไซลาเนส มีสภาวะการทำงานที่ pH 5.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.5 (กิจกรรมเอนไซม์ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และ 2.0 (กิจกรรมเอนไซม์400 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที จากนั้นปรับ pH 7 ด้วยสารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล ไฮโดรคลอริก และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที จะได้ตัวอย่างเพลเลส ฟูดิสเพอร์ชัน และซูเปอร์เนเทน นำมาวิเคราะห์โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสภาวะที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในสารสกัดไข่น้ำ

**ตาราง 10 แผนการทดลองศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | pH | เวลา (นาที) | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เอนไซม์ |
|---|---|---|---|---|---|
| ตัวอย่างควบคุม | 30±2 | - | 60 | - | - |
| 1 | 50 | 3.5 | 15 | 0.5 | เพคติเนส |
| 2 | 50 | 3.5 | 15 | 2.0 | เพคติเนส |
| 3 | 50 | 3.5 | 30 | 0.5 | เพคติเนส |
| 4 | 50 | 3.5 | 30 | 2.0 | เพคติเนส |
| 5 | 50 | 3.5 | 45 | 0.5 | เพคติเนส |
| 6 | 50 | 3.5 | 45 | 2.0 | เพคติเนส |
| 7 | 50 | 3.5 | 60 | 0.5 | เพคติเนส |
| 8 | 50 | 3.5 | 60 | 2.0 | เพคติเนส |
| 9 | 50 | 5.0 | 15 | 0.5 | เซลลูเลส |
| 10 | 50 | 5.0 | 15 | 2.0 | เซลลูเลส |
| 11 | 50 | 5.0 | 30 | 0.5 | เซลลูเลส |
| 12 | 50 | 5.0 | 30 | 2.0 | เซลลูเลส |
| 13 | 50 | 5.0 | 45 | 0.5 | เซลลูเลส |
| 14 | 50 | 5.0 | 45 | 2.0 | เซลลูเลส |
| 15 | 50 | 5.0 | 60 | 0.5 | เซลลูเลส |
| 16 | 50 | 5.0 | 60 | 2.0 | เซลลูเลส |
| 17 | 50 | 5.0 | 15 | 0.5 | ไซลาเนส |
| 18 | 50 | 5.0 | 15 | 2.0 | ไซลาเนส |
| 19 | 50 | 5.0 | 30 | 0.5 | ไซลาเนส |
| 20 | 50 | 5.0 | 30 | 2.0 | ไซลาเนส |
| 21 | 50 | 5.0 | 45 | 0.5 | ไซลาเนส |
| 22 | 50 | 5.0 | 45 | 2.0 | ไซลาเนส |
| 23 | 50 | 5.0 | 60 | 0.5 | ไซลาเนส |
| 24 | 50 | 5.0 | 60 | 2.0 | ไซลาเนส |

ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์




**ภาพ 13 แผนภาพศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

3.3 ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช

ไข่น้ำผง 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาปรับสภาพผนังเซลล์โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต กำลัง 280 วัตต์ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ตามระยะเวลาที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.5.3.1 ก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส และไซลาเนส ตามลำดับ ที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.5.3.2 และไข่น้ำผง 2 กรัม ผสมน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำมาทำลายผนังเซลล์โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกที่คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต กำลัง 280 วัตต์ ร่วมกับการย่อยด้วย เอนไซม์เพคติเนส เซลลูเลส และไซลาเนส ตามลำดับที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.5.3.2 จากนั้นปรับ pH 7 ด้วยสารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซต์ หรือ 1 นอร์มอล ไฮโดรคลอริก และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 30 นาที จะได้ตัวอย่างเพลเลส ฟูดิสเพอร์ชัน และซูเปอร์เนเทน นำมาวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสภาวะที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพสูงสุดในสารสกัดไข่น้ำ เพื่อศึกษาต่อในกระบวนการโปรตีโอไลซิส

**ตาราง 11 แผนการทดลองศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | กำลัง (วัตต์) | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | pH | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | เวลา (นาที) | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เอนไซม์ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 280 | 30±2 | * | 3.5 | 50 | ,, | ,, | เพคติเนส |
| 2 | 280 | 30±2 | * | 5.0 | 50 | ,, | ,, | เซลลูเลส |
| 3 | 280 | 30±2 | * | 5.0 | 50 | ,, | ,, | ไซลาเนส |
| 4 | 280 | - | - | 3.5 | 50 | ,, | ,, | เพคติเนส |
| 5 | 280 | - | - | 5.0 | 50 | ,, | ,, | เซลลูเลส |
| 6 | 280 | - | - | 5.0 | 50 | ,, | ,, | ไซลาเนส |

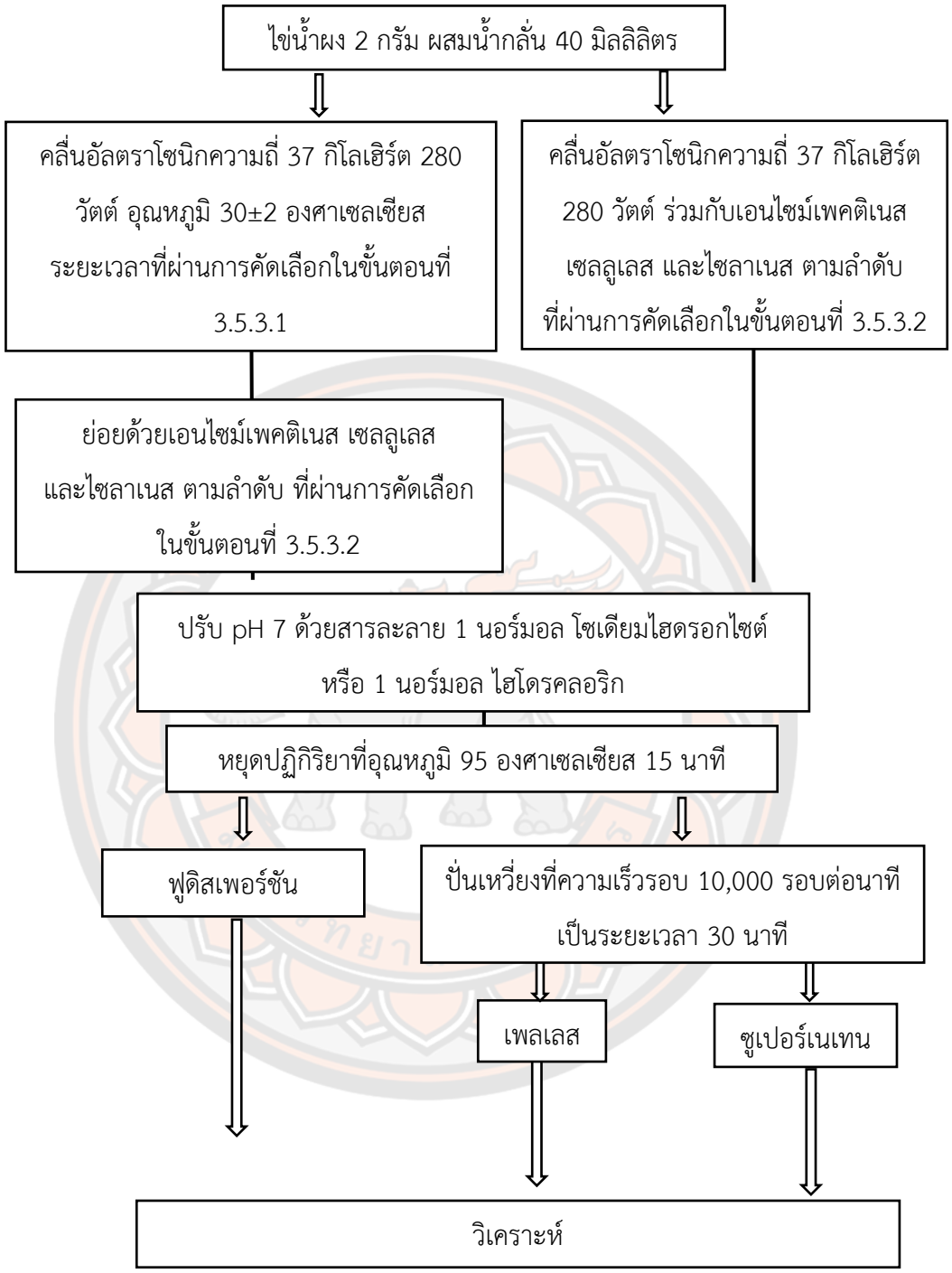
**หมายเหตุ:** ลำดับที่ 1 2 และ 3 คือ กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนนำมาพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

ลำดับที่ 4 5 และ 6 คือ กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

เครื่องหมาย * คือ ระยะเวลาที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.5.3.1

เครื่องหมาย ,, คือ ระยะเวลาและความเข้มข้นที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 3.5.3.2

เครื่องหมาย – คือ ไม่มีการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนนำมาพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช




**ภาพ 14 แผนภาพการทดลองผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์พืช**

**4. การวิเคราะห์**

1. ศึกษาสมบัติทางเคมี

โปรตีน จากวิธีของ AOAC, 2000

2. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand et al., 1955

2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) จากวิธีของ Benzie and Strain, 1996

2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ดัดแปลงจากวิธีของ Dinisetal, 1994

3. ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิค ทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม จากวิธีของ Gong et al., 2012)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design , CRD) สำหรับขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก และการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

วางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (factorial experiments in RCBD) สำหรับการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA และDuncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

**ศึกษาผลกระบวนการโปรตีโอไลซิส**

นำตัวอย่างที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.5.3.3 ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์อัลคาเลส สภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.5 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ สภาวะการทำงานที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6.5 ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.5 (กิจกรรมเอนไซม์อัลคาเลส 2,000 ยูนิตต่อกรัม และฟลาโวไซม์ 300 ยูนิตต่อกรัม) และ 2.0 (กิจกรรมเอนไซม์อัลคาเลส 8,000 ยูนิตต่อกรัม และฟลาโวไซม์ 1,200 ยูนิตต่อกรัม) ต่อน้ำหนักโปรตีน ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นปรับ pH 7 ด้วยสารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล ไฮโดรคลอริก และหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ เป็นเวลา 30 นาที จะได้ตัวอย่างเพลเลส ฟูดิสเพอร์ชัน และซูเปอร์เนเทน นำมาวิเคราะห์ โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกสภาวะที่ช่วยเพิ่ม

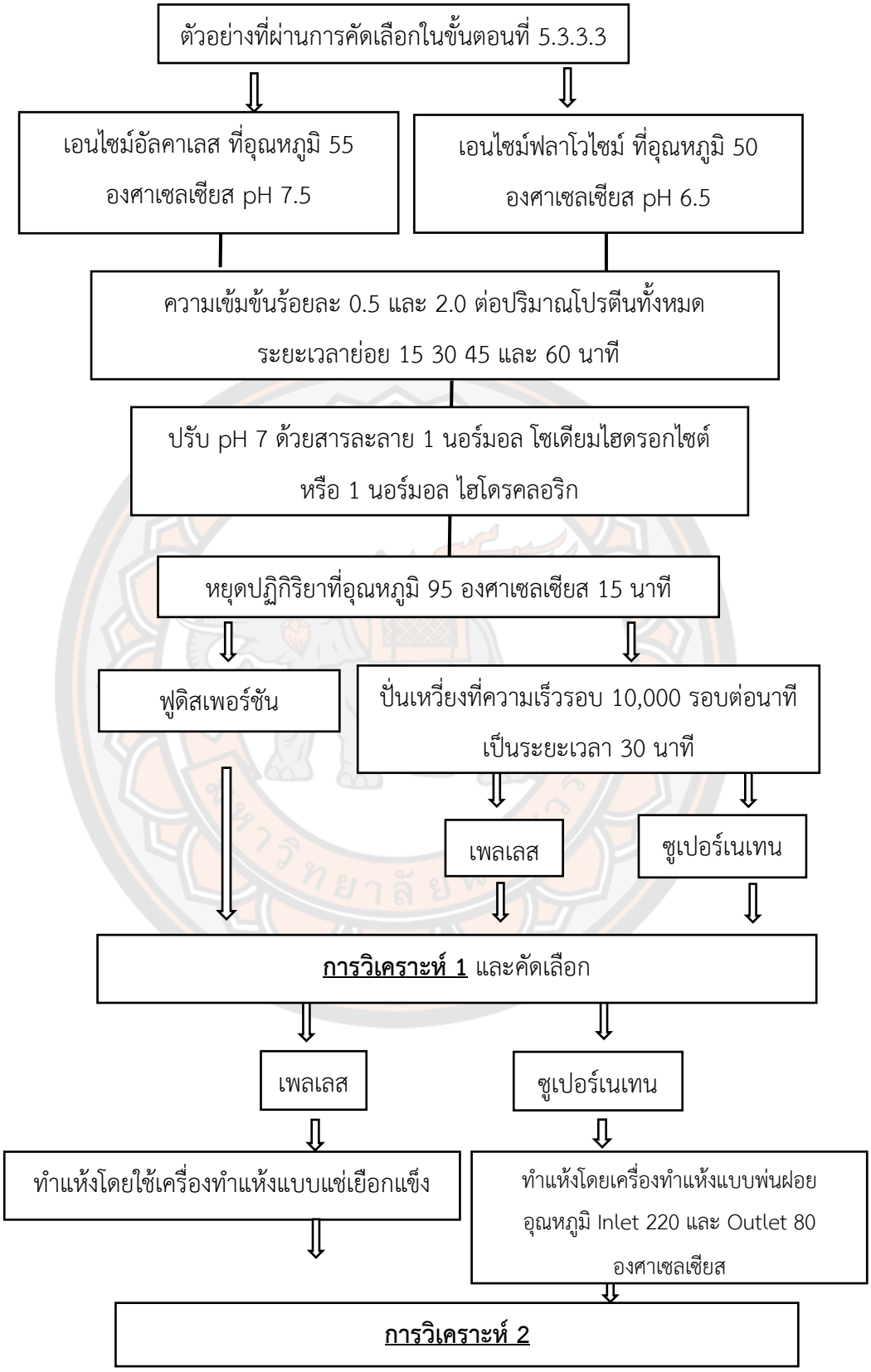
ประสิทธิภาพสูงสุดในสารสกัดไข่น้ำ และคัดเลือกตัวอย่างเพลเลสทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และซูเปอร์เนเทนทำแห้งแบบพ่นฝอยด้วยการใช้สารละลายมัลโตเดร็กตินต่อปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารสกัด เพื่อช่วยในการจับตัวเป็นผง จากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการแห้งมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ สมบัติเชิงหน้าที่ และกิจกรรมทางชีวภาพ

**ตาราง 12 แผนการทดลองศึกษาผลกระบวนการโปรตีโอไลซิส**

| ลำดับ | อัลตราโซนิก | เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช | อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) | pH | เวลา (นาที) | ร้อยละความเข้มข้น (ต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด) | เอนไซม์โปรติเอส |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | - | - | - | - | - | - | ตัวอย่างควบคุม |
| 2 | P | P | 55 | 7.5 | 15 | 0.5 | อัลคาเลส |
| 3 | P | P | 55 | 7.5 | 15 | 2.0 | อัลคาเลส |
| 4 | P | P | 55 | 7.5 | 30 | 0.5 | อัลคาเลส |
| 5 | P | P | 55 | 7.57 | 30 | 2.0 | อัลคาเลส |
| 6 | P | P | 55 | .5 | 45 | 0.5 | อัลคาเลส |
| 7 | P | P | 55 | 7.5 | 45 | 2.0 | อัลคาเลส |
| 8 | P | P | 55 | 7.5 | 60 | 0.5 | อัลคาเลส |
| 9 | P | P | 55 | 7.5 | 60 | 2.0 | อัลคาเลส |
| 10 | P | P | 50 | 6.5 | 15 | 0.5 | ฟลาโวไซม์ |
| 11 | P | P | 50 | 6.5 | 15 | 2.0 | ฟลาโวไซม์ |
| 12 | P | P | 50 | 6.5 | 30 | 0.5 | ฟลาโวไซม์ |
| 13 | P | P | 50 | 6.5 | 30 | 2.0 | ฟลาโวไซม์ |
| 14 | P | P | 50 | 6.5 | 45 | 0.5 | ฟลาโวไซม์ |
| 15 | P | P | 50 | 6.5 | 45 | 2.0 | ฟลาโวไซม์ |
| 16 | P | P | 50 | 6.5 | 60 | 0.5 | ฟลาโวไซม์ |
| 17 | P | P | 50 | 6.5 | 60 | 2.0 | ฟลาโวไซม์ |

ตัวอักษรย่อ P คือ สภาวะการพรีทรีทเมนท์ที่คัดเลือกจากขั้นตอนที่ 5.3.3.3

ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส




**ภาพ 15 แผนภาพการศึกษากระบวนการพรีทรีทเมนท์ก่อนการโปรตีโอไลซิส**

**1. การวิเคราะห์ 1**

1. ศึกษาสมบัติทางเคมี

โปรตีน จากวิธีของ AOAC, 2000

2. กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand et al., 1955

2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) จากวิธีของ Benzie and Strain, 1996

2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ดัดแปลงจากวิธีของ Dinisetal, 1994

3. ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิค ทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม จากวิธีของ Gong et al., 2012

4. ระดับการย่อยสลาย จากวิธีของ Nielsen et al., 2001

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (factorial experiments in RCBD) สำหรับขั้นตอนการโปรติโอไลซิส วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® statics version 25

**2. การวิเคราะห์ 2**

1. ศึกษาสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

1.1 ดัชนีการละลายน้ำและดัชนีการดูดซับน้ำ จากวิธีของ Anderson et al., 1969

1.2 ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และการวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน ดัดแปลงจากวิธีของ Pearce and Kinsella, 1978

1.3 ความสามารถการเกิดโฟม ดัดแปลงจากวิธีของ Sze-Tao and Sathe, 2000

1.4 วิเคราะห์ค่าสี (L* a* b*) Hunter lab ดัดแปลงจากวิธีของ Valencia rodriguez et al., 2003

2. ศึกษาสมบัติทางเคมีและกิจกรรมทางชีวภาพ

2.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

2.1.1 ความชื้น จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.2 ไขมัน จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.3 โปรตีน จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.4 เยื่อใย จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.5 เถ้า จากวิธีของ AOAC, 2000

2.1.6 คาร์โบไฮเดรต [คำนวณจาก 100–(ความชื้น+ไขมัน+โปรตีน+เถ้า)]

2.2 กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

2.2.1 ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันด้วยวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay) ดัดแปลงจากวิธีของ Brand et al., 1955

2.2.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay) จากวิธีของ Benzie, & Strain, 1996

2.2.3 ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ดัดแปลงจากวิธีของ Dinisetal, 1994

2.2.4 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด โดยวิธี Folin-Ciocalteu และคำนวณหาปริมาณฟีนอลิคทั้งหมดในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม จากวิธีของ Gong et al., 2012

2.2.5 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ดัดแปลงจากวิธีของ Pourmorad et al., 2006

2.2.6 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมดและปริมาณคลอโรฟิล ดัดแปลงจากวิธีของ Borowitzka, 1988

2.2.7 ปริมาณแทนนินทั้งหมด จากวิธีของ Hou et al., 2003

3. ศึกษาสมบัติจุลชีววิทยา

3.1 จำนวนจุลชีวะทั้งหมด จากวิธีของ FDA BAM, 2001

3.2 จำนวนยีสต์และราทั้งหมด จากวิธีของ FDA BAM, 2001

4. ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี ดัดแปลงจากวิธีของ Alireza et al., 2020

*อ้างอิงจากมาตรฐานอาหาร FAO/WHO

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Completely Randomized Design , CRD) วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA และ Duncan's new multiple range test ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

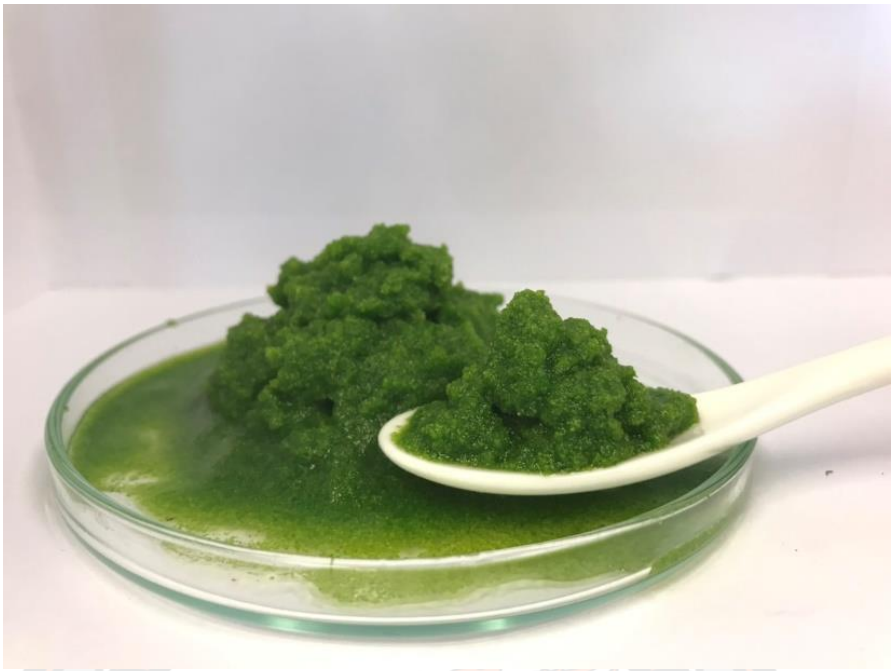
# บทที่ 4

## ผลการทดลอง

**ผลการทดลองกระบวนการเตรียมไข่น้ำผงและการวิเคราะห์**

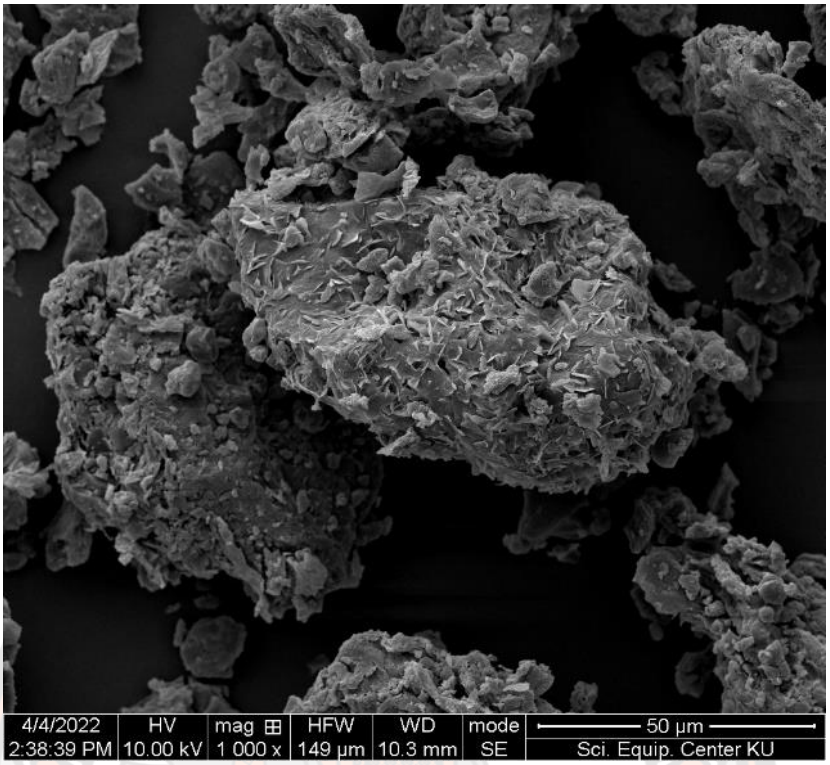
ลักษณะของไข่น้ำแช่แข็งก่อนการอบด้วยเครื่องอบลมร้อนมีการจับตัวเป็นก้อนและมีสีเขียวอ่อนหรือเขียวสด (ภาพที่16) ทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ไข่น้ำที่คลายตัวมีปริมาณน้ำเพิ่มขึ้นและมีสีเขียวเข้ม (ภาพที่17) เมื่อนำไปอบด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง และนำมาบดเกือบเป็นผงมีขนาด 40 ถึง 180 เมท ไม่ผ่านการร่อนด้วยตะแกรง เนื่องจากต้นทุนวัตถุดิบมีราคาสูงและดูดซับน้ำปริมาณสูงจาก 30 กิโลกรัมน้ำหนักเปียกผ่านการทำให้แห้งเหลือเท่ากับ 1 กิโลกรัมน้ำหนักแห้ง ประกอบด้วยไข่น้ำมีขนาดที่เล็ก 0.5 ถึง 1.5 มิลลิเมตร (นิศานาถ และคณะ, 2549) โดยผงไข่น้ำมีลักษณะสีเขียวคล้ำ (ภาพที่18) ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000x พบลักษณะภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์มีความหนาไม่เท่ากันตลอดและมีรูสำหรับสารต่าง ๆ เคลื่อนผ่านในผนังเซลล์ชั้นที่สองมีลักษณะเป็นรูปิด (ภาพที่19) ปริมาณความชื้นมีค่าเท่ากับร้อยละ 11.44±0.00 ค่าความสว่าง $L^*$ เท่ากับ 36.91±0.00 ค่า $a^*$ เท่ากับ -1.69±0.02 มีค่าไปทางด้านสีเขียว และค่า $b^*$ เท่ากับ 8.02±0.02 มีค่าไปทางด้านสีเหลือง

**ภาพ 16 ลักษณะไข่น้ำแช่แข็งจากบริษัท แอดวานซ์ กรีนฟาร์ม จำกัด**



ภาพ 17 ลักษณะไข่น้ำหลังการละลายที่อุณหภูมิห้อง (29 องศาเซลเซียส)

ภาพ 18 ลักษณะไข่น้ำแห้งผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
เวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง ความชื้นร้อยละ 11.44 และบดเกือบเป็นผง ขนาด 40 ถึง 180 เมท




**ภาพ 19 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำแห้งบดเกือบเป็นผง วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X**

องค์ประกอบทางเคมีโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำ พบปริมาณโปรตีน ร้อยละ 44.00±0.43 ไขมัน ร้อยละ 8.39±0.12 คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 37.31±1.43 เยื่อใย ร้อยละ 1.04±0.11 และเถ้า ร้อยละ 8.20±0.04 (ตาราง 13) สอดคล้องกับรายงานกองโภชนาการ, 2544 พบว่าคุณค่าทางโภชนาการโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำมีโปรตีนร้อยละ 6.80-45.00 ซึ่งไข่น้ำปริมาณโปรตีนโดยน้ำหนักแห้งสูงเทียบเท่ากับถั่วและธัญพืช (Klaus-J et al., 2018) สมบัติทางเชิงหน้าที่ของไข่น้ำมีความสามารถในการละลายน้ำ ร้อยละ 12.53±0.31 ความสามารถในการดูดซับน้ำ ร้อยละ 5.21±0.06 ความสามารถการเป็นอิมัลชัน ร้อยละ 6.23±0.13 เสถียรภาพของอิมัลชัน 10.1±0.09 ความสามารถการเกิดโฟม 6.38±0.12 และไม่มีเกิดความคงตัวของโฟม ปริมาณความชื้น ร้อยละ 11.44±0.00 และปริมาณน้ำอิสระ ร้อยละ 0.61±0.00 (ตาราง 14) ทั้งนี้การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชน้ำแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี พื้นที่เพาะปลูก ฤดูกาลการเพาะปลูก รวมถึงการเก็บเกี่ยว (M. Garcia-Vaquero et al., 2017)

**ตาราง 13 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของไข่น้ำอบแห้ง**

| สมบัติทางเคมี | ไข่น้ำ (ร้อยละ) |
|---|---|
| โปรตีน | 44.00±0.43 |
| ไขมัน | 8.39±0.12 |
| เยื่อใย | 1.04±0.11 |
| เถ้า | 8.20±0.04 |
| คาร์โบไฮเดรต | 37.31±1.43 |

**ตาราง 14 การทดลองสมบัติทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของไข่น้ำอบแห้ง**

| การทดสอบ | ไข่น้ำ |
|---|---|
| ความสามารถในการละลายน้ำ (ร้อยละ) | 12.53±0.31 |
| ดัชนีการดูดซับน้ำ (ร้อยละ) | 5.21±0.06 |
| ความสามารถในการเป็นอิมัลชัน (ร้อยละ) | 6.23±0.13 |
| เสถียรภาพของอิมัลชัน (ร้อยละ) | 10.1±0.09 |
| ความสามารถการเกิดโฟม (ร้อยละ) | 6.38±0.12 |
| ความคงตัวของโฟม (ร้อยละ) | 0.00±0.00 |
| ค่าสี *L** | 36.91±0.00 |
| *a** | -1.69±0.02 |
| *b** | 8.02±0.02 |
| ค่าความชื้น (ร้อยละ) | 11.44±0.00 |
| ปริมาณน้ำอิสระ (ร้อยละ) | 0.61±0.00 |

**ตาราง 15 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมทางชีวภาพของไข่น้ำอบแห้ง**

| **การทดสอบโดยน้ำหนักแห้ง** | **ไข่น้ำ** |
|---|---|
| ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม) | 7.11±0.04 |
| การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($IC_{50}$) (มิลลิกรัมต่อกรัม) | 24.26±0.33 |
| ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก (ร้อยละ) | 8.72±0.30 |
| ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP (มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม) | 14.31±0.02 |
| ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของเคอเซตินต่อกรัม) | 0.00±0.00 |
| ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 7.15±0.17 |
| ปริมาณคลอโรฟิลเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 17.75±0.78 |
| ปริมาณแทนนินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัม) | 48.89±0.14 |
| จำนวนยีสต์และราทั้งหมด (CFU/ml) | TNTC |
| จำนวนจุลชีวะทั้งหมด (CFU/ml) | TNTC |

**หมายเหตุ:** TNTC หมายถึง Too numerous to count หรือ มีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนี CFU/ml หมายถึง Colony forming unit/milliliter

ผลกิจกรรมทางชีวภาพโดยน้ำหนักแห้งของไข่น้ำ พบว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC50) เท่ากับ 24.26±0.33 มิลลิกรัมต่อกรัม ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชัน ด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 14.31±0.02 มิลลิกรัมต่อกรัม ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก เท่ากับร้อยละ 8.72±0.30 ปริมาณสารฟีนอลิคทั้งหมด เท่ากับ 7.1±0.04 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 0.00±0.00 มิลลิกรัมสมมูลของเคอเซตินต่อกรัม ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด เท่ากับ 7.2±0.17 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลเอ เท่ากับ 17.8±0.78 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณแทนนินทั้งหมด เท่ากับ 49.0±0.14 มิลลิกรัมต่อกรัม (ตาราง 15) มีโปรไฟล์ของกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็น 20 ชนิด (ตาราง 16) ซึ่งพบชนิดที่ใกล้เคียงกับรายงานวิจัยของ Appenroth et al., 2018 พบว่าไข่น้ำมี

ปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด จำนวนจุลชีวะทั้งหมดและจำนวนยีสต์ รา ทั้งหมด มีมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนี (ตาราง 15)

**ตาราง 16 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของไข่น้ำอบแห้ง (วัตถุดิบเริ่มต้น)**

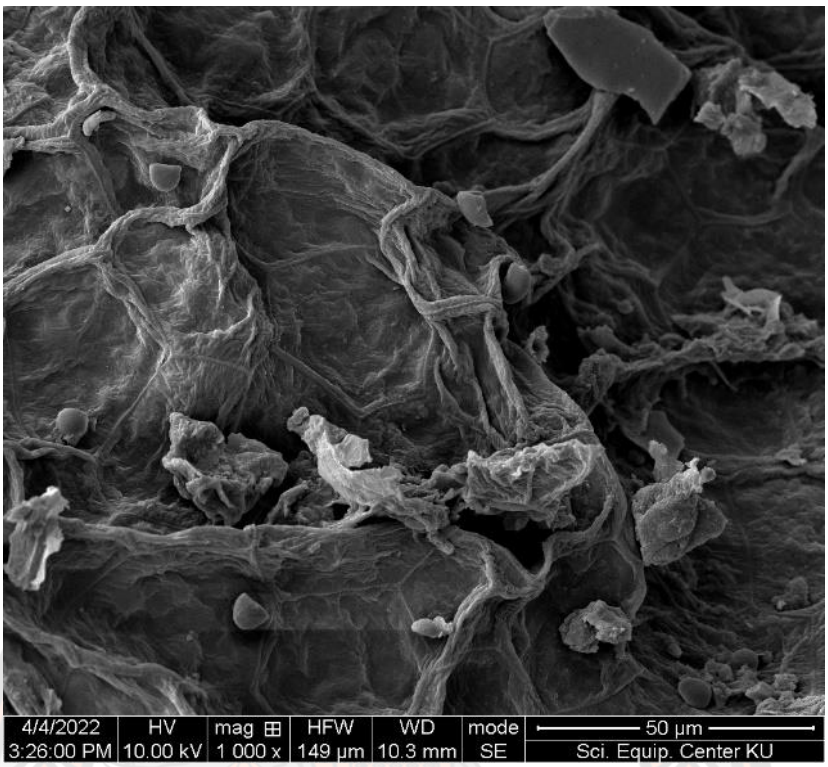
| **กรดอะมิโน** มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม | **ไข่น้ำอบแห้ง** |
|---|---|
| **กรดอะมิโนจำเป็น** | |
| Histidine | 1,635 |
| Isoleucine | 2,308 |
| Leucine | 3,386 |
| Lysine | 2,399 |
| Methionine | 379 |
| Phenylalanine | 4,599 |
| Valine | 2,155 |
| **กรดอะมิโนไม่จำเป็น** | |
| Alanine | 1,941 |
| Aspartic acid | 3,289 |
| Cystine | 536 |
| Glutamic acid | 2,712 |
| Glycine | 1,388 |
| Hydroxylysine | <20 |
| Hydroxyproline | <20 |
| Proline | 1,611 |
| Serine | 498 |
| Threonine | 341 |
| Tpytophan | 57 |
| Tyrosine | 2,869 |

**ผลของกระบวนการใช้คลื่นอัลตราโซนิก**

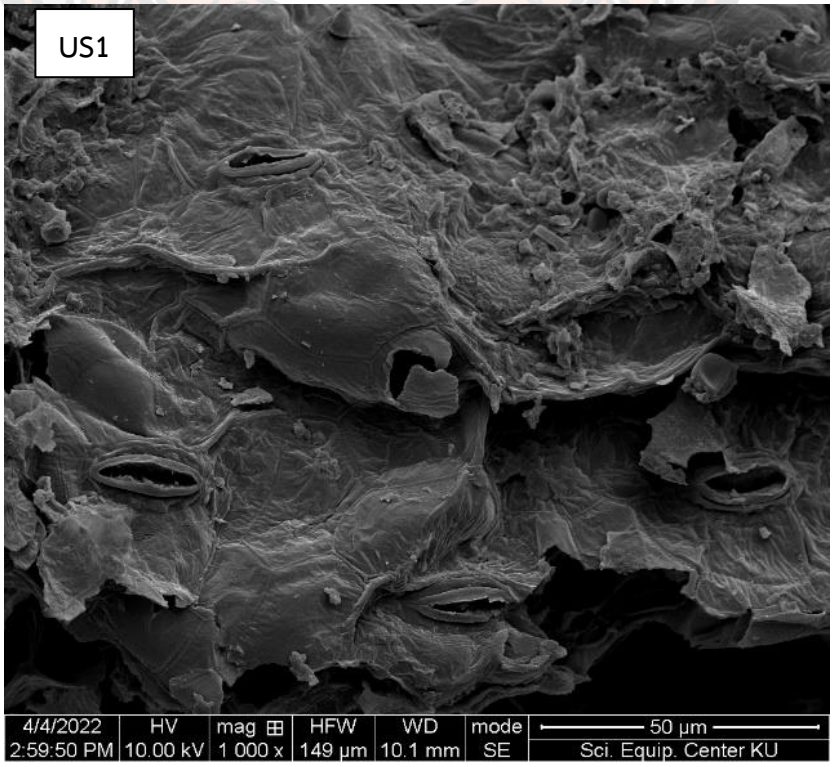
ผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก พบว่า กระบวนการทำลายผนังเซลล์โดยใช้อัลตราโซนิกแบบอ่าง กำลัง 280 วัตต์ คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิห้องของประเทศไทยในระหว่างการศึกษาอยู่ที่ 29 องศาเซลเซียส และการทำงานของคลื่นความถี่ที่สูงจะเกิดการปลดปล่อยพลังงานทำให้มีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในตัวอย่าง ระหว่างกระบวนการจึงต้องใช้น้ำเย็นหล่อเพื่อลดอุณหภูมิ ซึ่งสามารถควบคุมอุณภูมิด้วยการเดนน้ำภายในอ่างออกและเติมน้ำที่เย็นให้อยู่ได้ที่ 30±2 องศาเซลเซียส

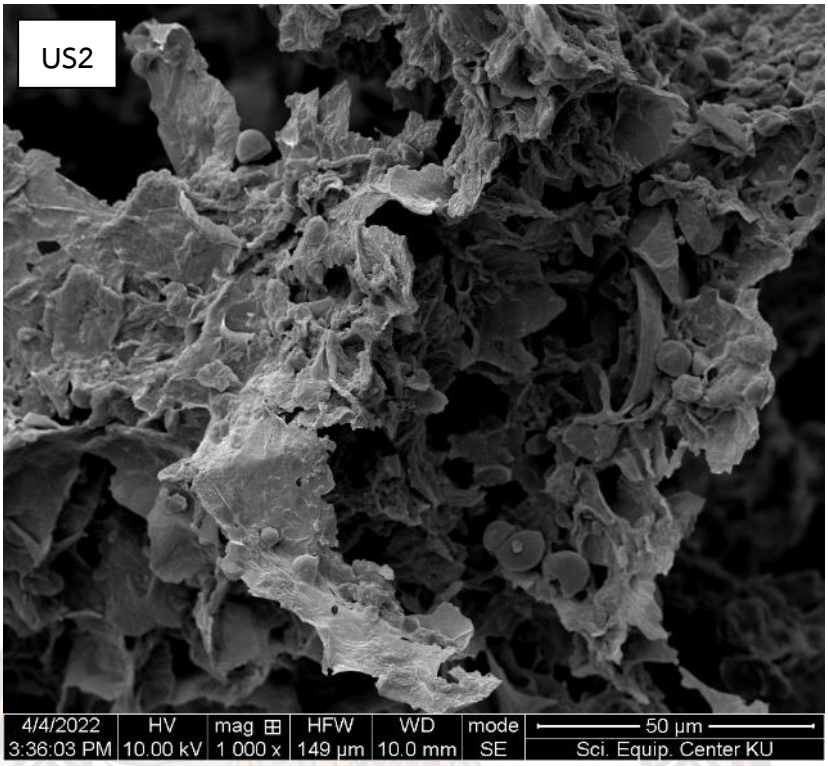
**1. ผลการวิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด**

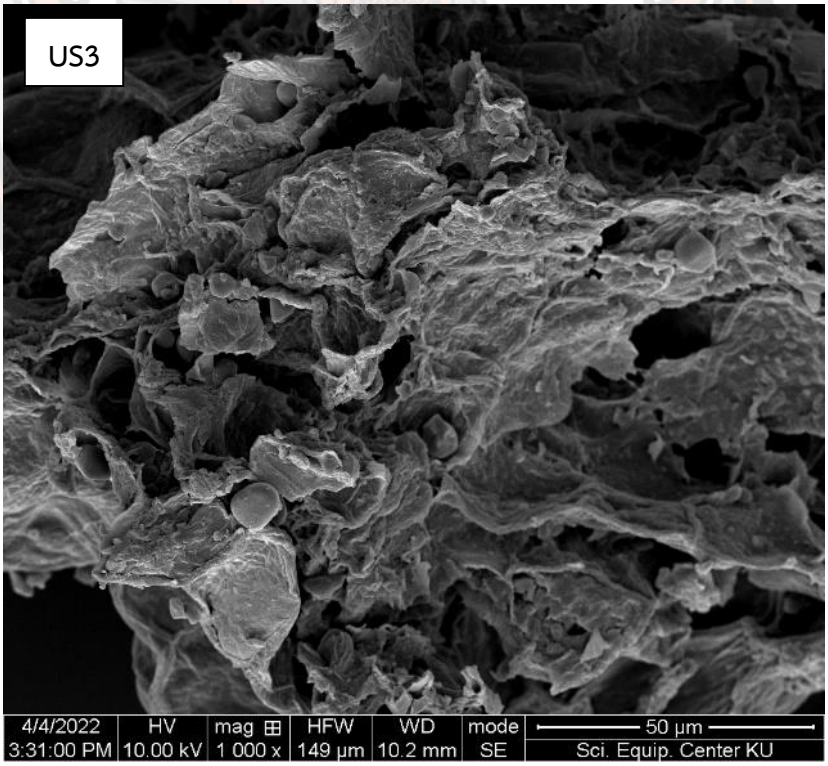
ผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก พบว่า มีผลต่อผนังเซลล์ของไข่น้ำ ซึ่งเกิดรูพรุนตามระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่เพิ่มขึ้น โดยการส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่กำลังขยาย 1000x การให้คลื่นอัลตราโซนิกเป็นระยะเวลา 15 นาที (ภาพ 21 US1) ผนังเซลล์ไข่น้ำมีรูพรุน เกิดการฉีกขาดของเยื่อเซลล์และมีความเสียหายของผนังเซลล์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่ 30 40 และ 60 นาที (ภาพที่ 21 US2 US3 US4) ตามลำดับ เนื่องจากคลื่นความถี่สามารถทำให้พื้นผิวที่บริเวณผนังเซลล์และภายในเซลล์เกิดการฉีกขาดด้วยการทำงานของคลื่นความถี่สูงมีความแรงที่สามารถทำลายผนังเซลล์พืชได้เทียบเท่ากับความดันบรรยากาศ ทำให้เกิดการยุบตัวของฟองอากาศในเยื่อหุ้มเซลล์และเกิดการฉีกขาดของผนังเซลล์ (Zheng et al., 2011) ดังนั้นการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจะช่วยทำให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัตถุดิบที่นำมาสกัดได้ดียิ่งขึ้น (Parniakov et al., 2015) เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งใช้เพียงแรงกวนเป็นระยะเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ผนังเซลล์ไข่น้ำมีลักษณะเป็นแผ่นเดียวกันและเกิดรูพรุนน้อย (ภาพ 20)

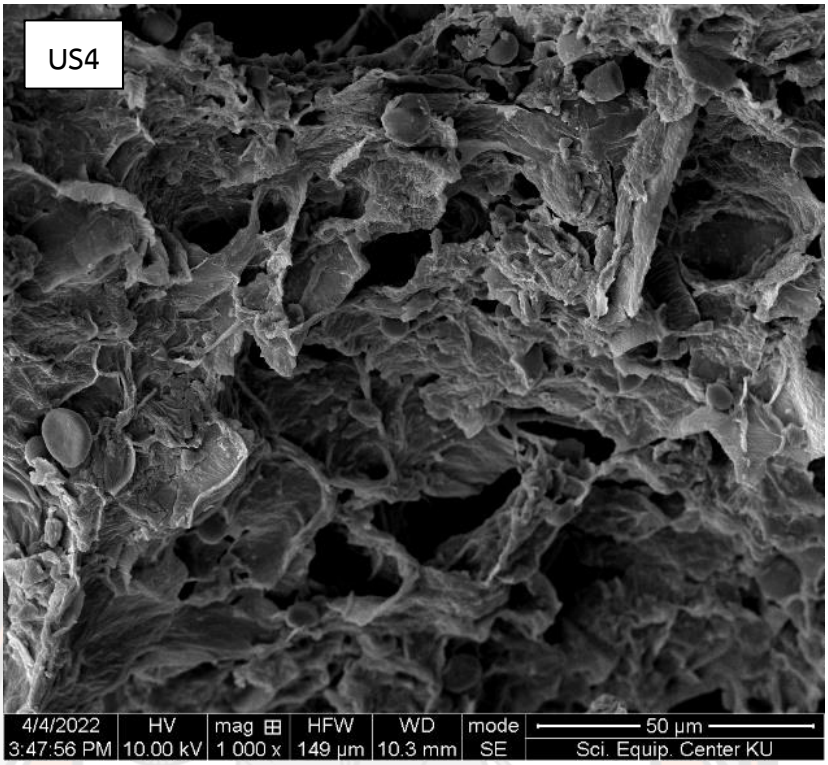



**ภาพ 20 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์หรือตัวอย่างควบคุม วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X**




US2
4/4/2022
3:36:03 PM
HV
10.00 kV
mag
1 000 x
HFW
149 µm
WD
10.0 mm
mode
SE
50 µm
Sci. Equip. Center KU


US3
4/4/2022
3:31:00 PM
HV
10.00 kV
mag
1 000 x
HFW
149 µm
WD
10.2 mm
mode
SE
50 µm
Sci. Equip. Center KU




**ภาพ 21 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ระยะเวลา 15 (US1) 30 (US2) 45 (US3) และ 60 (US4) นาที ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X**

**2. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีน**

ตาราง 17 ผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกมีความสามารถช่วยปรับสภาพผนังเซลล์ไข่น้ำทำให้โปรตีนในส่วนเพลเลสออกมาอยู่ในส่วนซูเปอร์เนเทนได้สูงเมื่อให้คลื่นความถี่เป็นระยะเวลา 30 นาที เท่ากับร้อยละ 65.74±0.02 เมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่ 45 และ 60 นาที พบว่าปริมาณโปรตีนในส่วนซูเปอร์เนเทนลดลง เท่ากับร้อยละ 63.47±0.04 และ 53.19±0.07 ตามลำดับ แม้ว่าระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่เพิ่มขึ้นช่วยทำให้ผนังเซลล์ไข่น้ำเกิดการฉีกขาดและรูพรุนเป็นจำนวนมากดังผลการศึกษาลักษณะผนังเซลล์ดังกล่าวข้างต้น โดยรายงานของ Sala et al., 1995 กล่าวว่า สารละลายโปรตีนได้รับคลื่นอัลตราซาวด์เป็นเวลานานมากขึ้นอาจมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส และมีความซับซ้อนในการเกิดปฏิกิริยาเมื่อสัมผัสกับคลื่นอัลตราซาวด์ เช่น โพลีเมอร์ของโปรตีนทรงกลมจะเกิดการแตกตัวทำให้มีขนาดเล็กลงเป็นหน่วยย่อยและ

ถ้าในสารละลายตัวกลางนั้นแก๊สออกซิเจน อาจมีผลทำให้โครงสร้างจตุรภูมิ โดยอาจทำให้สูญเสียสภาพธรรมชาติได้

ทั้งนี้การพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกระยะเวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ มีความสามารถในการสกัดโปรตีนออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนได้สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งมีโปรตีนเท่ากับร้อยละ 49.81±2.75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้ผลการทดลองในงานวิจัยนี้พบว่า ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ 15 30 45 และ 60 นาที เปอร์เซ็นต์ยิวในส่วนของซูเปอร์เนเทนเพิ่มขึ้น เท่ากับร้อยละ 30.81 22.43 22.26 33.31 ตามลำดับ การพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราซาวนด์ช่วยให้มวลสารที่อยู่ภายในส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนได้เพิ่มขึ้น เป็นไปตามรายงานวิจัยของ Parniakov et al., 2015 กล่าวว่าการนำคลื่นอัลตราโซนิกมาประยุกต์ใช้ในการพรีทรีทเมนท์ช่วยให้ตัวทำละลายแทรกซึมเข้าไปในวัตถุดิบได้ดีขึ้นทำให้ประสิทธิภาพการถ่ายเทมวลสารเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน และยังสอดคล้องกับร้อยละอัตราส่วนโปรตีน (ตาราง 18) แสดงถึงโปรตีนที่มีอยู่ในส่วนเพลเลสและซูเปอร์เนเทนที่ถูกแยกออกจากกัน พบว่าโปรตีนถูกตัวทำละลายซึ่งคือน้ำกลั่นดึงองค์ประกอบภายในเซลล์ส่วนเพลเลสถ่ายเทองค์ประกอบทางเคมีในที่นี้ ได้แก่ โปรตีนออกมาอยู่ในส่วนซูเปอร์ เท่ากับร้อยละ 15.47 14.75 14.13 และ 17.72 ตามลำดับ อีกทั้งขนาดของไข่น้ำที่มีขนาดเล็กถึง 0.5 ถึง 1.5 มิลลิเมตร กันย์สินี พันธ์วนิชดำรง (2552) ทำให้การเก็บตัวอย่างหรือการถ่ายเทตัวอย่างผ่านภาชนะในระหว่างกระบวนการทดลองนั้นไข่น้ำติดกับภาชนะและยากที่เกี่ยออกได้หมด ซึ่งเป็นไปได้ว่าค่าโปรตีนที่หายไปอาจเกิดจากการสูญเสียระหว่างกระบวนการ

อย่างไรก็ตามร้อยละอัตราส่วนโปรตีนไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่เวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ ส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชันมีความแตกต่างกัน โดยส่วนเพลเลสมีโปรตีนอยู่ในช่วงร้อยละ 5 ถึง 8 ซูเปอร์เนเทน ร้อยละ 14 ถึง 17 และฟูลดิสเพอชัน ร้อยละ 21 ถึง 24 จากผลการคำนวณร้อยละอัตราส่วนโปรตีนสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพิจารณาการนำไข่น้ำพัฒนาต่อยอดไปในอนาคตได้ เช่น ผลพลอยได้จากการสกัดสารสกัดไข่น้ำ คือ ส่วนเพลเลสที่ยังมีปริมาณโปรตีนสามารถนำไปศึกษาต่อได้หรือแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดที่ไม่ต้องการการละลายน้ำ เป็นต้น ทั้งนี้ในงานวิจัยนี้คัดเลือกส่วนฟลูดิสเพอร์ชัน นำไปศึกษาต่อในกระบวนการพรีทรีทเมนท์ร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช เนื่องจากเป็นส่วนที่มีทั้งเพลเลสและซูเปอร์เนเทนเป็นไปได้ว่าปริมาณโปรตีนจะมีอยู่ในส่วนฟลูดิสเพอร์ชันมากกว่าดังตาราง 18 ซึ่งการทำงานร่วมกับเอนไซม์อาจทำให้มีความสามารถย่อยผนังเซลล์ไข่น้ำและปลดปล่อยองค์ประกอบทางเคมีและเพิ่มขึ้นกิจกรรมทางชีวภาพของสารสกัดจากไข่น้ำ

**ตาราง 17 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดและร้อยละความชื้นของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | Pellet | | Supernatant | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 13.61±0.25$^{d}$ | 66.79 | 49.81±2.75$^{c}$ | 20.30 |
| 2 | | 15 | 22.62±0.01$^{b}$ | 30.60 | 50.22±0.12$^{b}$ | 30.81 |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 19.07±0.06$^{c}$ | 42.09 | 65.74±0.01$^{a}$ | 22.43 |
| 4 | | 45 | 11.24±0.00$^{e}$ | 44.86 | 63.47±0.01$^{a}$ | 22.26 |
| 5 | | 60 | 27.22±0.00$^{a}$ | 25.48 | 53.19±0.00$^{b}$ | 33.31 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d และ e ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

**ตาราง 18 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 9.09 | 10.11 | 24.80 |
| 2 | | 15 | 6.92 | 15.47 | 21.61 |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 8.03 | 14.75 | 21.23 |
| 4 | | 45 | 5.04 | 14.13 | 24.83 |
| 5 | | 60 | 6.94 | 17.72 | 19.35 |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก
ร้อยละโปรตีนไข่น้ำ (วัตถุดิบเริ่มต้น) เท่ากับ 44.00±0.43
ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน เท่ากับ (ร้อยละโปรตีนทั้งหมด/ %Yield) x 100

**3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ**

ผลการทดสอบกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (ตาราง 19) โดยคำนวณหาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยการวัดค่าความเข้มข้นการต้านอนุมูลอิสระ พบว่า ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่นานขึ้นมีร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันและคลื่นความถี่แต่ละช่วงเวลาทำให้ส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูดิสเพอร์ชันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนี้ การให้คลื่นความถี่เวลา 15 นาที เท่ากับร้อยละ 5.22±1.03 6.03±1.85 และ 6.65±2.73 ตามลำดับ 30 นาที เท่ากับร้อยละ 6.80±2.40 6.99±3.11 และ 6.93±2.02 ตามลำดับ 45 นาที เท่ากับร้อยละ 16.00±2.51 14.68±1.09 และ 14.99±1.96 ตามลำดับ และ 60 นาที เท่ากับร้อยละ 15.45±1.96 16.59±2.15 และ 17.77±0.43 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการให้คลื่นความถี่เวลา 15 และ 30 นาที มีร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 13.37±0.01 14.99±0.00 และ 20.33±0.03 ตามลำดับ ขณะที่การให้คลื่นความถี่ 45 และ 60 นาที มีร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูดิสเพอร์ชันที่ไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนั้นการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 45 นาที สามารถเป็นสภาวะที่ช่วยเสริมการสกัดสารต้านอนุมูลอิสระและใช้ระยะเวลาในการสกัดน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมและการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก 60 นาที

**ตาราง 19 ผลร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 13.37±0.54$^{c}$ | 14.99±0.07$^{a}$ | 20.32±0.08$^{a}$ |
| 2 | | 15 | 5.22±0.73$^{d}$ | 6.03±1.38$^{b}$ | 6.65±2.00$^{c}$ |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 6.80±1.76$^{d}$ | 6.99±2.36$^{b}$ | 6.93±2.36$^{c}$ |
| 4 | | 45 | 15.99±1.81$^{a}$ | 14.68±0.87$^{a}$ | 14.99±1.40$^{b}$ |
| 5 | | 60 | 15.46±1.53$^{b}$ | 16.59±2.70$^{a}$ | 17.77±0.32$^{a}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

จากตาราง 20 แสดงผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักเป็นวิธีการวัดความสามารถในการดักจับโลหะไอออนของไข่น้ำที่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกคำนวณเป็นร้อยละการแย่งจับกับโลหะหนัก พบว่า ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ที่เพิ่มขึ้นช่วยเสริมความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ $Fe^{2+}$ ของส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูดิสเพอร์ชันเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ดังนี้ 15 นาที เท่ากับร้อยละ 37.54±1.03 38.19±1.65 และ 38.23±0.77 ตามลำดับ 30 นาที เท่ากับร้อยละ 38.78±1.86 38.25±2.09 และ 38.65±0.54 ตามลำดับ 45 นาที เท่ากับร้อยละ 49.07±12.58 43.11±4.05 และ 40.84±0.74 ตามลำดับ และมีความสามารถลดลงเมื่อเพิ่มเวลา 60 นาที เท่ากับร้อยละ 40.33±1.31 39.62±0.62 และ 40.77±0.02 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกตามเวลาที่กำหนดไม่มีความสามารถจับโลหะหนักที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 39.24±2.19 47.90±13.15 และ 40.15±0.02 ตามลำดับ รายงานการวิจัยของ Sanchez-Moreno et al., 1998 พบว่าสารประกอบฟีนอลิกมีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักได้ เมื่อพิจารณาจากการอ้างอิงรายงานวิจัยดังกล่าวเป็นไปได้ว่าไข่น้ำมีคุณสมบัติที่มีความสัมพันธ์ในการแย่งจับกับโลหะ $Fe^{2+}$ ตั้งแต่เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น เนื่องจากในพืชจะมีสารประกอบโพลีฟีนอลที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของพืชน้ำแต่ละชนิดนั้นขึ้นอยู่กับโครงสร้างทางเคมี พื้นที่เพาะปลูก ฤดูกาลการเพาะปลูก

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะปลูก และการเก็บเกี่ยว รวมถึงการดัดแปลงโครงสร้างของโมเลกุลในระหว่างกระบวนการสกัด (M. Garcia-Vaquero et al., 2017)

**ตาราง 20 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 39.24 ±1.56$^{b}$ | 47.90 ±9.39$^{a}$ | 40.15 ±0.34$^{a}$ |
| 2 | | 15 | 37.54±0.73$^{b}$ | 38.19±1.22$^{b}$ | 38.23±0.71$^{b}$ |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 38.78±1.43$^{b}$ | 38.25±1.52$^{b}$ | 38.65±0.40$^{b}$ |
| 4 | | 45 | 49.07±9.63$^{a}$ | 43.11±2.91$^{ab}$ | 40.84±0.58$^{a}$ |
| 5 | | 60 | 40.33±0.94$^{b}$ | 39.62±0.44$^{ab}$ | 40.77±0.04$^{a}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a และ b ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05
ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

จากตาราง 21 แสดงผลวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ที่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก โดยคำนวณความสามารถการให้อิเล็กตรอนเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐานของเฟอรัสซัลเฟตแสดงค่าในรูปของมิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ 15 นาที ช่วยเสริมส่วน ซูเปอร์เนเทนให้มีความสามารถต้านออกซิเดชันสูง เท่ากับ 855.9±0.01 และ 30 นาที เท่ากับ 1189.7±0.02 แต่ความสามารถจะลดลงตามเวลาเพิ่มขึ้นที่ 45 และ 60 นาที เท่ากับ 1061.6±0.00 และ 705.2±0.01 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1100.8±0.00 พบว่า เวลา 30 และ 45 นาที มีความสามารถต้านออกซิเดชันที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ 15 30 45 และ 60 นาที พบว่าส่วนเพลเลส มีค่าเท่ากับ 85.7±0.01 66.1±0.00 52.4±0.02 และ 99.2±0.00 ตามลำดับ มีความสอดคล้องกับความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันที่เพิ่มขึ้นในส่วนซูเปอร์เนเทนอีกทั้งยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ดังนั้นเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติทางพฤกษเคมีในสารสกัดไข่น้ำหรือซูเปอร์เนเทนมีกลไกของสารจำพวก

ฟีนอลที่แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เมื่อมีอนุมูลอิสระมาดึงอิเล็กตรอนไปแต่โครงสร้างมีอิเล็กตรอนหนาแน่นจึงสามารถเกิดการเคลื่อนย้ายอิเล็กตรอนไปทั่วโครงสร้าง ทำให้โครงสร้างเสถียรไม่เกิดเป็นอนุมูลอิสระต่อไป โดยส่วนใหญ่สารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างหลักประกอบด้วยสารประกอบแอโรมาติกแทนที่ด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (Pietta, 2000)

**ตาราง 21 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 47.1±0.38$^{e}$ | 1100.8±0.00$^{b}$ | 342.0±0.45$^{b}$ |
| 2 | | 15 | 85.7±0.01$^{b}$ | 855.9±0.03$^{d}$ | 337.2±0.01$^{c}$ |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 66.1±0.00$^{c}$ | 1189.7±0.08$^{a}$ | 300.5±0.00$^{d}$ |
| 4 | | 45 | 52.4±0.02$^{d}$ | 1061.6±0.02$^{c}$ | 248.3±0.00$^{e}$ |
| 5 | | 60 | 99.2±0.00$^{a}$ | 705.2±0.02$^{e}$ | 349.7±0.00$^{a}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d และ e ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

**4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก**

จากตาราง 22 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยการหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่เกิดจากสารฟีนอลในไข่น้ำที่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก โดยไข่น้ำที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงจะทำปฏิกิริยากับสารละลายโฟลิน-ซิโอแคลโตรีเอเจนต์ ซึ่งจะเกิดสีน้ำเงินของโมลิบดีนัมในการวิเคราะห์ครั้งนี้ใช้กรดแกลลิกเป็นสารมาตรฐานและคำนวณหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลย์ของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารสกัด โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า ระยะเวลาการให้คลื่นความถี่ 15 นาที ช่วยเสริมส่วนซูเปอร์เนเทนมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดสูง เท่ากับ 91.19±1.85 และ 30 นาที เท่ากับ 163.60±3.11 แต่ลดลงตามเวลาเพิ่มขึ้นที่ 45 และ 60 นาที เท่ากับ 127.89±1.09 และ 98.53±2.15 ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม มีค่าเท่ากับ 141.05±0.00 พบว่า เวลาการให้คลื่นความถี่ต่อไข่น้ำที่เวลา 30 และ 45 นาที มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิกตามเวลาดังกล่าวช่วยลดเวลาในการสกัดไข่น้ำได้ ทั้งนี้ส่วนเพลเลส ระยะเวลา 15 30 45 และ 60 นาที มีค่าเท่ากับ 10.81±1.03 8.83±2.40 10.03±2.51 และ 12.77±1.96 ตามลำดับ มีความสอดคล้องกับปริมาณฟีนอลิกที่เพิ่มขึ้นในส่วนซูเปอร์เนเทน โดยรายงานวิจัยของ Thitiphan et al. (2015) พบว่าการใช้คลื่นความถี่จากอัลตราโซนิกมีประสิทธิภาพในการช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสาหร่ายขนาดใหญ่ *Spirogyra sp.* และ *Cladophora glomerata* อีกทั้งผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ในงานวิจัยไข่น้ำครั้งนี้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักและความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันดังกล่าวมาข้างต้น

**ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 6.54±0.00$^{e}$ | 141.05±0.01$^{b}$ | 41.29±0.00$^{b}$ |
| 2 | | 15 | 10.81±0.01$^{b}$ | 91.19±0.00$^{e}$ | 37.27±0.00$^{c}$ |
| 3 | **อัลตราโซนิก** | 30 | 8.83±0.00$^{d}$ | 163.60±0.00$^{a}$ | 34.13±0.00$^{d}$ |
| 4 | | 45 | 10.03±0.00$^{c}$ | 127.89±0.00$^{c}$ | 30.17±0.00$^{e}$ |
| 5 | | 60 | 12.77±1.96$^{a}$ | 98.53±0.00$^{d}$ | 43.54±0.00$^{a}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d และ e ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

**ผลการย่อยสลายผนังเซลล์ของไข่น้ำด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

**1. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด**

การพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์ไข่น้ำ พบว่าเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที มีการทำงานในการย่อยผนังเซลล์ไข่น้ำให้เกิดความเสียหายและปลดปล่อยองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตาราง 23) เนื่องจากเอนไซม์มีการทำงานเฉพาะต่อสารตั้งต้นและชนิดปฏิกิริยา และองค์ประกอบหลักของผนังเซลล์พืชประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสเชื่อมต่อกันแบบร่างแหและมีโครงข่ายพอลิเมอร์ของเพกทินฝังตัวในโครงข่าย ซึ่งเป็นตัวสร้างเมตริกที่อุ้มน้ำเพื่อต้านทานแรงกดและแรงเฉือน ซึ่งมีความสำคัญต่อการควบคุมการยอมให้สารผ่านของผนังเซลล์ (Ladyofhats, 2007) ดังนั้นการพรีทรีทเมนท์นี้ขึ้นอยู่กับการใช้เอนไซม์ที่ย่อยสลายโพลีแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์เพื่อปรับปรุงผลผลิต ปรับเปลี่ยนพื้นผิวของผนังเซลล์ (B.V. McCleary, 1986)

งานวิจัยนี้พบว่าเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เวลาย่อย 30 นาที สามารถปลดปล่อยโปรตีนออกมาส่วนซูเปอร์เนเทนได้สูงร้อยละ 78.15±0.03 ซึ่งเทียบเท่ากับการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเวลา 30 นาที (ตาราง 17) อรุณี คงดี อัลเดรด (2558; กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) กล่าวว่าสาหร่ายจะมีผนังเซลล์ 2 ชั้น คือ ชั้นนอกจะเป็นสารพวกเพคตินมีลักษณะอ่อนนิ่มเป็นเมือก ส่วนผนังชั้นในเป็นสารพวกเซลลูโลสที่ให้ความแข็งแรงกับเซลล์ทำให้เซลล์คงรูปอยู่ได้ ผลลัพธ์นี้ชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์เพคติเนสจากสภาวะดังกล่าวสามารถย่อยผนังเซลล์ไข่น้ำได้ดี เนื่องจากมีองค์ประกอบของเพคตินและมีลักษณะเป็นเมือกเมื่อโดนความร้อน โดยเอนไซม์จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงสารประกอบเพคตินที่ผนังเซลล์ทำให้สารประกอบเพคตินมีขนาดโมเลกุลสั้นลงและส่งผลให้เซลล์มีความอ่อนตัว (สมฤดี ไทพาณิชย์, 2555) และยืนยันผลลัพธ์เพิ่มเติมด้วยผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ไข่น้ำ ภาพ 22 การพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เพคติเนส (P0.5) แสดงให้เห็นลักษณะผนังเซลล์ที่หลวม ฉีกขาด และมีรูพรุนมากว่าการด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (C0.5) และไซลาเนส (X0.5) ตามลำดับ

จากตาราง 25 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ พบว่า ร้อยละความเข้มข้นและเวลาการย่อยของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีนที่ถูกปลดปล่อยจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนแตกต่างกัน ซึ่งค่าความน่าจะเป็นน้อยกว่า 0.05 (ตาราง 24) ทั้งนี้พบว่าร้อยละอัตราส่วนโปรตีนจากการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์มีความสามารถในการช่วยสกัดโปรตีนออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนได้เพิ่มขึ้นถึงร้อยละ 11.41 ถึง 30.39 และเปรียบเทียบกับการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (ตาราง 18) พบว่าเอนไซม์มีประสิทธิภาพในการช่วยปลดปล่อยโปรตีนภายในเซลล์ไข่น้ำมากถึงร้อยละ 1 ถึง 16

**ตาราง 23 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดและเปอร์เซ็นต์ยิวของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลา นาที | ความเข้มข้น ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | Pellet | | Supernatant | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0 | 0.0 | 13.61±0.25$^{r}$ | 66.79 | 49.81±2.75$^{b}$ | 20.30 |
| 2 | **เซลลูเลส** | 15 | 0.5 | 21.19±0.02$^{o}$ | 24.18 | 35.55±0.02$^{ghij}$ | 51.48 |
| 3 | | 30 | 0.5 | 16.98±0.03$^{q}$ | 27.94 | 49.79±0.00$^{b}$ | 38.88 |
| 4 | | 45 | 0.5 | 34.80±0.11$^{a}$ | 28.84 | 47.73±0.01$^{bc}$ | 32.71 |
| 5 | | 60 | 0.5 | 12.53±0.14$^{s}$ | 28.15 | 37.00±0.08$^{ghi}$ | 39.68 |
| 6 | | 15 | 2.0 | 26.99±0.06$^{j}$ | 40.63 | 35.09±0.02$^{hij}$ | 42.38 |
| 7 | | 30 | 2.0 | 27.56±0.20$^{hi}$ | 41.73 | 34.32±0.00$^{ij}$ | 41.69 |
| 8 | | 45 | 2.0 | 26.90±0.02$^{j}$ | 42.99 | 38.48±0.01$^{efg}$ | 42.85 |
| 9 | | 60 | 2.0 | 26.07±0.01$^{k}$ | 46.18 | 37.04±0.04$^{ghi}$ | 40.98 |
| 10 | **เพคติเนส** | 15 | 0.5 | 27.85±0.04$^{gh}$ | 38.80 | 35.95±0.01$^{ghij}$ | 51.48 |
| 11 | | 30 | 0.5 | 28.02±0.03$^{fg}$ | 38.12 | 78.15±0.03$^{a}$ | 38.88 |
| 12 | | 45 | 0.5 | 27.35±0.13$^{i}$ | 36.69 | 45.92±0.04$^{c}$ | 32.71 |
| 13 | | 60 | 0.5 | 26.92±0.01$^{j}$ | 36.37 | 42.67±0.06$^{d}$ | 39.68 |
| 14 | | 15 | 2.0 | 28.64±0.00$^{e}$ | 35.73 | 36.15±0.06$^{ghi}$ | 42.38 |
| 15 | | 30 | 2.0 | 28.56±0.02$^{de}$ | 36.25 | 36.63±0.05$^{ghi}$ | 41.69 |
| 16 | | 45 | 2.0 | 23.98±0.05$^{m}$ | 45.91 | 30.77±0.02$^{k}$ | 42.85 |
| 17 | | 60 | 2.0 | 30.85±0.06$^{c}$ | 41.80 | 32.99±0.06$^{jk}$ | 40.98 |
| 18 | **ไซลาเนส** | 15 | 0.5 | 22.64±0.03$^{n}$ | 45.44 | 36.60±0.02$^{ghi}$ | 31.19 |
| 19 | | 30 | 0.5 | 20.35±0.01$^{p}$ | 48.24 | 48.54±0.03$^{bc}$ | 30.03 |
| 20 | | 45 | 0.5 | 32.71±0.05$^{b}$ | 30.19 | 41.25±0.00$^{de}$ | 31.80 |
| 21 | | 60 | 0.5 | 29.30±0.06$^{d}$ | 31.98 | 37.74±0.01$^{fgh}$ | 31.73 |
| 22 | | 15 | 2.0 | 26.96±0.04$^{j}$ | 34.61 | 37.48±0.02$^{gh}$ | 31.62 |
| 23 | | 30 | 2.0 | 28.29±0.04$^{de}$ | 34.94 | 38.15±0.01$^{efg}$ | 30.25 |
| 24 | | 45 | 2.0 | 27.72±0.03$^{gh}$ | 38.69 | 38.69±0.00$^{efg}$ | 31.94 |
| 25 | | 60 | 2.0 | 25.02±0.04$^{l}$ | 44.15 | 37.87±0.02$^{fgh}$ | 34.37 |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d e f g h I j k l m n o p q และ s ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 24 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชันผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาที | ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0.0 | 0 | 9.09 | 10.11 | 24.80 |
| 2 | **เซลลูเลส** | 0.5 | 15 | 5.12 | 18.30 | 20.57 |
| 3 | | | 30 | 4.74 | 19.36 | 19.89 |
| 4 | | | 45 | 10.03 | 15.61 | 18.35 |
| 5 | | | 60 | 3.53 | 14.68 | 25.79 |
| 6 | | 2.0 | 15 | 10.97 | 14.87 | 18.16 |
| 7 | | | 30 | 11.50 | 14.31 | 18.19 |
| 8 | | | 45 | 11.56 | 16.49 | 15.95 |
| 9 | | | 60 | 12.04 | 15.16 | 16.80 |
| 10 | **เพคติเนส** | 0.5 | 15 | 10.81 | 18.51 | 14.69 |
| 11 | | | 30 | 10.68 | 30.39 | 2.93 |
| 12 | | | 45 | 10.04 | 15.02 | 18.94 |
| 13 | | | 60 | 9.79 | 16.93 | 17.28 |
| 14 | | 2.0 | 15 | 10.23 | 15.32 | 18.45 |
| 15 | | | 30 | 10.35 | 15.27 | 18.38 |
| 16 | | | 45 | 11.01 | 13.18 | 19.81 |
| 17 | | | 60 | 12.90 | 13.52 | 17.58 |
| 18 | **ไซลาเนส** | 0.5 | 15 | 10.29 | 11.41 | 22.30 |
| 19 | | | 30 | 9.82 | 14.57 | 19.61 |
| 20 | | | 45 | 9.88 | 13.12 | 21.00 |
| 21 | | | 60 | 9.37 | 11.98 | 22.65 |
| 22 | | 2.0 | 15 | 9.33 | 11.85 | 22.82 |
| 23 | | | 30 | 9.88 | 11.54 | 22.58 |
| 24 | | | 45 | 10.73 | 12.36 | 20.92 |
| 25 | | | 60 | 11.05 | 13.02 | 19.94 |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช
ร้อยละโปรตีนไข่น้ำ (วัตถุดิบเริ่มต้น) เท่ากับ 44.00±0.43
ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน เท่ากับ (ร้อยละโปรตีนทั้งหมด/ %Yield) x 100

**ตาราง 25 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยไข่น้ำต่ออิทธิพลการปลดปล่อยปริมาณโปรตีนจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน**

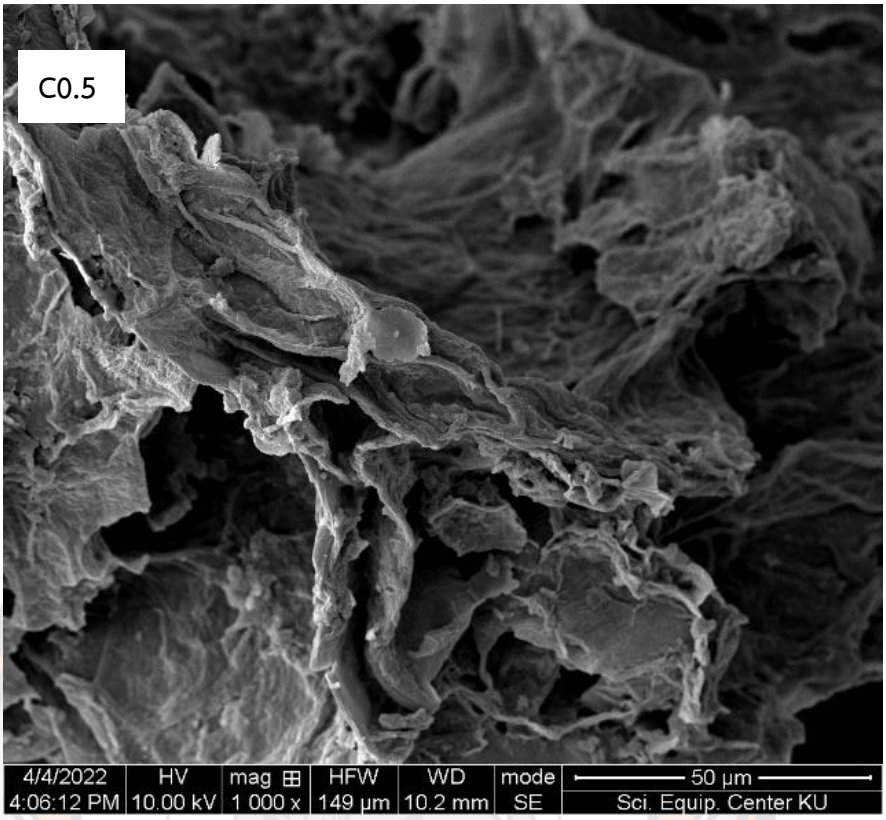
| การทดสอบ | F | Sig. |
|---|---|---|
| **ปริมาณโปรตีนทั้งหมด** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 6.150 | .016 |
| เวลา | 4.251 | .008 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 8.543 | .000 |

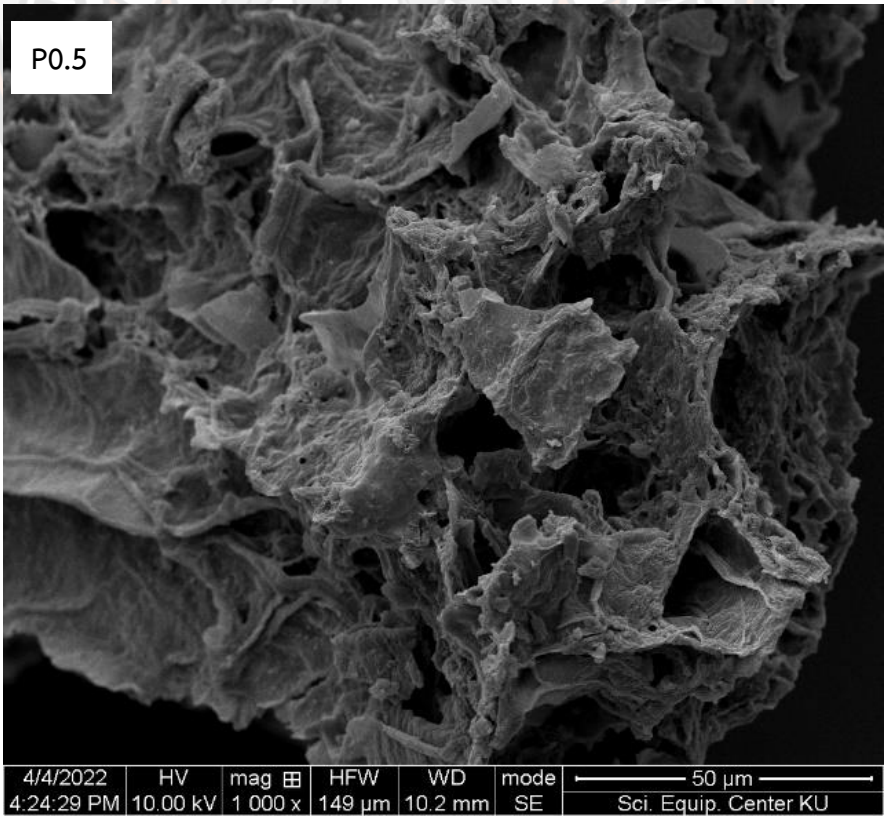
การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (Tests of between-subjects effects) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

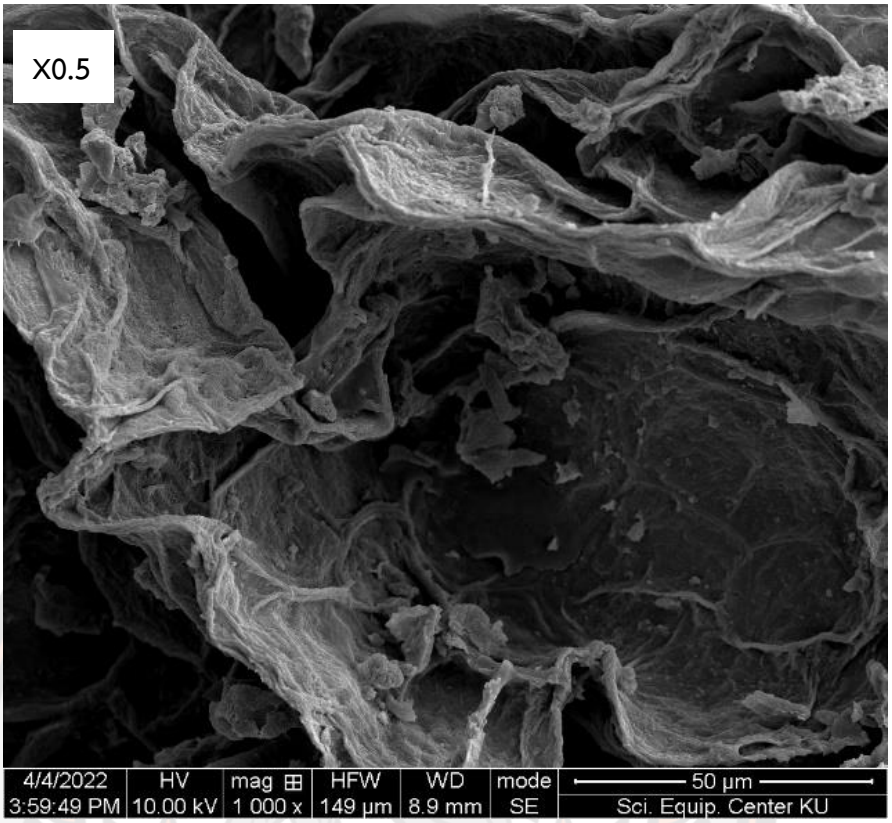
F คือ ค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณา (F-distribution) และ Sig. คือ ค่าความน่าจะเป็น (2-sided)

**2. ผลการวิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด**

จากผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช โดยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาการย่อยสลาย 30 นาที ถูกคัดเลือกให้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการปรับสภาพผนังเซลล์และสกัดโปรตีนไข่น้ำ เนื่องจากเป็นสภาวะที่ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนได้สูงถึง ร้อยละ 78.15±0.03 แม้กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีแอคติวีตี้ที่ต่ำกว่าใช้เอนไซม์เซลลูเลสและเอนไซม์ไซลาเนสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการปรับสภาพสาหร่าย *P. palmata* ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชสามารถปรับปรุงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (J. Dumay et al., 2013) เพื่อสามารถอธิบายปริมาณโปรตีนสูงได้อย่างสมบูรณ์จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม โดยคัดเลือกสภาวะการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาการย่อยสลาย 30 นาที ซึ่งเป็นสภาวะเดียวกันกับการทำงานของเอนไซม์เพคติเนส เพื่ออ้างอิงการค้นพบปริมาณโปรตีนสูงดังกล่าวด้วยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงลักษณะของผนังเซลล์ที่กำลังขยาย 1000x พบว่า กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ผนังเซลล์ไข่น้ำบิดเบี้ยวฉีกขาดและมีรูพรุนเล็กน้อย (ภาพ 22 C0.5) การย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ผนังเซลล์ไข่น้ำเกิดการฉีกขาดและมีรูพรุนเล็กน้อย (ภาพ 22 X0.5) และเอนไซม์เพคติเนส ผนังเซลล์ไข่น้ำฉีกขาดและมีรูพรุนมากกว่าไข่น้ำที่ผ่านการ Pretreatments ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ตามลำดับ (ภาพ 22 P0.5) ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ตาราง 23)


C0.5
4/4/2022
4:06:12 PM
HV
10.00 kV
mag
1 000 x
HFW
149 µm
WD
10.2 mm
mode
SE
50 µm
Sci. Equip. Center KU


P0.5
4/4/2022
4:24:29 PM
HV
10.00 kV
mag
1 000 x
HFW
149 µm
WD
10.2 mm
mode
SE
50 µm
Sci. Equip. Center KU




**ภาพ 22 ลักษณะผนังเซลล์ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (C0.5) เพคติเนส (P0.5) และไซลาเนส (X0.5) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด กำลังขยาย 1000X**

**3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ**

ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า ชนิดร้อยละความเข้มข้น และระยะเวลาการย่อยของเอนไซม์มีผลต่อความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระของส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูดิสเปอร์ชันที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าความน่าจะเป็น (ตาราง 30) พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.332 ระยะเวลาย่อย เท่ากับ 0.989 และการทำงานร่วมกันของความเข้มข้นและเวลาย่อย เท่ากับ 0.956 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทำให้ข้อกำหนดดังกล่าว ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 เวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ของเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของส่วนซูเปอร์เนเทน

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาผลของกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของแต่ส่วน พบว่า เอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เวลาย่อย 60 นาที สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงสุด เท่ากับร้อยละ 44.59±0.98 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม เอนไซม์เซลลูเลส และเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 เวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที รวมถึงเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

ตาราง 27 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก พบว่า การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เซลลูเลส ร้อยละ 0.5 มีความสามารถการแย่งจับกับโลหะหนักของส่วนซูเปอร์เนเทนได้สูงที่เวลา 45 นาที เท่ากับร้อยละ 48.59±12.48 และความเข้มข้นร้อยละ 2.0 เวลา 60 นาที เท่ากับร้อยละ 39.68±0.01 ลดลงเมื่อใช้เวลาการย่อยที่ 30 นาที เท่ากับร้อยละ 36.15±0.00 อย่างไรก็ตามการใช้เอนไซม์เซลลูเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ระยะเวลาย่อย 15 45 และ 60 นาที มีร้อยละการแย่งจับกับโลหะหนักของส่วนซูเปอร์เนเทนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ขณะที่เวลา 30 นาที มีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุมและไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (ตาราง 24) แม้การคำนวณความแตกต่างด้วยวิธีดันแคน ผลความเข้มข้น ชนิด และระยะเวลาย่อยของเอนไซม์มีความสามารถการแย่งจับกับโลหะหนักภายในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อพิจารณาค่าความน่าจะเป็น (ตาราง 30) พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.881 ระยะเวลาย่อย เท่ากับ 0.196 และการทำงานร่วมกันของความเข้มข้นและเวลาย่อย เท่ากับ 0.151 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทำให้ข้อกำหนดดังกล่าว ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 เวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ของเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการแย่งจับกับโลหะหนักของส่วนซูเปอร์เนเทน

ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์เพคติเนสร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ทำให้ส่วนซูเปอร์เนเทนมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน เท่ากับ 1123.6±0.00 1423.1±0.02 1394.6±0.01 และ 1295.1±0.00 ตามลำดับ และความเข้มข้นร้อยละ 2.0 มีค่าเท่ากับ 1173.2±0.00 1121.7±0.00 1138.6±0.00 และ 1238.7±0.00 ตามลำดับ การพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เพคติเนสมีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันสูง 1 ถึง 11 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก เอนไซม์ไซลาเนส และเอนไซม์เซลลูเลส ตามลำดับ ทั้งนี้การคำนวณความแตกต่างด้วยวิธีดันแคน ผลของความเข้มข้น ชนิด และระยะเวลาย่อยของเอนไซม์มีความสามารถในการ

รีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันภายในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เมื่อพิจารณาค่าความน่าจะเป็น (ตาราง 30) พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.000 มีค่าน้อยกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งอธิบายได้ว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ทั้งนี้ระยะเวลาย่อย เท่ากับ 0.557 และการทำงานร่วมกันของความเข้มข้นและเวลาย่อย เท่ากับ 0.300 ซึ่งมีค่ามากกว่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทำให้เวลาย่อยและความสัมพันธ์การทำงานของความเข้มข้นร่วมกับเวลาย่อยของเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ไม่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP

ผลลัพธ์การพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อย ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการย่อยชั้นเซลล์ของไข่น้ำที่เกิดขึ้นจากเอนไซม์ดังกล่าวทำให้สารประกอบในชั้นเซลล์หลุดออกมากับตัวทำละลาย ในการทดลองครั้งนี้ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายและใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดคลอกริกในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างทำให้เกิดการคลาดเคลื่อนได้และด้วยเอนไซม์จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ดังนั้นเมื่อค่าค่าความเป็นกรดและด่างสูงหรือต่ำเกินไปทำให้โครงสร้างของเอนไซม์ถูกทำลายและสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ได้ (Eskin, & Henderson, 1971)

**4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก**

จากตาราง 29 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง ของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสารประกอบฟีนอลในส่วนซูเปอร์เนเทน เท่ากับ 61.40±0.00 80.32±0.00 13.90±0.00 และ 78.5±0.01 ตามลำดับ และความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 2.0 เท่ากับ 74.20±0.65 71.8±0.00 81.6±0.04 และ 85.9±0.06 ตามลำดับ เวลาการย่อยสลายและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อปริมาณฟีนอลิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

**ตาราง 26 ผลการวิเคราะห์ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาที | ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0.0 | 0 | 13.37±0.00$^{l}$ | 14.99±0.00$^{j}$ | 20.32±0.00$^{gh}$ |
| 2 | เซลลูเลส | 0.5 | 15 | 27.90±0.00$^{d}$ | 23.34±0.00$^{g}$ | 22.49±0.00$^{fg}$ |
| 3 | | | 30 | 24.19±0.00$^{fgh}$ | 25.04±0.00$^{f}$ | 26.82±0.02$^{e}$ |
| 4 | | | 45 | 27.12±0.01$^{de}$ | 25.04±0.00$^{f}$ | 26.82±0.00$^{e}$ |
| 5 | | | 60 | 25.73±0.00$^{def}$ | 26.05±0.01$^{f}$ | 21.64±0.00$^{fg}$ |
| 6 | | 2.0 | 15 | 26.43±1.96$^{def}$ | 26.12±0.65$^{f}$ | 26.82±2.73$^{e}$ |
| 7 | | | 30 | 26.58±0.54$^{de}$ | 23.11±0.00$^{g}$ | 26.20±3.60$^{e}$ |
| 8 | | | 45 | 26.43±0.07$^{def}$ | 26.51±0.04$^{e}$ | 27.74±0.07$^{e}$ |
| 9 | | | 60 | 24.65±0.00$^{fgh}$ | 23.11±0.06$^{g}$ | 21.56±0.03$^{fg}$ |
| 10 | เพคติเนส | 0.5 | 15 | 41.19±0.11$^{b}$ | 33.93±0.10$^{cd}$ | 32.54±0.33$^{d}$ |
| 11 | | | 30 | 37.64±0.10$^{c}$ | 32.15±1.96$^{d}$ | 33.46±0.32$^{d}$ |
| 12 | | | 45 | 37.63±0.54$^{c}$ | 35.24±4.59$^{ab}$ | 33.93±0.33$^{d}$ |
| 13 | | | 60 | 38.48±1.09$^{c}$ | 33.31±0.10$^{d}$ | 35.78±0.32$^{c}$ |
| 14 | | 2.0 | 15 | 41.73±2.84$^{b}$ | 36.71±0.11$^{a}$ | 39.49±2.29$^{b}$ |
| 15 | | | 30 | 42.19±0.21$^{b}$ | 35.09±0.43$^{ab}$ | 37.02±0.32$^{c}$ |
| 16 | | | 45 | 42.81±2.84$^{b}$ | 37.18±0.54$^{a}$ | 41.04±3.38$^{a}$ |
| 17 | | | 60 | 44.59±0.98$^{a}$ | 38.03±2.18$^{a}$ | 39.88±1.53$^{b}$ |
| 18 | ไซลาเนส | 0.5 | 15 | 23.11±0.02$^{gh}$ | 17.62±0.00$^{l}$ | 17.62±0.00$^{i}$ |
| 19 | | | 30 | 22.72±0.00$^{gh}$ | 19.71±0.01$^{h}$ | 20.87±0.00$^{fg}$ |
| 20 | | | 45 | 23.34±0.00$^{gh}$ | 20.63±0.00$^{h}$ | 22.49±0.00$^{fg}$ |
| 21 | | | 60 | 22.49±0.00$^{gh}$ | 20.79±0.00$^{h}$ | 18.39±0.00$^{hi}$ |
| 22 | | 2.0 | 15 | 10.12±13.66j | 4.64±10.17$^{m}$ | 11.51±10.20$^{j}$ |
| 23 | | | 30 | 11.36±13.11$^{lij}$ | 6.26±11.37$^{l}$ | 6.49±12.04$^{k}$ |
| 24 | | | 45 | 10.74±13.47$^{ij}$ | 8.27±11.91$^{k}$ | 7.11±12.98$^{k}$ |
| 25 | | | 60 | 12.98±12.98$^{lij}$ | 7.65±12.01$^{kl}$ | 8.34±11.18$^{k}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d e f g h I j k l และ m ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 27 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาที | ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0.0 | 0 | 39.24 ±2.19$^{d}$ | 47.90 ±13.15$^{b}$ | 40.15 ±0.02$^{b}$ |
| 2 | **เซลลูเลส** | 0.5 | 15 | 41.17±0.23$^{b}$ | 38.96±0.87$^{de}$ | 39.66±0.25$^{c}$ |
| 3 | | | 30 | 38.32±0.38$^{e}$ | 40.30±3.28$^{c}$ | 39.68±0.28$^{c}$ |
| 4 | | | 45 | 49.71±13.90$^{a}$ | 48.59±12.48$^{a}$ | 39.60±0.49$^{c}$ |
| 5 | | | 60 | 37.72±1.39$^{ef}$ | 39.58±0.10$^{d}$ | 37.72±3.15$^{e}$ |
| 6 | | 2.0 | 15 | 39.07±0.67$^{d}$ | 37.54±0.65$^{ef}$ | 40.70±4.72$^{ab}$ |
| 7 | | | 30 | 38.18±2.19$^{e}$ | 36.15±0.00$^{f}$ | 40.15±0.43$^{b}$ |
| 8 | | | 45 | 37.28±2.73$^{f}$ | 38.63±0.07$^{e}$ | 37.30±4.16$^{e}$ |
| 9 | | | 60 | 40.04±0.80$^{c}$ | 39.68±0.01$^{d}$ | 41.25±1.00$^{a}$ |
| 10 | **เพคติเนส** | 0.5 | 15 | 35.07±0.02$^{h}$ | 27.52±0.31$^{k}$ | 34.52±0.64$^{g}$ |
| 11 | | | 30 | 39.20±0.07$^{d}$ | 31.07±0.05$^{j}$ | 31.96±0.07$^{j}$ |
| 12 | | | 45 | 37.23±0.12$^{f}$ | 34.54±0.15$^{g}$ | 35.91±0.02$^{f}$ |
| 13 | | | 60 | 34.67±0.02$^{h}$ | 35.56±0.15$^{fg}$ | 35.20±0.00$^{f}$ |
| 14 | | 2.0 | 15 | 35.64±0.05$^{g}$ | 32.80±0.02$^{i}$ | 34.45±0.02$^{g}$ |
| 15 | | | 30 | 36.37±0.10$^{f}$ | 32.79±0.05$^{i}$ | 34.63±0.02$^{g}$ |
| 16 | | | 45 | 35.33±0.02$^{gh}$ | 34.81±0.02$^{g}$ | 35.58±0.02$^{f}$ |
| 17 | | | 60 | 36.84±0.00$^{f}$ | 33.85±0.05$^{h}$ | 35.25±0.02$^{f}$ |
| 18 | **ไซลาเนส** | 0.5 | 15 | 34.23±0.02$^{i}$ | 36.13±0.02$^{f}$ | 33.92±0.05$^{h}$ |
| 19 | | | 30 | 35.55±0.02$^{g}$ | 33.94±0.02$^{h}$ | 33.28±0.02$^{hi}$ |
| 20 | | | 45 | 34.21±0.10$^{i}$ | 35.98±0.02$^{f}$ | 34.12±0.02$^{gh}$ |
| 21 | | | 60 | 35.23±0.00$^{gh}$ | 34.67±0.02$^{g}$ | 34.05±0.02$^{gh}$ |
| 22 | | 2.0 | 15 | 34.78±0.02$^{h}$ | 33.90±0.02$^{h}$ | 34.45±0.02$^{g}$ |
| 23 | | | 30 | 33.46±0.02$^{ij}$ | 33.55±0.00$^{h}$ | 33.35±0.02$^{h}$ |
| 24 | | | 45 | 33.13±0.02$^{j}$ | 34.43±0.00$^{g}$ | 33.32±0.02$^{h}$ |
| 25 | | | 60 | 34.67±0.02$^{h}$ | 34.08±0.02$^{gh}$ | 32.13±0.00$^{i}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษย a b c d e f g h I j และ k ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 28 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้น (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) | เวลา (นาที) | ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0.0 | 0 | 47.0±0.00$^{p}$ | 1100.8±0.00$^{h}$ | 342.0 ±0.00$^{h}$ |
| 2 | **เซลลูเลส** | 0.5 | 15 | 141.4±0.00$^{b}$ | 494.1±0.01$^{s}$ | 274.7±0.01$^{k}$ |
| 3 | | | 30 | 100.2±0.01$^{h}$ | 728.1±0.01$^{l}$ | 327.1±0.01$^{i}$ |
| 4 | | | 45 | 121.2±0.01$^{c}$ | 123.7±0.01$^{t}$ | 318.9±0.01$^{j}$ |
| 5 | | | 60 | 146.5±0.01$^{a}$ | 807.4±0.00$^{j}$ | 318.2±0.01$^{j}$ |
| 6 | | 2.0 | 15 | 58.3±0.00$^{lm}$ | 518.6±0.00$^{r}$ | 217.1±0.00$^{op}$ |
| 7 | | | 30 | 56.6±0.00$^{mn}$ | 538.0±0.00$^{q}$ | 231.4±0.00$^{n}$ |
| 8 | | | 45 | 55.4±0.00$^{no}$ | 537.0±0.00$^{q}$ | 221.5±0.00$^{o}$ |
| 9 | | | 60 | 51.7±0.00$^{o}$ | 562.4±0.00$^{p}$ | 222.5±0.00$^{o}$ |
| 10 | **เพคติเนส** | 0.5 | 15 | 96.5±0.01$^{i}$ | 1123.6±0.00$^{g}$ | 314.1±0.01$^{j}$ |
| 11 | | | 30 | 103.2±0.03$^{g}$ | 1423.1±0.02$^{a}$ | 422.8±0.01$^{g}$ |
| 12 | | | 45 | 111.1±0.01$^{e}$ | 1394.6±0.01$^{b}$ | 439.9±0.01$^{f}$ |
| 13 | | | 60 | 108.2±0.01$^{f}$ | 1295.1±0.00$^{c}$ | 446.7±0.00$^{e}$ |
| 14 | | 2.0 | 15 | 119.0±0.00$^{d}$ | 1173.2±0.00$^{e}$ | 466.0±0.00$^{c}$ |
| 15 | | | 30 | 110.8±0.01$^{e}$ | 1121.7±0.00$^{g}$ | 461.3±0.01$^{d}$ |
| 16 | | | 45 | 90.8±0.00$^{j}$ | 1138.6±0.00$^{f}$ | 522.6±0.00$^{b}$ |
| 17 | | | 60 | 102.0±0.01$^{h}$ | 1238.7±0.00$^{d}$ | 549.5±0.01$^{a}$ |
| 18 | **ไซลาเนส** | 0.5 | 15 | 58.7±0.00$^{lm}$ | 728.7±0.00$^{l}$ | 266.9±0.00$^{l}$ |
| 19 | | | 30 | 51.0±0.00$^{o}$ | 767.8±0.00$^{j}$ | 259.7±0.00$^{m}$ |
| 20 | | | 45 | 84.1±0.00$^{k}$ | 745.0±0.00$^{k}$ | 259.8±0.00$^{m}$ |
| 21 | | | 60 | 82.6±0.00$^{k}$ | 732.8±0.00$^{kl}$ | 274.9±0.00$^{k}$ |
| 22 | | 2.0 | 15 | 53.4±0.00$^{no}$ | 591.2±0.00$^{o}$ | 161.4±0.01$^{r}$ |
| 23 | | | 30 | 53.3±0.01$^{no}$ | 640.3±0.01$^{n}$ | 200.5±0.00$^{q}$ |
| 24 | | | 45 | 57.8±0.00$^{lm}$ | 661.6±0.00$^{m}$ | 212.7±0.00$^{p}$ |
| 25 | | | 60 | 59.4±0.00$^{l}$ | 638.9±0.01$^{n}$ | 221.4±0.00$^{o}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d e f g h I j k l m n o p q r และ s ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

การพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เพคติเนสต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ส่วนซูเปอร์เนเทนมีสารประกอบฟีนอลิกเท่ากับ 90.5±0.10 96.6±1.96 95.8±4.59 และ 93.1±0.10 ตามลำดับ ซึ่งการวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี DMRT ระยะเวลาย่อยของเอนไซม์มีผลต่อความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ขณะที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 2.0 ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที มีค่าเท่ากับ 85.6±0.11 90.3±0.43 81.7±0.54 และ 90.2±2.18 ตามลำดับ ระยะเวลาการย่อยของเอนไซม์ไม่มีผลต่อความสามารถในการสกัดสารประกอบฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ไซลาเนสต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่าการย่อยด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 15 และ 30 นาที มีความสามารถสกัดสารประกอบฟีนอลออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน เท่ากับ 92.8±0.00 และ 109.4±0.01 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มที่ปริมาณฟีนอลิกลดลงเมื่อใช้เวลาการย่อยสลายที่ 45 และ 60 นาที เท่ากับ 99.5±0.00 และ 92.1±0.00 ตามลำดับ การย่อยผนังเซลล์ไข่น้ำด้วยเอนไซม์ไซลาเนสความเข้มข้นร้อยละ 2.0 พบว่าปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามเวลาการย่อย 15 30 และ 45 นาที เท่ากับ 88.4±10.17 91.1±11.37 และ 96.5±11.91 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการใช้เวลาย่อย 60 นาที ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดลดลง เท่ากับ 89.7±12.01 ทั้งนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ไซลาเนสและระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดภายในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยวิธี DMRT ที่ระดับ 0.05

ผลลัพธ์โดยรวมของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ต่อปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด พบว่า ค่าความน่าจะเป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ เท่ากับ 0.000 ซึ่งมีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ขณะที่ระยะเวลาย่อย เท่ากับ 0.744 และการทำงานร่วมกันระหว่างความเข้มข้นและเวลาย่อย เท่ากับ 0.181 ไม่มีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งภายในส่วนซูเปอร์เนเทน ทั้งนี้พบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดหลงเหลืออยู่ในส่วนเพลเลส เนื่องด้วยไข่น้ำเป็นพืชที่มีรงควัตถุ ได้แก่ คลอโรฟิลล์ ซึ่งเป็นสารประกอบฟีนอลิกที่ไม่ละลายน้ำซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Beatriz A. et al., 2014)

**ตาราง 29 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้น (ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง) | เวลา (นาที) | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | **ตัวอย่างควบคุม** | 0.0 | 0 | 6.5±0.00$^{lm}$ | 141.0±0.00$^{a}$ | 41.3±0.00$^{c}$ |
| 2 | **เซลลูเลส** | 0.5 | 15 | 16.1±0.00$^{b}$ | 61.4±0.00$^{m}$ | 33.8±0.00$^{ijk}$ |
| 3 | | | 30 | 16.0±0.00$^{b}$ | 80.3±0.00$^{ijk}$ | 34.2±0.02$^{fgh}$ |
| 4 | | | 45 | 18.0±0.01$^{a}$ | 13.9±0.00$^{n}$ | 32.7±0.00$^{jk}$ |
| 5 | | | 60 | 18.5±0.00$^{a}$ | 78.5±0.01$^{jkl}$ | 37.4±0.00$^{e}$ |
| 6 | | 2.0 | 15 | 10.1±1.96$^{gh}$ | 74.2±0.65$^{kl}$ | 31.8±2.73$^{kl}$ |
| 7 | | | 30 | 10.3±0.54$^{fgh}$ | 71.8±0.00$^{l}$ | 34.0±3.60$^{ghi}$ |
| 8 | | | 45 | 9.5±0.07$^{i}$ | 81.6±0.04$^{hij}$ | 34.7±0.07$^{fgh}$ |
| 9 | | | 60 | 8.4±0.00$^{j}$ | 85.9±0.06$^{ghi}$ | 33.6±0.03$^{ijk}$ |
| 10 | **เพคติเนส** | 0.5 | 15 | 11.3±0.11$^{def}$ | 90.5±0.10$^{efg}$ | 29.1±0.33$^{kl}$ |
| 11 | | | 30 | 11.2±0.10$^{def}$ | 96.6±1.96$^{cde}$ | 33.5±0.32$^{ijk}$ |
| 12 | | | 45 | 11.1±0.54$^{def}$ | 95.8±4.59$^{cde}$ | 34.8±0.33$^{fgh}$ |
| 13 | | | 60 | 11.9±1.09$^{cd}$ | 93.1±0.10$^{cdef}$ | 36.5±0.32$^{ef}$ |
| 14 | | 2.0 | 15 | 12.3±2.84$^{c}$ | 85.6±0.11$^{ghi}$ | 38.8±2.29$^{d}$ |
| 15 | | | 30 | 11.9±0.21$^{cd}$ | 90.3±0.43$^{efg}$ | 40.1±0.32$^{cd}$ |
| 16 | | | 45 | 9.6±2.84$^{i}$ | 81.7±0.54$^{hij}$ | 43.1±3.38$^{b}$ |
| 17 | | | 60 | 11.0±0.98$^{def}$ | 90.2±2.18$^{efg}$ | 47.5±1.53$^{a}$ |
| 18 | **ไซลาเนส** | 0.5 | 15 | 10.3±0.02$^{fgh}$ | 92.8±0.00$^{defg}$ | 36.0±0.00$^{efg}$ |
| 19 | | | 30 | 7.4±0.00$^{kl}$ | 109.4±0.01$^{b}$ | 33.9±0.00$^{hi}$ |
| 20 | | | 45 | 12.0±0.00$^{c}$ | 99.5±0.00$^{c}$ | 35.4±0.00$^{efgh}$ |
| 21 | | | 60 | 12.2±0.00$^{c}$ | 92.1±0.00$^{defg}$ | 36.2±0.00$^{efg}$ |
| 22 | | 2.0 | 15 | 7.9±13.66$^{jk}$ | 88.4±10.17$^{fgh}$ | 27.9±10.20$^{l}$ |
| 23 | | | 30 | 6.1±13.11$^{n}$ | 91.1±11.37$^{efg}$ | 29.1±12.04$^{kl}$ |
| 24 | | | 45 | 7.0±13.47$^{kl}$ | 96.5±11.91$^{cde}$ | 32.1±12.98$^{jkl}$ |
| 25 | | | 60 | 7.3±12.98$^{klm}$ | 89.7±12.01$^{efg}$ | 32.4±11.18$^{jkl}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอักษรภาษาอังกฤษ a b c d e f g h I j k l m และ n ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 30 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลย่อยไข่น้ำต่อสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน**

| การทดสอบ | F | Sig. |
|---|---|---|
| **ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 0.957 | 0.332 |
| เวลา | 0.040 | .989 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 0.107 | .956 |
| **ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 0.222 | 0.881 |
| เวลา | 1.706 | 0.196 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 1.824 | 0.151 |
| **ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 20.767 | 0.000 |
| เวลา | 0.698 | 0.557 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 1.246 | 0.300 |
| **ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 34.562 | 0.000 |
| เวลา | 0.413 | 0.744 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 1.673 | 0.181 |

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (Tests of between-subjects effects) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

F คือ ค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณา (F-distribution) และ Sig. คือ ค่าความน่าจะเป็น (2-sided)

**ศึกษาผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

จากการค้นพบกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก กำลัง 280 วัตต์ คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลาพรีทรีทเมนท์ 30 นาที มีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณโปรตีน และกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 30 นาที มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนั้นจึงศึกษาผลการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช เพื่อตรวจสอบผลการเสริมฤทธิ์ของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ดังกล่าวต่อปริมาณโปรตีน กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

US-C หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

USC หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

US-P หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

USP หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

US-X หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

USX หมายถึง ไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที

**1. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีน**

ตาราง 31 พบว่า กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นความถี่เวลา 30 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที โปรตีนส่วนซูเปอร์เนเทน เท่ากับร้อยละ 46.98±0.05 44.35±0.02 และ 48.10±0.03 ตามลำดับ และผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที โปรตีนส่วนซูเปอร์เนเทน เท่ากับร้อยละ 34.64±0.01 44.24±0.01 และ 53.88±0.02 ตามลำดับ จากผลลัพธ์ดังกล่าวกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ไซลาเนสสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนได้สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง

ควบคุม ทั้งนี้การทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชยังไม่สามารถช่วยเพิ่มโปรตีนได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกที่เวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ (ตาราง 17) และการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ (ตาราง 23) โดยการโซนิเคชันเพียงอย่างเดียวหรือร่วมกับการใช้ความร้อนมีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่มีความสำคัญทางอุตสาหกรรม (Coakley, Brown, & James, 1973)

อย่างไรก็ตามการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์นั้นทำได้ที่อุณหภูมิสูง 60-80 องศาเซลเซียส และความดัน 200 กิโลปาสกาล การยับยั้งเอนไซม์ในระบบอาหารอาจแตกต่างกันอย่างมากเนื่องจากการปรากฏของส่วนประกอบอาหารอื่น ๆ (Kadkhodaee, & Povey, 2008) ทั้งนี้ประสิทธิภาพของอัลตร้าซาวด์สำหรับควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์นั้นได้รับอิทธิพลจากปัจจัยภายนอก เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ ค่า pH และองค์ประกอบของของเหลวที่ใช้เป็นตัวกลาง โดยงานวิจัยนี้ใช้อัลตราโซนิกความถี่ 30 กิโลเฮิร์ต กำลัง 280 วัตต์ และมีการควบคุมอุณภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส มีความเป็นไปได้ว่าคลื่นอัลตราโซนิกไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของโปรตีน (ตาราง 31) และร้อยละอัตราส่วนโปรตีน (ตาราง 32) ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการพรีทรีทเมนท์ ค่า pH ของเอนไซม์ และจากการศึกษาทั่วไปรายงานว่าระยะเวลาการสัมผัสคลื่นเป็นเวลานานจะสามารถยับยั้งเอนไซม์ โดยใช้อัลตร้าซาวด์ที่ความเข้มสูงมากกว่า 100 กิโลเฮิร์ต โดยทั่วไปแล้วอัลตร้าซาวด์ที่ใช้ในการแปรรูปอาหารใช้ความถี่ต่ำ 20 ถึง 100 กิโลเฮิร์ต และทำให้เกิดโพรงอากาศที่มีความเข้มข้น 10 ถึง 1,000 วัตต์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (Feng, & Yang, 2005) และมีรายงานวิจัยกล่าวว่าอัลตร้าซาวด์ไม่มีผลกระทบต่อเอนไซม์บางชนิด ในขณะที่บางรายงานวิจัยกล่าวว่าการเกิดโพรงอากาศที่เกิดจากคลื่นอัลตร้าซาวด์ทั้งทางกายภาพและทางเคมีส่งผลกระทบต่อเอนไซม์ (Kadkhodaee, & Povey, 2008)

**ตาราง 31 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยน้ำหนักแห้ง และ %Yield ของไข่น้ำผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | เวลานาที | ความเข้มข้นเอนไซม์ ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | Pellet | | Supernatant | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยน้ำหนักแห้ง | %Yield | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด โดยน้ำหนักแห้ง | %Yield |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 60 | 0.0 | 13.61±0.25$^{g}$ | 66.79 | 49.81±2.75$^{b}$ | 20.30 |
| 2 | US-C | 30:30 | 0.5 | 32.90±0.02$^{b}$ | 25.23 | 46.98±0.05$^{d}$ | 35.19 |
| 3 | USC | 30 | 0.5 | 30.19±0.01$^{c}$ | 17.49 | 34.64±0.01$^{f}$ | 33.64 |
| 4 | US-P | 30:30 | 0.5 | 28.51±0.01$^{e}$ | 29.28 | 44.35±0.02$^{e}$ | 34.24 |
| 5 | USP | 30 | 0.5 | 42.44±0.03$^{a}$ | 31.03 | 44.24±0.01$^{e}$ | 37.17 |
| 6 | US-X | 30:30 | 0.5 | 29.90±0.01$^{d}$ | 30.80 | 48.10±0.03$^{c}$ | 35.01 |
| 7 | USX | 30 | 0.5 | 24.90±0.01$^{f}$ | 28.73 | 53.88±0.02$^{a}$ | 32.35 |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรภาษาอังกฤษยกกำลัง a b c d e f และ g ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 32 ร้อยละอัตราส่วนโปรตีนของไข่น้ำในส่วนเพลเลส ซูเปอร์เนเทน และฟูลดิสเพอร์ชัน ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาทีต่อนาที | ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| **1** | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 9.09 | 10.11 | 24.80 |
| **2** | US-C | 0.5 | 30:30 | 8.30 | 16.53 | 18.17 |
| **3** | USC | 0.5 | 30 | 5.28 | 11.65 | 26.07 |
| **4** | US-P | 0.5 | 30:30 | 8.35 | 15.19 | 19.46 |
| **5** | USP | 0.5 | 30 | 13.17 | 16.44 | 13.39 |
| **6** | US-X | 0.5 | 30:30 | 9.21 | 16.84 | 16.95 |
| **7** | USX | 0.5 | 30 | 7.15 | 17.43 | 18.42 |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม หมายถึง ตัวอย่างไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

ร้อยละโปรตีนไข่น้ำ (วัตถุดิบเริ่มต้น) เท่ากับ 44.00±0.43

ร้อยละอัตราส่วนโปรตีน เท่ากับ (ร้อยละโปรตีนทั้งหมด/ %Yield) x 100

**2. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ**

ตาราง 33 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที เพลเลส และฟูดิสเพอร์ชัน มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูง เท่ากับร้อยละ 36.55±0.03 และ 38.52±0.04 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม การพรีทรีทเมนท์เพียงเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เวลา 15 30 40 และ 60 นาที ตามลำดับ (ตาราง 26) มีประสิทธิยับยั้งอนุมูลอิสระ (ร้อยละ 23.11 ถึง 38.03) ได้ดีกว่ากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์

ตาราง 34 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก พบว่า กระบวนการ พรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์และการทำงานของอัลตราโซนิกร่วมกับย่อยด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพแย่งจับกับโลหะหนักของส่วนเพลเลสได้มากถึง

ร้อยละ 50 การพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ของความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักในส่วนซูเปอร์เนเทน ขณะที่ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักในส่วนเพลเลสเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้การทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์มีประสิทธิภาพการแย่งจับโลหะหนักของส่วนเพลเลสเท่ากับร้อยละ 67.29 ถึง 88.23 และซูเปอร์เนเทน เท่ากับร้อยละ 52.29 ถึง 79.41 ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก (ตาราง 20) หรือเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส (ตาราง 27) เพียงใดอย่างหนึ่ง

ตาราง 35 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทั้ง 2 วิธี ช่วยเสริมความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันในส่วนซูเปอร์เนเทนได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชทำให้ส่วนซูเปอร์เนเทนมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม 3 ถึง 4 เท่า อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ FRAP ของการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที เท่ากับ 1189.7±0.08 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม (ตาราง 21) และการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เวลาย่อย 30 นาที เท่ากับ 1423.1±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม (ตาราง 28) สูงกว่าการพรีทรีทเมนท์ร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ตามลำดับ

**3. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก**

ตาราง 36 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับการย่อยด้วยเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระยะเวลาย่อย 30 นาที ส่วนของซูเปอร์เนเทนมีปริมาณฟีนอลิกสูง เท่ากับ 146.0±0.03 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม และไม่มีความแตกต่างกับตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ เท่ากับ 90.9 ถึง 146.0 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม มีประสิทธิภาพการเพิ่มปริมาณฟีนอลิกได้ดีกว่าการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 เวลาย่อย 15 30 40 และ 60 นาที ตามลำดับ (ตาราง 29)

**ตาราง 33 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้น ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลา นาทีต่อนาที | ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 13.37±0.01$^{d}$ | 14.99±0.03$^{f}$ | 20.33±0.02$^{c}$ |
| 2 | US-C | 0.5 | 30:30 | 16.79±0.05$^{b}$ | 16.59±0.05$^{d}$ | 16.97±0.05$^{e}$ |
| 3 | USC | 0.5 | 30 | 10.95±0.07$^{e}$ | 21.15±0.04$^{c}$ | 17.40±0.05$^{d}$ |
| 4 | US-P | 0.5 | 30:30 | 13.28±0.06$^{d}$ | 14.60±0.06 | 14.24±0.06$^{f}$ |
| 5 | USP | 0.5 | 30 | 36.55±0.03$^{a}$ | 23.22±0.05$^{b}$ | 38.52±0.04$^{a}$ |
| 6 | US-X | 0.5 | 30:30 | 11.34±0.08$^{e}$ | 23.90±0.04$^{a}$ | 26.63±0.05$^{b}$ |
| 7 | USX | 0.5 | 30 | 16.21±0.05$^{c}$ | 15.78±0.05$^{e}$ | 17.47±0.06$^{d}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 34 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาทีต่อนาที | ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 39.24±2.19$^{f}$ | 47.90±13.15$^{a}$ | 40.15±0.02$^{f}$ |
| 2 | US-C | 0.5 | 30:30 | 88.23±0.10$^{a}$ | 39.70±0.04$^{b}$ | 79.41±0.03$^{a}$ |
| 3 | USC | 0.5 | 30 | 69.66±0.03$^{d}$ | 35.16±0.00$^{bc}$ | 59.13±0.03$^{b}$ |
| 4 | US-P | 0.5 | 30:30 | 70.36±0.02$^{d}$ | 37.84±0.00$^{b}$ | 56.92±0.01$^{c}$ |
| 5 | USP | 0.5 | 30 | 67.29±0.16$^{e}$ | 39.12±0.21$^{b}$ | 56.88±0.21$^{c}$ |
| 6 | US-X | 0.5 | 30:30 | 76.53±0.02$^{b}$ | 29.76±0.12$^{c}$ | 52.29±0.02$^{e}$ |
| 7 | USX | 0.5 | 30 | 71.91±0.02$^{c}$ | 38.42±0.02$^{b}$ | 55.79±0.04$^{d}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 35 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาทีต่อนาที | ความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 47.0±0.00[b] | 1100.8±0.00[a] | 342.0±0.00[a] |
| 2 | US-C | 0.5 | 30:30 | 50.9±0.01[a] | 311.6±0.00[b] | 111.9±0.04[d] |
| 3 | USC | 0.5 | 30 | 51.6±0.00[a] | 266.6±0.03[d] | 103.1±0.00[f] |
| 4 | US-P | 0.5 | 30:30 | 29.5±0.05[f] | 248.5±0.00[e] | 110.4±0.02[d] |
| 5 | USP | 0.5 | 30 | 34.3±0.06[e] | 315.6±0.00[b] | 106.8±0.00[e] |
| 6 | US-X | 0.5 | 30:30 | 43.5±0.00[c] | 280.3±0.06[c] | 128.8±0.01[b] |
| 7 | USX | 0.5 | 30 | 38.7±0.03[d] | 267.4±0.02[d] | 116.7±0.00[c] |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

**ตาราง 36 ผลปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้น ร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลา นาทีต่อนาที | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 6.5±0.00$^{d}$ | 141.0±0.00$^{a}$ | 41.3±0.00$^{b}$ |
| 2 | US-C | 0.5 | 30:30 | 16.4±0.02$^{c}$ | 90.9±0.01$^{e}$ | 33.0±3.27$^{c}$ |
| 3 | USC | 0.5 | 30 | 22.1±2.85$^{a}$ | 105.4±0.01$^{d}$ | 50.6±1.26$^{a}$ |
| 4 | US-P | 0.5 | 30:30 | 16.5±0.01$^{c}$ | 106.5±0.00$^{d}$ | 37.7±0.03$^{bc}$ |
| 5 | USP | 0.5 | 30 | 17.5±0.01$^{bc}$ | 112.4±0.05$^{c}$ | 53.5±3.03$^{a}$ |
| 6 | US-X | 0.5 | 30:30 | 21.8±1.53$^{a}$ | 121.2±0.07$^{b}$ | 51.3±3.84$^{a}$ |
| 7 | USX | 0.5 | 30 | 19.8±0.01$^{ab}$ | 146.0±0.03$^{a}$ | 52.8±1.67$^{a}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

ผลการพรีทรีทเมนท์ทั้ง 3 วิธีดังกล่าว ค้นพบว่าการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ไข่น้ำส่งผลต่อการช่วยปลดปล่อยโปรตีนออกมากับตัวทำละลายและเพิ่มปริมาณฟีนอลิก การพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ได้แก่ เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ไข่น้ำและกระตุ้นกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ขณะที่การพรีทรีทเมนท์ร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์มีความสามารถต่อการช่วยปลดปล่อยโปรตีนออกมากับตัวทำละลายมีประสิทธิภาพปลดปล่อยโปรตีน เสริมฤทธิ์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอกนิก

ทั้งนี้ส่วนเพลเลสยังหลงเหลือโปรตีนและฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกจากกระบวนการพรีทรีทเมนท์ร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชด้วยการใช้ส่วนฟูดิสเพอร์ชันเป็นส่วนที่มีทั้งเพลเลสและซูเปอร์เนเทนรวมกัน โดยจะถูกนำมาโปรติไลซิสเพื่อปรับปรุง

คุณสมบัติทางเคมี ทางชีวภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ในขั้นตอนต่อไป ซึ่งหลักการสำคัญของการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์เกิดการตัดสายพอลิเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้น ๆ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน (Kristinsson, & Rasco, 2000) เพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติหน้าที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ความคงตัวและกลิ่นรส เป็นต้น

**ผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิส**

US:C:A หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์อัลคาเลส

US:C:F หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์

US:P:A หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์เพคติเนสร่วมกับเอนไซม์อัลคาเลส

US:P:F หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์เพคติเนสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์

US:X:A หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์อัลคาเลส

US:X:F หมายถึง การพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์ไซลาเนสร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์

0.5:0.5 หมายถึง ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชต่อความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อปริมาณโปรตีนตัวอย่าง ของเอนไซม์โปรติเอส

0.5:2.0 หมายถึง ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชต่อความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ต่อปริมาณโปรตีนตัวอย่าง ของเอนไซม์โปรติเอส

30:30 หมายถึง ระยะเวลาย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช 30 นาที และย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส 30 นาที

30:60 คือ ระยะเวลาย่อย ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช 30 นาที และย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส 60 นาที

**1. ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย**

ตาราง 37 กระบวนการ US:P:F ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.5:0.5 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที มีระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 90.18±0.11 และ 98.67±0.53 ตามลำดับ และความเข้มข้นร้อยละ 0.5:2.0 เวลาย่อย 30 และ 60 นาที มีระดับการย่อยสลาย

เท่ากับร้อยละ 96.83±0.28 และ 95.56±1.37 ตามลำดับ ซึ่งมีระดับการย่อยสลายสูงร้อยละ 2 ถึง 97 เปรียบเทียบกับกระบวนการสกัดด้วย US:X:A US:X:F US:C:A และ U:C:F ตามลำดับ ทั้งนี้ยังสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของส่วนซูเปอร์เนเทน (ตาราง 32) พบร้อยละปริมาณโปรตีนสูงจากกระบวนการสกัดด้วย US:P:F ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 เวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ร้อยละ 49.97±10.93 และ 67.48±12.81 ตามลำดับ และการย่อยด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.5:2.0 เวลาย่อย 30 และ 60 นาที เท่ากับร้อยละ 59.88±5.22 และ 57.97±5.70 ตามลำดับ เนื่องจากสาหร่ายจะมีผนังเซลล์ชั้นนอกเป็นสารพวกเพคติน (กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์, 2527) ทำให้เอนไซม์เพคติเนสทำงานได้ดีในการย่อยสลายผนังเซลล์และเอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดสและเอกโดเปปติเดส ซึ่งการทำงานของเอนโดเปปติเดสทำหน้าที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระด้านในโซ่ของโมเลกุลโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ และมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง มีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) ส่วนเอกโซเปปติเดสทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้านนอก (Adler-Nissen, 1986) และสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) การย่อยด้วยเอนไซม์แบบผสมที่ประกอบไปด้วยเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดสจะมีค่าสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอกโซเปปติเดสเพียงอย่างเดียว (Aaslyng et al., 1998)

**ตาราง 37 ผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายของไข่น้ำผ่านกาโปรตีโอไลซิส**

| ลำดับ | วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ร้อยละระดับการย่อยสลาย |
|---|---|---|---|---|
| 1 | US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 18.84±2.10$^{gh}$ |
| 2 | US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 31.03±4.00$^{efg}$ |
| 3 | US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 5.54±2.43$^{i}$ |
| 4 | US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 24.38±4.99$^{gh}$ |
| 5 | US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 27.71±7.49$^{fgh}$ |
| 6 | US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 32.14±2.31$^{efg}$ |
| 7 | US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 39.16±0.69$^{ef}$ |
| 8 | US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 45.44±1.26$^{e}$ |
| 9 | US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 3.82±5.14$^{i}$ |
| 10 | US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 1.27±1.95$^{i}$ |
| 11 | US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 19.54±5.95$^{gh}$ |
| 12 | US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 82.82±0.00$^{ab}$ |
| 13 | US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 90.18±0.11$^{ab}$ |
| 14 | US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 98.67±0.53$^{a}$ |
| 15 | US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 96.83±0.28$^{a}$ |
| 16 | US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 95.56±1.37$^{a}$ |
| 17 | US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 63.83±1.21$^{cd}$ |
| 18 | US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 83.03±0.59$^{ab}$ |
| 19 | US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 73.85±4.01$^{bc}$ |
| 20 | US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 95.33±2.05$^{a}$ |
| 21 | US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 24.62±1.65$^{gh}$ |
| 22 | US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 51.53±1.00$^{de}$ |
| 23 | US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 67.17±3.86$^{bc}$ |
| 24 | US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 69.68±1.31$^{bc}$ |

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c d e f g h และ i ตามแนวตั้งแสดงถึงไข่น้ำที่แตกต่างกันจะมีระดับการย่อยสลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**2. ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมด**

ตาราง 38 พบว่า การทำงานของกระบวนการ US:C:F ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.5:0.5 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ไม่มีความสามารถสกัดโปรตีนได้ในส่วนซูเปอร์เนเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หลักการสำคัญของการย่อยสลายโปรตีนเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณสมบัติหน้าที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน ผลผลิตที่ได้เป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระขึ้นอยู่กับชนิดเอนไซม์ สภาวะในการย่อย ได้แก่ ค่า pH อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ เป็นต้น (Whitaker, 1994) ทั้งนี้ การทำงานร่วมกันของกระบวนการ US:C:F US:C:A US:P:F US:P:A US:X:A และ US:X:F ตามลำดับ อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อร้อยละการย่อยสลาย อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเร่งของปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นแต่อุณหภูมิที่เพิ่มสูงมากเกินไปอาจมีผลให้เกิดการสูญเสียธรรมชาติของเอนไซม์ได้เช่นกัน (Cigic, & Zelenik-Blatnik, 2004) ซึ่งการดำเนินงานวิจัยนี้มีขั้นตอนการปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์และปรับอุณหภูมิให้สูงถึง 95 องศาเซลเซียส ถึง 2 ครั้ง เพื่อหยุดยั้งปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์

อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดของกระบวนการโปรตีโอไลซิสด้วย US:C:A US:P:F US:X:A และ US:X:F ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ สามารถช่วยสกัดโปรตีนได้ดีขึ้นร้อยละ 1 ถึง 14 เมื่อเปรียบเทียบกับผลของกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที และตัวอย่างควบคุม (ตาราง 31) อีกทั้งผลของกระบวนการ US:P:F ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 เวลาย่อย 30:60 นาที เป็นกระบวนการที่สามารถสกัดโปรตีนออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน เท่ากับร้อยละ 67.48±12.81 ความสามารถสกัดโปรตีนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 กับกระบวนการ US:P:F ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:2.0 เวลาย่อย 30:30 นาที โปรตีนเท่ากับร้อยละ 59.88±5.22 ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในกระบวนการได้ถึง 30 นาที สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับย่อยสลาย (ตาราง 37) พบว่ากระบวนการ US:P:F ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.5:0.5 และ 0.5:2.0 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที มีระดับการย่อยสลายสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ความสามารถย่อยสลายอยู่ในช่วงร้อยละ 90 ถึง 98 ผลลัพธ์ดังกล่าวตัวอย่างที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสจะให้ปริมาณโปรตีนในส่วนของสารสกัดมากกว่าการใช้เพียงเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ซึ่งสามารถอธิบายได้ด้วยผลโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนที่อยู่ในสารสกัด (Alireza et al., 2020)

**ตาราง 38 ผลการวิเคราะห์ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | Pellet | | Supernatant | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield | ร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดโดยน้ำหนักแห้ง | %Yield |
| ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 13.61±0.25$^{d}$ | 66.79 | 49.81±2.75$^{b}$ | 20.30 |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 25.12±0.23$^{cd}$ | 17.22 | 51.05±2.40$^{b}$ | 26.13 |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 25.84±0.17$^{cd}$ | 15.08 | 59.42±0.05$^{a}$ | 26.54 |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 19.13±1.71$^{d}$ | 15.14 | 54.46±2.57$^{ab}$ | 30.11 |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 24.69±1.57$^{cd}$ | 15.96 | 50.86±0.95$^{b}$ | 30.63 |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 32.72±2.28$^{c}$ | 11.51 | 23.68±0.21$^{cd}$ | 39.74 |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 44.81±2.15$^{ab}$ | 16.13 | 27.72±1.02$^{c}$ | 26.92 |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 28.22±3.14$^{cd}$ | 5.55 | 23.47±0.69$^{cd}$ | 26.62 |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 58.66±3.50$^{a}$ | 10.37 | 28.51±0.58$^{c}$ | 29.34 |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 46.66±0.16$^{a}$ | 6.46 | 52.58±13.34$^{a}$ | 25.81 |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 19.79±0.07$^{d}$ | 12.68 | 36.46±10.01$^{c}$ | 27.89 |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 52.18±2.75$^{a}$ | 12.49 | 41.05±2.86$^{c}$ | 30.00 |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 22.91±1.00$^{d}$ | 13.02 | 43.87±2.31$^{bc}$ | 29.36 |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 31.23±0.92$^{c}$ | 10.09 | 49.97±10.93$^{b}$ | 40.29 |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 15.60±1.81$^{d}$ | 13.30 | 67.48±12.81$^{a}$ | 27.11 |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 45.59±1.17$^{ab}$ | 5.93 | 59.88±5.22$^{a}$ | 26.04 |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 48.08±4.55$^{a}$ | 8.92 | 57.97±5.70$^{a}$ | 29.58 |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 29.78±2.31$^{c}$ | 7.30 | 57.43±0.88$^{a}$ | 23.76 |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 42.43±0.99$^{b}$ | 7.23 | 57.32±1.91$^{a}$ | 20.34 |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 37.14±2.63$^{b}$ | 7.19 | 53.42±0.81$^{b}$ | 27.07 |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 24.53±0.57$^{cd}$ | 6.60 | 41.36±1.38$^{c}$ | 28.94 |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 27.45±1.77$^{c}$ | 7.01 | 45.59±1.90$^{b}$ | 27.87 |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 39.78±0.40$^{b}$ | 6.98 | 49.59±1.76$^{b}$ | 23.40 |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 26.59±1.71$^{c}$ | 7.15 | 50.09±2.08$^{b}$ | 25.40 |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 38.43±0.39$^{b}$ | 7.02 | 42.07±1.49$^{c}$ | 27.46 |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวตั้งแสดงถึงตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีการโปรตีโอไลซิสที่แตกต่างกันจะมีร้อยละปริมาณโปรตีนทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**3. ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ**

ตาราง 39 ผลร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า กระบวนการโปรติโอไลซิสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 และ 0.5:2.0 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ สามารถช่วยเสริมฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระร้อยละ 77 ถึง 81 ของตัวอย่าง US:C:A และร้อยละ 83 ถึง 86 ของตัวอย่าง US:C:F ซึ่งเป็นความสามารถต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่ากระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก (ตาราง 19) เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช (ตาราง 26) และตัวอย่างควบคุม และด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ เวลาการย่อย มีค่าความน่าจะเป็นเท่ากับ 0.026 และ 0.024 ตามลำดับ (ตาราง 43) มีผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ทั้งนี้ยังพบว่าความสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระในส่วนเพลเลสของกระบวนการโปรติโอไลซิสที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 และ 0.5:2.0 เวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ กระบวนการ US:C:A และ US:C:F มีความสามารถช่วยเพิ่มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระอยู่ในช่วงร้อยละ 56 ถึง 69 และ 71 ถึง 72 ตามลำดับ US:P:A และ US:P:F ร้อยละ 29 ถึง 40 และ 44 ถึง 59 ตามลำดับ US:X:A และ US:X:F ร้อยละ 29 ถึง 43 และ 44 ถึง 59 ตามลำดับ

ตาราง 41 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า ผลของกระบวนการ US:C:A ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 เวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ ซูเปอร์เนเทนมีความสามารถต้านออกซิเดชันสูง เท่ากับ 179.2±1.58 และ 178.4±1.55 ตามลำดับ ความเข้มข้น 0.5:2.0 เวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที เท่ากับ 173.9±4.52 และ 167.9±0.47 ตามลำดับ มีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 กับกระบวนการ US:C:F US:P:A US:P:F US:X:A และ US:X:F ตามลำดับ และค่าความน่าจะเป็น พบว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ เวลาย่อย และการทำงานร่วมกันของความเข้มข้นเอนไซม์กับเวลาย่อย เท่ากับ 0.104 0.550 และ 0.079 ตามลำดับ (ตาราง 41) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตาราง 41 ผลการวิเคราะห์ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก พบว่ากระบวนการของ US:C:A ความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 เวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ ทำให้ส่วนซูเปอร์เนเทนมีความสามารถจับโลหะหนักได้สูงถึงร้อยละ 54.58±0.08 และ 84.86±0.08 ตามลำดับ และ 0.5:2.0 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ เท่ากับร้อยละ 76.73±0.08 และ 66.24±0.08 ตามลำดับ US:P:A เท่ากับร้อยละ 60.53±3.67 และ 56.70±3.08 ตามลำดับ 59.47±9.83 และ 65.89±9.92 ตามลำดับ US:X:A เท่ากับร้อยละ 58.64±10.50 และ 63.18±5.83 ตามลำดับ 79.5±9.25 และ 84.56±0.00 ตามลำดับ US:P:F เท่ากับร้อยละ 37.61±4.08 และ 68.07±2.50 ตามลำดับ 63.30±6.75 และ 44.97±12.66 ตามลำดับ และค่าความ

น่าจะเป็น พบว่า ความเข้มข้นเอนไซม์ เท่ากับ 0.010 (ตาราง 43) มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

**ตาราง 39 ผลร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยด้วยวิธี DPPH ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 13.37±0.0$^{i}$ | 14.99±0.03$^{i}$ | 20.33±0.02$^{i}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 69.95±0.03$^{b}$ | 77.18±0.01$^{b}$ | 68.08±0.00$^{cd}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 59.66±0.01$^{b}$ | 77.93±0.01$^{b}$ | 75.12±0.00$^{cd}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 58.67±0.00$^{bc}$ | 81.36±0.00$^{ab}$ | 73.75±0.00$^{bc}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 56.98±0.01$^{bc}$ | 79.68±0.01$^{ab}$ | 72.32±0.02$^{bc}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 71.38±0.02$^{a}$ | 83.67±0.01$^{ab}$ | 79.86±0.01$^{a}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 72.76±0.00$^{a}$ | 85.79±0.01$^{ab}$ | 78.37±0.01$^{a}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 71.88±0.00$^{a}$ | 86.03±0.01$^{a}$ | 77.62±0.01$^{ab}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 71.38±0.01$^{a}$ | 85.91±0.00$^{a}$ | 78.87±0.01$^{ab}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 29.90±0.30$^{gh}$ | 38.66±1.18$^{gh}$ | 25.21±1.92$^{i}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 41.79±1.77$^{gh}$ | 31.78±0.89$^{gh}$ | 29.90±2.66$^{i}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 43.98±0.74$^{fg}$ | 37.20±1.18$^{ef}$ | 35.64±5.75$^{h}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 40.54±2.36$^{fg}$ | 53.37±2.80$^{ef}$ | 44.40±1.92$^{h}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 44.61±0.15$^{ef}$ | 24.69±5.02$^{h}$ | 38.56±4.57$^{i}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 49.20±0.74$^{ef}$ | 36.37±0.59$^{h}$ | 22.71±3.10$^{i}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 57.02±0.89$^{bcd}$ | 34.81±2.80$^{fg}$ | 50.77±5.02$^{fg}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 59.63±0.44$^{bcd}$ | 45.97±5.90$^{fg}$ | 44.40±5.75$^{fg}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 29.05±0.01$^{h}$ | 48.47±0.03$^{de}$ | 42.46±0.01$^{g}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 35.80±0.01$^{h}$ | 55.13±0.04$^{de}$ | 50.14±0.02$^{g}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 35.80±0.03$^{g}$ | 37.93±0.03$^{fg}$ | 50.32±0.01$^{f}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 43.20±0.01$^{g}$ | 46.35±0.00$^{fg}$ | 54.02±0.01$^{f}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 44.96±0.13$^{de}$ | 45.88±5.10$^{d}$ | 57.17±2.22$^{e}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 59.94±2.22$^{de}$ | 60.13±1.96$^{d}$ | 61.79±3.53$^{e}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 55.41±1.31$^{cd}$ | 60.41±1.57$^{c}$ | 65.31±0.13$^{d}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 55.69±6.67$^{cd}$ | 66.05±0.39$^{c}$ | 67.35±0.92$^{d}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส

ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c d e f g h และ i ตามแนวตั้งแสดงถึงตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีการโปรตีโอไลซิสที่แตกต่างกันจะมีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**ตาราง 40 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน (มิลลิกรัมสมมูลของ Fe2+ ต่อกรัม) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| ตัวอย่างควบคุม | 0 | 60 | 47.0±0.00$^{f}$ | 1100.8±0.00$^{a}$ | 342.0±0.00$^{a}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 37.7±0.50$^{f}$ | 179.2±1.58$^{b}$ | 65.8±0.57$^{h}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 34.1±0.71$^{g}$ | 178.4±1.55$^{b}$ | 96.2±0.70$^{e}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 38.7±0.12$^{f}$ | 173.9±4.52$^{b}$ | 94.0±1.35$^{e}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 35.9±0.93$^{g}$ | 167.9±0.47$^{c}$ | 93.1±0.72$^{e}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 60.7±0.69$^{cd}$ | 99.8±0.41$^{f}$ | 136.5±4.54$^{d}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 106.2±3.7$^{b}$ | 93.3±1.11$^{f}$ | 167.5±1.70$^{b}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 67.6±7.31$^{c}$ | 111.1±2.45$^{de}$ | 172.5±5.87$^{b}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 136.1±0.17$^{a}$ | 91.8±0.32$^{f}$ | 150.8±3.41$^{c}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 58.1±0.25$^{d}$ | 108.5±0.56$^{e}$ | 85.3±0.50$^{f}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 23.0±0.71$^{h}$ | 124.9±0.77$^{d}$ | 69.0±1.13$^{gh}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 22.0±0.29$^{h}$ | 119.4±1.19$^{d}$ | 63.0±1.48$^{h}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 21.9±0.88$^{h}$ | 80.3±0.70$^{g}$ | 54.0±1.88$^{i}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 28.6±0.08$^{gh}$ | 71.5±2.51$^{h}$ | 59.5±0.54$^{i}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 18.0±0.26$^{i}$ | 102.5±1.87$^{e}$ | 72.8±2.94$^{g}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 48.5±1.01$^{ef}$ | 87.9±2.43$^{fg}$ | 55.7±0.63$^{i}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 23.6±0.26$^{h}$ | 73.7±1.46$^{h}$ | 51.4±1.26$^{i}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 47.6±1.00$^{f}$ | 126.3±0.30$^{d}$ | 84.0±0.49$^{f}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 47.2±0.41$^{f}$ | 134.6±2.50$^{d}$ | 89.0±1.50$^{e}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 48.2±0.53$^{ef}$ | 108.6±0.80$^{e}$ | 109.0±1.77$^{e}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 50.5±0.47$^{e}$ | 91.3±1.49$^{f}$ | 73.2±1.44$^{g}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 58.3±0.65$^{d}$ | 96.0±0.52$^{f}$ | 67.6±0.15$^{g}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 54.7±0.44$^{e}$ | 103.1±0.92$^{e}$ | 75.8±0.75$^{g}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 49.2±0.42$^{e}$ | 87.1±0.57$^{fg}$ | 89.1±0.91$^{e}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 50.5±0.95$^{e}$ | 76.6±0.52$^{g}$ | 70.9±1.51$^{g}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c d e f g h และ i ตามแนวตั้งแสดงตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีการโปรตีโอไลซิสที่แตกต่างกันจะมีความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**ตาราง 41 ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักของไข่น้ำที่ผ่านการโปรติโอไลซิส**

| วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| ตัวอย่างควบคุม | 0 | 60 | 39.24±2.19$^{f}$ | 47.90±13.15$^{d}$ | 40.15±0.02$^{d}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 45.62±1.08$^{e}$ | 54.58±0.08$^{c}$ | 85.92±0.92$^{b}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 52.34±0.75$^{e}$ | 84.86±0.08$^{a}$ | 78.73±0.92$^{c}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 2.26±1.42$^{h}$ | 76.73±0.08$^{ab}$ | 61.47±1.33$^{cd}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 1.43±0.25$^{h}$ | 66.24±0.08$^{b}$ | 68.48±9.42$^{c}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 54.16±0.50$^{de}$ | 45.86±0.08$^{d}$ | 42.68±0.25$^{d}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 24.76±0.75$^{g}$ | 47.45±9.00$^{d}$ | 33.96±0.25$^{e}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 59.23±0.33$^{d}$ | 47.92±6.50$^{d}$ | 83.80±0.08$^{bc}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 52.81±0.58$^{e}$ | 61.47±9.17$^{c}$ | 69.54±0.58$^{c}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 25.94±2.42$^{fg}$ | 60.53±3.67$^{c}$ | 86.92±0.00$^{b}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 24.82±1.17$^{g}$ | 56.70±3.08$^{c}$ | 56.17±8.33$^{d}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 31.78±9.33$^{f}$ | 59.47±9.83$^{bc}$ | 67.83±5.83$^{c}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 30.54±7.08$^{f}$ | 65.89±9.92$^{b}$ | 76.14±0.08$^{c}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 32.84±7.50$^{f}$ | 37.61±4.08$^{e}$ | 90.63±0.08$^{a}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 88.92±0.17$^{a}$ | 68.07±2.50$^{b}$ | 90.16±0.08$^{a}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 89.04±0.00$^{a}$ | 63.30±6.75$^{bc}$ | 89.75±0.00$^{a}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 38.02±0.83$^{f}$ | 44.97±12.66$^{de}$ | 89.16±0.33$^{ab}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 93.23±0.08$^{a}$ | 58.64±10.50$^{c}$ | 93.40±0.17$^{a}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 72.19±5.17$^{c}$ | 63.18±5.83$^{bc}$ | 88.34±0.00$^{b}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 82.56±4.83$^{b}$ | 79.56±9.25$^{a}$ | 93.05±0.00$^{a}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 93.52±0.00$^{a}$ | 84.56±0.00$^{a}$ | 91.93±0.08$^{a}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 79.03±0.00$^{b}$ | 61.53±0.08$^{c}$ | 92.87±0.08$^{a}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 81.21±5.58$^{b}$ | 43.85±6.08$^{de}$ | 86.16±1.42$^{bc}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 83.39±5.17$^{b}$ | 50.16±9.83$^{d}$ | 89.34±0.25$^{ab}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 59.64±0.08$^{d}$ | 62.12±3.42$^{bc}$ | 87.22±0.25$^{b}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c d e f g และ h ตามแนวตั้งแสดงถึงตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีการโปรตีโอไลซิสที่แตกต่างกัน จะมีร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**4. ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิก**

ตาราง 42 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด หน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบว่า กระบวนการโปรตีโอไลซิสด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.5:0.5 และ 0.5:2.0 ระยะเวลาย่อย 30:30 และ 30:60 นาที ตามลำดับ US:X:A มีค่าเท่ากับ 159.6±14.95 และ 150.2±32.77 ตามลำดับ 152.8±26.55 และ 169.0±18.81 ตามลำดับ US:X:F มีค่าเท่ากับ 160.3±17.65 และ 147.3±20.32 ตามลำดับ 175.6±16.60 และ 167.1±9.49 ตามลำดับ US:C:F มีค่าเท่ากับ 87.4±8.95 และ 108.6±8.39 ตามลำดับ 151.9±20.76 และ 149.4±17.40 ตามลำดับ US:P:F มีค่าเท่ากับ 60.9±9.17 และ 93.3±28.95 ตามลำดับ 137.2±26.91 และ 142.5±19.95 ตามลำดับ US:C:A มีค่าเท่ากับ 99.9±14.25 และ 114.7±16.04 ตามลำดับ 116.0±18.51 และ 123.9±10.76 ตามลำดับ US:P:A มีค่าเท่ากับ 80.2±6.85 และ 90.0±9.69 ตามลำดับ 111.7±15.13 และ 113.7±15.21 ตามลำดับ และค่าความน่าจะเป็นของความเข้มข้นเอนไซม์ เท่ากับ 0.000 ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณฟีนอลิกในส่วนซูเปอร์เนเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ผลลัพธ์โดยรวมของกระบวนการโปรตีโอไลซิสทางผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกวิธีการสกัดสารสกัดจากไข่น้ำ โดยกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 30 นาที จากนั้นนำส่วนฟูดิสเพอร์ชันย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ต่อปริมาณโปรตีน เวลาย่อย 30 นาที เนื่องจากผลระดับการย่อยสลาย (ตาราง 37) กระบวนการ US:P:F มีระดับการย่อยสลายสูงถึงร้อยละ 96.83±0.28 และสามารถสกัดโปรตีนได้ร้อยละ 59.88±5.22 ทางผู้วิจัยสันนิษฐานว่าการคัดเลือกจากระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีน ตามลำดับ สามารถช่วยเสริมการย่อยสายเปปไทด์ให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพและช่วยเสริมคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสกัดจากไข่น้ำหลังจากการทำแห้งได้

**ตาราง 42 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของไข่น้ำที่ผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| วิธีการ | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| ตัวอย่างควบคุม | 0 | 60 | 6.5±0.00$^{i}$ | 141.0±0.00$^{c}$ | 41.3±0.00$^{f}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 23.8±0.50$^{h}$ | 100.0±14.25$^{f}$ | 51.5±3.37$^{e}$ |
| US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 27.0±2.70$^{g}$ | 114.7±16.04$^{f}$ | 64.7±8.96$^{de}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 28.0±2.53$^{g}$ | 116.0±18.51$^{ef}$ | 66.6±5.32$^{d}$ |
| US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 25.4±0.71$^{h}$ | 123.9±10.76$^{e}$ | 72.2±2.82$^{d}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 44.9±3.87$^{ef}$ | 87.4±8.95$^{g}$ | 58.9±0.24$^{e}$ |
| US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 32.1±2.94$^{fg}$ | 108.5±8.39$^{f}$ | 63.3±6.10$^{de}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 104.1±7.04$^{a}$ | 152.0±20.76$^{bc}$ | 74.0±19.04$^{c}$ |
| US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 59.7±3.91$^{c}$ | 149.4±17.40$^{c}$ | 89.6±4.40$^{bc}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 38.0±3.92$^{f}$ | 80.2±6.85$^{h}$ | 60.3±9.49$^{e}$ |
| US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 24.0±4.84$^{h}$ | 90.0±9.69$^{g}$ | 56.9±4.70$^{e}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 28.2±3.09$^{g}$ | 111.7±15.13$^{f}$ | 73.0±4.74$^{d}$ |
| US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 30.6±1.95$^{fg}$ | 113.7±15.21$^{f}$ | 86.1±8.77$^{c}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 37.3±4.56$^{f}$ | 60.9±9.17$^{i}$ | 57.2±6.70$^{e}$ |
| US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 26.2±3.42$^{gh}$ | 93.3±28.95$^{g}$ | 63.4±7.00$^{de}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 112.3±10.48$^{a}$ | 137.2±26.91$^{c}$ | 101.2±1.33$^{ab}$ |
| US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 59.5±5.75$^{c}$ | 142.5±19.95$^{c}$ | 91.0±3.84$^{bc}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 55.9±9.4$^{e}$ | 159.6±14.95$^{b}$ | 97.8±5.05$^{b}$ |
| US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 62.1±8.7$^{c}$ | 150.2±32.77$^{bc}$ | 105.8±6.53$^{ab}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 72.1±7.60$^{b}$ | 152.8±26.55$^{bc}$ | 111.7±3.50$^{ab}$ |
| US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 83.7±1.87$^{b}$ | 169.0±18.81$^{a}$ | 114.0±4.61$^{ab}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 66.9±6.08$^{b}$ | 160.3±17.65$^{ab}$ | 96.9±9.60$^{b}$ |
| US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 63.1±3.86$^{c}$ | 147.3±20.32$^{c}$ | 105.7±9.11$^{ab}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 75.2±0.62$^{b}$ | 175.6±16.60$^{a}$ | 120.4±12.02$^{a}$ |
| US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 65.3±7.19$^{bc}$ | 167.1±9.49$^{a}$ | 132.0±13.48$^{a}$ |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านการพรีทรีทเมนท์และโปรตีโอไลซิส ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c d e f g h และ i ตามแนวตั้งแสดงถึงตัวอย่างเดียวกันด้วยวิธีการโปรตีโอไลซิสที่แตกต่างกันจะมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการวัดสาม (n=3)

**ตาราง 43 ผลความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยไข่น้ำต่อสารประกอบฟีนอลิกและกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทน**

| การทดสอบ | F | Sig. |
|---|---|---|
| **ร้อยละปริมาณโปรตีน** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 0.285 | 0.595 |
| เวลา | 0.189 | 0.665 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 1.513 | 0.223 |
| **ร้อยละกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 5.178 | 0.026 |
| เวลา | 5.290 | 0.024 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 0.076 | 0.783 |
| **ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 6.997 | 0.010 |
| เวลา | 2.341 | 0.130 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 1.973 | 0.165 |
| **ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 2.721 | 0.104 |
| เวลา | 0.360 | 0.550 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 3.170 | 0.079 |
| **ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด** | | |
| ความเข้มข้นเอนไซม์ | 17.678 | 0.000 |
| เวลา | 0.864 | 0.356 |
| ความเข้มข้นเอนไซม์และเวลา | 0.343 | 0.560 |

การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวางแผนการทดลองแฟคทอเรียลแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลองโดย ANOVA (Tests of between-subjects effects) ที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (0.05) โดยใช้โปรแกรม IBM® SPSS® ststics version 25

F คือ ค่าสถิติที่ใช้ในการพิจารณา (F-distribution) และ Sig. คือ ค่าความน่าจะเป็น (2-sided)

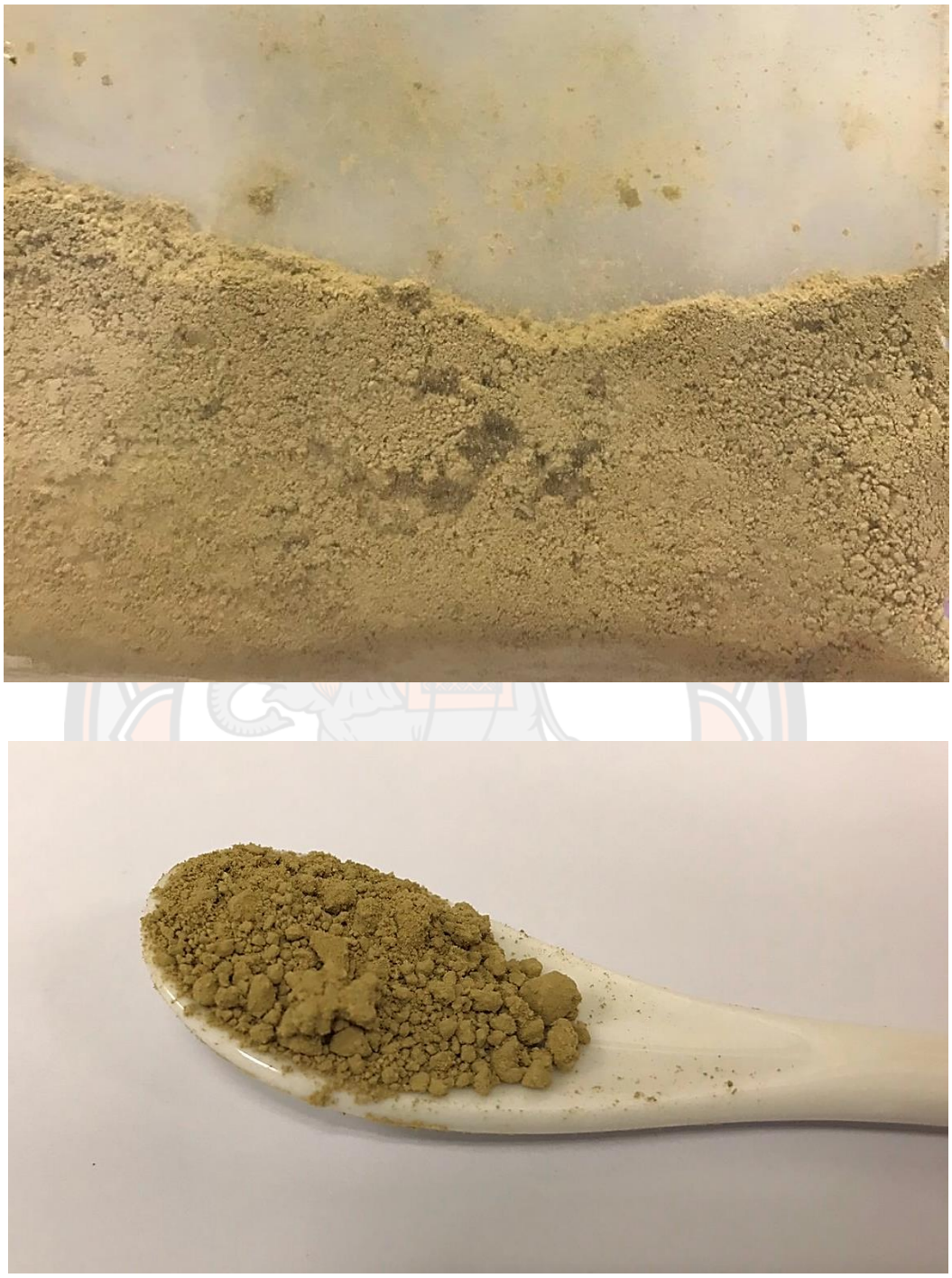
**5. ผลการวิเคราะห์ไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F**

ผลของการทำแห้งส่วนซูเปอร์เนเทนของตัวอย่างควบคุม พบปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารสกัด เท่ากับร้อยละ 1.16±0.01 และสารสกัดจากกระบวนการ US:P:F ปริมาณของแข็งทั้งหมดในสารสกัด เท่ากับร้อยละ 2.53±0.01 การทำแห้งสารสกัดเพื่อหลีกเลี่ยงการเน่าเสีย อำนวยความสะดวกในการขนส่งและการเก็บรักษา (Villagracia et al., 2016) และทางอุตาสหกรรมนิยมใช้มัลโตเดร็กตินช่วยให้สารสกัดจับตัวเป็นผงเหมาะสำหรับสารสกัดที่ต้องการความคงตัว การละลาย และการควบคุมการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Ray S et al., 2016) โดยงานวิจัยนี้ตัวอย่างควบคุมต้องใช้สารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 3 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัด เนื่องจากผู้วิจัยได้ทดลองการใช้สารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างควบคุม ลักษณะของตัวอย่างสุดท้ายที่ออกจากเครื่องสเปย์ดรายมีลักษณะเปียกไม่เป็นผง (ภาพ 23) และสารสกัดจากกระบวนการ US:P:F สารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัด จากการสังเกตผงสารสกัดด้วยตาเปล่า พบว่า ผงของตัวอย่างควบคุมมีลักษณะเกาะกันเป็นก้อน ไม่มีความละเอียด (ภาพ 24) มีค่าความสว่าง *L** เท่ากับ 58.18±0.01 *a** เท่ากับ 4.80±0.17 มีค่าไปทางด้านสีแดง และ *b** เท่ากับ 17.10±0.15 มีค่าไปทางด้านสีเหลือง (ตาราง 44) ขณะที่ตัวอย่างจากกระบวนการ US:P:F ผงของสารสกัดไข่น้ำมีความละเอียดเนื้อสัมผัสเนียน และไม่จับตัวเป็นก้อน (ภาพ 25) มีค่าความสว่าง *L** เท่ากับ 56.16±0.14 *a** เท่ากับ 4.36±0.21 มีค่าไปทางด้านสีแดง และ *b** เท่ากับ 14.71±0.49 มีค่าไปทางด้านสีเหลือง (ตาราง 44) ทั้งนี้มีความสามารถในการละลายน้ำของผงสารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F ร้อยละ 93.75±3.80 โดยชนิดโปรตีนที่มีความสามารถในการละลายน้ำคือโกบูลาโปรตีนมีลักษณะขดกันเป็นวงกลมพันธะที่ยึดกันไม่เหนียวแน่นมากนัก และมีค่าใกล้เคียงกับรายวิจัยของ (Le Guillard et al., 2016) พบว่าการสกัดด้วยอัลตร้าซาวด์และเอนไซม์ในสาหร่าย *G. turuturu* เมื่อรวม 2 กระบวนการนี้ทำให้วัตถุดิบละลายน้ำได้มากถึงร้อยละ 91 ทั้งนี้สารสกัดจากจาการโปรติโอไลซิสไข่น้ำมีความสามารถในการเกิดโฟม ร้อยละ 96.61±1.02 และความคงตัวของโฟม ร้อยละ 14.00±2.83 สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเปรียบกับตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามสารสกัดตัวอย่างควบคุมมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ ความเสถียรภาพของอิมัลชัน และความคงตัวของโฟมสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 (ตาราง 44)

ภาพ 26 แสดงผลการวิเคราะห์ลักษณะไข่น้ำส่วนเพลเลสของตัวอย่างควบคุม มีค่าความสว่าง *L** เท่ากับ 43.93±0.03 *a** เท่ากับ -0.49±0.02 มีค่าไปทางด้านสีเขียว และ *b** เท่ากับ 4.22±0.03 มีค่าไปทางด้านสีเหลือง และตัวอย่างจากกระบวนการ US:P:F มีค่าความสว่าง *L** เท่ากับ 43.66±0.27 *a** เท่ากับ -0.15±0.04 มีค่าไปทางด้านสีเขียว และ *b** เท่ากับ 3.50±0.09 มีค่าไปทางด้านสีเหลือง (ภาพ 27) ทั้งนี้การวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ พบว่า ตัวอย่างควบคุมมี

ความเสถียรภาพของอิมัลชัน ร้อยละ 32.14±5.98 ความสามารถการเกิดโฟม ร้อยละ 28.18±1.29 สูงกว่าตัวอย่าง U:P:F ถึงร้อยละ 28 และ 58 ตามลำดับ (ตาราง 44)

**ภาพ 23 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำตัวอย่างควบคุมผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 1 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย**



**ภาพ 24 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำตัวอย่างควบคุมผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 3 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย**

**ภาพ 25 ลักษณะสารสกัดจากไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F ผสมสารละลายมัลโตเดร็กติน ร้อยละ 1 ทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย**

**ภาพ 26 ลักษณะไข่น้ำส่วนเพลเลสของตัวอย่างควบคุม ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง**

**ภาพ 27 ลักษณะไข่น้ำส่วนเพลเลสจากกระบวนการ US:P:F ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง**

**ตาราง 44 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ความชื้น และปริมาณน้ำอิสระของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิสด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งส่วนเพลเลสและทำแห้งแบบพ่นฝอยส่วนซูเปอร์เนเทน**

| การทดสอบ (ค่าเฉลี่ย) | ตัวอย่างควบคุม | | US:P:F | |
|---|---|---|---|---|
| | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ |
| ความสามารถในการละลายน้ำ (ร้อยละ) | 2.90±0.66$^{Ac}$ | 80.05±5.48$^{Bb}$ | 3.45±0.60$^{Ac}$ | 93.75±3.80$^{Aa}$ |
| ดัชนีการดูดซับน้ำ (ร้อยละ) | 6.12±0.84$^{Ab}$ | 0.87±0.04$^{Ac}$ | 7.60±0.56$^{Aa}$ | 0.05±0.02$^{Bd}$ |
| ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (ร้อยละ) | 13.57±1.51$^{Ab}$ | 54.76±3.37$^{Aa}$ | 14.29±0.48$^{Ab}$ | 3.36±1.54$^{Bc}$ |
| เสถียรภาพของอิมัลชัน (ร้อยละ) | 32.14±5.98$^{Ab}$ | 48.55±4.88$^{Aa}$ | 8.03±1.49$^{Bd}$ | 20.67±2.92$^{Bc}$ |
| ความสามารถการเกิดโฟม (ร้อยละ) | 28.18±1.29$^{Ac}$ | 38.66±2.57$^{Bb}$ | 4.75±1.28$^{Bd}$ | 96.61±1.02$^{Aa}$ |
| ความคงตัวของโฟม (ร้อยละ) | 0.00±0.00$^{Ac}$ | 30.00±5.66$^{Aa}$ | 0.00±0.00$^{Ac}$ | 14.00±2.83$^{Bb}$ |
| ค่าสี *L** | 43.93±0.03 | 58.18±0.01 | 43.66±0.27 | 56.16±0.14 |
| *a** | -0.49±0.02 | 4.80±0.17 | -0.15±0.04 | 4.36±0.21 |
| *b** | 4.22±0.03 | 17.10±0.15 | 3.50±0.09 | 14.71±0.49 |
| ค่าความชื้น (ร้อยละ) | 8.05±0.52$^{Ab}$ | 0.24±0.01$^{Aa}$ | 14.73±0.71$^{Bc}$ | 7.57±0.01$^{Bb}$ |
| ปริมาณน้ำอิสระ (ร้อยละ) | 0.54±0.00$^{Ac}$ | 0.10±0.00$^{Aa}$ | 0.49±0.03$^{Ac}$ | 0.14±0.00$^{Bb}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b c และ d ตามแนวนอนแสดงถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างต่างกันที่กระบวนการสกัดต่างกัน และตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ A และ B ตามแนวนอนแสดงถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างเดียวกันที่กระบวนการสกัดต่างกัน จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 หมายเหตุ: ตัวอักษรยกกำลังภาษาอักกฤษแสดงถึงการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ FD หมายถึง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ SD หมายถึง การทำแห้งแบบพ่นฝอย ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

ผลการทดสอบคุณสมบัติทางเคมี พบว่า ผงสารสกัดจากกระบวนการ US:P:F มีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 36.52±0.48 ไขมัน ร้อยละ 0.32±0.03 เถ้า 30.58±0.10 เยื่อใย 0.10±0.44 ความชื้น 7.57±0.01 ซึ่งปริมาณโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของตัวอย่างควบคุม (ตาราง 45) ทั้งนี้ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างที่มีส่วนผสมสารละลายมัลโตเดร็กตินลดลงร้อยละ 6 ของตัวอย่างควบคุม และร้อยละ 1 ของตัวอย่าง US:P:F เมื่อผ่านความร้อนจากกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอย มีข้อดี คือ สามารถควบคุมขนาดอนุภาคและสัณฐานวิทยา แต่อุณหภูมิสูง ซึ่งในงานวิจัยนี้ใช้ 120 องศาเซลเซียส มีผลต่อการทำลายสารรวมถึงโปรตีนที่ไวต่อความร้อนได้ (Ryckebosch et al., 2011) พบว่าการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีความไวต่อการสลายไขมันน้อยกว่าเมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จากสาหร่ายและช่วยให้แคโรทีนอยด์สามารถออกซิไดซ์ได้ทันทีเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ตาราง 46 ผลการวิเคราะห์จุลชีวะทั้งหมด ยีสต์และราทั้งหมด พบว่า สารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F มีจำนวนจุลชีวะทั้งหมด เท่ากับ $71x10^2$ CFU/ml และจำนวนยีสต์และราทั้งหมดมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $1x10^1$ ซึ่งปริมาณน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมที่พบจำนวนจุลชีวะทั้งหมด เท่ากับ $73x10^4$ CFU/ml และจำนวนยีสต์และราทั้งหมด จำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $20x10^1$ เป็นไปตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2560 เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 กล่าวว่าอาหารที่ผ่านกระบวนการทำให้แห้งที่มีปริมาณน้ำอิสระในอาหารน้อยกว่า 0.86 จำนวนยีสต์และรา น้อยกว่า 100 CFU/g

ทั้งนี้การทำแห้งแบบพ่นฝอยมีจุลชีวะทั้งหมด ยีสต์และราทั้งหมดที่น้อยกว่าการทำแห้งแช่เยือกแข็งของส่วนเพลเลส เนื่องจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยใช้อุณหภูมิในการระเหยน้ำที่ 90 ถึง 200 องศาเซลเซียส ในเวลาอันรวดเร็ว ทำให้ผลิตภัณฑ์ผงสุดท้ายที่ได้มีความชื้นที่ต่ำและการเติมมัลโตเดร็กตินจะช่วยเพิ่มส่วนที่เป็นของแข็งและจะไปลดส่วนที่เป็นน้ำอิสระทำให้ค่าความชื้นลดลง (Tuyen C. Kha, 2010) สอดคล้องกับปริมาณน้ำอิสระ (ตาราง 44) โดยค่าปริมาณน้ำอิสระ ≤0.20 พบได้ในผลิตภัณฑ์นมผง ผักแห้งและคอนเฟก เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งได้แก่ *Osmophilic yeasts* และราบางชนิดได้ ส่งผลให้การเก็บรักษายาวนานขึ้น (Jay, 2000)

**ตาราง 45 ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิสด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งส่วนเพลเลสและทำแห้งแบบพ่นฝอยส่วนซูเปอร์เนเทน**

| สมบัติทางเคมี (ร้อยละ) | ตัวอย่างควบคุม | | | US:P:F | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Supernatant$^{MT}$ | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Supernatant$^{MT}$ |
| โปรตีน | 33.83±3.05 | 33.38±0.11 | 39.96±1.95 | 26.42±2.36 | 36.52±0.48 | 37.92±0.04 |
| ไขมัน | 5.40±0.08 | 0.53±0.04 | - | 7.63±0.10 | 0.32±0.03 | - |
| เยื่อใย | 64.36±0.06 | 46.73±0.05 | - | 0.20±0.05 | 0.10±0.44 | - |
| เถ้า | 6.26±0.33 | 6.87±0.20 | - | 36.60±0.06 | 30.58±0.10 | - |
| คาร์โบไฮเดรต | 46.45±5.25 | 54.44±1.67 | - | 24.61±2.80 | 23.61±0.07 | - |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรยกกำลังภาษาอังกฤษแสดงถึงการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ FD หมายถึง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง, SD หมายถึง การทำแห้งแบบพ่นฝอย และ MT หมายถึง สารสกัดมีส่วนผสมของสารละลายมัลโตเดร็กตริน ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

**ตาราง 46 ผลการวิเคราะห์จุลชีวะทั้งหมด ยีสต์และราทั้งหมด ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| การทดสอบ CFU/ml | ตัวอย่างควบคุม | | US:P:F | |
|---|---|---|---|---|
| | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ |
| จำนวนจุลชีวะทั้งหมด | TNTC | $7.3x10^{5}$ | TNTC | $7.1x10^{3}$ |
| จำนวนยีสต์และราทั้งหมด | TNTC | จำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $20x10^{1}$ | TNTC | จำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $1x10^{1}$ |

**หมายเหตุ:** TNTC หมายถึง Too numerous to count หรือมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนี

ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

CFU/ml หมายถึง Colony forming unit/milliliter

**ตาราง 47 ผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด ปริมาณคลอโรฟิลทั้งหมด และปริมาณแทนนินทั้งหมด ของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| การทดสอบ โดยน้ำหนักแห้ง | ตัวอย่างควบคุม | | US:P:F | |
|---|---|---|---|---|
| | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ |
| ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม) | 164.93±12.04$^{Be}$ | 585.85±4.44$^{Bb}$ | 270.25±13.88$^{Ac}$ | 665.10±7.99$^{Aa}$ |
| การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($IC_{50}$) (มิลลิกรัมต่อกรัม) | 1.00±0.08$^{Ab}$ | 0.33±0.10$^{Aa}$ | 0.62±0.12$^{Bb}$ | 0.34±0.11$^{Aa}$ |
| ร้อยละความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก (ร้อยละ) | 75.23±3.93$^{Bb}$ | 31.94±5.92$^{Bc}$ | 99.61±0.08$^{Aa}$ | 98.58±0.05$^{Aa}$ |
| ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชัน (มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ต่อกรัม) | 226.26±5.76$^{Bc}$ | 1291.42±2.62$^{Aa}$ | 417.76±7.93$^{Ab}$ | 1117.40±4.96$^{Ab}$ |
| ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (มิลลิกรัมสมมูลของเคอเซตินต่อกรัม) | 0.20±0.02$^{Bb}$ | 0.04±0.00$^{Aa}$ | 0.30±0.01$^{Aa}$ | 0.01±0.00$^{Bc}$ |
| ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 5.08±0.17$^{Ba}$ | 0.86±0.01$^{Bb}$ | 5.33±0.10$^{Aa}$ | 1.20±0.00$^{Ab}$ |
| ปริมาณคลอโรฟิลเอ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) | 20.07±0.51$^{Aa}$ | 4.34±0.03$^{Bc}$ | 20.50±0.47$^{Aa}$ | 11.22±0.07$^{Ab}$ |
| ปริมาณแทนนินทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อกรัม) | 546.38±2.12$^{Bc}$ | 1014.00±9.48$^{Aa}$ | 918.58±6.26$^{Aa}$ | 626.20±0.85$^{Bb}$ |

**หมายเหตุ:** ตัวอักษรพิมพ์เล็ก a b และ c ตามแนวนอนแสดงถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างต่างกันที่กระบวนการสกัดต่างกัน และตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ A และ B ตามแนวนอนแสดงถึงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างเดียวกันที่กระบวนการสกัดต่างกัน จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตัวอักษรยกกำลังภาษาอักกฤษแสดงถึงการทำแห้งด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ได้แก่ FD หมายถึง การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ SD หมายถึง การทำแห้งแบบพ่นฝอย ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

ตาราง 48 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน หน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง พบกรดอะมิโนจำเป็นในผงสารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F ได้แก่ ฮีสทิดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไทโอนิน ฟีนิลแอลานีน และ วาลีน มีค่าเท่ากับ 668 1,338 2,531 1,774 425 1,474 และ 2,206 ตามลำดับ กรดอะมิโนไม่จำเป็น ได้แก่ อะลานีน กรดแอสปาร์ติก ซิสตีอีน กรดกลูตามิก ไกซีน โพรลีน เซอลีน ทรีโอนีน ทริปโตแฟน ไทโรซีน และ อาร์จินีน มีค่าเท่ากับ 2,054 5,104 <200 4,280 1,678 1,611 1,240 1,419 336 1,020 และ 1,892 ตามลำดับ และตรวจไม่พบไฮดรอกซีโพรลีน และ ไฮดรอกซีโพรลีน ซึ่งชนิดของกรดอะมิโนมีความจำเป็นในด้านอุตสาหกรรมอาหารและจัดอยู่ในรูปแบบของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่แสดงคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ การต้านอนุมูลอิสระ ส่งเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน รวมไปถึงการช่วยดูดซึมสารอาหารและลดความดันโลหิต ตลอดจนการช่วยลดคอเลสเตอรอลที่แตกต่างกัน (M. Garcia-Vaquero et al., 2016) (M. Garcia-Vaquero et al., 2017) เช่น กรดกลูตามิก มีความสำคัญในการให้รสชาติอูมามิในอาหาร ซึ่งเกิดจากการรวมกันของ Glutamates และ Aspartate (Mouritsen, 2015)

รายงานวิจัยของ Cepoi et al. (2009) ศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากสารสกัดสาหร่าย *Spirulina platensis* และ *Nostoc linckia* พบ Glutamates สูงถึง 2,240 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมของสาหร่ายแห้ง ซึ่งในสารสกัดจากไข่น้ำจากการโปรตีโอไลซิสของงานวิจัยนี้ พบ กรดกลูตามิก และกรดแอสปาร์ติก 4,280 และ 5,104 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ สูงกว่าวัตถุดิบเริ่มต้นถึง 1,568 และ 1,815 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับทั้งนี้การผลิตกลูตาเมสจากธรรมชาติที่มีความเข้มข้นสูงได้รับความสนใจมากขึ้น (Eko et al., 2016) รสชาติเป็นสิ่งสำคัญในอาหารและรสอูมามิเป็นหนึ่งในรสชาติพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการยอมรับของผู้บริโภค

อาร์จินีนในสารสกัดไข่น้ำของงานวิจัยนี้พบ 1,892 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูงกว่าสารสกัดตัวอย่างควบคุมถึง 438 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม อาร์จินีนเป็นอีกหนึ่งกรดอะมิโนที่ได้รับความสนใจบริโภคเป็นอาหารเสริมในกลุ่มผู้ออกกำลังกาย จะช่วยกระตุ้นการหลั่งโกรทฮอร์โมนช่วยในเรื่องของการเจริญเติบโตของร่างกายและเป็นสารตั้งต้นในการสร้างไนตริกออกไซด์ช่วยการไหลเวียนและสุบฉีดโลหิตของร่างกายโดยการเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือดและกล้ามเนื้อจะรับสารอาหารและออกซิเจนได้มากขึ้นเกิดการเผาผลาญไขมันที่สะสมตามร่างกายทำให้กล้ามเนื้อกระชับ (Goret L et al., 2008) จากการศึกษากระบวนการสร้างไนตริคออกไซด์ด้วยการทดลองในหนูเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley พบว่า L-arginine สามารถลดความดันเลือดและบรรเทาการทำงานที่ผิดปกติของชั้นเอนโดทีเลียมของหลอดเลือดในหนูแรท (สราวุธ บรรบุผา และคณะ, 2562) ทั้งนี้วาลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีน เป็นอีกหนึ่งกรดอะมิโนจำเป็นที่ได้รับความสนใจในการผลิตเป็นอาหารเสริมเช่นกัน ซึ่งในงานวิจัยนี้พบ 2,206 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม โดยน้ำหนักแห้ง วาลีนเป็นกรดอะมิโนสายโซ่กิ่งหรือ บีซีเอเอเป็นสารตั้งต้นของกรดอะมิโนและโปรตีนอื่น ๆ เมแทบอลิซึมจากตับ

เป็นสารตั้งต้นของพลังงาน และช่วยในการซ่อมแซมโปรตีนของกล้ามเนื้อ (Brosnan, & Margaret, 2006) อย่างไรก็ตามยังตรวจพบกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็นหลงเหลืออยู่ในส่วนเพลเลส (ตาราง 48) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ในกระบวนงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปต่อยอดให้เกิดประโยชน์ผลิตภัณฑ์ในรูปแบบใหม่ หรือศึกษาต่อในอนาคตได้

คุณสมบัติทางชีวภาพของกรดอะมิโนในผงสารสกัดจากไข่น้ำที่ผ่านกระบวนการ US:P:F จัดอยู่ในรูปแบบของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ มีคุณสมบัติทางชีวภาพ ดังนี้ ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด 665.10±7.99 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH ($IC_{50}$) 0.34±0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ร้อยละ 98.58±0.05 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 1.20±0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลเอ 11.22±0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 1117.40±4.96 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม (ตาราง 48) ผลลัพธ์ดังกล่าวมีค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

**ตาราง 48 ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนของไข่น้ำผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| กรดอะมิโน มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม | ตัวอย่างควบคุม | | US:P:F | |
|---|---|---|---|---|
| | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ | Pellet$^{FD}$ | Supernatant$^{SD}$ |
| **กรดอะมิโนจำเป็น** | | | | |
| Histidine | 856 | 608 | 698 | 668 |
| Isoleucine | 1,408 | 1,259 | 1,144 | 1,338 |
| Leucine | 3,072 | 2,387 | 2,485 | 2,531 |
| Lysine | 1,878 | 1,560 | 1,333 | 1,774 |
| Methionine | 506 | 431 | 340 | 425 |
| Phenylalanine | 2,039 | 1,396 | 1,730 | 1,474 |
| Valine | 2,046 | 2,196 | 1,550 | 2,206 |
| **กรดอะมิโนไม่จำเป็น** | | | | |
| Alanine | 1,946 | 2,103 | 1,495 | 2,054 |
| Aspartic acid | 2,778 | 3,072 | 2,133 | 5,104 |
| Cystine | <200 | <200 | ND | <200 |
| Glutamic acid | 3,516 | 4,554 | 2,511 | 4,280 |
| Glycine | 1,807 | 1,878 | 1,479 | 1,678 |
| Hydroxylysine | ND | ND | ND | ND |
| Hydroxyproline | <500 | <500 | <500 | ND |
| Proline | 1,553 | 1,731 | 1,151 | 1,611 |
| Serine | 1,351 | 885 | 1,079 | 1,240 |
| Threonine | 1,401 | 1,123 | 1,065 | 1,419 |
| Tryptophan | 582 | 291 | 510 | 336 |
| Tyrosine | 1,144 | 877 | 879 | 1,020 |
| Arginine | 1,850 | 1,454 | 923 | 1,892 |

**หมายเหตุ**: ND คือ ตรวจพบน้อยมาก (Not Detected)

ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

# บทที่ 5

## บทสรุป

ไข่น้ำแช่แข็งอบให้แห้งด้วยเครื่องอบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ถึง 8 ชั่วโมง หลังจากการบดให้ละเอียดเกือบเป็นผงจะมีสีเขียวคล้ำ โดยลักษณะของผนังเซลล์ส่วนที่อยู่ภายนอกเยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะที่หนาไม่เท่ากันตลอดและมีรูสำหรับสารต่าง ๆ เคลื่อนผ่านในผนังเซลล์ชั้นที่สองลักษณะเป็นรูปิด และปริมาณโปรตีนโดยน้ำหนักแห้ง ร้อยละ 44.00±0.43 ซึ่งตรวจพบโปรไฟล์ของกรดอะมิโนจำเป็นและไม่จำเป็น จำนวน 20 ชนิด ทั้งนี้ปริมาณจุลชีวะทั้งหมดและจำนวนยีสต์ รา ทั้งหมดของไข่น้ำอบแห้งมีจำนวนมากกว่า 300 โคโลนี

การพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก กำลัง 280 วัตต์ คลื่นความถี่ 37 กิโลเฮิร์ต อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส เวลา 15 30 45 และ 60 นาที ตามลำดับ มีความสามารถช่วยปลดปล่อยโปรตีนจากไข่น้ำส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนและมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อให้คลื่นความถี่เป็นระยะเวลา 30 นาที สามารถสกัดโปรตีนได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 65.74±0.02 สอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงผนังเซลล์ไข่น้ำด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 1000X ผนังเซลล์ไข่น้ำเกิดรูพรุน มีการฉีกขาดของเยื่อเซลล์และมีความเสียหายของผนังเซลล์ มีความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 1189.74±0.02 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม และปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด เท่ากับ 163.59±3.11 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม

การพรีทรีทเมนท์ไข่น้ำด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ระยะเวลาย่อย 15 30 45 และ 60 นาที พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์มีอิทธิพลต่อการเพิ่มปริมาณสารประกอบฟีนอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 มีความสามารถช่วยลดปล่อยโปรตีนจากส่วนเพลเลสออกมาในส่วนซูเปอร์เนเทนได้ช่วงร้อยละ 30 ถึง 49 เป็นปริมาณน้อยกว่ากระบวนการด้วยอัลตราโซนิก (ร้อยละ 50 ถึง 65) และไม่มีแตกต่างตัวอย่างควบคุม (ร้อยละ 49) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 อย่างไรก็ตามผลการย่อยด้วยเอนไซม์เพคติเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ย่อยเวลา 30 นาที มีความสามารถในการสกัดปริมาณโปรตีนได้สูงเท่ากับร้อยละ 78.15±0.03 เทียบเท่ากับกระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกที่เวลา 30 นาที ร้อยละ 65.74±0.02 ซึ่งการค้นพบความสามารถของเอนไซม์เพคติเนสได้โปรตีนปริมาณสูงดังกล่าวถูกอ้างอิงด้วยผลการเปลี่ยนแปลงลักษณะของผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดกำลังขยาย 1000X ที่สามารถทำให้ผนังเซลล์ไข่น้ำฉีกขาดและมีรูพรุนมากกว่าไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส และไซลาเนส ความเข้มข้น

ร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่า เวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ ทั้งนี้กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระและปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของส่วนซูเปอร์เนเทนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

กระบวนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์มีความสามารถต่อการช่วยปลดปล่อยโปรตีนออกมากับตัวทำละลายทำให้มีประสิทธิภาพต่อการปลดปล่อยโปรตีน เสริมฤทธิ์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ และปริมาณฟีนอกนิก โดยการทำงานของอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที มีความสามารถช่วยปลดปล่อยโปรตีน เท่ากับร้อยละ 53.88±0.02 และการทำงานของอัลตราโซนิกสกัด 30 นาที ก่อนย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไซลาเนส เท่ากับร้อยละ 48.10±0.03 และเซลลูเลส ร้อยละ 46.98±0.05 ไม่มีความสามารถสกัดโปรตีนแตกต่างตัวอย่างควบคุมเท่ากับร้อยละ 49.81±2.75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผลการทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์เซลลูเลส เพคติเนส และไซลาเนส ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที ตามลำดับ สามารถช่วยสกัดสารประกอบฟีนอลได้ 105 ถึง 146 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลิกต่อกรัม อีกทั้งสามารถบ่งชี้ว่ากระบวนการทำงานร่วมกันของอัลตราโซนิกและเอนไซม์เป็นวิธีการสกัดที่ใช้เวลาน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมและวิธีการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชถึง 30 นาที ทั้งนี้ส่วนเพลเลสยังหลงเหลือโปรตีนและฤทธิ์ทางชีวภาพ งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกจากกระบวนการพรีทรีทเมนท์ร่วมกันของอัลตราโซนิกกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชด้วยการใช้ส่วนฟูดิสเพอร์ชันเป็นส่วนที่มีทั้งเพลเลสและซูเปอร์เนเทนรวมกัน โดยจะถูกนำมาโปรตีไลซิส

ผลของกระบวนการโปรตีโอไลซิส พบว่าการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์เพคติเนสความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง เวลาย่อย 30 นาที ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ต่อปริมาณโปรตีน เวลาย่อย 30 นาที ให้ระดับการย่อยสลายโดยกระบวนการ US:P:F สูงถึงร้อยละ 96.83±0.28 และมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 59.88±5.22 ถูกคัดเลือกนำมาทำให้แห้งด้วยวิธีทำพ่นฝอยด้วยการใช้สารละลายมัลโตเดร็กตินร้อยละ 3 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างควบคุม และร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักของแข็งทั้งหมดในสารสกัดตัวอย่างจากกระบวนการ US:P:F ซึ่งผงของสารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการ US:P:F มีความละเอียดเนื้อสัมผัสเนียน และไม่จับตัวเป็นก้อน ปริมาณโปรตีน ร้อยละ 36.52±0.48 สูงกว่าร้อยละ 4 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนของตัวอย่างควบคุม และมีความสามารถในการละลายร้อยละ 93.75±3.80 ความสามารถในการเกิดโฟม ร้อยละ 96.61±1.02 และความคงตัวของโฟมร้อยละ 14.00±2.83 สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 จำนวน

จุลชีวะทั้งหมด เท่ากับ $7.1x10^3$ CFU/ml และจำนวนยีสต์และราทั้งหมดมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่า $1x10^1$ ซึ่งจำนวนยีสต์และราเป็นไปตามประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 3

ทั้งนี้สารสกัดไข่น้ำจากกระบวนการโปรติโอไลซิสประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดกรดกลูตามิกและกรดแอสปาร์ติก 4,280 และ 5,104 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ สูงกว่าวัตถุดิบเริ่มต้น 1,568 และ 1,815 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ และอาร์จีนีน 1,892 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม สูงกว่าสารสกัดตัวอย่างควบคุมถึง 438 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม มีคุณสมบัติทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิคทั้งหมด 665.10±7.99 มิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัม การยับยั้งสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH (IC50) 0.34±0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก ร้อยละ 98.58±0.05 ปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด 1.20±0.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณคลอโรฟิลเอ 11.22±0.07 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความสามารถการรีดิวซ์เฟอร์ริกสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP เท่ากับ 1117.40±4.96 มิลลิกรัมสมมูลของ $Fe^{2+}$ ต่อกรัม ผลลัพธ์ดังกล่าวมีค่าสูงกว่าสารสกัดตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ผลการวิเคราะห์ทั้งหมดสามารถนำไปใช้ประกอบการศึกษาเพิ่มเติม และใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อประกอบการศึกษา พัฒนาผลิตภัณฑ์ และอื่น ๆ ต่อไปในอนาคตได้

**ข้อเสนอแนะ**

ควรเปลี่ยนสารละลายกรดในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น เช่นใช้สารละลายกรดซิตริกเนื่องจากไฮโดรคลอริกเป็นกรดแก่ที่ทำปฏิกิริยากับเบสจะมีการถ่ายโอนโปรตอนโดยปฏิกิริยาระหว่าง $H^+$ จากสารละลายกรดกับ $OH^-$ จากสารละลายเบสได้ $H_2O$ เรียกว่า ปฏิกิริยาสะเทิน ปฏิกิริยาระหว่างกรดกับเบสจะได้เกลือกับน้ำเป็นส่วนใหญ่ แต่จะมีบางปฏิกิริยาที่ได้เกลือเพียงอย่างเดียว ทำให้สารสกัดจากไข่น้ำสุดท้ายมีความเค็ม

ควรศึกษาชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาการย่อยสลายของเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืชและเอนไซม์โปรติเอสอื่น ๆ เพื่อนำมาย่อยสลายผนังเซลล์ไข่น้ำ ย่อยสลายโปรตีนในสารสกัดไข่น้ำและเพิ่มข้อมูลเบื้องต้นมากขึ้น

# บรรณานุกรม

# บรรณานุกรม


กาญจนภาชน์ ลิ่วมโนมนต์. (2527). *สาหร่าย (Algae).* กรุงเทพฯ: คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). *ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เรื่องเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3. หน้า 4.* สืบค้น 4 เมษายน 2566, จาก http://bqsf.dmsc.moph.go.th

กองโภชนาการ กระทรวงสาธารณสุข. (2544). *คุณค่าอาหารส่วนที่กินได้ 100 กรัม ของผำ.* กรุงเทพฯ: กองโภชนาการ กรมอนามัย.

กันย์สินี พันธ์วนิชดำรง. (2552). *การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไข่น้ำ* (*Wolffia arrhiza (L.) wimm.*) (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกริกชัย ชีระปฏิยุทธ, วรภา คงเป็นสุข, สุเมธ ตันตระเธียร, และอัจฉรา จันทร์ฉาย. (2552) *นวัตกรรมผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากวอฟเฟีย กลอโบซ่า (ไข่น้ำ).* กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชฎาพร หัตถบูรณ์. (2556). *การสกัดแยกพลาสติกและอลูมิเนียมฟอยล์จากกล่องเครื่องดื่มด้วยกระบวนการทางชีวภาพ.* กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลพระนคร.

ตุลวิทย์ สถาปนจารุ, พัฒนา อนุรักษ์พงศธร, และรัชชา ชัยชนะ. (2555). *โครงการ "การทดสอบความเป็นพิษ การสะสม และการเพิ่มปริมาณทางชีวภาพในระบบนิเวศน์ทางน้ำของอนุภาคเงินระดับนาโนที่เป็นองค์ประกอบในเนื้อผ้า".* กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

ณัฐมล จินดาพรรณ, สุจิตรา ศรีเงินวง, และชญานิน แดงพรม. (2556-2557). อิทธิพลของpH และอุณหภูมิที่มีต่อสมบัติการละลายและการเกิดฟองของโปรตีนถั่วเขียวเข้มข้น. *วารสารเทคโนโลยีการอาหารมหาวิทยาลัยสยาม, 9*(1), 297-309.

ณพัฐอร บัวฉุน. (2564). การศึกษาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดและฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบใบพิลังกาสา. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, 16*(3) 15-24.

ทิพวรรณ ทองสุข. (2559). การสกัดโปรตีนและน้ำตาลจากรำข้าวสกัดน้ำมัน. *นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 12: วิจัยและนวัตกรรมกับการพัฒนาประเทศ.* พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ทิพาพร เรืองยศ, สมเกียรติ จตุรงค์ล้าเลิศ, ชนวัฒน์ นิทัศน์วิจิตร, และจตุรภัทร วาฤทธิ์. (2559). ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลิน่าโดยวิธีแช่แข็งสลับกับการละลายร่วมกับคลื่นอัลตร้าโซนิค. *วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง, คณะวิศวกรรมและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่, 10*(2), 78-87.

ธันยพร จันทร์แสนโรจน์. (2550). *การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ Haliotis asinine* (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ธีรพร กงบังเกิด. (2547). *การใช้อัลตราซาวด์ในกระบวนการแปรรูปอาหาร.* พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2545). *เคมีอาหาร.* กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

นิศานาถ ละอองพันธ์, และอำพร คลายแกว. (2549). *นิเวศวิทยาและการใช้ประโยชน์ของ Duckweed Ecology and Utillization of Duckweed*. กรุงเทพฯ: โครงการวิจัยกรมชลประทาน.

บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด. (2553-2554). อูมามิ ที่มาของความอร่อย. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 6*(1), 17-26.

บุญมี ปิยะจันทร์. (2530). *การวิเคราะห์สารอาหารพื้นบ้าน เส้นใย และเถ้า ใน Spirogyra sp* (การค้นคว้าแบบอิสระปริญญาบัณฑิต). เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา และวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โบนาเซล่า, ฮวน; ราฮิบไมเคิล; Levin, Simon. (2555). *แบบจำลองไดนามิกของการดูดซึมสารอาหารแพลงก์ตอนพืชแบบยืดหยุ่น.* PNAS 108 (51): 20633–20638 ดอย: 10.1073/pnas.1118012108. PMC 3251133. PMID 22143781

ประโชติ เปล่งวิทยา. (2544). *ตารางแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนในประเทศไทย.* นนทบุรี: กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2543). *เอนไซม์ทางอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 3). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). *เอนไซม์ทางอาหาร* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปาริฉัตร ทัพภะสุต. (2539). *การใช้เอนไซม์ดัดแปลงสมบัติการให้ฟองของโปรตีนจากกากถั่วเหลือง.* กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปุณณาณี สัมภวะผล, และธรรมรัตน์ แก้วมณี. (2554). *การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี สมบัติเชิงหน้าที่และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วหรั่ง.* สงขลา:

โครงการวิจัยจาก ทุนสนับสนุนเงินรายได้มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รหัส AGR540642S.

พัชรา วีระกะลัส. (2543). *เอนไซม์* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพลิน เพ็ชรทวีพรเดช. (2548). *การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากกากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี.* กรุงเทพฯ: คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ภิญญาพัชญ์ คำมามูล. (2562). *เนื้อไร้เนื้อ (Planted Based Food) เทรนด์อาหารอนาคตปี 2020. เอกสารองค์ความรู้ด้านนวัตกรรม (FM-IN-SN-01).* ม.ป.ท.; ม.ป.พ.

ยุวดี พีรพรพิศาล. (2535). *คุณค่าทางโภชนาการและการเพาะเลี้ยงสาหร่าย Spirogyra spp.* กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุวดี พีรพรพิศาล, สนิท มกรแก้วเกยูร, อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, ดวงพร อมรเลิศพิศาล, จีรพร เพกเกาะ, ..., สุดาพร ตงศิริ. (2549). *โครงการศักยภาพของสาหร่ายน้ำจืดขนาดใหญ่ในการนำมาเป็นอาหารและยา* (รายงานผลการวิจัย). กรุงเทพฯ: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).

วารสารเพื่อการเตือนภัยสินค้าเกษตรและอาหาร. (2563). *การพัฒนา Future protein สู่ตลาด ปีที่ 12 รายไตรมาส เดือนกรกฎาคม-กันยายน.* ม.ป.ป.

วิลาสินี ดีปัญญา. (2555). *การพัฒนาผลิตภัณฑ์ไข่น้ำแผ่น* (รายงานผลการวิจัย). เพชรบูรณ์: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์, เพชรบูรณ์.

วัฒนี บุญวิทยา, นันท์ปภัทร์ ทองคำ, และภาสุรี ฤทธิเลิศ. (2559). ผลของการเสริมไข่น้ำต่อคุณภาพของช็อกโกแลตชิฟมัฟฟิน. *วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, 11*(3), 41-53.

วัณเพ็ญ แสงทองพินิจ, บาจารีย์ ศรีเจริญ, และมัทรี กร่างปรีชา. (2560). ผลของการลวกในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ต่อปริมาณฟีนอลิกและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำ (*Wolffia globosa*). ใน *การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 55 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร* (น. 671-677). กรุงเทพฯ: คณะเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วรรณิณี จันทร์แก้ว, อัมพร รัตนมูสิก, วัลภา เหลือแหล่, และกัญญารัตน์ รักษาแก้ว. (2562). *องค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไข่น้ำจากธรรมชาติและการเลี้ยง.* สงขลา: สาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

ศิริภาวี ศรีเจริญ, นำชัย เจริญเทศประสิทธิ์, พีระพงษ์ แพงไพรี, และรัศมีแข ชูชีพ. (2545). *การเพาะเลี้ยงไข่น้ำสำหรับการลดต้นทุนอาหารปลา* (รายงานผลการวิจัย). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยข่อนแก่น.

สมฤดี ไทพาณิชย์. (2555). กระบวนการแปรรูปด้วยเอนไซม์ และการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นฝอยของไซรัปขนุนชนิดผง. *เทคโนโลยีการอาหาร, 7,* 31-39.

สมฤดี ไทพาณิชย์, และปราณี อ่านเปรื่อง. (2559). การวิเคราะห์ทางเคมีกายภาพของโปรตีนมะพร้าว (*Cocos nucifera L.*) ดัดแปรโดยใช้เอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้า. *วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม, 11*(1), 21-37.

สราวุธ บรรบุผา, พัชรวิภา มณีไสย, เทวฤทธิ์ เบิกบาน, ปาริฉัตร ประจะเนย์, ยุพา ดู่คงวิริยพันธ์, และพวงรัตน์ ภักดีโชติ. (2562) แอล-อาร์จินีนลดความดันเลือดและปรับปรุงการทำงานของเซลล์ชั้นเอนโดทีเลียมของหลอดเลือดในหนูแรทความดันเลือดสูงจากภาวะพร่องไนตริกออกไซด์. *นิพนธ์ต้นฉบับวารสารศรีนครินทร์เวชสาร, 34*(1), 11-17.

สุปราณี แย้มพราย. (2539). *การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์.* กรุงเทพฯ: สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารคณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุขุม เร้าใจ, และสุทิน สมบูรณ์. (2551). การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไข่น้ำ (*Wolffia arrhiza* (L.) *wimm.*). *วารสารประมง, 60*(5), 405-413.

สุชาดา มานอก, และปวีณา ลิ้มเจริญ. (2015). การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH, ABTS และ FRAP และปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดของสารสกัดสมุนไพรในตำรับยาหอมเทพจิตร. *Advanced science, 15*(1), 106-117.

สุภาวดี ทรัพย์สิริไพบูลย์. (2550). *ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ของโปรตีนถั่วเหลืองสกัดที่ผ่านการดัดแปรด้วยวิธีทางเอ็นไซม์และวิธีทางเคมี.* กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อรพรรณ เสลามาศสกุล, ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์, และอรพิน เกิดชูชื่น. (2555). สมบัติการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทสาหร่ายด้วยโบรมิเลน, *วารสารวิทยาศาสตร์การเกษตร, 43*(2), 509-512.

อรุณี คงดี อัลเดรด (2558) *การผลิตและทดสอบสมบัติของกระดาษจากสาหร่ายน้ำจืดสีเขียว.* เชียงใหม่: มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

อรุณี จิตชื่น. (2543). *การผลิตน้ำซอสปรุงรสจากโปรตีนสกัดจากเมล็ดงา* (วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต). กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อุมาพร นิยะนุช. (2553). *การเปลี่ยนแปลงหลังการเก็บเกี่ยวขององค์ประกอบและกิจกรรมในการต้านออกซิเดชั่นของไข่น้ำ.* ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อุมาพร นิยะนุช, และรัชฎา ตั้งวงศ์ไชย. (2553) ผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะของไข่น้ำ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร, 41*(1)พิเศษ, 447-250.

อุมารินทร์ มัจฉาเกื้อ. (2558). การใช้ผำบดแห้งทดแทนกากถั่วเหลืองในสูตรอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนขาว และปลาไน. ใน *การประชุมวิชาการวิจัยรำไพพรรณี ครั้งที่ 9, "การบูรณาการงานวิจัยเพื่อพัฒนาท้องถิ่นอย่างยั่งยืน".* ปทุมธานี: คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

A. H. Pripp, T. Isaksson, L. Stepaniak, & T. Sørhaug. (2004). Quantitative structure-activity relationship modelling of ACE-inhibitory peptides derived from milk proteins, Eur. *Food Res. Technol, 219,* 579–583.

Aaslyng, D. M., Magnl, M., Leif, P., Per, N., Hanne, F., & Lone, M. L. (1998). Chemical andsensory characterization of hydrolyzed vegetable protein, a savory flavoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46*, 481-489.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food protein.* New York: Vanderbilt.

Anderson, R. A., Conway, H. F., Pfeifer, V. F., & Griffin, E.L. (1969). Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Science Today, 14*, 4-12.

Andrea Rivera del Rioa, Mauricio Opazo-Navarretea, Yamira Cepero-Betancourtb, Gipsy Tabilo-Munizagab, Remko M. Booma, & Anja E.M. Janssen. (2020). Heat-induced changes in microstructure of spray-dried plant protein isolates and its implications on in vitro gastric digestion. *LWT - Food Science and Technology, 118,* 108795.

Anonymous. (2000). *Novozyme.* Retrieved December 28, 2010, from www.Novozymes.com

Antonov, V. K. (1993). *Chemistry of proteolysis.* Germany: Springer-Verlag Berlin.

Anut Chantiratikul, & Songsak Chumpawadee. (2011). Effect of heat-treatment on ruminal protein degradability of Wolffia meal (Wolffia globosa L. Wimm). *Asian Journal of Animal Sciences, 5*(3), 183-189.

AOAC. (2000). *Official method of analysis of AOAC international* (17th ed.) Washington D.C.: The association of official analytical chemists.

APHA-AWWA-WPCF. (1975). *Standard Method for the Examination of Water and Wastewater* (14th ed.). Washington DC, U.S.A.: American Public Health Association.

Appenroth, K.-J., Sree, K.S., Bog, M., Ecker, J., Seeliger, C., Böhm, V., Lorkowski, S., Sommer, K., Vetter, W., Tolzin-Banasch, K., Kirmse, R., Leiterer, M., Dawczynski, C., Liebisch, G., & Jahreis, G. (2018). *Nutritional value of the duckweed species of the genus Wolffia.* N.P.: n.p.

Batista, A. P., Gouveia, L., Bandarra, N. M., Franco, J. M., & Raymundo, A. (2013). Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research, 2,* 164-173.

Beatriz A. Acosta-Estrada, J. A. Gutiérrez-Uribe, S. & O. Serna-Saldívar. (2014). *Bound phenolics in foods, a review Food Chemistry*, 152, pp. 46-55. Retrieved December 28, 2010, from https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.093

Becker, E. W. (1994). *Microalgae: Biotechnology and Microbiology.* New York: Cambridge University Press.

Benzie, IFF., & Strain, J. J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ‘‘antioxidant power’’: the FRAP assay. *Anal Biochem, 239,* 70–76

Borowitzka, M. A. (1988). Algal media and sources of algal cultures. In Borowitzka, M. A., & L. J. Borowitzka (Eds.). *Microalgal Biotechnology* (pp. 456–465). Cambridge: Cambridge University Press.

Brand, W.W., Cuvelier, M., & Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *lebensmittel wissenschaft und tech, 28,* 25–30.

Brummell, D. A. (2006). Cell wall disassembly in ripening fruit. *Functional Plant Biology, 33*, 103-119.

Cepoi, L., Rudi, L., Miscu, V., Cojocari, A., Chiriac, T., & Sadovnic, D. (2009). Antioxidative Activity of Ethanol Extracts from *Spirulina* sp. platensis and Nostoclinckia Measured by Various Methods. *J of Fascicula Biologie, 16*(2), 43–48.

Chanikan, S., Natta, L., & Orapin, K. (2011). Physicochemical and flavor charateristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59,* 8475-8483.

Chen, C., Adolphson, R., Dean, F., Eriksson, K., Adamas, M., & Westpheling, J. (1997) Release of lignin from kraft pulp by a hyperthermophilic xylanase from Thermotoga maritime. *Enzyme and Microbial Technology, 20,* 39-45.

Chuan, H.T., Xian, S. W., & Xian, Q. Y. (2009). Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Journal of Food Chemistr, 114,* 1484-1490.

Chukwunonso E.C.C. Ejike, Stephanie A. Collins, Nileeka Balasuriya, Andrew K. Swanson, Beth Mason, & Chibuike C. Udenigwe. (2016). *Prospects of microalgae proteins in producing peptide-based functional foods for promoting cardiovascular health. Accepted Manuscript*. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.10.026.

Church, F. C., Porter, D. H. Catignani, G. L., & Swaisgood, H. E. (1985). An o-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. *Anal. Biochem. 146*, 343-348.

Cigic, B., & Zelenik-Blatnik, M. (2004). Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chemistry, 51*, 177-188.

Damodaran, S., Parkin, K., & Fennema, O. R. (2008). *Fennema's Food Chemistry* (4th ed.). New York: Marcel Dekker.

Dekker, R., & Linder, W. (1979). Bioconversion of hemicellulose: aspects of hemicellulase production by Trichoderma reesi QM9414 and enzymic saccharification of hemicellulose. *South African Journal Science, 75,* 65-71.

Denis, C., Morançais, M., Gaudin, P., & Fleurence, J. (2009). Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from Grateloupia turuturu. *Botanica Marina, 52*(3), 262e267.

Dey, S., & Rathod, V.K. (2013). Ultrasound assisted extraction of β-carotene from Spirulina platensis. *Ultrason. Sonochem, 20,* 271–276.

Dhillon, A., Gupta, J. K., & Khanna, S. (2000). Enhanced production, purification and characterization of a novel cellulose-poor thermostable, alkalitolerant xylanase from Bacillus circulans AB 16. *Process Biochemistry, 35*, 849-856.

Dinis, T. C. P., V.M.C. Madeira, & L. M. Almeida. (1994). Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysic, 315,* 161-169.

Downes, F. P., & K, IT O. (2001). *Compendium of methods for the Microbiological examination of food* (4th ed.). Washington D.C.: American Public health association.

Eko Nurcahya Dewi, Ulfah Amalia, & Maizirwan Mel. (2016) The Effect of Different Treatments to the Amino Acid Contents of Micro Algae *Spirulina sp*. ScienceDirect. *Aquatic Procedia, 7,* 59 – 65.

Eskin, N. A., & Henderson, H. M. (1971). *Biochemistry of food*. New York: Academic Press.

Fan, L. T., Gharpuray, M. M., & Lvy, Y. (1987). Nature of cellulosis material. Cellulose HydrolysisSpringer-Verlay Berlin Heideltery. Publisher (pp. 5-20). N.P.: n.p.

Fan, L. T., Gharpuray, M. M., Lee, Y-H. (1987). *Cellulose hydrolysis.* London: Springer-Verlag berlinHeidelberg,

Feng H, & Yang W. (2005). Power ultrasound. In Hui YH, (Ed., p. 3632). *Handbook of food science, technology, and engineering.* New York: CRC Press.

Fernando Pagels, Ricardo N. Pereira, António A. Vicente, & A. Catarina Guedes. (2021). Extraction of Pigments from Microalgae and Cyanobacteria-A Review on Current Methodologies. *Appl. Sci. 2021, 11,* 5187. https:// doi.org/10.3390/app11115187.

Food and Drug Administration (FDA). (2001). *Bacteriolgiical analytical manual (BAM).* Retrieved March 20, 2014, from http://www.fda.gov

Frizzell, L. A. (1988). Biological effects of acoustic cavitation. In Suslick, K.S. (Ed., pp. 287-304) *ultrasound: Its chemical, physical and biological effects*. New York, NY, VCH.

García, M.C., Puchalska, P., Esteve, C., & Marina, M. L. (2013). Vegetable foods: A cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta, 106,* 328-349.

Giulia Graziani, Simona Schiavo, Maria Adalgisa Nicolai, Silvia Buono, Vincenzo Fogliano, Gabriele Pinto, & Antonino Pollioac. (2013) Microalgae as human food: Chemical and nutritional characteristics of the thermo-acidophilic microalga Galdieria sulphuraria. *Food & Function, 4*(1). DOI: 10.1039/c2fo30198a.

Gong, M., & Bassi, A. (2016) Carotenoids from microalgae: A review of recent developments. *Biotechnol. Adv., 34,* 1396–1412.

Goret L, Tanguy S, Guiraud I, Dauzat M, & Obert P. (2008) Acute administration of l-arginine restores nitric oxidemediated relaxation in isolated pulmonary arteries from pulmonary hypertensive exercise trained rats. Eur J Pharmacol, *581,* 148-56.

Guil-Guerrero, J., Navarro-Juárez, R., López-Martínez, J., Campra-Madrid, P., & Rebolloso Fuentes, M. (2004) Functional properties of the biomass of three microalgae species. *Journal of Food Engineering, 65,* 511–517.

Guowan, S., Jiaoyan, R., Bao, Y., Chun, C., & Mouming, Z. (2011). Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from Aspergillus oryzae and commercial proteases. *Journal of Food Chemistry, 126*, 1306–1311.

Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2013). Extraction of protein from the macroalga Palmaria palmata. *LWT-Food Science and Technology*, *51*(1), 375-382.

Hoover, D. G. (2000). Microorganism and Their products in preservation of food. In Lund, B.M., T.C. Baird-Parker and G.W. Gould: (Eds., pp. 251-276). *The microbiological safety and quality of food.* Washington D.C.: ASM Pree.

Hou C W, Lin R D, Cheng K T, Hung Y T, Cho C H, Chen C H, Hwang S Y, & Lee M H. (2003). Free radicalscavenging activity of Taiwanese native plants. *Phytomedicine, 10,* 170.

J. Dumay, N. Clément, M. Morançais, & J. Fleurence, (2013). Optimization of hydrolysis conditions of Palmaria palmata to enhance R-phycoerythrin extraction, Bioresour. *Technol, 131,* 21–27, https://doi.org/10.1016/j.biortech. 2012.12.146.

James M. Jay. (2000). Modern food microbioloby. N.P.: n.p.

Jantawat, P., Chinprahast, N., & U. Siripatrawan. (1998). Effects of hydrolysing conditions on chemical and sensory properties of hydrolysed mungbean protein. *Journal of the Scientific Society, 24,* 147–154.

Juin, C.; Chérouvrier, J.-R.; Thiéry, V.; Gagez, A.-L.; Bérard, J.-B.; Joguet, N.; Kaas, R.; Cadoret, J.-P.; Picot, L. (2015). Microwave-assistedextraction of phycobiliproteins from Porphyridium purpureum. *Appl. Biochem. Biotechnol, 175,* 1–15.

Kadkhodaee, R., & Povey, M. J. W. (2008). Ultrasonic inactivation of Bacillus **α**-amylase. I. effect of gas content and emitting face of probe. *Ultrasonics Sonochemistry*, *15*(2), 133-142.

Kaplan, A., Zelicha, H., Tsaban, G., Yaskolka Meir, A., Rinott, E..., Shai, I. (2019). Protein bioavailability of Wolffia globosa duckweed, a novel aquatic plant – A randomized controlled trial. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland), 38*(6), 25762582.

Kashyap, D.R., Vohra P.K., Chopra, S., & Tewari, R., (2001). Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology, 77*, 215-227.

Kha, T. C., Nguyen, M. H., & Roach, P. D. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (Momordica cochinchinensis) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering, 98*(3), 385-392.

Kim, S. M., Kang, S. W., Kwon, O. N., Chung, D., & Pan, C. H. (2012). Fucoxanthin as a major carotenoid in Isochrysis aff. galbana: Characterization of extraction for commercial application. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem., 55,* 477–483.

Klaus-J. Appenroth, K. Sowjanya Sree, Manuela Bog, Josef Ecker, Claudine Seeliger, Volker Böhm..., Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysate: Productivity, biochemical and functional properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrit, 40,* 43-81.

Kong, X., Guo, M., Hua, Y., Cao, D. and Zhang, C. (2008). Enzymatic preparation of Immune modulating hydrolysates from soy proteins. *Bioresource Technology, 99*, 8873–8879.

Kose, A., & Oncel, S. S. (2015). Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. *Biotechnology Reports, 6,* 137-143.

Kosugi, S., & Ohashi, Y. (2002). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J., 29,* 45–59.

Ladyofhats. (2007). *A section of the cell wall in plant cell*. N.P.: n.p.

Landolt, E. (1986). The family of lemnaceae-a monographic study 1 Veroffentlichungen des Geobotanischen institutes der ETH. *Stiflung Rober Zurich, 71*, 566.

Landrault, N., Poucheret, P., Ravel, P. Gase, F., Cros, G., & Teissedre, P. L. (2001) Antioxidant capacity and phenolics levels of france wine from different varieties and vintages. *J. Agric. Food chem., 49,* 3341-3348.

Lee, Y., Lowe, S., & Zeikus, J. (1998). Molecular biology and biochemistry of xylan degradation by thermoanaerobes. In Kalegoris, E., Christakopoulos, D., Kekos, D., Macris, B. (Eds.). Study on the solid-state production of thermostable endoxylanases from Thermoascus aurantiacus: characterization of two isoenzymes. *Journal of Biotechnology, 60,* 155-163.

Li, M., & Lee, T. C. (1996). Effect of cysteine on the functional properties and microstructure of wheat flour extrudates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44,* 1871-1880.

Liebisch, & Gerhard Jahreis. (2018). *Nutritional Value of the Duckweed Species of the Genus Wolffia (Lemnaceae) as Human Food. frontiersman chemistry. 10.3389/fchem.2018.00483*. N.P.: n.p.

M. Garcia-Vaquero, & M. Hayes. (2016). Red and green macroalgae for fish and animal feed and human functional food development. *Food Reviews International 32,* 15–45.

M. Garcia-Vaquero, G. Rajauria, J.V. O'Doherty, & T. Sweeney. (2017). Polysaccharides from macroalgae: recent advances, innovative technologies and challenges in extraction and purification. *Food Res. Int., 99,* 1011–1020.

M. Garcia-Vaquero, L. Mora, & M. Hayes. (2019). In vitro and in silico approaches to generating and identifying angiotensin-converting enzyme I inhibitory peptides from green macroalga Ulva lactuca. *Marine Drugs, 17,* 204.

M. Hayes, & B. Tiwari. (2015). Bioactive carbohydrates and peptides in foods: An overview of sources, downstream processing steps and associated bioactivities. *Int. J. Mol. Sci., 16,* 22485–22508.

M. Valero, N. Recrosio, D. Saura, N. Munoz, N. Mart, & V. Lizama. (2007). Effects of ultrasonic treatments in orange juice processing. *Journal of Food Engineering, 80*(2), 509-516.

Maisuthisakul, P., Suttajit, M., & Pongsawatmanit, R. (2007). Assessment of phenolic content and free radical-scavenging capacity of some Thai indigenous plants. *Food chem., 100*, 1409-1418.

Manley, C. H., & Fagerson, I. S. (1971). Aspects of aroma and taste characteristics of hydrolyzed vegetable protein. *The Flavor Industry, 2*(12), 686-690.

Manley, C. H., McCann, J. S., & Swane, R. L. Jr. (1981). The Chemical base of the taste and flavor enhancing properties of hydrolyzed protein. *The Quality of Food and Beverage Chemistry and Technology, 1*, 61-82.

Mannheim, A., & Cheryan, M. (1992). Enzymemodified proteins from corn gluten meal: Preparation and functional properties. *Journal of the American Oil Chemist's Society, 69,* 1163–1169.

Marvin Edelman, & Monica Colt. (2016). *Nutrient value of leaf vs. seed. frontiersnin chemistry. 10.3389/fchem.2016.00032.* N.P.: n.p.

Mason, T.J. (1998). *Sonochemistry*. New York: Oxford University.

Meynier, A., & Mottram, D. S. (1995). The effect of pH on the formation of volatile compound in meat-related model systems. *Food Chemistry, 52,* 361–366.

Moore, S., & Stein, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem., 176,* 367-388.

Morris, H. J., Almarales, A., Carrillo, O., & Bermudez, R. C. (2008). Utilisation of Chlorella vulgaris cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Bioresour. Technol, 99,* 7723–7729.

Mouritsen, O. G. (2015). The Science of Taste. *Flavour, 4*(18), 1–2. DOI: 10.1186/si3411-014-0028-3

Naseri, A., Marinho, G. S., Holdt, S. L., Bartela, J. M., & Jacobsen, C. (2020). Enzyme-assisted extraction and characterization of protein from red seaweed Palmaria palmata. *Algal Research*, *47*, 101849.

Niehaus, F., Bertoldo, C., Kahler, M., & Antranikian, G. (1999). Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology, 51*, 711-729.

Nielsen, P. M., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science, 66*(5), 642–646. https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04614.x.

*Palomar college wayne armstrong's treatment of the lemnaceae. © W.P. Amstrong.* (2012). Retrieved December 25, 2021, from https://www2.palomar.edu/users/warmstrong/imgwogl.htm

Parniakov, O., Apicella, E., Koubaa, M., Barba, F. J., Grimi, N., Lebovka, N., ... & Vorobiev, E. (2015). Ultrasound-assisted green solvent extraction of high-added value compounds from microalgae Nannochloropsis spp. *Bioresource technology, 198,* 262-267.

Pastor, F. l. j., Gallardo, O., Sanz Aparicio, j., & Diaz, P. (2007). *Industrialenzymes, Chapter 5: Xylanase: molecular properties and applications*. Netherlands: springer.

Patel, K., & Borchardt, R. T. (1990). Chemical pathways of peptide degradation II. Kinetics of deamidation of an asparaginyl residue in a model hexapeptide. *Pharmaceutical Research, 7,* 703–711.

Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod., 63,* 1035-1042.

Plaza, M., Herrero, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2009). Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 57,* 7159–7170.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology, 5*(11), 1142-1145.

Rasmussen, R. S., & Morrissey, M. T. (2007). Marine Biotechnology for Production of Food Ingredients. In Taylor, S.L. (Ed.). *Advances in Food and Nutrition Research, 52* (pp. 237-292). New York: Elsevier

Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Biosci 13,* 76–83. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009

Ruekaewma, N., Piyatiratitivorakul, S., & Powtongsook, S. (2015). Culture system for *Wolffia globosa* L. (lemnaceae) for hygiene human food. Songklanakarin *Journal of Science and Technology, 37*(5), 575-580.

Sahasakmontri, K. (2001). Process Development of seasoning sauce using enzyme to reduce 3- MCPD substance (Master Thesis). Bangkok: Kasetsart University.

Sala, F. J., J. Burgos, S. Condon, P., Lopez, J., R. (1995). Effect of heat and ultrasound on microorganisns and enzymes. pp. 176-204. In G. W. Gould (ed.). *New methods of food preservation*. Glasgow: Blackie Academic and Professinal.

Salinas-Salazar, C., Saul Garcia-Perez, J., Chandra, R., Castillo-Zacarias, C., Iqbal, H. M. N., & Parra-Saldívar, R. (2019). Methods for Extraction of Valuable Products from Microalgae Biomass BT—Microalgae Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment. In Alam, M. A., & Wang, Z. (Eds.). Biotechnology for Development of Biofuel and Wastewater Treatment (pp. 245–263). SingaporeL: Springer Microalgae

Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods, 3,* 229-254.

Sierra, L. S., Dixon, C. K., & Wilken, L. R. (2017). Enzymatic cell disruption of the microalgae Chlamydomonas reinhardtii for lipid and protein extraction. *Algal Res., 25,* 149–159.

Silvestre, M. P. C. (1997). Review of methods for the analysis of protein hydrolysate. *Food Chem., 60*(2), 263-271.

Soldo, T., Blank, I., & Hofmann, T. (2003). (+)-(S)-alapyridaine-A General Taste Enhancer. *J of Chemical Senses, 28*(5), 371–379.

Sonklin, C., Laohakunjit, N., & Kerchoechuen, O. (2011). Physicochemical and flavor charateristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59*, 8475-8483.

Sonklin, Ch., Laohakunjit, N., & Kerdchoechuen, O. (2010). Encapsulation Technique of chicken flavor from protein hydrolysate. *Journal of Agricultural Science, 41*, 629-632.

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering, 101,* 87–96.

Suslick, K. S. (1988). Ultrasound: its chemical, physical and biological effect. New York: VCH.

Szamrej, I. K., & Czerpak, R. (2004). The Effect of Sex Steroids and Corticosteroids on the Content of Soluble Proteins, Nucleic Acids and Reducing Sugars in *Wolffia arrhiza (L.) Wimm. (Wolffia arrhiza (L.) Wimm. (Wolffia arrhiza Lemnaceae (L.).* 565-571.

T. Lafarga, & M. Hayes. (2014). Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat Sci., 98,* 227–239.

Tarky, W., O. P. Agawara, & G. M. Pigott. (1973). Protein hydrolysate from waste. *Journal of Food Science, 38,* 917-918.

Tavanandi, H. A., Vanjari, P., Raghavarao, K. S. M. S. (2019). Synergistic method for extraction of high purity Allophycocyanin from dry biomass of Arthrospira platensis and utilization of spent biomass for recovery of carotenoids. *Sep. Purif. Technol., 225,* 97–111.

Tavano, O. L. (2013). Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90,* 1-11.

Tomas Lafargaa, Francisco Gabriel Acién-Fernándeza, Marco Garcia-Vaquerob. (2020). Bioactive peptides and carbohydrates from seaweed for food applications: Natural occurrence, isolation, purification, and identification. Contents lists available at ScienceDirect. *Algal Research, 48,* 101909.

Trucksess, M. W., Weaver, C. M., Oles, C. J., Fry, F. S., & Noonan, G. O. (2008). Determination of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2 and Ochratoxin A in Ginseng and Ginger by Multitoxin immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic quantitation: Collaborative study. *J. AOAC Int., 91*(3), 511-523.

Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y.S. (2005). The effect of cooking methods on total phenolics and antioxidant activity of selected green vegetable. *Food chemistry, 93*(4), 731-718.

Udenigwe, C.C., & Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science, 77,* R11–R24.

Vàsquez, V., Martínez, R., & Bernal, C. (2019). Enzyme-assisted extraction of proteins from the seaweeds Macrocystis pyrifera and Chondracanthus chamissoi: Characterization of the extracts and their bioactive potential. *Journal of Applied Phycology, 31*(3), 1999e2010.

Vernès, L.; Li, Y., Chemat, F., & Abert-Vian, M. (2019). Biorefinery Concept as a Key for Sustainable Future to Green Chemistry-The Case of Microalgae BT-Plant Based “Green Chemistry 2.0”: Moving from Evolutionary to Revolutionary. In Li, Y., Chemat, F., (Eds.). *Plant Based “Green Chemistry 2.0* (pp. 15–50). Springer: Singapore.

Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., & Bates, D. (2008). plications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry--A review. *Innovative Food Science & Emerging Technologies, 9*(2), 161-169.

Villagracia ARC, Mayol AP, Ubando AT, Biona JBMM, Arboleda NB, David MY, ..., Kasai H. (2016). Microwave drying characteristics of microalgae (Chlorella vulgaris) for biofuel production. *Clean Technol Environ Policy, 18*(8), 2441–2451. https://doi.org/10.1007/s10098-016-1169-0

Whitaker, J. R. (1994). The proteolytic enzyme. In *principles of enzymology for the food science* (pp. 469-498). New York: Marcel DeKKer.

Williams, R. (2013). *Science shows ABC. N*.P.: n.p.

Xingfeng, G., Shaojun T., & Darryl M. S. (2010). Generation of meat-like flavourings from enzymetic hydrolysates of proteins from Brassica sp. *Journal of Food Chemistry, 119,* 167-172.

Xu, J., & Cheng, J. J. (2011). Pretreatment of switchangrass for sugar production with the combination of sodium hydroxide and lime. *Bioresource Tecnology 102,* 3861-3868.

Yin, S., Tang, C., Cao, J., Hub, E., Wen, Q., & Yang, X. (2008). Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate. *Food Chemistry, 106,* 1004–1013.

Yu, S. Y., & Tan, L. K. (1990). Acceptibility of creaker (Keropok) with fish protein hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology, 25,* 204-208.

Zhang, J., Zhang, H., Wang, Li., Guo, X., Wang, X., & Yao, H. (2009). Antioxidant activities of the rice endosperm protein hydrolysate: identification of the active peptide. *European Food Res. Tech., 229,* 70-719.

Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., & Dou, C. (2011). Disruption of Chlorella vulgaris cells for the release of biodiesel-producing lipids: a comparison of grinding, ultrasonication, bead milling, enzymatic lysis, and microwaves. *Appl. Biochem. Biotechnol. 164,* 1215–1224.

Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Proc. Biochem., 4* 1296-1302.

# ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก ตารางผลการวิเคราะห์**

**ตาราง 49 ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด ของไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกและเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

| ลำดับ | วิธีการพรีทรีทเมนท์ | ความเข้มข้นร้อยละต่อน้ำหนักแห้งตัวอย่าง | เวลานาทีต่อนาที | ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมด | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| 1 | ตัวอย่างควบคุม | 0 | 0 | 26.96±0.12 | 1.16±0.01 | 3.76±0.20 |
| 2 | US-C | 0.5 | 30:30 | 11.13±1.69 | 1.66±0.01 | 4.94±0.19 |
| 3 | USC | 0.5 | 30 | 9.89±0.32 | 1.74±0.06 | 4.54±0.32 |
| 4 | US-P | 0.5 | 30:30 | 17.60±0.97 | 1.87±0.01 | 4.86±0.01 |
| 5 | USP | 0.5 | 30 | 15.93±0.64 | 1.74±0.03 | 4.58±0.10 |
| 6 | US-X | 0.5 | 30:30 | 11.49±1.98 | 1.63±0.02 | 4.60±0.03 |
| 7 | USX | 0.5 | 30 | 14.30±0.28 | 1.78±0.01 | 4.87±0.21 |

**หมายเหตุ**: ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์
เครื่องหมาย “-” หมายถึง ไข่น้ำที่ผ่านการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช

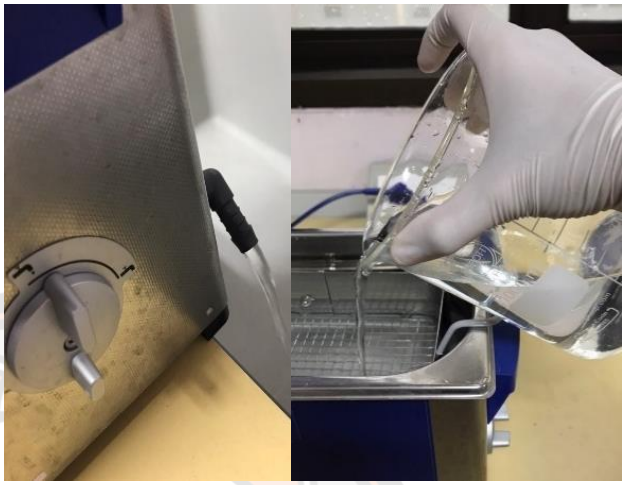
**ตาราง 50 ร้อยละปริมาณของแข็งทั้งหมดของไข่น้ำที่ผ่านการโปรตีโอไลซิส**

| ลำดับ | ตัวอย่าง | ความเข้มข้น (ร้อยละ) | เวลา (นาทีต่อนาที) | ปริมาณของแข็งทั้งหมด (ร้อยละ) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Pellet | Supernatant | Full dispersions |
| **1** | US:C:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 13.86±0.57 | 2.59±0.07 | 4.76±0.12 |
| **2** | US:C:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 11.58±1.15 | 2.64±0.19 | 4.83±0.12 |
| **3** | US:C:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 11.64±1.45 | 2.86±0.10 | 5.05±0.53 |
| **4** | US:C:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 12.40±0.50 | 2.92±0.01 | 4.70±0.01 |
| **5** | US:C:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 8.85±0.07 | 3.80±1.73 | 5.00±0.07 |
| **6** | US:C:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 12.85±3.34 | 2.55±0.01 | 4.86±0.11 |
| **7** | US:C:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 7.19±0.01 | 2.53±0.01 | 4.29±0.04 |
| **8** | US:C:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 7.77±0.29 | 2.80±0.06 | 4.85±0.03 |
| **9** | US:P:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 5.52±0.05 | 2.45±0.02 | 4.07±0.01 |
| **10** | US:P:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 11.58±1.15 | 2.64±0.19 | 4.83±0.12 |
| **11** | US:P:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 11.64±1.45 | 2.86±0.10 | 5.05±0.53 |
| **12** | US:P:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 12.40±0.50 | 2.92±0.01 | 4.70±0.01 |
| **13** | US:P:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 8.85±0.07 | 3.80±1.73 | 5.00±0.07 |
| **14** | US:P:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 12.85±3.34 | 2.55±0.01 | 4.86±0.11 |
| **15** | US:P:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 4.46±0.01 | 2.53±0.01 | 4.29±0.04 |
| **16** | US:P:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 7.77±0.29 | 2.80±0.06 | 4.85±0.03 |
| **17** | US:X:A | 0.5:0.5 | 30:30 | 6.82±0.39 | 2.25±0.01 | 4.13±0.00 |
| **18** | US:X:A | 0.5:0.5 | 30:60 | 6.65±0.13 | 1.91±0.01 | 3.62±0.01 |
| **19** | US:X:A | 0.5:2.0 | 30:30 | 6.44±0.67 | 2.56±0.01 | 3.08±0.11 |
| **20** | US:X:A | 0.5:2.0 | 30:60 | 5.82±0.10 | 2.74±0.03 | 4.27±0.02 |
| **21** | US:X:F | 0.5:0.5 | 30:30 | 6.30±0.15 | 2.64±0.03 | 4.65±0.03 |
| **22** | US:X:F | 0.5:0.5 | 30:60 | 6.25±0.36 | 2.21±0.02 | 3.65±0.03 |
| **23** | US:X:F | 0.5:2.0 | 30:30 | 6.50±0.63 | 2.40±0.00 | 3.75±0.02 |
| **24** | US:X:F | 0.5:2.0 | 30:60 | 6.47±0.37 | 2.60±0.03 | 3.61±0.09 |

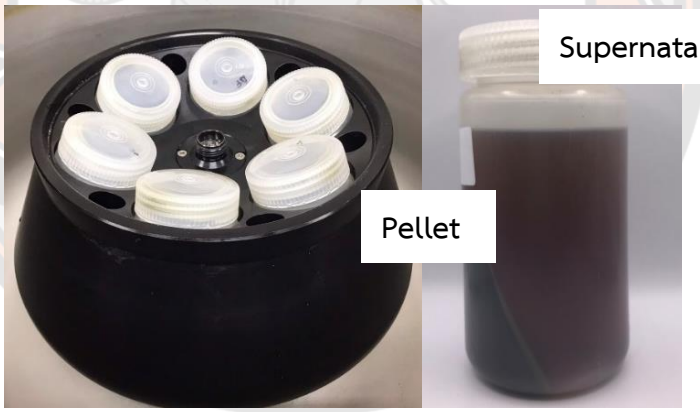
**หมายเหตุ:** ตัวอย่างควบคุม คือ ตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการพรีทรีทเมนท์และการโปรตีโอไลซิส

**ภาคผนวก ข รูปภาพการทดลอง**

1. Pretreatments ด้วยอัลตราโซนิก 37 กิโลเฮิร์ต 280 วัตต์ อุณหภูมิ 30±2 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 15 30 45 และ 60 นาที



2. การควบคุมอุณหภูมิ (30±2 องศาเซลเซียส) ด้วยการเดนน้ำออก และเติมน้ำเย็น

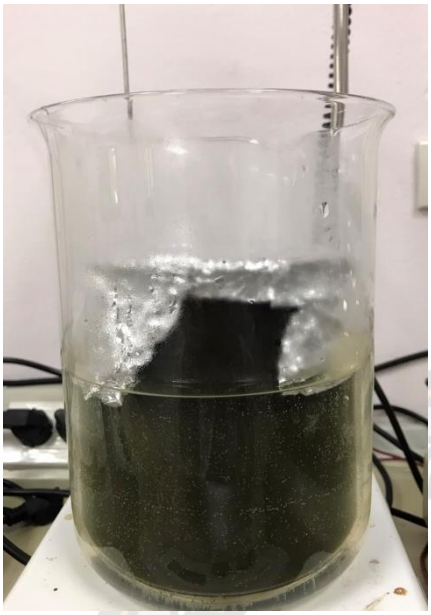



3. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 30 นาที

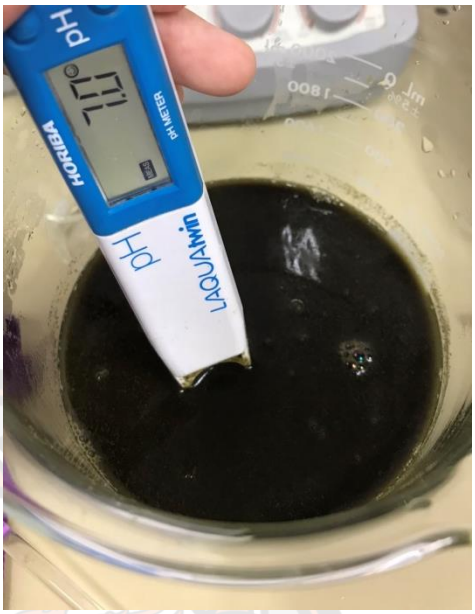
**ภาพ 28 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก**

1. ปรับอุณหภูมิสำหรับการทำงานของเอนไซม์ (50 องศาเซลเซียส) และปรับ pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์

2. เอนไซม์ ได้แก่ เพคติเนส pH 3.5 เซลลูเลส pH 5.0 และไซลาเนส pH 5.0 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 เป็นเวลา 15 30 45 และ 60 นาที



3. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที



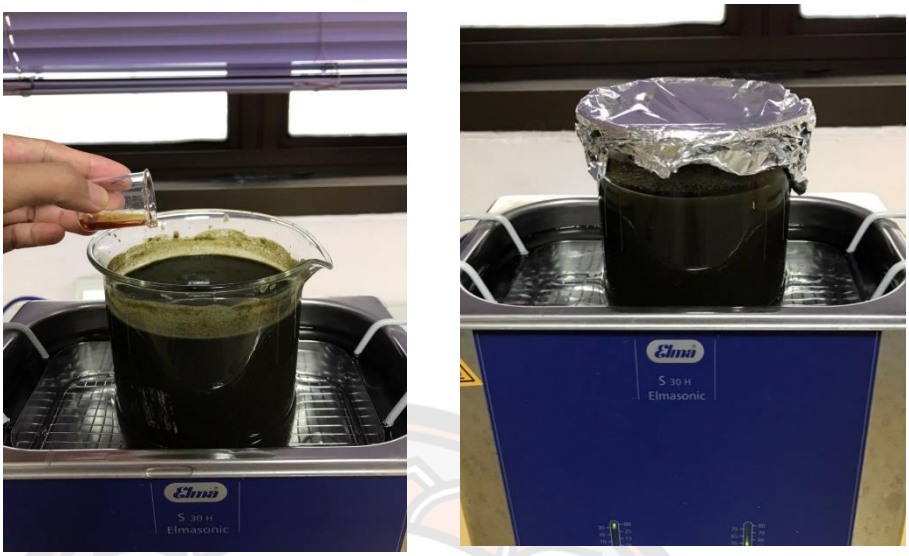

4. ปรับ pH 7 โดยใช้สารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอลิก

5. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 30 นาที

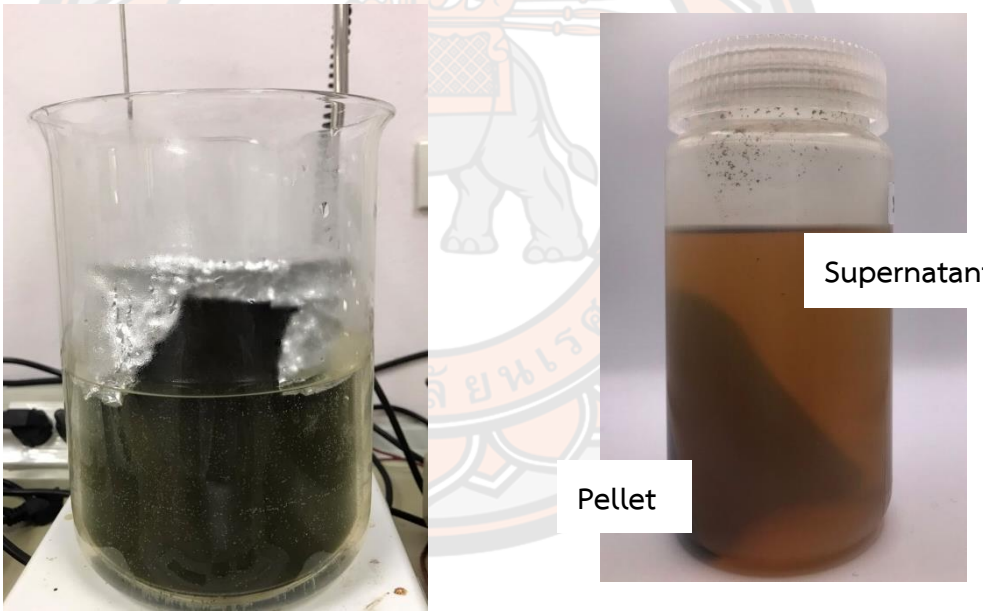
**ภาพ 29 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**

1. ปรับอุณหภูมิสำหรับการทำงานของเอนไซม์ (50 องศาเซลเซียส) และปรับ pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์

2. เอนไซม์ ได้แก่ เพคติเนส pH 3.5 เซลลูเลส pH 5.0 และไซลาเนส pH 5.0 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5



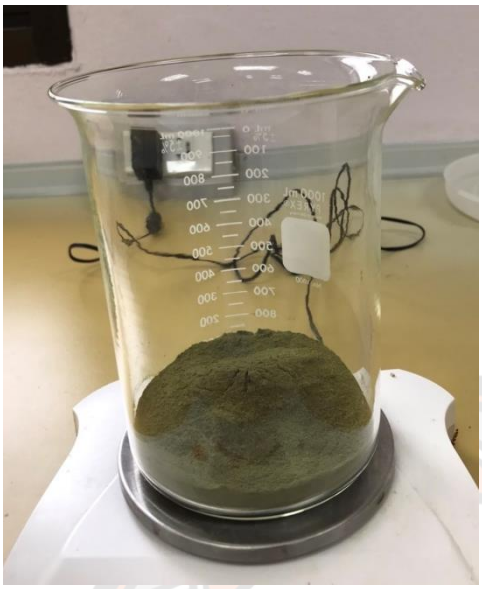

3. Pretreatments ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช 30 นาที




4. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที และปรับ pH 7 โดยใช้สารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอลิก

6. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 นาที

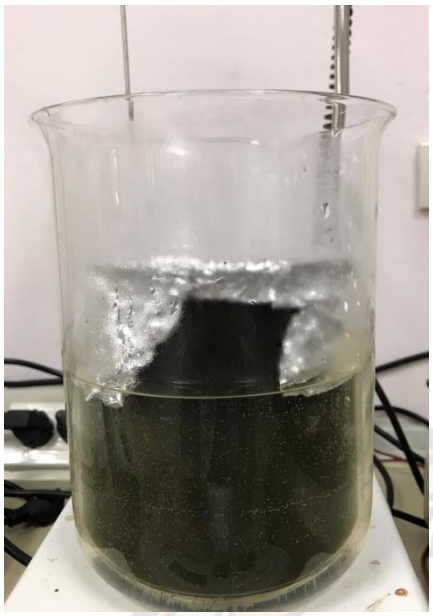
**ภาพ 30 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช**



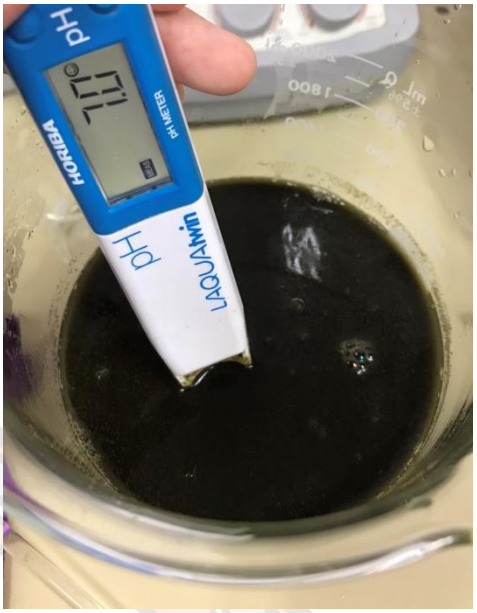
1. ชั่งผงไข่น้ำ 2 กรัม
ต่อน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร

3. ปรับอุณหภูมิสำหรับการทำงานของเอนไซม์ (50 องศาเซลเซียส)

4. ปรับ pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ดังนี้ เพคติเนส pH 3.5 เซลลูเลส pH 5.0 และไซลาเนส pH 5.0 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เวลา 30 นาที



5. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที



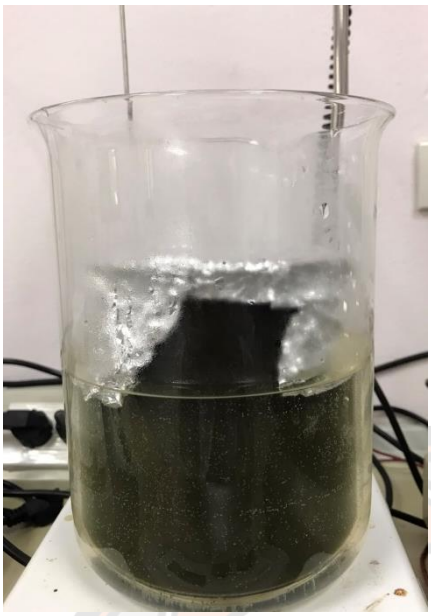

6. ปรับ pH 7 โดยใช้สารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอลิก

7. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 นาที

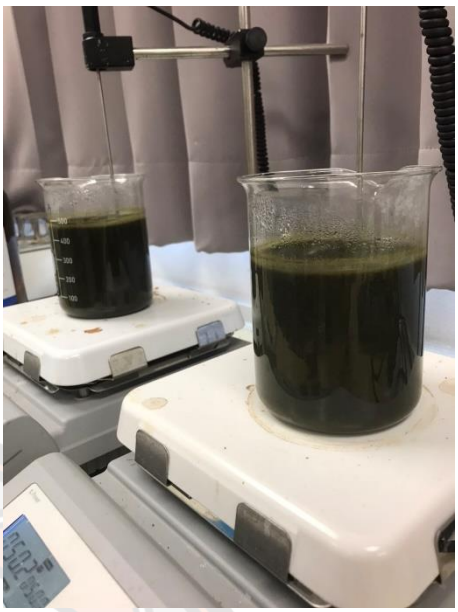
**ภาพ 31 ขั้นตอนการพรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิก 30 นาที ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระยะเวลา 30 นาที**

1. ปรับอุณหภูมิ (50 องศาเซลเซียส) และ pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ดังนี้ เพคติเนส pH 3.5 เซลลูเลส pH 5.0 และไซลาเนส pH 5.0 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

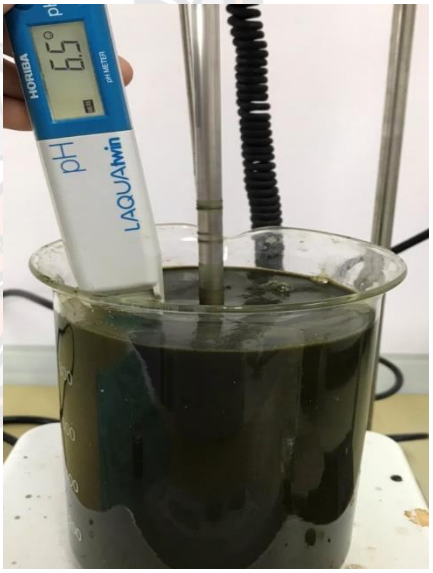
2. พรีทรีทเมนท์ด้วยอัลตราโซนิกร่วมกับเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์พืช 30 นาที



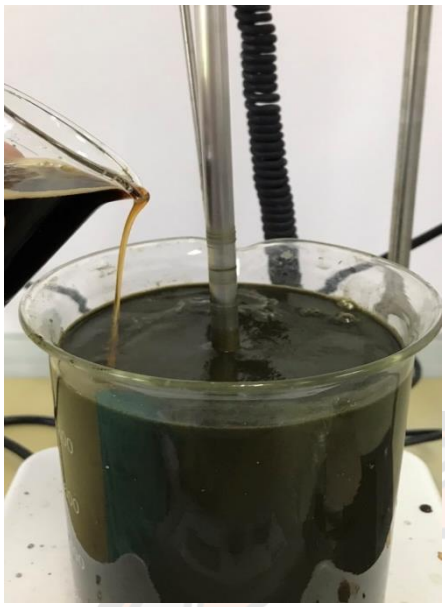
3. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที



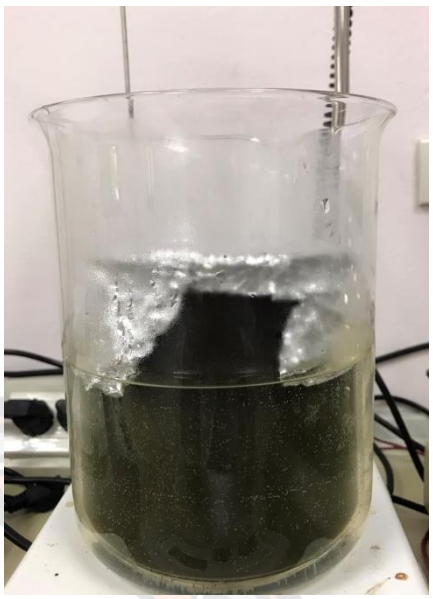
4. ปรับอุณหภูมิสำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส



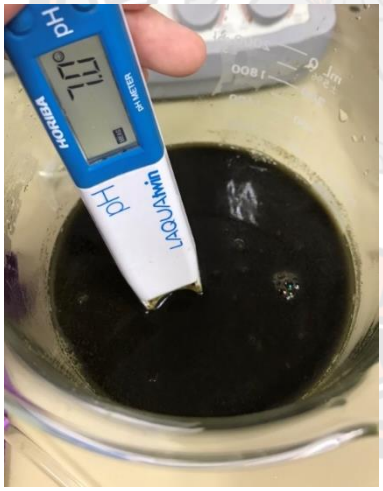

5. ปรับ pH สำหรับการทำงานของเอนไซม์ ดังนี้
เอนไซม์อัลคาเลส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 7.5 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์
ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 6.5
ย่อยเป็นเวลา 30 และ 60 นาที ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ ได้แก่ ร้อยละ 0.5 และ 2.0



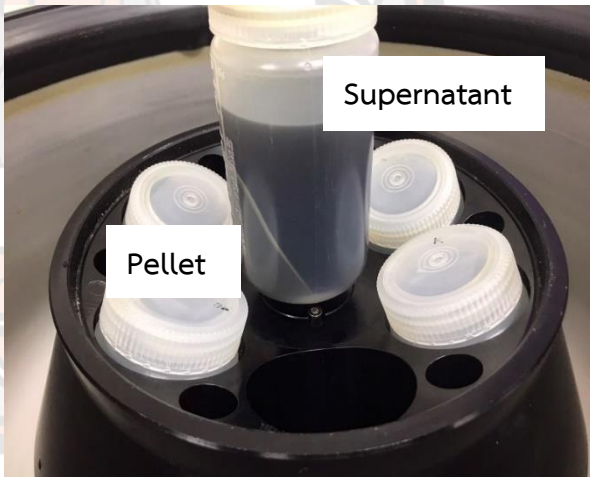
6. ย่อยเป็นระยะเวลา 15 30 45 และ 60 นาที



7. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 15 นาที




8. ปรับ pH 7 โดยใช้สารละลาย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ 1 นอร์มอล กรดไฮโดรคลอลิก




9. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 30 นาที

**ภาพ 32 ขั้นตอนกระบวนการโปรตีโอไลซิส**

**ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์**

**1. การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2000)**

อุปกรณ์

1. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น
2. ตูอบไฟฟา
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟาทศนิยม 4 ตำแหนง

วิธีการวิเคราะห์

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตูอบไฟฟาที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง นำออกจากตูอบใสไวในโถดูดความชื้นนหลังจากนั้นชังน้ำหนักภาชนะหลังอบ

2. ทำเช่นเดียวกันกับข้อ 1 ซ้ำจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

3. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนอย่างละเอียดประมาณ 1-2 กรัม ใส่ในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว

4. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง

5. นำออกจากตู้อบใส่โถดูดความชื้น หลังจากนั้นชั่งหาน้ำหนัก

6. อบซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาทีและทำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

7. คำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

ปริมาณความชื้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ = $M_1$-$M_2$ /$M_1$ *100

เมื่อ M1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ

M2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

**2. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)**

**อุปกรณ**

1. อุปกรณการยอยโปรตีน ประกอบด้วยเตาเผาและเครื่องดักจับไอกรด
2. อุปกรณกลั่นโปรตีน
3. ขวดรูปชมพู ขนาด 125 มิลลิลิตรและขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลลิตร
4. ปเปต (แบบกระเปราะ) ขนาด 5 และ 10 มิลลลิตร
5. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
6. ลูกแกว

7. เครื่องชั่งไฟฟาทศนิยม 4 ตำแหนง

**สารเคมี**

1. สารผสมระหวางคอปเปอรซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$) และโพแทสเซียมซัลลเฟต ($K_2SO_4$) อัตราสวน 1:10

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

3. โซเดียมไฮดรอกไซดเขมขนรอยละ 40

4. กรดบอริกเข้มขนรอยละ 4

5. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

6. อินดิเคเตอรเปนสารผสมระหวางเมทิลเรต เมธีลีนบลูและโบรโมครีซอลกรีน

**วิธีการวิเคราะห์**

ขั้นตอนการย่อย

1. การชั่งตัวอยางใหไดน้ำหนักแนนอน 1-3 กรัมใสลงในหลอดยอยโปรตีน

2. ใสสารผสมระหวางคอปเปอรซัลเฟตและโพแทสเซียมซัลเฟต ปริมาณ 5 กรัม

3. เติมกรดซัลฟูริกปริมาณ 20 มิลลลิตร

4. วางหลอดย่อยในตัวอย่างยอยแล้วประกอบสายยางระหวางฝาครอบ ขวดใสดางและเครื่องดักจับไอกรดใหเรียบรอย

5. เปดสวิทชเครื่องดักจับไอกรดและเตาย่อยแล้วตั้งอุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นปรับเพิ่มอุณหภูมิเปน 400 องศาเซลเซียส ยอยตอกี 60 นาทีจนไดสารละลายใส

6. ปลอยทิ้งไวใหเย็น

**ขั้นตอนการกลั่นและไตเตรท**

1. จัดอุปกรณ์กลั่นแลวเปิดสวิทชใหความรอนและเปิดน้ำหลอเย็นเครื่องควบแน่น

2. นำขวดรูปชมพูขนาด 125 มิลลลิตร ซึ่งบรรจุกรดบอริก (เขมขนรอยละ 4) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอรแล้วไปรองรับของเหลวที่กลั่นไดโดยใหสวนปลายของอุปกรณควบแนนจุมลงในสารละลายกรด

3. เติมน้ำกลั่นลงในหลอดย่อย 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ทำปฏิกิริยาเกินพอสังเกตให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลขุ่น

4. กลั่นให้ได้ของเหลวอยู่ในระดับ 125 มิลลิลิตร

5. ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 0.1 N จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู

6. คำนวณหาปริมาณโปรตีนจากสูตร

ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = $\frac{(A-B)\times N\times 1.4007\times F}{W}$

เมื่อ A คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

B คือ ปริมาณกรดที่ใช้ไตเตรทกับแบลงค์ (มิลลิลิตร)

N คือ ความเข้มข้นของกรด (N)

F คือ แฟคเตอร์ (6.25)

W คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

**3. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)**

**อุปกรณ**

1. Soxhlet apparatus
2. หลอดใส่ตัวอย่าง
3. สำลี
4. ตู้อบไฟฟ้า
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า
6. โถดูดความชื้น

**สารเคมี**

ปิโตรเลียมอีเทอร์หรือเฮกเซน

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ใส่ขวดกลมสำหรับการหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนักที่แน่นอน

2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก 3-5 กรัม ห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง

3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงใน Soxhlet เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียม อีเทอร์ ลงในขวดหาไขมันประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตา

4. ประกอบอุปกรณ์ชุดกลั่นไขมันพร้อมทั้งเปิดน้ำหล่ออุปกรณ์ควบแน่นและเปิดสวิทช์ให้ความร้อน

5. ปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หนดต่อนาที

6. เมื่อครบ 6 ชั่วโมงแล้ว นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจาก Soxhlet ทั้งให้ตัวทำละลายไหลจาก Soxhlet ลงในขวดก้นกลมจนหมด

7. ระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

8. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น

9. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

10. คำนวณหาปริมาณไขมันจากสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W2-W1\times100}{S}$$

เมื่อ $W_1$ คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างก่อนอบ

$W_2$ คือ น้ำหนักขวดตัวอย่างหลังอบ

S คือ น้ำหนักตัวอย่าง

**4. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)**

**อุปกรณ์**

1. Crucible
2. Muffle furnace (เตาเผา)
3. Hot plate
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่ง

**วิธีการวิเคราะห์**

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง นำออกจากเตาเผาเก็บไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

2. ทำซ้ำเช่นเดียวกับ ข้อ 1) จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่ (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ($W_1$)

3. ชั่งตัวอย่างอย่างละเอียดประมาณ 2 กรัม (S) ลงในถ้วยกระเบื้องเคลือบ เผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

4. นำไปเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งได้สีเทาอ่อนหรือสีขาวสม่ำเสมอนำออกจากเตาเผา เก็บในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นลงจนถึงอุณหภูมิห้อง ชั่งน้ำหนัก บันทึกผล

5. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 4. (ในแต่ละซ้ำต่างกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม) หาค่าเฉลี่ย บันทึกผล ($W_2$)

6. คำนวณหาปริมาณเถ้าจากสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(W2-W1)\times 100}{S}$$

**5. การวิเคราะห์หาปริมาณใยอาหารโดยใช้วิธีการสกัดด้วยกรด-ด่าง (AOAC, 2000)**

**อุปกรณ์**

1. อุปกรณ์ชุดหาปริมาณใยอาหาร
2. กระดากรองเบอร์ 41
3. Suction funnel
4. กรวยกรอง
5. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ
6. Hot air oven
7. เตาอบ
8. โถดูดความชื้น
9. เครื่องชั่ง

**สารเคมี**

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1.25
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 1.25
3. เอทิลแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95

**วิธีการวิเคราะห์**

1. นำกระดาษกรองอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่โถดูดความชื้นและชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างที่ผ่านการสกัดไขมันออกและนำมาใส่ในบีกเกอร์สำหรับวิเคราะห์ใยอาหาร
3. เติมกรดซัลฟิวริก ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
4. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่นเปิดสวิตซ์ไฟฟ้า ต้มให้เดือดนาน 30 นาที
5. กรองตัวอย่างขณะร้อนผ่านกระดาษกรองล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นกรด
6. ถ่ายกากที่ได้ในบีกเกอร์ใบเดิมเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาณ 200 มิลลิลิตร
7. วางบีกเกอร์ลงบนอุปกรณ์ให้ความร้อนที่ต่อกับเครื่องควบแน่นและเปิดน้ำหล่อเครื่องควบแน่นเปิดสวิทซ์ไฟฟ้า ต้มให้เดือดนาน 30 นาที

8. กรองขณะร้อนผ่านกระดาษกรองแผ่นเดิมล้างด้วยน้ำร้อนจนกระทั่งน้ำล้างหมดความเป็นด่าง

9. ล้างด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

10. นำกระดาษกรองพร้อมกากใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบและอบในตู้อบ 105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่ในโถดูดความชื้น

11. ชั่งน้ำหนักซ้ำจนกระทั่งได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

12. คำนวณหาปริมาณเถ้าตามสูตร ดังนี้

$$\text{ปริมาณใยอาหาร} = \frac{(\mathrm{M2}-M1)\times 100}{\mathrm{S}}$$

เมื่อ $M_1$ คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา

$M_2$ คือ ผลต่างน้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

S คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

**6. การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันวิธี DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging assay)** ดัดแปลงตามวิธีของ Brand et al. (1955)

**อุปกรณ์**

1. คิวเวท
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
3. 96 well plate
4. Volumetric Flask ปริมาตร 50-100 ml
5. ไมโครปิเปต ปริมาตร 100-1000 µL

**สารเคมี**

1. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)
2. เอทานอลร้อยละ 95
3. น้ำกลั่น

**วิธีการวิเคราะห์**

เตรียมสารละลายDPPH โดยชั่งมา 4 mg ละลายในเอทานอล 95% ปรับปริมาตรเป็น 100 ml จากนั้นทำการทดสอบตัวอย่าง โดยผสมสารละลายตัวอย่าง 750 µL กับสารละลายDPPH 750 µL ใน 96 well plate ตั้งทิ้งไว้ที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดการดูดกลืนแสงที่ 517 nm นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(A2-A1)\times 100}{A2}$$

เมื่อ $A_1$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

$A_2$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของ Control

ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันจะแสดงเป็นค่า $IC_{50}$ คือความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50%

**7. การวิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกของสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP (Ferric ion reducing antioxidant power assay)** ตามวิธีของ Benzin, & Strain, 1996

**อุปกรณ์**

1. คิวเวท
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
3. 96 well plate
4. Volumetric Flask ปริมาตร 50-100 ml
5. ไมโครปิเปต ปริมาตร 100-1000 µL

**สารเคมี**

1. เฟอร์ริกคลอไรด์
2. พีทีแซด (TPTZ)
3. น้ำกลั่น
4. กรดไฮโดรคลอริก
5. อะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3)

**วิธีการวิเคราะห์**

หลักการของสารต้านออกซิเดชันทีสามารถถ่ายเทอเล็กตรอนให้กับสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์ริก $[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเฟอร์รัส $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2}$ จากสารละลายสีเหลืองจะถูกเปลี่ยนเป็นสารละลายสีน้ำเงินม่วง ปริมาณของ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$ ที่เกิดขึ้นคือความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันทีแสดงผลในรูป FRAP value เทียบกับกราฟมาตรฐานของโทรลอกซ์ (trolox equivalent) การเตรียมสารละลาย FRAP reagent โดยการชั่งเฟอร์ริกคลอไรด์ 0.054 g ละลายในน้ำกลั่น 10 mL และชั่งพีทีแซด (TPTZ) 0.031 g ละลายในกรดไฮโดรคลอริก 10 mL ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แล้วผสมด้วยอะซิเตทบัฟเฟอร์ (pH 3) 100 mL เติมน้ำกลั่น 12 mL เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ทำการทดสอบสารตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่าง 200 µL กับสารละลาย FRAP reagent 1000 µL ใน 96 well plate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 nm โดยใช้โทรลอกซ์เป็นสารมาตรฐาน

**8. วิเคราะห์ความสามารถในการแย่งจับกับโลหะหนัก** ดัดแปลงตามวิธีของ Dinisetal, 1994

**อุปกรณ์**

1. คิวเวท
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
3. 96 well plate
4. Volumetric Flask ปริมาตร 50-100 ml
5. ไมโครปิเปต ปริมาตร 100-1000 µL

**สารเคมี**

1. Ferous Sulfate Heptahydrate ($FeSO_4 . 7H_2O$)
2. Ferrozine
3. น้ำกลั่น

**วิธีการวิเคราะห์**

เจือจางสารสกัดตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่น 1.5 มิลลิลิตร เติม 2 mM $FeSO_4 . 7H_2O$ 50 ml และ 5 mM Ferrozine 100 ml ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

**9. การหาปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด** ตามวิธี Gong et al. (2012)

**อุปกรณ์**

1. คิวเวท
2. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
3. 96 well plate
4. Volumetric Flask ปริมาตร 50-100 ml
5. ไมโครปิเปต ปริมาตร 100-1000 µL

**สารเคมี**

1. Gallic acid
2. Folin-Ciocalteu
3. น้ำกลั่น

4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

**วิธีการวิเคราะห์**

เตรียมสารมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 3.90, 7.81,15.62, 31.25 62.50, 125, 250 และ 500 มิลลิกรัม ต่อลิตร ในน้ำกลั่น และเตรียมสารตัวอย่างเจือจาง 1:3 โดยปริมาตร โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ได้จากการสกัด 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำ 1.5 มิลลิลิตร ในขวดใส่สารพลาสติกขนาด 2 มิลลิลิตร นำสารละลายตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับ Folin-Ciocalteu reagent (เจือจางด้วยน้ำ 1:5 โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เติม NaOH 0.35 โมลาร์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในหลุมไมโครเวลเพลท ทิ้งไว้นาน 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับแบลงค์ หาปริมาณฟีนอลิกรวมในสารสกัด โดยเปรียบเทียบค่าที่วัดได้กับกราฟมาตรฐานซึ่งเตรียมจากสารละลาย gallic acid ในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของสารตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g DW)

**10. การตรวจวัดปริมาณฟลาโวนอยดทั้งหมด** ดัดแปลงตามวิธีของ Pourmorad, Hosseinimehrm & Shahabimajd, 2006

**วิธีการวิเคราะห์**

นำสารละลายตัวอยางมา 0.3 mL เจือจางดวย methanol 1.7 mL เติม 10% aluminium chloride 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL และน้ำกลั่น 2.8 mL ตั้งทิ้งไวที่อุณภูมิหองเปนเวลา 30 นาทีแลวนำไปวัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm และนำคาการดูดกลืนแสงที่ไดไปคำนวณหาปริมาณจากสมการของกราฟสารละลายมาตรฐาน quercetin (calibration curve)

**11. การหาปริมาณแคโรทีนอยด์** ตามวิธีของ Borowitzka, 1988

**วัสดุอุปกรณ์**

1. สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)
2. คิวเวต (Cuvettes)
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
4. เครื่องบด (tissue grinder)
5. เครื่องกรองแบบสุญญากาศ
6. หลอดปั่นขนาด 15 มิลลิลิตรพร้อมฝาเกลียว
7. กระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมโครมิเตอร์
8. สารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนต

9. สารละลายอะซิโตน 90 เปอร์เซนต์

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองแล้วเติมสารละลายแมกนีเซียมคาร์บอเนตลงไปเล็กน้อยก่อนกรอง เพื่อเคลือบกระดาษกรองช่วยให้ประสิทธิภาพการกรองดีขึ้น

2. ม้วนกระดาษกรองใส่ในหลอดแก้วความจุประมาณ 15 มิลลิลิตร เติมสารละลายอะซิโตน 90% ลงไป 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมงในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง

3. นำมาบดนาน 1 นาที ด้วยเครื่องบด เทสารละลายลงในหลอดปั่น นำมาเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที รินน้ำส่วนใสวัดปริมาตรแล้วนำไปวัดด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750, 664, 647 และ 452 นาโนเมตร โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 เป็นค่าความขุ่น นำค่านี้ไปลบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 664, 647 และ 452 นาโนเมตร

4. คำนวณได้จากสูตร (อ่านค่าเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

คลอโรฟิลล์ a (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) = $(11.93 \times E_{664}) - (1.93 \times E_{647})$

แคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) = $E_{452} \times 3.86 \times$ ปริมาตรอะซิโตนที่สกัดได้/ปริมาตรอะซิโตนที่นำมาสกัด

เมื่อ E คือค่าการดูดกลืนแสง

**12. ดัชนีการละลายน้ำและดัชนีการดูดซับน้ำ** ตามวิธีของ Anderson et al. (1969)

**วิธีการวิเคราะห์**

ชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม ใส่ลงในหลอดหมุนเหวี่ยงที่มีฝาและทราบน้ำหนักแน่นอนเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยคนด้วยแท่งแก้ว และคนทุก ๆ 5 นาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างส่วนที่ติดมากับแท่งแก้วลงในหลอดหมุนเหวี่ยงโดยใช้น้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสลงในถ้วยอะลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนัก นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนได้น้ำหนักคงที่ แล้วชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณดัชนีการละลายน้ำ สำหรับหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมส่วนที่เหลือในหลอดนำไปชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณค่าการดูดซับน้ำดังนี้

ดัชนีการละลายน้ำ = (น้ำหนักตัวอย่างส่วนที่ละลายน้ำ / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น) x 100

ดัชนีการดูดซับน้ำ = (น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยงพร้อมตะกอน – น้ำหนักหลอดหมุนเหวี่ยง) / น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น

**13. การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และการวิเคราะห์เสถียรภาพของอิมัลชัน** ดัดแปลงตามวิธีของ Pearce, & Kinsella (1978)

วิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากไข่น้ำ โดยวิเคราะห์หาค่าความสามารถในการเกิดอิมัลชันจากค่า EAI และวิเคราะห์ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจากค่า ESI

**วิธีการวิเคราะห์**

1. นำนำมันถั่วเหลืองปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปรตีนปริมาตร 6 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ ร้อยละ 0.10, 0.25, 0.50 และ1.0 (กรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันโดยใช้ Homogenizer ที่ความเร็วรอบ 20,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที

2. จากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลายปริมาตร 50 ไมโครลิตร ที่นาทีที่ 0 และ 10 นำมาเจือจาง 100 ด้วยสารละลาย SDS เข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้ Vortex mixer เป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophptpmeter ที่ 500 nm

3. คำนวณได้จากสูตร

$$EAI\ (m2/g) = (2 \times 2.303 \times A_{500} \times DF) / l\emptyset C$$

เมื่อ $A_{500}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

DF คือ dilution factor

l คือ path length ของคิวเวท (m)

$\emptyset$ คือ oil volume fraction

C คือ ความเข้มข้นของอิมัลซิไฟเออร์ ($g/m^3$)

ค่า ESI คำนวณได้จาก

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

เมื่อ $A_0$ คือ ค่าความขุ่น

$\Delta t$ คือ ระยะเวลาที่ผ่านไป (นาที)

$\Delta A$ คือ ค่าความขุ่นที่เปลี่ยนไป $A_0$-$A_{10}$

**14. การวัดค่าสี** ดัดแปลงตามวิธีของ Li & Lee, 1996

**วิธีการวิเคราะห์**

วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสี chroma meter รุ่น CR-400 ใช้ระบบสี CIE LAB วัดค่า L* a* และ b* โดยที่ L* หมายถึง ค่าความสว่าง มีค่าตั้งแต่ 0 (ดำ) จนถึง 100 (ขาว) +a* หมายถึง ค่าความเป็นสีแดง และ -a* หมายถึง ค่าความเป็นสีเขียว +b* หมายถึง ค่าความเป็นสีเหลือง และ -b* หมายถึงค่าความเป็นสีน้ำเงิน คำนวณค่าดัชนีความขาว (Whiteness Index, WI) จากค่าดัชนีความขาว = $100 - [(100\text{-}L^*)^2 + a^{*2} + b^*2]^{1/2}$

**15. การวิเคราะห์เชื้อจุลชีวะทั้งหมด** ตามวิธีของ FDA BAM, 2001

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดแล้ว 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2. นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารเป็นเวลา 60 นาที จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ จากนั้นใช้เปปโตน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันได้เครื่องปั่นผสม

3. จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง $10^{-2}$ เจือจางสารละลายตัวอย่างต่อไปตามวิธีดังกล่าวข้างต้นจนได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางเหมาะสม

4. ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางระดับต่าง ๆ ใส่ลงจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อจานแล้ว จานละ 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) หลอมเหลวอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสลงในจานเพาะเชื้อที่มีสารละลายตัวอย่างอยู่จานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

6. ผสมสารละลายตัวอย่างและเทอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดีโดยหมุนจาน

7. วางทิ้งไว้จนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวจากนั้นคว่ำจานเพาะเชื้อลง นำไปบ่มเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง

8. เมื่อบ่มเพาะเชื้อครบตามกำหนดแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลยีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี

9. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป $\log_{10}$ CFU/g

**16. การวิเคราะห์ยีสต์และราทั้งหมด** ตามวิธีของ FDA BAM, 2001

**วิธีการวิเคราะห์**

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่บดแล้ว 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

2. นำไปผสมด้วยเครื่องตีผสมอาหารเป็นเวลา 60 วินาที จะได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจาง $10^{-1}$ จากนั้นใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ถ่ายตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายเปปโตน 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมจากนั้นจะได้สารละลายที่มีความแตกต่าง $10^{-2}$

3. เจือจางสารละลายตัวอย่างต่อไปตามวิธีดังกล่าวข้างต้นจนได้สารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางเหมาะสม

4. ถ่ายสารละลายตัวอย่างที่มีความเจือจางระดับต่าง ๆ ใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่มีอาหาร Rose Bengal choramphenical (RBC) agar จานละ 0.1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ

5. ใช้แท่งแก้วปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าของอาหารแต่ละจานนำไปบ่มเพาะเชื้อโดยไม่ต้องความจำเพาะเชื้อในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

6. เมื่อบ่มเชื้อครบตามกำหนดแล้วตรวจนับจำนวนโคโลนี บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะจานที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี

7. คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีจากจากจานเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ซ้ำ รายงานผลในรูป log10 CFU/g

**17. การวิเคราะห์ลักษณะผนังเซลล์ด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด** ดัดแปลงตามวิธีของตุลวิทย์ สถาปนจารุ และคณะ, 2555

ใช้เทคนิค ESEM (environmental scanningelectron microscope) ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถถ่ายภาพตัวอย่างขณะมีความชื้นสูงหรือเปียกได้ (Wet mode imaging) โดยการใช้เนื้อเยื่อไข่น้ำที่ไม่ผ่านการอบแห้ง

1. ใช้ตัวอย่างที่เป็นเนื้อของไข่น้ำในส่วน Full-dispertion และ Pellet เกลี่ยตัวอย่างให้มีขนาดพื้นที่เท่ากับ 0.5 ซม.

2. นำชิ้นตัวอย่างวางบนแท่นยึดตัวอย่างแบบระบายความร้อนได้ (Cooling stsge) ซึ่งมีการติดตั้งระบบถ่ายเทความร้อนไว้ด้านล่าง (Peltier plate)

3. ปรับสภาวะของกล้อง SEM ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่าง โดยใช้โหมด ESEM จากนั้นทำการปรับลดอุณหภูมิของตัวอย่างให้เหลือ 3-5 องศาเซลเซียส กำหนดความชื้นสัมพัทธ์ภายในช่องใส่ตัวอย่าง (chamber) เท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ ทำงานภายใต้ความดันบรรยากาศที่ 800 Pa

**18. ปริมาณแทนนินทั้งหมด** ตามวิธีของ Hou et al., 2003

โดยให้สารประกอบแทนนินทำปฏิกิริยากับ Folin- Ciocalteu Reagent (FCR) โดยใช้กรดแทนนิกเป็นสารมาตรฐาน มีขั้นตอนที่สำคัญดังนี้

**การเตรียมสารละลายมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm และ 100 ppm**

สารละลายมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 1000 ppm โดยชั่งแทนนิก 0.025 กรัม ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์และปรับปริมาตรให้เป็น 25 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร จากนั้นเจือจางสิบเท่าให้ได้

สารมาตรฐานแทนนิกเข้มข้น 100 ppm ด้วยการปิเปตมา 2.5 มิลลิลิตร เจือจางด้วยเอทานอลให้ได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

**การสร้างกราฟมาตรฐานกรดแทนนิก**

1. นำสารละลายมาตรฐานกรดแทนนิกเข้มข้น 100 ppm มาเจือจางด้วยเอทานอลให้มีความเข้มข้นเป็น 0, 20, 40, 60 และ 80 ppm ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร โดยแยกแต่ละหลอดการทดลอง

2. จากนั้นนำทุกหลอดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดีและเติมโซเดียมคาร์บอเนต ($Na_2CO_3$) เข้มข้น 7% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

3. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 90 นาที

4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร (A760) จากนั้นน าค่า A760 และความเข้มข้นของสารมาตรฐานกรดแทนนิกมาเขียนกราฟมาตรฐานและหาค่าความชัน (m) เพื่อใช้วิเคราะห์ปริมาณแทนนินในสารสกัดต่อไป

**การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบแทนนินในสารสกัด**

1. นำสารสกัดจำนวน 0.05 กรัม มาละลายด้วยเอทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร

2. นำสารสกัดที่เตรียมได้จากข้อ 1 มาปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

3. นำสารสกัดมาเติมน้ำ 2.5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายเฟอร์รินปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี และเติม 7% Na2CO3 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร

4. นำไปเขย่าให้สารผสมกันด้วยเครื่องผสม ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 60 นาที

5. นำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดช่วงความยาวคลื่น 200 - 800 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV-vis Spectrophotometer และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร

6. หาปริมาณสารประกอบแทนนินจากกราฟมาตรฐานกรดแทนนิกที่ทำในวันเดียวกัน โดยทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

7. คำนวณหาปริมาณสารประกอบแทนนินทั้งหมดในสารสกัด

**19. ปริมาณกรดอะมิโนด้วยเทคนิคแมสสเปกโทรเมตรี** ดัดแปลงตามวิธีของ Alireza Naseri et al. (2020)

นำเปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยทริปซิน มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LCMS/MS (Q-TOF micromass, UK) โดยมีกระบวนการสังเขปดังนี้ นำ Tryptic peptide ฉีดผ่าน 75 µm ID x 150 mm C18 PepMap column (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) เพื่อกำจัดเกลือในสารละลาย จากนั้นฉีดตัวอย่างโปรตีน 6 µl เข้าสู่ LC-MS/MS ซึ่งเครื่องจะทำให้เปปไทด์แตกตัวในลักษณะต่าง ๆ กันและบันทึกผลลักษณะเอกลักษณ์ของเปปไทด์

นั้น ๆ เป็นโครมาโทแกรม เมื่อนำผลโครมาโทแกรมที่ได้ เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น ฐานข้อมูลจีโนม หรือ ฐานข้อมูลโปรตีน ก็จะสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ โดยจะใช้ใช้โปรแกรม ProteinLyn x (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) และMascot ของ Matrix Science (http://www.matrixscience.com) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISSPROT และ ฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI

**20. การวัดระดับการย่อยสลาย** ตามวิธีของ Nielsen et al. (2001)

ใช้ตัวอย่างโปรตีนจากไข่น้ำปริมาณ 125 ไมโครลิตร มาผสมกับ 0.2125 โมลาร์ของ phosphate buffer ที่ pH 8.2 จำนวน 2 มิลลิลิตร และผสมกับร้อยละ 0.01 ของ TNBS จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสาร 0.1 โมลาร์ ของ Sodium sulfite จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบอัตราการย่อยสลายโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Degree of hydrolysis คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis} = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

โดย $L_t$ คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่เวลาใด ๆ ของตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรด

L0 คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรด

Lmax คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้นสูงสุด นำตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยกรดมา 500 ไมโครลิตรมาผสมกับ 6 นอร์มัลของ HClจำนวน 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสมาปรับให้เป็นกลางด้วย NaOH ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว

**21. ความสามารถการเกิดโฟม** ดัดแปลงตามวิธีของ Sze-Tao and Sathe, 2000

**ความสามารถในการเกิดโฟม (Foam capacity)** โดยชั่งผงไข่น้ำ 4 g ละลายในน้ำกลั่น 200 mL น าไปใส่ในโถปั่นแล้วตีปั่นด้วยเครื่องผสมอาหารจนเกิดฟองขึ้น (ใช้ความเร็วรอบระดับ 6 เป็น เวลา 3 นาที) นำมาคำนวณจากสูตรดังนี้

ความสามารถในการเกิดโฟม (%) =ปริมาณของโฟม/ปริมาตรของเหลวเริ่มต้นX100

**ความเสถียรของโฟม (Foam stability)**

นำโฟมมาบรรจุใส่ในกรวยกรองพลาสติกที่ทราบปริมาตร ใช้กระบอกตวงรองรับของเหลวที่หยดลงมาใต้กรวยอ่านปริมาตรของเหลวที่รองรับได้ทุก ๆ 15 นาที เป็นเวลา 60 นาที นำมาคำนวณจากสูตรดังนี้

ความสามารถในการเกิดโฟม (%) =ปริมาณของเหลว – ปริมาณของแหลงที่หยดลงมา/ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น X100

**ความหนาแน่นของโฟม (Foam density)**

ตักโฟมบรรจุในถ้วยที่ทราบปริมาตรแน่นอน นำไปหาค่าจากสูตรดังนี้

ความหนาแน่นของโฟม (g/mL) = น้ำหนักของโฟม (g)/ปริมาตรของถ้วย (mL) X100