



รายงานการวิจัย เรื่อง

การวิจัยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของเพปไทด์จากโปรตีนพลาสมาสุกรเพื่อใช้
ผลิตการผลิตก้อนเลือดสุกรที่มีเพปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการผลิตเชิงพาณิชย์

(Research in antioxidant activities and functional properties of porcine blood
plasma peptides to use in the production of porcine blood curd containing
bioactive peptides for commercial production)

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรชัย สิ้นสุวรรณ

รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สทว.)

ชื่อเรื่อง การวิจัยฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของเปปไทด์จากโปรตีนพลาสมาสุกรเพื่อใช้ผลิตการ
ผลิตก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อการผลิตเชิงพาณิชย์

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรัชัย สิ้นสุวรรณ
รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิ์กุล

ปีที่แล้วเสร็จ 2566

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ (1) ผลิตเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร
(2) ปรับปรุงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส และ (3) พัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบ
ก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ในการทดลองนี้ได้เลือกโปรตีน 6 ชนิด (อัลคาเลส โปรตาเมกซ์ เปปซิน อะมาโน พี อะมาโน เอ็ม และโปรตี
เอสหายาจาก *Virgibacillus* sp. 37) ไฮโดรไลเซตที่ได้จากอะมาโน พี มีค่า ABTS scavenging activity สูง หมูอัลฟาอะ
มิโน (44 มิลลิกรัม ลิวซัน) ระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ 70) และปริมาณโปรตีนคืนกลับ (ร้อยละ 40) การย่อยเป็นเวลา 6
ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไฮโดรไลเซต การใช้นาโนลิควิดโครมาโทกราฟี-แทนเด็มแมสสเปกโตรเมตรี
พบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงจากไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยอะมาโน พี คือ PPDPKYPPGHVPGP, LVHGPHVYC,
MNPVDHPHGGWTKPVSM, DTFPHYKPHDDR, และ VPGPLPGHVP สมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยอะมา
โน พี และโปรตีนพลาสมาสุกรมีผลการเปลี่ยนแปลงจากอันตรกิริยากับกรดทาลิกและกรดคลอโรเจนิก พบว่า
ความสามารถการเกิดอนุมูลชั้น ความคงตัวของอนุมูลชั้น และการเกิดเจลดีขึ้น นอกจากนี้ก้อนเลือดที่เติมกรดคลอโรเจนิ
กร้อยละ 1 พบว่า ABTS scavenging activity มีค่าสูงเมื่อผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

คำสำคัญ เปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ก้อนเลือดสุกร การย่อยด้วยเอนไซม์ สมบัติเชิงหน้าที่

Title: Research in antioxidant activities and functional properties of porcine blood plasma peptides to use in the production of porcine blood curd containing bioactive peptides for commercial production

Researcher(s): Assistant Professor Dr. Sornchai Sinsuwan
Associate Professor Dr. Jirawat Yongsawatdigul

Year: 2023

Abstract

The present study aimed to (1) generate antioxidant peptides from porcine plasma protein, (2) improve antioxidant peptide activity and peptide functionality by using transglutaminase, and (3) develop a porcine blood curd prototype containing antioxidant peptides.

For this experiment, six proteases were selected (alcalase, protamex, pepsin, amamo P, amamo M, and crude protease from *Virgibacillus* sp. SK37). The amino P hydrolysate demonstrated strong ABTS scavenging activity as well as high levels of α -amino (44 mg leucine), degree of hydrolysis (70%), and protein recovery (40%). A 6 hour hydrolysis time was suitable for enzymatic hydrolysis. Using nano-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, peptide sequences with potential antioxidant activity were identified from amino P hydrolysate, including PPDPKYPPGHVPGP, LVHGPHVYC, MNPVDHPHGGWTKPVSM, DTFPHYKPHDDR, and VPGPLPGHVP. The functional characteristics of amino P hydrolysate and porcine plasma protein were determined to be affected by their interactions with gallic acid (GA) and chlorogenic acid (CGA). Enhanced emulsion ability, emulsion stability, and gelation of amino P hydrolysate and porcine plasma protein were observed. In addition, blood curd containing 1% CGA showed significant ABTS scavenging activity after simulated in vitro gastrointestinal digestion.

Keyword(s): Antioxidant peptide, Porcine blood curd, Enzyme hydrolysis, Functional property

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ที่สนับสนุนงบประมาณด้านวิจัยและนวัตกรรม ประเภท Fundamental Fund ประจำปีงบประมาณ 2565 ทำให้งานวิจัยนี้ (รหัสโครงการ 171011) ได้ดำเนินงานเสร็จสิ้นตามวัตถุประสงค์ สาขาวิชามนุษยนิเวศศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราชที่สนับสนุนการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ได้อนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์สำหรับดำเนินการวิจัยนี้ และผู้ช่วยนักวิจัยคุณรัตนาลี สิงห์คำมา และคุณสุนันทา ชูมี ที่มีวิริยะอุตสาหะทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	1
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	2
กิตติกรรมประกาศ	3
สารบัญ	4
สารบัญภาพ	5
สารบัญตาราง	6
บทที่ 1 บทนำ	7
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	11
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	27
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ บรรณานุกรม	52

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการแยกเพปไทด์ด้วย reverse-phase chromatography ของไฮโดรไลเซตจากพลาสมาสุกรที่ย่อยด้วยอะมาโน พี เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง	32
ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของไฮโดรไลเซตหยาดจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก เมื่อวิเคราะห์ด้วย size exclusion chromatography	41
ภาพที่ 3 การกระจายตัวของเม็ดไขมันในอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาดจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก	44
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเจลของของไฮโดรไลเซตหยาดจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก	45
ภาพที่ 5 ค่าความหนืดเฉือนของโปรตีนพลาสมาจากสุกรที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของพลาสมาสุก	27
ตารางที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ	28
ตารางที่ 3 ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนคืนกลับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของไฮดรอลิเซตที่ย่อยสลายด้วยโปรติเอสชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 4 ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนคืนกลับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของไฮดรอลิเซตที่ย่อยสลายด้วยเปปซินและอะมาโน พี เป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง	31
ตารางที่ 5 ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของไฮดรอลิเซตพลาสมาสุกที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะมาโน พี ที่แยกด้วย reverse-phase chromatography	33
ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงสุด 15 อันดับแรก ด้วยวิธี in silico anlysis ของ fraction 2	34
ตารางที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงสุด 15 อันดับแรก ด้วยวิธี in silico anlysis ของ fraction 4	35
ตารางที่ 8 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	37
ตารางที่ 9 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสผสม (TB-B) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	38
ตารางที่ 10 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยกรดกลูตamicและกรดกลูตamicและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง	39
ตารางที่ 11 สมบัติเชิงหน้าที่ ผิวประจุ ของไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่เตรียมจากอะมาโน พีและโปรตีนพลาสมาสุก ที่เชื่อมโยงด้วยกรดกลูตamicและกรดกลูตamic	42
ตารางที่ 12 ค่าสี ค่าเนื้อสัมผัส และการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนของก้อนเลือดที่เติมไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุก สารประกอบฟีนอลิก และทรานกลูตามิเนส	47
ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของก้อนเลือดที่เติมไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุก สารประกอบฟีนอลิก และทรานกลูตามิเนส ในระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์	48

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เลือด (blood) เป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีสำหรับการบริโภคของมนุษย์เนื่องจากมีกรดอะมิโนจำเป็นปริมาณสูง ธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปฮีม (heme) ซึ่งมีชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) สูง และเป็นโปรตีนชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ (non-allergenic protein) ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนอาหารบางชนิดที่ก่อให้เกิดอาการภูมิแพ้ในบางบุคคลได้ เช่น โปรตีนนม โปรตีนถั่วเหลือง เป็นต้น (Sorapukdee & Narunatsopanon, 2017) เลือดจัดเป็นของเหลือทิ้ง (by-product) ที่เกิดขึ้นจากการฆ่าสัตว์เพื่อแปรรูปสัตว์เป็นอาหาร สุกเป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศไทย ในปี 2561 - 2565 มีความต้องการบริโภคสุกรภายในประเทศลดลงในอัตราร้อยละ 7.15 ต่อปี โดยในปี 2565 ประเทศไทยมีปริมาณการบริโภคสุกร 1.15 ล้านตัน และคาดว่าจะในปี 2566 จะมีปริมาณการบริโภคสุกร 1.30 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2565 ปริมาณ 1.15 ล้านตัน เนื่องจากการฟื้นตัวทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะภาคการท่องเที่ยวและบริการ โดยการผลิตสุกรของประเทศไทยใช้บริโภคภายในประเทศเป็นหลักประมาณร้อยละ 99 ของปริมาณการผลิตทั้งหมด ในปี 2565 ประเทศไทยมีการผลิตสุกรที่มีชีวิตปริมาณ 15.51 ล้านตัว (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) เลือดมีปริมาณร้อยละ 3.9 ของน้ำหนักสุกรโดยประมาณ (Nowak & Von Mueffling, 2006) ดังนั้นในปี 2565 หากสุกรมีน้ำหนักตัว 100 กิโลกรัม เมื่อเข้าสู่โรงฆ่าสัตว์จะเกิดเลือดสุกรปริมาณมากถึง 60.5 ล้านกิโลกรัม ($100 \text{ กิโลกรัม} \times 0.039 \times 15.51 \text{ ล้านตัว}$) จึงเห็นได้ว่าในแต่ละปีมีเลือดสุกรที่ได้จากกระบวนการฆ่าสัตว์ปริมาณมาก การใช้ประโยชน์จากเลือดในปัจจุบันที่เป็นผลิตภัณฑ์ทางการค้า เช่น ไส้กรอกเลือด (blood sausage) แฉกเลือด (blood cake) และก้อนเลือด (blood curd) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษาเพื่อใช้ประโยชน์และสร้างมูลค่าเพิ่มในผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากเลือดสุกรจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจ ซึ่งผลที่เกิดขึ้นจะสร้างประโยชน์ทางด้านเศรษฐกิจและคุณภาพของผู้บริโภค

การผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) จากเลือดสัตว์เป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่ากับเลือดสัตว์ โดยมีรายงานพบว่าเลือดสัตว์เป็นแหล่งของเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์หลากหลาย เช่น การยับยั้งเอนจินโอเทนซิน-1-คอนเวอร์ตติ้งเอนไซม์ (angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory) สารต้านออกซิเดชัน (antioxidation) สารกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรีย (bacterial growth stimulating) และสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) (Bah et al., 2016; Deng et al., 2014; Lafarga et al., 2016) งานวิจัยที่ผ่านมาที่เกี่ยวกับเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน (antioxidant peptide) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนจากเลือดอาจแบ่งออกได้เป็น 6 ประเด็น คือ (1) การผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน มีรายงานการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันด้วยเอนไซม์โปรติเอส (protease) จากแหล่งต่าง ๆ โดยใช้เลือด เม็ดเลือดแดง และโปรตีนพลาสมาจากสัตว์เป็นสารตั้ง

ต้น (Bah et al., 2016; Sun, Shen, et al., 2011; Sun & Luo, 2011; Verma et al., 2019) ด้วยวิธีอัลตราซาวด์ (ultrasound treatment) โดยใช้โปรตีนพลาสมาเป็นโปรตีนเริ่มต้น (Zou et al., 2019) ด้วยแรงดัน (pressure) ร่วมกับอุณหภูมิสูง โดยใช้ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนเริ่มต้น (Álvarez et al., 2012) และน้ำกึ่งวิกฤติ (subcritical water) โดยใช้ฮีโมโกลบินเป็นโปรตีนเริ่มต้น (Álvarez et al., 2016) (2) การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของเป็ดด้วยเอนไซม์นิวเทรส (neutrase) และฟลาโวไซม์ (flavourzyme) คือ อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส พีเอช 7 สัดส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นร้อยละ 14 เป็นเวลา 7.5 ชั่วโมง (Zheng, Wei, et al., 2018) ขณะที่สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) คือ อุณหภูมิ 54.1 องศาเซลเซียส พีเอช 7.82-8.32 สัดส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 5.6-6.6 ชั่วโมง (Seo et al., 2015) นอกจากนี้มีรายงานสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในโปรตีนพลาสมาจากเลือดเป็ดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โปรตามิกซ์ (Protamex) และฟลาโวไซม์ (Yang, Huang, Dong, et al., 2020) เม็ดเลือดจากไก่ด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) และฟลาโวไซม์ (Zheng et al., 2018b) เม็ดเลือดแดงจากสุกรด้วยเอนไซม์ปาเปน (Sun et al., 2012) (3) การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) ของเปปไทด์ พลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เพื่อใช้เป็นส่วนผสมอาหารที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ (functional ingredient) พบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเพิ่มความไม่มีขั้ว (hydrophobicity) ลดความสามารถในการละลาย (solubility) และความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsifying capacity) แต่ไม่มีผลต่อค่าดัชนีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsifying activity index) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability) (Silva & Silvestre, 2003) ผลการศึกษาที่ได้แตกต่างจากพลาสมาโปรตีนจากเลือดสุกรถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าค่าพื้นผิวความไม่มีขั้ว (surface hydrophobicity) ลดลง ความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น และมีผลลดความสามารถในการเกิดอิมัลชันและการเกิดโฟม (foaming capacity) (Liu et al., 2010) (4) การทำบริสุทธิ์และระบุลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน การทำบริสุทธิ์เปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ได้จากการย่อยโปรตีนพลาสมาจากเลือดเป็ดด้วยวิธีการอัลตราฟิเตรชัน (ultrafiltration) ไซตเอ็กครูชันโครมาโทกราฟี (size exclusion chromatography) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงรีเวอร์เฟส (reversed-phase high performance chromatography) จากนั้นระบุลำดับกรดอะมิโนพบว่าเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเป็นเปปไทด์สายสั้นขนาดโมเลกุลระหว่าง 260-560 ดาลตัน ที่มีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Leu-Asp-Gly-Pro, Thr-Gly-Val-Gly-Thr-Lys, Glu-Val-Gly-Lys, Arg-Cys-Leu-Gln, Leu-His-Asp-Val-Lys, Lys-Leu-Gly-Ala และ Ala-Gly-Gly, Val-Pro-Ala-Gly (Yang, Huang, Dong, et al., 2020) ขณะที่ฮีโมโกลบินจากสุกรที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (pepsin) ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการอัลตราฟิเตรชัน ไอออนเอ็กแซงโครมาโทกราฟี (ion exchange chromatography) เจลฟิเตรชันโครมาโทกราฟี (gel filtration chromatography) และโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงรีเวอร์เฟส จากนั้นระบุลำดับกรดอะมิโนพบว่า Ala-Arg-Arg-Leu-

Gly-His-Asp-Phe-Asp-Val-Gln-Ala-Ala (ขนาดโมเลกุล 1,666 ดาลตัน) เป็นเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่สำคัญ (Sun, Luo, et al., 2011) (5) การศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณลักษณะของเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน เปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่ได้จากโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรทำปฏิกิริยากับกรดแทนนิก (tannic acid) หรือกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid) เพื่อให้เกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุลทั้งสองพบว่า ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันสูงขึ้น ความคงตัวของอิมัลชันสูงขึ้น แต่กิจกรรมการเกิดอิมัลชัน (emulsifying activity) ต่ำลง (Chen et al., 2019) นอกจากนี้มีรายงานการนำไฮโดรไลเซต (hydrolysate) จากอีโมโกลบินและเนื้อจากสุกรบ่มด้วยกันพร้อมกับเติมเอนไซม์อัลคาเลสเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregation) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงฤทธิ์ชีวภาพ (bioactivity) คุณค่าทางโภชนาการ และกลิ่นรส (Li et al., 2020) (6) การใช้เปปไทด์ในผลิตภัณฑ์อาหาร ไฮโดรไลเซตโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรเติมลงในไส้กรอกอิมัลชันพบว่าเนื้อสัมผัสของไส้กรอกอิมัลชันดีขึ้น แต่ไม่มีผลชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Jin et al., 2021) ขณะที่การเติมไฮโดรไลเซตจากเลือดสุกรลงในแป้งทอดจากสุกร (pork batter) พบว่าช่วยปรับปรุงสีและลดการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระหว่างการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียสได้ (Verma et al., 2018) เห็นได้ว่าเลือดสัตว์เป็นแหล่งเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่ดีและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตามแนวทางการปรับปรุงคุณลักษณะของไฮโดรไลเซตหยาบ (crude hydrolysate) ที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันที่ได้จากโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (transglutaminase : TGase) ยังไม่พบว่ามีการศึกษามาก่อน ผลที่ได้รับอาจช่วยเพิ่มฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) ของไฮโดรไลเซตหยาบ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำไฮโดรไลเซตหยาบที่ได้ไปเป็นส่วนผสมอาหารที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ (functional ingredient) ต่อไป ซึ่งแนวทางการใช้ประโยชน์หนึ่งคือ การนำไฮโดรไลเซตหยาบที่ปรับปรุงคุณลักษณะด้วย TGase แล้วเติมลงในการผลิตก้อนเลือดสุกรเพื่อผลิตก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสก้อนเลือดสุกรให้ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษา

- 1) ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร
- 2) ปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส
- 3) พัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

1.3 ขอบเขตการวิจัย

นำโปรตีนพลาสมาสุกรย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ และตรวจวัดฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบ จากนั้นนำไฮโดรไลเซตหยาบปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่และพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

1.4 กรอบแนวคิดการวิจัย

งานวิจัยจะนำโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรทำการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบ จากนั้นจึงปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสและสารอื่นๆ เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ จากนั้นจึงพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

1.5 สมมติฐานการวิจัย

- 1) โปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรสามารถใช้ผลิตไฮโดรไลเซตหยาบที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชันได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอส
- 2) เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสสามารถปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาที่ได้จากเลือดสุกร
- 3) ไฮโดรไลเซตหยาบที่ดัดแปรด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

1.6 นิยามศัพท์/นิยามศัพท์เชิงปฏิบัติการ

โปรตีนพลาสมา หมายถึง โปรตีนพลาสมาที่ถูกแยกออกจากเลือดสุกร และกำจัดโซเดียมคลอไรด์ด้วยวิธีไดอะไลซิส ทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ไฮโดรไลเซตหยาบ หมายถึง โปรตีนพลาสมาที่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส ทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน หมายถึง การแสดงออกถึงการกำจัดอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง

สมบัติเชิงหน้าที่ หมายถึง สมบัติของเปปไทด์หรือพอลิเปปไทด์ที่ทำให้อาหารมีคุณลักษณะที่เหมาะสมต่อการบริโภค ได้แก่ การละลาย อิมัลชัน โฟม และเจล

1.7 ประโยชน์ที่ได้รับ

- 1) ด้านพาณิชย์ โครงการวิจัยคาดหวังว่าจะเกิดการถ่ายทอดเทคโนโลยี โดยทดลองนำ “โปรตีนไฮโดรไลเซต” ที่ได้จากโครงการวิจัยไปใช้การผลิต “ก้อนเลือดสุกร” ในโรงงานผู้ผลิต เนื่องด้วยแนวคิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบได้ใช้กระบวนการผลิตเดียวกับโรงงานผู้ผลิตก้อนเลือดสุกร ทำให้โรงงานผู้ผลิตก้อนเลือดสุกรไม่จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนกระบวนการผลิตมากนัก
- 2) ด้านวิชาการ โครงการวิจัยจะเผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

ในช่วงปี 2561 - 2565 การผลิตสุกรของประเทศไทยมีอัตราการลดลงร้อยละ 6.28 ต่อปี เนื่องจากแม่พันธุ์สุกรได้รับผลกระทบจากการระบาดของโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African swine fever : ASF) และเกษตรกรรายย่อยชะลอการเลี้ยงเพื่อลดความเสี่ยง ส่งผลให้ปริมาณการผลิตสุกรในภาพรวมลดลง อย่างไรก็ตามในปี 2566 คาดว่าการผลิตสุกรมีปริมาณ 17.47 ล้านตัว เพิ่มขึ้นจาก 15.51 ล้านตัวของปี 2565 ร้อยละ 12.66 เนื่องจากจำนวนแม่พันธุ์สุกรที่เพิ่มขึ้นจะสามารถขยายการผลิตสุกรได้เพิ่มขึ้น (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2565) ขณะที่การบริโภคสุกรภายในประเทศในปี 2566 คาดว่าจะมีปริมาณ 1.30 ล้านตัน เพิ่มขึ้นจากปี 2565 ที่มีปริมาณการบริโภค 1.15 ล้านตัน เพิ่มขึ้นร้อยละ 12.58 เนื่องจากการฟื้นตัวทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะภาคการท่องเที่ยวและบริการ ซึ่งจะส่งผลให้ความต้องการบริโภคเนื้อสุกรเพิ่มขึ้นจากปีที่ผ่านมา (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2565)

การนำสุกรที่มีชีวิตเป็นอาหารคือการฆ่าสัตว์โดยนำเลือดออกจากร่างกาย โดยเลือดมีปริมาณร้อยละ 3.9 ของน้ำหนักสุกรโดยประมาณ ประมาณได้ว่ามีเลือดปริมาตร 1.5-3 ลิตรที่ได้จากการฆ่าสุกรหนึ่งตัว ดังนั้นในปี 2565 เมื่อเข้าสู่โรงฆ่าสัตว์จะเกิดเลือดสุกรปริมาณมากถึง 26.2- 52.4 ล้านลิตร (คิดจากจำนวนสุกรที่มีชีวิต 17.47 ล้านตัว) ส่วนประกอบทางเคมีของเลือดประกอบด้วยน้ำ (ร้อยละ 79-81) โปรตีน (ร้อยละ 17-20) ไขมัน (ร้อยละ 0.1-0.3) และเถ้า (ร้อยละ 0.8) (Nowak & Von Mueffling, 2006) หากพิจารณาส่วนประกอบหลักของเลือดพบว่า เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) เป็นส่วนประกอบหลักในเลือดสุกรมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 60 โดยประมาณ (Zheng, Wei, et al., 2018) โดยมากจะถูกกำจัดทิ้งหรือใช้ประโยชน์ในลักษณะอื่นที่ไม่ใช่อาหารของมนุษย์ เนื่องจากมีบางลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับหรือสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน (protein functionality) ไม่เหมาะสม ส่วนโปรตีนพลาสมา (plasma protein) เป็นโปรตีนที่มีการใช้ประโยชน์ทางการค้าในการผลิตอาหารเนื่องจากสามารถปรับแต่งสีและกลิ่นได้โดยง่ายและมีสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนที่ดี พลาสมาของเลือดสุกรมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 6.6 (Montero Castillo et al., 2015) ในปัจจุบันการนำของเหลือทิ้ง (by-product) ที่เกิดขึ้นจากการเกษตรหรือกระบวนการผลิตอาหารกลับมาใช้ประโยชน์เป็นแนวคิดที่ได้รับความนิยมอย่างมาก โดยเลือดจากสุกรเป็นของเหลือทิ้งที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จัดเป็นแหล่งโปรตีนที่เหมาะสมสำหรับการบริโภคของมนุษย์ ทั้งที่เลือดสุกรจัดเป็นส่วนประกอบมีปริมาณโปรตีนสูง แต่การใช้เป็นประโยชน์จากเลือดเพื่อเป็นอาหารยังมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนอื่น ๆ ของสุกร (Nowak & Von Mueffling, 2006)

2.1 เลือด

เลือด (blood) มีองค์ประกอบ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเม็ดเลือด (blood corpuscle) และส่วนที่เป็นของเหลวหรือเรียกว่าพลาสมา (plasma) (1) ส่วนเม็ดเลือดประกอบด้วยเม็ดเลือดแดง (erythrocyte) เม็ดเลือดขาว (leukocyte) และเกร็ดเลือด (platelet) มีสัดส่วนประมาณร้อยละ 20-40 ของปริมาตรเลือดทั้งหมด (Sorapukdee & Narunatsopanon, 2017) ชนิดโปรตีนที่สำคัญในเม็ดเลือดแดงคือ สารสี (pigment) ที่มีชื่อว่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (Bah et al., 2016) (2) ของเหลวพลาสมา (liquid plasma) มีสัดส่วนประมาณร้อยละ 60-80 ของปริมาตรเลือดทั้งหมด (Sorapukdee & Narunatsopanon, 2017) โปรตีนพลาสมาคือ อัลบูมิน (albumin) กลอบูลิน (globulin) และไฟบริโนเจน (fibrinogen) (Bah et al., 2016) ในปัจจุบันแนวทางการใช้ประโยชน์จากเลือดในอาหารจะมุ่งเน้นสมบัติเชิงหน้าที่ โดยโปรตีนพลาสมามีรายงานการใช้เป็นสารทำให้เกิดเจล (gelling agent) ไบเดอร์ (binder) อิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) สแตบิไลเซอร์ (stabilizer) สารทดแทนไขมัน (fat replacer) และสารยับยั้งโปรติเอส (protease inhibitor) ในขณะที่เม็ดเลือดแดงพบว่ามีการใช้ประโยชน์ที่น้อยกว่าเนื่องจากข้อจำกัดด้านสี กลิ่น และความน่ารับประทานจึงถูกใช้ในรูปการทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) เพื่อใช้เติมเป็นแหล่งของธาตุเหล็ก (iron fortification)

2.2 สมบัติเชิงหน้าที่ของเลือดสัตว์

เลือดประกอบด้วยโปรตีนที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ชนิดที่สำคัญคือ ฮีโมโกลบินและโปรตีนพลาสมา โดยทั่วไปสัดส่วนของเม็ดเลือดและพลาสมาในเลือดประมาณร้อยละ 40 และ 60 ตามลำดับ (Parés et al., 2006) ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดก้อนเลือดสุกร (porcine blood curd) (F.-S. Wang & Lin, 1994) แต่ฮีโมโกลบินมีข้อจำกัดในการใช้ประโยชน์คือ สีคล้ำและกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ (off-flavor) ขณะที่โปรตีนพลาสมาเป็นโปรตีนที่มีการใช้ประโยชน์ที่หลากหลาย โดยโปรตีนพลาสมามีสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญ 3 ประการ คือ ความสามารถในการละลาย (solubility) การเกิดเจล (gelation) และการเกิดอิมัลชัน (emulsification) (Tarté, 2011) โดยความสามารถในการละลายเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญต่อสมบัติเชิงหน้าที่อื่น (Ramos-Clamont et al., 2003) จึงพบว่าโปรตีนพลาสมามีสมบัติเชิงหน้าที่อื่นด้วย เช่น ความสามารถอุ้มน้ำ (water-holding capacity) แพตไบเดอร์ (fat binder) การเกิดโฟม (foaming) เป็นต้น (Tarté, 2011) มีรายงานการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนพลาสมาในด้านต่าง ๆ เช่น โปรตีนพลาสมาที่ได้จากสุกรมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันที่ดีกว่าโปรตีนพลาสมาจากวัว (Ramos-Clamont et al., 2003) อัลบูมิน (albumin) เป็นชนิดโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการเกิดโฟมของโปรตีนพลาสมา (Dávila et al., 2007) พีเอชมีผลต่อเจลที่เตรียมจากโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรทั้งความสามารถอุ้มน้ำ เนื้อสัมผัส และโครงสร้างจุลภาค (microstructure) (Parés et al., 2006) โดยพีเอชมีผลต่อการปรับเปลี่ยนคุณสมบัติของเจลที่ได้จากโปรตีนพลาสมา (P. Wang et al.,

2014) โดยทั่วไปโปรตีนพลาสมาเตรียมอยู่ในรูปผง โดยอาจผ่านขั้นตอนการแยกชนิดโปรตีนในโปรตีนพลาสมาด้วยวิธีซอลติงเอาท์ (salting out) จากนั้นจึงทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) หรือแบบพ่นฝอย (spray drying) (Parés et al., 2006) ทั้งนี้วิธีการทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็งทำให้ได้โปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรที่ดีทั้งความสามารถในการละลาย ความสามารถอุ้มน้ำ และการเกิดอิมัลชัน (Chinprahast et al., 1995) การเติมโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรลงในการเตรียมเจลของซูริมหรือแอกโตมัยโอซิน (actomyosin) เพื่อปรับปรุงคุณภาพของเจลจากโปรตีนปลาให้ดีขึ้น โดยพบว่าโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรมีบทบาทยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อปลาและมีเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (transglutaminase : TGase) (Benjakul et al., 2001; Visessanguan et al., 2000)

ทั้งนี้การย่อยโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรด้วยโปรติเอสมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ซึ่งแนวความคิดการผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเลือดสุกร พร้อม ๆ กับสามารถนำไฮโดรไลเซตหยาบ (crude hydrolysate) ที่ผลิตได้ใช้ประโยชน์ด้านการปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นประเด็นที่ควรศึกษา แนวทางหนึ่งในการปรับปรุงคุณภาพเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพให้มีสมบัติเชิงหน้าที่คือ การตัดแปรรูปเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (transglutaminase : TGase) โดยพบว่าเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์สามารถเพิ่มคุณลักษณะเนื้อสัมผัสและความสามารถอุ้มน้ำของเจลที่เตรียมจากโปรตีนพลาสมาจากสุกรได้ (Saguer et al., 2007)

2.3 เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันจากเลือดสัตว์

การผลิตเปปไทด์ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) เป็นแนวคิดหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากเลือดหรือส่วนประกอบของเลือด (ฮีโมโกลบินและโปรตีนพลาสมา) เพื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ให้มีทั้งคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ (health benefit) และมีสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) ที่เหมาะสม โดยมุ่งเน้นการใช้เอนไซม์โปรติเอส (protease) เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง ผลิตผล (yield) สูง ระหว่างเกิดปฏิกิริยามีโอกาสเกิดสารชนิดอื่นต่ำ มีความปลอดภัยสูง และต้นทุนค่าพลังงานต่ำ (Zheng, Wei, et al., 2018) การย่อยโปรตีนพลาสมาจากเลือดเป็ดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ได้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดที่สภาวะการย่อยคือ อุณหภูมิ 62.5 องศาเซลเซียส พีเอช 10 สัดส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นร้อยละ 0.3 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Yang, Huang, Zhu, et al., 2020) เช่นเดียวกับโปรตีนพลาสมาจากเลือดวัวพบเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Seo et al., 2015) เม็ดเลือด (blood corpuscle) จากไก่ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) และฟลาโวไซม์ (flavourzyme) ที่สภาวะสัดส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นร้อยละ 2 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมงได้เปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุด โดยพบค่าทั้ง DPPH radical scavenging activity, superoxide anion scavenging activity และ reducing power สูง โดยเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้าน

ออกซิเดชันสูงสุดได้จากโมเลกุลของฮีโมโกลบิน หน่วยย่อยอัลฟา-ดี (subunit alpha-D) มีลำดับกรดอะมิโนคือ Ala-Glu-Asp-Lys-Lys-Ile-Gln (Zheng, Si, et al., 2018)

2.4 สมบัติเชิงหน้าที่ของเลือดสัตว์ที่ผ่านการย่อยด้วยโปรติเอส

เลือดจากสัตว์ต่างชนิดกันมีสมบัติเชิงหน้าที่ที่แตกต่างกัน พบว่าเลือดไก่สามารถเกิดเจลที่แข็งแรง (strong gel) ได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และมีคุณสมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่ความเข้มข้นโปรตีนต่ำ ในขณะที่เลือดจากสุกรเกิดเจลอ่อน (soft gel) เมื่อต้มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แต่สามารถเกิดเจลที่แข็งแรงได้ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที และมีความสามารถเกิดโฟมได้ดีกว่าเลือดไก่ (Sorapukdee & Narunatsopanon, 2017) การย่อยโปรตีนจากเลือดสัตว์มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ โดยการย่อยโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกรด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีผลต่อการเพิ่มการละลาย แต่ลดค่าความเป็นไฮโดรโฟบิก (hydrophobicity) ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิดโฟม (Liu et al., 2010) ฮีโมโกลบินจากเลือดไก่เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส (neutrase) และฟลาโวไซม์ พบว่ามีคุณสมบัติการละลาย (solubility) ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน และความสามารถในการเกิดโฟมสูงขึ้น จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้เติมในอาหารหรือเป็นวัตถุเจือปนอาหาร (food additive) ได้ (Zheng, Wei, et al., 2018)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร

1) การเตรียมโปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกร สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำเลือดสุกรจากโรงชำแหละสุกรอำเภอยะพือ จ.ยะลา โดยบรรจุลงขวดพลาสติก ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเติมเกลือโซเดียมซิเตรต (sodium citrate) ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1 (w/v) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด (coagulation) และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตลอดเวลาการขนส่งไปยังห้องปฏิบัติการ แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000×g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Hitachi CR22GIII, Hitachi Koki Co. Ltd., Tokyo, Japan) สารละลายส่วนใส (supernatant) ที่ได้คือ โปรตีนพลาสมา แล้วนำไปทำการไดอะไลซิส (dialyze) ด้วยถุงไดอะไลซิส (dialysis bag) ขนาด 7 kDa กับน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำโปรตีนพลาสมาไปทำแห้งด้วยวิธีการแช่แบบเยือกแข็ง (freeze drying) เพื่อรอการวิจัยต่อไป

2) การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและปริมาณความชื้น วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในตัวอย่างเลือดและโปรตีนพลาสมา ตามวิธีของ Association of Official Analytical Chemists (AOAC) Method 981.10 (AOAC, 2000) การรายงานค่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดใช้ค่าแฟกเตอร์ของโปรตีนเท่ากับ 6.25 วิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC Method 950.46 (AOAC, 2000) วิเคราะห์ปริมาณไขมันตามวิธีของ AOAC Method 922.06 และวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามวิธีของ AOAC Method 920.153

3) การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสหยาบจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ซึ่งมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอสสูงถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Y medium (1% yeast extract, 0.3% trisodium citrate, 0.2% potassium chloride, 2.5% magnesium sulfate) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 5% บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 rpm เป็นระยะเวลา 2 วัน นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายส่วนใส (supernatant) ที่ได้คือ เอนไซม์โปรติเอสหยาบ นำไปทำแห้งด้วยวิธีการแช่แบบเยือกแข็งเพื่อรอการวิจัยต่อไป

4) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้สำหรับการเตรียมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมา นำเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (flavourzyme; Novozymes, Basvaerd, Denmark) นิวเทรส (neutrase; Novozymes, Basvaerd, Denmark) ปาเปน (papain; Sigma-Aldrich, USA) อัลคาเลส (alcalase; Novozymes, Basvaerd, Denmark) โปรตามิกซ์ (protamex; Sigma-Aldrich, USA) เพปซิน (pepsin; Sigma-Aldrich, USA) อะมานโน พี (amano P; Ajinomoto Co., Tokyo, Japan) และ อะ

มาโน เอ็ม (amano M; Ajinomoto Co., Tokyo, Japan) ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 0.1% (w/v หรือ v/v ขึ้นอยู่กับสถานะตั้งต้นของเอนไซม์) ในขณะที่โปรติเอสหายจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK37 ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้น 20% (w/v) จากนั้นนำเอนไซม์โปรติเอสไปย่อยสารตั้งต้นเคซีน (casein) (เข้มข้นร้อยละ 2) ยกเว้นเปปซินใช้สารตั้งต้นฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ที่สภาวะดังนี้

เอนไซม์	สภาวะ
ฟลาโวไซม์ (flavourzyme)	50 องศาเซลเซียส พีเอช 7
นิวเทรส (neutrase)	50 องศาเซลเซียส พีเอช 7
ปาเปน (papain)	60 องศาเซลเซียส พีเอช 7
อัลคาลาส (alcalase)	55 องศาเซลเซียส พีเอช 8
โปรตามิกซ์ (protamex)	60 องศาเซลเซียส พีเอช 8
เปปซิน (pepsin)	37 องศาเซลเซียส พีเอช 2 ไขมัน
อะมาโน พี (amono P)	45 องศาเซลเซียส พีเอช 8
อะมาโน เอ็ม (amono M)	45 องศาเซลเซียส พีเอช 8
โปรติเอสหายจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Virgibacillus</i> sp. 37	60 องศาเซลเซียส พีเอช 8

(1) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยสารตั้งต้นเคซีน เติมสารละลายเคซีนที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.55% นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยให้มีพีเอชและอุณหภูมิเหมาะสมต่อชนิดของเอนไซม์นั้น ๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายของเอนไซม์ ผสมสารละลายจนเข้ากันดี และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เวลาที่แน่นอนในการบ่ม 10 นาที หลังจากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก (trichloroacetic acid; TCA) ที่มีความเข้มข้น 110mM นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้เติมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนตความเข้มข้น 500 mM และสารละลายฟอลิน-ไซโอแคลท์ รีเอเจนท์ (Folin-Ciocalteu's reagent) ความเข้มข้น 0.5M แล้วบ่มสารละลายอีก 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 15 นาที และไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้สารละลายไทโรซีน (L-tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์โดยรายงานค่าการทำงานของเอนไซม์เป็น U/ml ให้ U คือ μmol ของไทโรซีนต่ออนาที

(2) การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยสารตั้งต้นฮีโมโกลบิน เติมสารละลายฮีโมโกลบินความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 2% (pH 2.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง บ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่ทราบความ

เข้มข้นที่แน่นอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมนสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาแล้วจึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์เป็น U/ml โดยให้ U คือ absorbance unit (a.u.) ที่ 280 นาโนเมตร ต่อนาที

5) การผลิตไฮโดรไลเซต ในขั้นต้นได้ทดสอบการผลิตไฮโดรไลเซตด้วยโปรตีนพลาสมาที่ความเข้มข้น 10, 5, 2.5, และ 1% (w/v) ในสถานะที่ให้และไม่ให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสกับโปรตีนพลาสมา ก่อนการย่อยด้วยโปรติเอส จากนั้นได้เลือกสถานะโปรตีนพลาสมาที่ความเข้มข้น 1% (w/v) และให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียสกับโปรตีนพลาสมา ก่อนการย่อยด้วยโปรติเอส โดยการเตรียมให้ซึ่งตัวอย่างโปรตีนพลาสมา (ผง) 110.25 มิลลิกรัม ละลายน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร น้ำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับ pH ของสารละลายด้วย HCl หรือ NaOH ตามสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ (บันทึกปริมาตรที่ใช้) ปรับให้มีปริมาตรเป็น 9 มิลลิลิตร เติมนเอนไซม์โปรติเอส 1 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิเป็น 10 มิลลิลิตร โดยเอนไซม์ที่ศึกษา (ได้จากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่า มีระดับการย่อยในระดับที่เหมาะสม) มีดังนี้

เอนไซม์	สภาวะการย่อย	E : S ¹
อัลคาเลส (alcalase)	55 องศาเซลเซียส พีเอช 8	5 : 100
โปรตามิกซ์ (protamex)	60 องศาเซลเซียส พีเอช 8	5 : 100
เพปซิน (pepsin)	37 องศาเซลเซียส พีเอช 2 ไข่ม้อย	5 : 100
อะมาโน พี (amono P)	45 องศาเซลเซียส พีเอช 8	5 : 100
อะมาโน เอ็ม (amono M)	45 องศาเซลเซียส พีเอช 8	5 : 100
โปรติเอสหยาบจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Virgibacillus</i> sp. 37	60 องศาเซลเซียส พีเอช 8	5 : 100 10 : 100 15 : 100

¹ E หมายถึง คำนวณจากปริมาตร (ml) หรือน้ำหนักเอนไซม์ (g) โดยการตวงหรือชั่ง; S หมายถึง กรัมโปรตีนที่ละลายได้ (soluble protein content, g.) ของโปรตีนพลาสมาได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) และให้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

ทำการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm หยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับค่า pH เป็นกลาง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองตะกอนโปรตีนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 แล้วบันทึกปริมาตรที่แน่นอน ก่อนจะนำไปวิเคราะห์หกระดับการย่อยสลาย (degree of

hydrolysate ; DH) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคืนกลับ (protein recovery) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

6) ระยะเวลาการผลิตไฮโดรไลเซตด้วยอะมาโน พี เตรียมปริมาณโปรตีนพลาสมาที่ความเข้มข้นสุดท้าย 1% (w/v) โดยชั่งตัวอย่างพลาสมา 110.25 มิลลิกรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 8 มิลลิลิตร นำไปต้มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับ pH ของสารละลายให้ได้ pH 8 ปรับให้มีปริมาตรเป็น 9 มิลลิลิตร เติมเอนไซม์อะมาโน พี 1 มิลลิลิตร ปริมาตรสุทธิเป็น 10 มิลลิลิตร โดยอัตราส่วน E:S คือ 5:100) เป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง พร้อมเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 rpm ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น แล้วปรับค่า pH เป็นกลางปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองตะกอนโปรตีนด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 แล้วบันทึกปริมาตรที่แน่นอน ก่อนจะนำไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysate ; DH) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคืนกลับ (protein recovery) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

7) การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysate : DH) ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนอิสระทั้งหมด (L_{max}) วิเคราะห์โดยชั่งตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักแน่นอน 50 มิลลิกรัม ลงในหลอดย่อย แล้วเติมกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 6 N ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วย่อยที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นลง กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 และทำการปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็นกลางแล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 หรือ 25 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโนด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) โดยใช้ลิวซีน (L-leucine) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณระดับการย่อยสลายนี้อย่างสมการ

$$\% DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \times 100$$

เมื่อ	%DH	=	ร้อยละของระดับการย่อย
	L_0	=	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระเริ่มต้น (สภาวะเดียวกับตัวอย่าง แต่ไม่มีการเติมเอนไซม์)
	L_t	=	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระที่ระยะเวลาการย่อยใดๆ
	L_{max}	=	ปริมาณหมู่อะมิโนอิสระทั้งหมดของสารตั้งต้น

8) การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนคืนกลับ (protein recovery) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน ทำ

การชั่งตัวอย่างโปรตีนพลาสมา (ผง) ทราบน้ำหนักแน่นอน 500 มิลลิกรัม เติมสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) ที่ความเข้มข้น 10% ปริมาตร 9.5 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส จนไม่มีตะกอนเหลือในหลอดทดลองแล้วเตรียมสารละลายเจือจางให้มีความเข้มข้น 10, 20, 50 และ 100 เท่า จากนั้นปิเปตตัวอย่างใส่ลงในหลอดทดลอง 100 ไมโครลิตร (3 ซ้ำ) ทำปฏิกิริยากับ reagent D (2% Na_2CO_3 ใน 0.1 M NaOH : 0.5% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ อัตราส่วน 50:1) ปริมาตร 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม reagent C (Folin-Ciocalteu reagent : DI water อัตราส่วน 1:1) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนคืนกลับดังสมการ

$$\% \text{ Protein recovery} = \frac{W_t}{W_0} \times 100$$

เมื่อ W_t = ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของตัวอย่างไฮโดรไลเซต
 W_0 = ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของตัวอย่างเริ่มต้น

9) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ประกอบด้วยความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ (ABTS scavenging activity assay) ความสามารถในการจับโลหะ (metal chelation) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power) และ hydroxyl radical scavenging activity รายละเอียดดังนี้

(1) *ความสามารถในกำจัดอนุมูลอิสระ (ABTS scavenging activity assay)* ดัดแปลงจากวิธีของ Re et al., (1999) โดยเตรียมสารละลาย 2,2 α -azino-di-(3-ethylbenzothiazoline sulfonic acid) หรือ ABTS เจือจางให้มีความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เท่ากับ 0.734 (เก็บสารละลายให้พ้นแสง) จากนั้นปิเปตตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตปริมาตร 20 ไมโครลิตร เติมสารละลาย ABTS ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 1,980 ไมโครลิตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้องโดยเก็บสารละลายให้พ้นแสงเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตรใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน และใช้น้ำปราศจากไอออนเป็นตัวควบคุมปฏิกิริยา รายงานเป็นค่า Trolox equivalent antioxidant capacity (mM Trolox equivalents) หรือ % inhibition ตามการรายงานของ Dudonné et al. (2009)

(2) *ความสามารถในการจับโลหะ (metal chelation)* ตรวจวัดความสามารถในการจับกับโลหะ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Decker & Welch (1990) ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน (deionized-water) ปริมาตร 1.4 มิลลิตร เติมสารละลายเฟอร์รัสคลอไรด์ (FeCl_2) ความเข้มข้น 2 mM ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเติมสารละลายเฟอร์โรซีน (ferrozine) ความเข้มข้น 5 mM ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มสารผสมที่อุณหภูมิห้อง (เก็บสารละลายให้

พันธแสง) เป็นเวลา 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร โดยใช้กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (ethylenediamine-tetraacetic acid : EDTA) เป็นสารมาตรฐาน รายงานค่าเป็น chelating ability (%) ดังสมการ

$$\text{Chelating ability (\%)} = \frac{(B - A)}{B} \times 100$$

เมื่อ A = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง
B = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม (control)

(3) ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (*ferric reducing antioxidant power*) วิเคราะห์ความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie & Strain (1996) เตรียมสารละลายที่ประกอบด้วยอะซีเตทบัฟเฟอร์ (pH 3.6) ความเข้มข้น 300 mM กับ 2,4,6- tripyridyl-s-triazine หรือ TPTZ ความเข้มข้น 10 mM ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 40 mM และสารละลายเฟอร์ริกคลอไรด์ (FeCl₃) ความเข้มข้น 20 mM จากนั้นปิเปตตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายข้างต้นปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (เก็บสารละลายให้พ้นแสง) เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐาน คำนวณความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกในตัวอย่างและรายงานค่าเป็น mM Trolox equivalents

(4) *Hydroxyl radical scavenging activity* วิเคราะห์การยับยั้งอนุมูล hydroxyl ตามดัดแปลงวิธีการของ Sakanaka & Tachibana (2006) โดยเตรียมสารผสมของเฟอร์รัสซัลเฟต ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) สารละลาย EDTA และสารละลาย 2-deoxyribose ความเข้มข้น 10 mM อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร นำมาผสมกับตัวอย่างไฮโดรไลเซต 0.1 มิลลิลิตร และเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) ความเข้มข้น 0.1 M ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 10 mM ลงไป 0.1 มิลลิลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากการบ่มเติมสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 2.8% และสารละลาย thiobarbituric acid (TBA) ความเข้มข้น 1.0% อย่างละ 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปต้มจนเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยชุดควบคุมจะเติมน้ำแทนตัวอย่างและ blank จะเติม phosphate buffer แทนสารละลาย 2-deoxyribose และนำไปคำนวณเป็น % inhibition ได้ตามสมการ

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{1 - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{Blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right] \times 100$$

10) การทำบริสุทธิ์ไฮโดรไลเซตหยาบ ทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค reverse-phase chromatography (RPC) โดยใช้เครื่องแยกสารชีวโมเลกุลโปรตีนให้บริสุทธิ์ (Fast Protein Liquid Chromatography: FPLC, AKTA PURE, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) ใช้ตัวอย่างไฮโดรไลเซต 0.1 มิลลิลิตร มีปริมาณเบสไทด์ 8.63 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เฟสเคลื่อนที่ A คือ น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง (ultrapure water: Type I) และเฟสเคลื่อนที่ B คือ สารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ความเข้มข้น 0.1% (v/v) ในสารละลายอะซิโตนไทรล์ (acetonitrile) ความเข้มข้น 30% (v/v) ใช้เวลาในการแยกทั้งหมด 30 นาที ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น UV เท่ากับ 214 นาโนเมตร

นำ fraction ทำแห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) เพื่อนำไปวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไป ทั้งนี้การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันให้เตรียมตัวอย่างปริมาณเบสไทด์ที่เท่ากันคือ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยคำนวณจากปริมาณหมู่อัลฟอะมิโน (mg) ที่วิเคราะห์ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) โดยใช้ลิวซีน (L-leucine) เป็นสารมาตรฐาน

11) การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค De novo sequencing นำ fraction F2 และ F4 ทำการแยกองค์ประกอบโดยใช้ nanocolumn (Acclaim PepMap RPLC, C18, 5 μ m, 100 Å) เชื่อมกับระบบ Thermo Scientific™ EASY-nLC™ 1200 system (liquid chromatography)- Q Exactive hybrid quadrupole-orbitrap mass spectrometry ข้อมูลดิบจาก LC-MS นำมาวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ด้วย PEAKS Studio 10.6 De novo for peptide sequence

12) ไบโอมินฟอเมติกของเปปไทด์ การศึกษาฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของเปปไทด์จาก De novo sequencing ด้วยวิธี silico analysis ผ่านโปรแกรม AnOxPePred - 1.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/AnOxPePred-1.0/>) ตามวิธีการของ Olsen et al. (2020)

13) การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.2 การปรับปรุงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร

1) การเชื่อมโยงโปรตีนและเปปไทด์ ประกอบด้วยด้วยการใช้เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสและสารประกอบฟีนอลิกดังนี้ **(1.1) ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสบริสุทธิ์** ดัดแปลงตามวิธีการของ (Song et al., 2013) ซึ่งโตนไฮโดรไลเซตจากพลาสมา (freeze-dried powder form) 0.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้มีความเข้มข้น 1% (w/v) โดยมีปริมาตรสุดท้าย 10 mL ที่เติมสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (microbial transglutaminase, Sigma Chemical Company,

USA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ 10%, 25%, และ 50% ของกรัมโปรตีน (g soluble protein of hydrolysate) จากนั้นบ่มอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 2, 4 และ 6 ชั่วโมง เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 180 rpm หยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 25 องศาเซลเซียส, 10 นาที และนำตัวอย่างหลังบ่มไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) ใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน โดยนำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 4 องศาเซลเซียส, 10 นาทีก่อน ค่าความขุ่นโดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (α -amino groups) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน **(1.2) ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสผสม** ดัดแปลงตามวิธีการของ Song et al. (2013) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพลาสมา (freeze-dried powder form) 0.1 กรัม ละลายในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้มีความเข้มข้น 1% (w/v) โดยมีปริมาตรสุดท้าย 10 mL ที่เติมสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (Activa® TG-B strong adhesive type, Ajinomoto Co., Tokyo, Japan) ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายคือ 1 และ 3% ของกรัมโปรตีน (g soluble protein of hydrolysate) จากนั้นบ่มอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 4 ชั่วโมง เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 180 rpm หยุดปฏิกิริยาด้วยการให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 10 นาที ทำให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g, 25 องศาเซลเซียส, 10 นาที ส่วนของตัวอย่างควบคุมใช้สารละลายเคซีนให้มีความเข้มข้น 1% (w/v) แทนสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส จากนั้นนำตัวอย่างหลังบ่มไปวิเคราะห์ Lowry (Lowry et al., 1951) ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (α -amino groups) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน **(1.3) ด้วยสารประกอบฟีนอลิก** ซึ่งโปรตีนพลาสมาผง (freeze-dried powder form) 50 mg/mL และซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพลาสมา (freeze-dried powder form) 100 mg/mL ละลายด้วยบัฟเฟอร์ 50 mM Tris-HCl (pH 9) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ได้สารละลายโปรตีน จากนั้นเตรียมสารละลายกรดกาอิก (gallic acid : GA) และกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid : CGA) ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ให้มีความเข้มข้น 10% และปรับพีเอชให้ได้ 9 ด้วย 1M NaOH การทำปฏิกิริยาการเชื่อมโยงให้สารละลายโปรตีนพลาสมา และสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตมีความเข้มข้นสุดท้าย 5% (w/v) โดยมีสารละลายฟีนอลิกเข้มข้น 1%, 5% และ 10% ของกรัมโปรตีนที่ละลายได้ (g soluble protein) ปรับพีเอชให้ได้ 9 และปรับปริมาตรให้ได้ 25 ml ใส่ลงใน 50 ml-centrifuge tube นำตัวอย่างก่อนบ่มไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry (Lowry et al., 1951) และปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (α -amino groups) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าตลอดเวลาที่ความเร็วรอบ 180 rpm จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็วรอบ 6,000×g อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างหลังบ่มไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Lowry (Lowry et al., 1951) ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (α -amino groups) ด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่

2) การวิเคราะห์ความสามารถการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม (foaming ability and stability) ดัดแปลงวิธีของ Stone et al., (2019) นำสารละลายโปรตีนความเข้มข้น 5% (W/V) พีเอช 9.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ปริมาตรเริ่มต้น) ลงกระบอกตวง จากนั้นโฮโมจีไนส์ความเร็ว 7,200 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นวัดปริมาตรโฟมที่เกิดขึ้นทันที (0 นาที) และเวลาที่ผ่านไป 30 นาที รายงานค่าเป็นความสามารถการเกิดโฟม (% foaming capacity) โดยให้ปริมาตรเริ่มต้นเป็น 100% และความคงตัวของโฟม (% foaming stability) โดยให้ปริมาตรโฟมหน้าที่ 0 100%

3) การวิเคราะห์ความสามารถการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion ability and stability) ดัดแปลงวิธีการของ (Liceaga-Gesualdo & Li-Chan, 1999) และ (Hall et al., 2017) ตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/ml ค่าพีเอช 9.0 นำโปรตีนไฮโดรไลเซตปริมาตร 3 ml มาผสมกับน้ำมันถั่วเหลือง 1 ml ปั่นผสม ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที อุณหภูมิห้อง ปิเปตสารจากกันหลอดออกมา 50 μ l ที่เวลา 0 และ 30 นาที ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำมาเจือจางกับสารละลาย 0.3% โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (1:50) ปริมาตร 2.5 ml แล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น A_{500} รายงานค่าเป็นความสามารถการเกิดอิมัลชัน (%emulsion ability index: %EAI) ดังสมการ และความคงตัวของอิมัลชัน (% emulsion stability) ให้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ 500 nm เป็น 100%

$$EAI (m^2/g) = \frac{2 \times T \times DF}{f \times C}$$

เมื่อ T คือ ค่าความขุ่น ($T = 2.3A/l$ ซึ่ง A คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร, l คือ light path ในหน่วยเมตร)

f คือ สัดส่วนปริมาตรของเฟสกระจาย (disperse phase) (0.25)

C คือ ความเข้มข้นโปรตีน (kg/ml)

DF คือ แฟกเตอร์การเจือจาง

3) การวิเคราะห์ผิวประจุ (surface charge) ของอิมัลชัน วิเคราะห์ขนาดอนุภาคศักย์ซีต้า ดัดแปลงวิธีการของ Bhatt et al. (2010) ด้วยเครื่อง Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., GB) เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/ml พีเอช 9.0 นำตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร ปั่นผสม ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปิเปตสารละลายจากกันหลอดมาทำการเจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออนในอัตราส่วน 1:10 ทำการผสมให้เข้ากัน

ปิเปตตัวอย่างใส่ dip cell ทำการวัดค่าต่างศักย์ของอนุภาคใช้เวลาวิเคราะห์ 2 นาทีต่อตัวอย่าง รายงานค่าเป็นต่างศักย์ของอนุภาค (mv)

4) การวิเคราะห์ขนาดอนุภาคเม็ดไขมัน วิเคราะห์ขนาดเม็ดไขมันด้วยเครื่อง Laser scattering particle size distribution analyzer (Partica LA-960, HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan) ดัดแปลงวิธีการของ Bhatt et al. (2010) เตรียมตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/mL พีเอชที่ 9.0 นำตัวอย่าง 3 มิลลิลิตร เติมน้ำมันถั่วเหลือง 1 มิลลิลิตร ปั่นผสมที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง รายงานค่าขนาดของเม็ดไขมัน

5) การวิเคราะห์การเกิดเจล (gelation) ดัดแปลงวิธีการของ Dion-Poulin et al. (2020) นำตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/ml พีเอชที่ 9.0 นำไปให้ความร้อนด้วยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง สังเกตลักษณะการเกิดเจลด้วยตาและบันทึกภาพถ่าย

6) การวิเคราะห์ค่ารีโอโลยี ดัดแปลงวิธีของ Luo et al.(2020) วิเคราะห์ด้วยเครื่อง Rheometer (HAAKE MARS 40 Rheometer, Thermo Fischer Scientific, Waltham) Probe แบบ Parallel Plate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 มิลลิเมตร ระยะห่าง 0.5 มิลลิเมตร ใช้ตัวอย่างความเข้มข้น 50 mg/ml พีเอชที่ 9.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ขั้นแรกทำการทดสอบเพื่อหาค่าความเค้นโดยให้อุณหภูมิกับตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นกำหนดความถี่ที่ 1 Hz และใช้ค่าความเค้นในช่วงร้อยละ 0.1-100 พบว่าความเค้นที่ทำให้ storage modulus (G') และ loss modulus (G'') ของตัวอย่างอยู่ในช่วง liner viscoelastic เท่ากับร้อยละ 0.1 – 1 จึงนำค่าความเค้นที่ร้อยละ 0.1 มาใช้ในการทำ frequency sweep test และ temperature test (1) *frequency sweep test* ทำโดยให้อุณหภูมิตัวอย่าง 10 องศาเซลเซียส มาวัดค่า storage modulus (G') และ loss modulus (G'') โดยขณะทดสอบจะปรับค่าความเค้นร้อยละ 0.1-100 1/วินาที (2) *temperature test* ทำโดยตั้งโปรแกรมการให้ความร้อนกับตัวอย่างจากอุณหภูมิ 10-90 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 1 องศาเซลเซียส ต่อนาที คงอุณหภูมิไว้ที่ 90 องศาเซลเซียส 10 นาที แล้วทำให้เย็นจากอุณหภูมิ 90-10 องศาเซลเซียส ที่อัตรา 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที คงอุณหภูมิไว้ที่ 10 องศาเซลเซียส 10 นาที

7) การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

3.3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1) การเตรียมก้อนเลือดสุกร ชั่งผงเลือดสุกรที่เตรียมด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งละลายในน้ำปราศจากไอออนและกวนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมสารชนิดต่าง ๆ โดยให้เลือดหมูมีปริมาณโปรตีนสุดท้ายคือ 20% (w/v) ดังนี้ (1) ไม่เติมสารใด ๆ บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (2) เติมผงไฮดรอลิเซตหยาบที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ปริมาณ 1 และ

5% (w/w) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (3) กรดกลูตาเมต ปริมาณ 1% (w/w) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (4) กรดคลอโรเจนิก ปริมาณ 1% (w/w) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และ (5) เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส (ACTIVA® TG-K, Ajinomoto Co., Tokyo, Japan) ปริมาณ 0.5% (w/w) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เทตัวอย่างลงในพิมพ์ ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ทำให้เย็นในน้ำสะอาด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป

2) การสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อน (cooking loss) ของก้อนเลือดสุกร ดัดแปลงวิธีการของ Yoshihara & Yokoyama (2021) ซึ่งนำหนักก้อนเลือดก่อนและหลังต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นและซับตัวอย่างให้แห้งก่อนชั่งน้ำหนัก รายงานค่าการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อน (% cooking loss) ให้น้ำหนักก้อนเลือดก่อนต้มเป็น 100%

3) การวัดเนื้อสัมผัสของก้อนเลือดสุกร ตรวจวัดด้วยเครื่อง texture analyser วัดค่าความแข็งแรงของเจล (gel strength: g.cm) และระยะทางที่หัววัดกดผิวหน้าจนกระทั่งผิวหน้าเจลแตก (deformation, cm)

4) การวัดค่าสี ด้วยเครื่องวัดสี (color meter) ในระบบ CIE lac scale (L^* , a^* และ b^*) รายงานผลการทดสอบเป็นค่า L^* (ค่าความสว่าง) a^* ($-a^*$ = greenness และ $+a^*$ = redness) และ b^* ($-b^*$ = blueness และ $+b^*$ = yellowness)

5) การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน วิธีการดังที่กล่าวข้างต้น โดยทำการสกัดเปปไทด์ในน้ำก่อนเลือดสุกรด้วยน้ำปราศจากไอออนอัตราส่วน (1:2) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใส (supernatant) วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไป

6) ความคงตัวของฤทธิ์ทางชีวภาพในระบบย่อยอาหารจำลอง (in vitro gastrointestinal (GI) digestion) ตามวิธีของ Minekus et al. (2014) โดยชั่งน้ำหนักเลือดหมู 2.5 กรัม ผสมกับน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายจำลองของเหลวในกระเพาะอาหาร (simulated gastric fluid, 1.25X) ปริมาตร 3.2 มิลลิลิตร โดยมีความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์สุดท้าย 0.075 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับค่า pH 3.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล คงปริมาตรรวมไว้ที่ 9.2 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายผสมไปบ่มในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์เพปซินปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 2000 U/mL) ในขั้นตอนสุดท้าย บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที (เขย่า 200 รอบต่อนาที)

สำหรับการจำลองการย่อยอาหารในลำไส้เล็ก เตรียมโดยเติมสารละลายจำลองของเหลวในลำไส้ (simulated intestine fluid, 1.25X) ปริมาตร 5.5 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 นอร์มอล ปริมาตร 0.20 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างกับ gastric chyme ปริมาตร 10 มิลลิลิตรอย่างรวดเร็ว แล้วปรับค่า pH >5.6 จากนั้นจึงเติมแคลเซียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ (ในส่วนผสมสุดท้าย) ปรับค่า pH ให้เป็น 7.0 และคงปริมาตรรวมไว้ที่ 17.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มในอ่างน้ำควบคุม

อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วเติมเอนไซม์แพนครีเอตินปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 100 U/ mL) ในขั้นตอนสุดท้ายแล้วทำการย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที (เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตลอดเวลา) หยุดการทำงานของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหาร จำลอง โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นลงทันที แล้วปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 25 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) ใช้ bovine serum albumin เป็นสารมาตรฐาน ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนด้วยวิธี trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) (Adler-Nissen, 1979) โดยใช้ลิวซีน (L-leucine) เป็นสารมาตรฐาน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันต่อไป

7) การวิเคราะห์ผลทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการวิจัยแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยแบ่งออกเป็น 3 ส่วนคือ **ส่วนที่ 1** การศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร **ส่วนที่ 2** การปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส และ**ส่วนที่ 3** การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

ส่วนที่ 1 การศึกษาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร

1) โปรตีนพลาสมาจากเลือดสุกร

เลือดสุกรเมื่อปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกของเหลวออกจากเซลล์เม็ดเลือดที่เป็นของแข็งจะได้สัดส่วนของเหลวประมาณ 70% จากเลือดสุกรตั้งต้น ส่วนของแข็งประมาณ 30% เมื่อนำของเหลวที่แยกได้มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า โปรตีนพลาสมาจากสุกรมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลัก โปรตีน 6.37% ไขมัน และเถ้าน้อยกว่า 2% (**ตารางที่ 1**) ในส่วนของการทำวิจัยเลือดสุกรที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์จะเติมโซเดียมซิเตรตเพื่อป้องกันการแข็งตัว (coagulation) จึงจำเป็นต้องกำจัดออก (desalting) ด้วยวิธีไดอะไลซิส จากนั้นจึงทำให้แห้งด้วยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze drying) พบว่าสามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนพลาสมาได้ประมาณ 83.4% ผงโปรตีนพลาสมาที่ได้มีปริมาณโปรตีนที่สูงมากกว่า 90.7% เมื่อวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด ในการทดสอบเบื้องต้นพบว่าความสามารถในการละลายโปรตีน (protein solubility) ของผงโปรตีนพลาสมามีค่า 100% เมื่อคำนวณเปรียบเทียบกับโปรตีนทั้งหมดในผงโปรตีนพลาสมา

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของพลาสมาสุกร

ความชื้น (%)	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	เถ้า (%)
90.92 ± 0.02	6.37 ± 0.13	0.42 ± 0.16	1.24 ± 0.07

2) กิจกรรมเอนไซม์

งานวิจัยได้เตรียมเอนไซม์ทางการค้าและเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 พบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดมี unit activity ที่แตกต่างกัน โดยปาเปน (papain) มีค่า U/ml สูงที่สุด ขณะที่โปรตีนเอนไซม์หยาบจาก *Virgibacillus* sp. 37 มีค่าต่ำที่สุด (**ตารางที่ 2**)

ตารางที่ 2 ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ

เอนไซม์โปรติเอส	U/ml
ฟลาโวไซม์ (flavourzyme)	1.77 ± 0.03
นิวเทรส (neutrase)	153.45 ± 3.76
ปาเปน (papain)	356.82 ± 10.72
อัลคาเลส (alcalase)	180.69 ± 5.13
โปรตามิกซ์ (protamex)	97.50 ± 3.62
เพปซิน (pepsin)	127.83 ± 5.25
อะมาโน พี (amono P)	6.25 ± 0.24
อะมาโน เอ็ม (amono M)	1.42 ± 0.02
โปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ <i>Virgibacillus</i> sp. 37	0.4347 ± 0.14

3) เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮดรอลิเซตหายาที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ฟลาโวไซม์ (flavourzyme) นิวเทรส (neutrase) และปาเปน (papain) มีระดับการย่อยโปรตีนพลาสมาต่ำ จึงไม่ได้ถูกนำมาศึกษาเพื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) โปรตามิกซ์ (protamex) เพปซิน (pepsin) อะมาโน พี (amono P) อะมาโน เอ็ม (amono M) และโปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 ในการผลิตไฮดรอลิเซตหายาที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน โดยทำการย่อย ณ สภาพที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า อะมาโน พี (amono P) มีปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนสูงที่สุด รองลงมาคือ อะมาโน เอ็ม เพปซิน อัลคาเลส โปรตามิกซ์ และโปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 ตามลำดับ ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับระดับการย่อยสลาย (% DH) โปรตีน ที่เพิ่มขึ้นด้วย ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) หากพิจารณาปริมาณโปรตีนคืนกลับเห็นได้ว่า เอนไซม์เพปซินจะให้ปริมาณโปรตีนคืนกลับสูงที่สุด ($p < 0.05$) ตามมาด้วยเอนไซม์โปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 ที่ 84-89% ขณะที่เอนไซม์อัลคาเลส อะมาโน พี อะมาโน เอ็ม และโปรตามิกซ์ โดยรวมแล้วจะน้อยกว่า 50% (ตารางที่ 3) เมื่อพิจารณาปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนของโปรตีนพลาสมาที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 ที่เวลา 0 และ 6 ชั่วโมง พบว่า มีปริมาณไม่แตกต่างกัน ($p \geq 0.05$) ส่งผลให้ไม่สามารถคำนวณระดับการย่อยสลาย (%DH) ได้ แม้ว่าจะเพิ่มระดับการเติมของเอนไซม์จาก 5% เป็น 10% และ 15% พบผลลัพธ์ไม่แตกต่างกัน เนื่องจาก unit activity ของเอนไซม์โปรติเอสหายาจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 มีปริมาณต่ำมาก ซึ่งอาจยังไม่เพียงพอที่จะนำไปใช้ย่อยโปรตีนได้

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ABTS scavenging activity assay ของไฮดรอลิเซตหยาบที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ (ตารางที่ 3) พบว่า ไฮดรอลิเซตจากเปปซินมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) รองลงมาเป็นลำดับคือ อะมาโน พี $\approx$ อะมาโน เอ็ม > โปรตาเมกซ์ $\approx$ อัลคาเลส > โปรติเอสหยาบจาก *Virgibacillus* sp. 37 ($p < 0.05$) ขณะที่ค่า hydroxyl radical scavenging activity พบว่า โปรตาเมกซ์ อัลคาเลส และเปปซินมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) ไฮดรอลิเซตทั้งหมดที่ศึกษาไม่พบความสามารถในการจับกับโลหะ และ ferric ion reducing antioxidant power ไม่สูงมากนัก

4) ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮดรอลิเซตหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ในการศึกษาขั้นต่อไปมีความจำเป็นที่จะต้องใช้ไฮดรอลิเซตหยาบในปริมาณมาก จึงต้องทำการยกระดับการผลิตจากระดับ 25 มิลลิลิตร เป็นระดับ 4 ลิตร ให้ปริมาตรรวม 12 ลิตรต่อรุ่นการผลิต เพื่อให้ได้ผลผลิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเพียงพอต่อการทดลอง รวมถึงในการยกระดับการผลิตไฮดรอลิเซตหยาบจากระดับห้องปฏิบัติการ (lab scale) เป็นการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (pilot scale) จำเป็นต้องมีสภาวะการผลิตที่เหมาะสมเพื่อได้ปริมาณไฮดรอลิเซตหยาบต่อรุ่น (batch) สูง เพื่อความคุ้มค่าและประสิทธิภาพการผลิต งานวิจัยจึงศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮดรอลิเซตหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ตารางที่ 4.3) โดยเลือกเปปซินและอะมาโนพีศึกษาเวลาที่เหมาะสม ใช้ระยะเวลาในการย่อย 0 2 4 8 และ 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่า ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนคืนกลับ ABTS scavenging activity assay และ hydroxyl radical scavenging activity ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย โดยเอนไซม์เปปซินมีปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรกและมีค่าแนวโน้มเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยในช่วงที่ของการย่อย จากนั้นจึงมีแนวโน้มคงที่จนชั่วโมงที่ 10 ขณะที่อะมาโน พีปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนเพิ่มขึ้นอย่างอย่างรวดเร็วในระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรกเช่นกันและเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 6 ($p < 0.05$) จึงมีแนวโน้มคงที่จนชั่วโมงที่ 10 งานวิจัยนี้ได้เลือกไฮดรอลิเซตหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่ผลิตจากเอนไซม์อะมาโน พี เพื่อการพัฒนาและศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป

ตารางที่ 3 ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนคืนกลับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของไฮดรอลิเซตที่ย่อยสลายด้วยโปรติเอสชนิดต่างๆ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

เอนไซม์โปรติเอส	E : S	ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (mg leucine)	ระดับการย่อยสลาย (%DH)	ปริมาณโปรตีนคืนกลับ (%protein recovery)	ABTS scavenging activity assay (mM Trolox equivalents)	metal chelation (chelating ability, %)	FRAP (mM Trolox equivalents)	Hydroxyl radical scavenging activity (% inhibition)
อัลคาเลส (alcalase)	5 : 100	11.82 ± 0.88 ^d	14.95 ± 2.08 ^d	44.30 ± 0.21 ^c	1.49 ± 0.02 ^c	N.D.	0.32 ± 0.00 ^c	71.02 ± 1.02 ^a
โปรตามักซ์ (protamex)	5 : 100	6.26 ± 0.29 ^e	4.86 ± 0.57 ^e	31.14 ± 7.60 ^d	1.50 ± 0.09 ^c	N.D.	0.32 ± 0.01 ^{b,c}	74.87 ± 0.52 ^a
เพปซิน (pepsin)	5 : 100	14.64 ± 2.00 ^c	21.10 ± 0.05 ^c	107.47 ± 2.19 ^a	1.93 ± 0.01 ^a	N.D.	0.34 ± 0.00 ^{abc}	67.81 ± 1.09 ^a
อะมาโน พี (amono P)	5 : 100	43.71 ± 1.92 ^a	70.17 ± 4.22 ^a	39.56 ± 2.53 ^{c,d}	1.57 ± 0.01 ^{b,c}	N.D.	0.34 ± 0.00 ^{abc}	26.10 ± 2.50 ^c
อะมาโน เอ็ม (amono M)	5 : 100	26.43 ± 1.38 ^b	38.98 ± 0.34 ^b	31.11 ± 0.56 ^d	1.61 ± 0.02 ^b	N.D.	0.35 ± 0.00 ^a	43.53 ± 3.18 ^b
โปรติเอสหายาจาก <i>Virgibacillus</i> sp. 37	5 : 100	3.37 ± 0.22 ^f	N.D.	88.17 ± 6.6 ^b	0.72 ± 0.02 ^e	N.D.	0.34 ± 0.00 ^{a, b}	40.37 ± 0.86 ^b
	10 : 100	3.06 ± 0.26 ^f	N.D.	84.08 ± 1.48 ^b	0.85 ± 0.00 ^d	N.D.	0.35 ± 0.00 ^a	39.22 ± 2.04 ^b
	15 : 100	3.98 ± 0.25 ^{e,f}	N.D.	89.16 ± 8.96 ^b	0.72 ± 0.02 ^e	N.D.	0.33 ± 0.00 ^{abc}	24.28 ± 3.10 ^c

อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

N.D., not detected

ตารางที่ 4 ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโน ระดับการย่อยสลาย ปริมาณโปรตีนคืนกลับ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ของไฮดรอลิเซตที่ย่อยสลายด้วยเปปซินและอะมาโน พี เป็นเวลา 0-10 ชั่วโมง

เอนไซม์โปรติเอส	เวลา (h)	ปริมาณหมู่แอลฟาอะมิโน (mg leucine)	ระดับการย่อยสลาย (%DH)	ปริมาณโปรตีนคืนกลับ (% protein recovery)	ABTS scavenging activity assay (%inhibition)	metal chelation (chelating ability, %)	FRAP (mM Trolox equivalents)	Hydroxyl radical scavenging activity (% inhibition)
เปปซิน (pepsin)	0	12.57±4.45 ^c	-	-	-	N.D.	N.D.	-
	2	33.83±4.21 ^b	9.18±2.05 ^c	94.1±9.8 ^{a,b}	75.99±2.01 ^b	N.D.	N.D.	41.79±1.51
	4	41.71±1.61 ^{a,b}	13.02±0.79 ^b	92.7±5.4 ^{a,b}	77.25±0.70 ^b	N.D.	N.D.	39.58±0.29
	6	44.06±1.29 ^a	14.17±0.63 ^{a,b}	94.2±5.4 ^{a,b}	77.57±1.59 ^b	N.D.	N.D.	39.49±0.27
	8	44.89±1.42 ^a	14.58±0.69 ^{a,b}	88.4±1.6 ^b	80.61±1.89 ^{a,b}	N.D.	N.D.	39.05±0.34
	10	48.15±1.98 ^a	16.17±0.96 ^a	100.0±4.2 ^a	76.97±0.61 ^b	N.D.	N.D.	56.60±0.94
อะมาโน พี (amono P)	0	25.74±1.86 ^c	-	-	-	N.D.	N.D.	-
	2	138.00±11.84 ^b	52.44±5.23 ^b	67.81±2.22	72.14±1.69 ^d	N.D.	N.D.	39.77±0.72 ^a
	4	147.18±2.38 ^b	58.07±0.97 ^b	70.00±2.28	75.50±1.52 ^c	N.D.	N.D.	33.95±0.85 ^b
	6	165.65±3.36 ^a	67.65±1.23 ^a	64.68±4.22	76.52±0.84 ^{b,c}	N.D.	N.D.	30.46±0.61 ^c
	8	170.52±8.56 ^a	70.00±3.56 ^a	68.57±3.94	78.44±1.16 ^{a,b}	N.D.	N.D.	30.53±0.57 ^c
	10	173.57±13.47 ^a	69.79±5.74 ^a	68.66±3.22	80.54±0.59 ^a	N.D.	N.D.	30.94±0.20 ^c

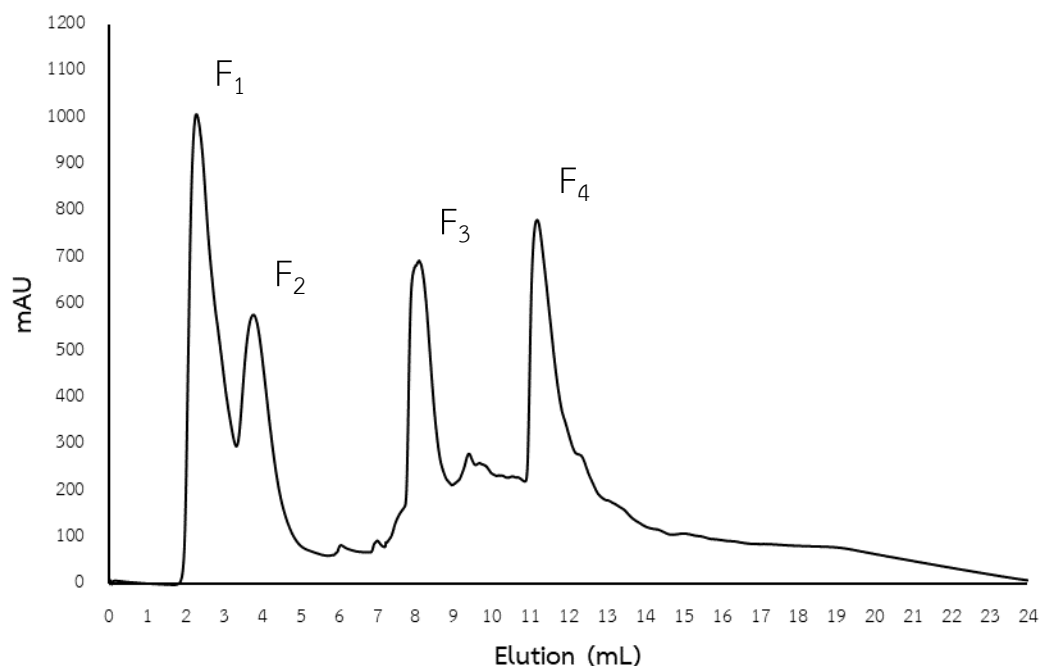
อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

N.D., not detected

5) การทำบริสุทธิ์ไฮโดรไลเซตหยาบ

การทำบริสุทธิ์ไฮโดรไลเซตหยาบด้วยคอลัมน์ Reverse-phase chromatography (RPC) โดยใช้เครื่องแยกสารชีวโมเลกุลโปรตีนให้บริสุทธิ์ (fast protein liquid chromatography : FPLC, AKTA PURE, GE Healthcare, Uppsala, Sweden) ใช้เฟสเคลื่อนที่ A คือ น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูง (ultrapure water: type i) และเฟสเคลื่อนที่ B คือ สารละลายกรดไตรฟลูออโรอะซิติก (TFA) ความเข้มข้น 0.1% (v/v) ในสารละลายอะซิโตไนไตรล์ (acetonitrile : ACN) ความเข้มข้น 30% (v/v) ใช้เวลาในการแยกทั้งหมด 30 นาที ควบคุมอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ที่ความยาวคลื่น 214 นาโนเมตร พบว่า สามารถแยกเปปไทด์ออกมาได้ 4 ส่วน คือ fraction ที่ 1 2 3 และ 4 (ภาพที่ 1) โดยมีอัตราส่วนร้อยละของปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนแต่ละ fraction ที่เก็บเกี่ยวได้เท่ากับ 68.63% (F_1), 22.83% (F_2), 5.89% (F_3) และ 2.64% (F_4) ตามลำดับ

เมื่อนำตัวอย่างเปปไทด์ที่แยกได้ไปทดสอบฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชัน ABTS scavenging activity assay และฤทธิ์ต้านอนุมูลไฮดรอกซิล hydroxyl radical scavenging activity พบว่า fraction ที่ 2 มี ABTS scavenging activity assay สูงที่สุด ($p < 0.05$) ขณะที่ fraction ที่ 1 มี hydroxyl radical scavenging activity สูงที่สุด ($p < 0.05$) (ตารางที่ 5)



ภาพที่ 1 โครมาโทแกรมแสดงการแยกเปปไทด์ด้วย reverse-phase chromatography ของไฮโดรไลเซตจากพลาสมาสุกรที่ย่อยด้วยอะมาโน พี เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ และฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน องไฮโดรไลเซต พลาสมาสุกที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะมาโน พี ที่แยกด้วย reverse-phase chromatography

Fraction	ปริมาณ หมู่อัลฟาอะมิโน (mg/mL)	ปริมาณโปรตีนที่ ละลายได้ (mg/mL)	ABTS scavenging activity assay (mM Trolox equivalent)	Hydroxyl radical scavenging activity (% inhibition)
1	21.31±2.74 ^a	0.55±0.02 ^c	0.15±0.0 ^b	32.09 ± 0.94 ^a
2	7.09±1.14 ^b	1.31±0.06 ^d	0.83±0.05 ^a	18.90 ± 0.65 ^b
3	1.83±0.08 ^c	0.33±0.02 ^a	0.12±0.01 ^b	9.22 ± 0.86 ^c
4	0.82±0.03 ^c	0.46±0.00 ^b	0.18±0.01 ^b	5.73 ± 1.01 ^d

อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

N.D., not detected

6) การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค De novo sequencing

งานวิจัยนี้ได้เลือก fraction 2 และ fraction 4 เพื่อวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค De novo sequencing พบว่า fraction 2 ได้ลำดับเปปไทด์จำนวน 148 เปปไทด์ มี chain length เฉลี่ยจำนวน 7 กรดอะมิโน ขนาดโมเลกุลเฉลี่ย 876.32 Da ขณะที่ fraction 4 ได้ลำดับเปปไทด์จำนวน 1,351 เปปไทด์ มี chain length เฉลี่ยจำนวน 10 กรดอะมิโน ขนาดโมเลกุลเฉลี่ย 1,136.88 Da

จากนั้นได้ใช้เทคนิค silico analysis เพื่อทำนายฤทธิ์ต้านออกซิเดชันโดยวิเคราะห์ใน 2 กลไกการยับยั้งอนุมูลอิสระคือ scavenging และ chelating พบว่า 15 อันดับแรกลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ scavenging และ chelating มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 6 และ 7) ใน fraction 2 เปปไทด์ที่มี scavenging ได้แก่ DCCAWWPACY, SSSGGGGGGYQRSS, KPYPQ, GPAGGPAGRP, EGYSP, VLPY, GDAGENPGHCD, HLPLP, KPCPLPCPGCE, GHVDPKYP, PPACY, MGDPGPS, PCGCP, FPPQ, และ MSPFPK โดยมีค่า predicted scavenging activity ประมาณ 0.45-0.55 จากคะแนนเต็ม 1.00 สูงกว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ chelating พบว่ามีค่า predicted chelating activity ต่ำกว่า (ตารางที่ 6) ในขณะที่ fraction 4 เปปไทด์ที่มี scavenging ได้แก่ PDPKYPPGHVPGP, LVHGPVYC, MNPVDHPHGGWTKPVSM, DTFPHYKPHDDR, VPGPLPGHVP, VGLTCPPPTP, GPGGPGTWKPGREPP, DTFPHYKPHD, SSSEHHLPGHPP, PLTLCPPPTP, LPVCTPLTCPPPTPPK, LPLTCPPPTP, DMHPYEEHVKLVR, PPGLPHVP, และ LPLTCPPPTPK มีค่า predicted scavenging activity ประมาณ 0.6-0.7 ซึ่งโดยรวมสูงกว่าเปปไทด์จาก fraction 2 และเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ chelating มีค่า predicted chelating activity ต่ำกว่าเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ scavenging (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 6 ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงสุด 15 อันดับแรก ด้วยวิธี *in silico* analysis ของ fraction 2

Sequence	Length	Mass (Da)	Intensity	Predicted scavenging activity	Sequence	Length	Mass (Da)	Intensity	Predicted chelating activity
DCCAWWPPACY	11	1485	3.05×10^6	0.598	FPPQ	4	488	N.D.	0.333
SSSGGGGGGYQRSS	14	1243	4.50×10^5	0.591	LPLP	4	439	7.99×10^5	0.326
KPY PQ	5	673	2.91×10^6	0.530	HLPLP	5	576	1.68×10^6	0.325
GPAGGPAGRP	10	835	3.36×10^5	0.516	DEPPAC	6	345	1.22×10^6	0.316
EGYSP	5	551	1.92×10^6	0.515	LPLQ	4	470	1.77×10^6	0.315
VLPY	4	490	1.78×10^6	0.514	EDPPAC	6	688	2.14×10^6	0.311
GDAGENPGHCD	11	1127	1.26×10^6	0.509	LHML	4	257	2.31×10^6	0.306
HLPLP	5	575	1.68×10^6	0.504	EDLPAD	6	659	1.63×10^7	0.304
KPCPLPCPGCE	11	1314	2.48×10^6	0.500	LPPAPEE	7	752	N.D.	0.302
GHVDPKYP	8	911	8.26×10^5	0.499	LVPN	4	442	1.03×10^7	0.301
PPACY	5	606	7.68×10^5	0.497	LDPAP	5	512	3.22×10^6	0.299
MGDPGPS	7	675	3.55×10^5	0.497	ATDDSCPKPELPGK	15	806	8.46×10^6	0.298
PCGCP	5	589	8.75×10^5	0.491	VPFP	4	459	2.47×10^6	0.297
FPPQ	4	487	N.D.	0.483	MSPFPK	6	383	5.05×10^6	0.289
MSPFPK	6	763	5.05×10^6	0.479	LTPPN	5	545	2.74×10^5	0.287

N.D. means not detected.

ตารางที่ 7 ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่มีค่าสูงสุด 15 อันดับแรก ด้วยวิธี *in silico* analysis ของ fraction 4

Sequence	Length	Mass (Da)	Intensity	Predicted scavenging activity	Sequence	Length	Mass (Da)	Intensity	Predicted chelating activity
PPDPKYPPGHVPGP	15	1659	N.D.	0.691	SSSEHHLPGHPP	12	1281	1.61×10^6	0.362
LVHGPHVYC	9	1081	1.79×10^6	0.639	SCPPPPQLP	9	991	1.97×10^8	0.353
MNPVDHPHGGWTKPVSM	17	1905	7.32×10^5	0.622	CSPPPPQLP	9	991	1.97×10^8	0.352
DTFPHYKPHDDR	12	1527	1.51×10^6	0.620	SPPP	4	396	3.63×10^6	0.339
VPGPLPGHVP	10	969	5.83×10^7	0.619	FPPPK	5	584	2.95×10^7	0.336
VGLTCPPPTP	11	1177	1.89×10^8	0.615	ATDATDDSCPKPELPKG	18	1898	4.95×10^8	0.333
GPGGPGTWKPGREPP	15	1489	2.88×10^6	0.610	LPPAP	5	493	1.23×10^8	0.329
DTFPHYKPHD	10	1256	6.15×10^6	0.609	ATDDSMPPKPELPKG	16	1695	6.03×10^6	0.327
SSSEHHLPGHPP	12	1281	1.61×10^6	0.601	QTDATDDSCPKPELPKG	18	1955	9.22×10^6	0.325
PLTLCPPPTP	11	1189	2.14×10^7	0.592	FPPSH	5	583	N.D.	0.324
LPVCTPLTCPPPTPPK	16	1774	5.87×10^6	0.591	ATDDSCPKPELP	13	1426	1.46×10^8	0.323
LPLTCPPPTP	11	1189	2.14×10^7	0.588	CDPPHLP	7	834	4.10×10^7	0.322
DMHPYEEHVKLVR	13	1668	9.85×10^6	0.587	TDDSCPKPELPK	13	1483	8.66×10^7	0.322
PPGLPHVP	8	812	N.D.	0.586	FPLP	4	472	N.D.	0.321
LPLTCPPPTKP	12	1317	2.77×10^7	0.586	DATDDSCPKPELPKG	16	1726	1.55×10^8	0.320

N.D. means not detected.

ส่วนที่ 2 การปรับปรุงฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส

1) การเชื่อมโยงข้ามด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส

งานวิจัยได้ศึกษาการเชื่อมโยงข้ามเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสทางการค้า (microbial transglutaminase จาก Sigma Chemical Co.) โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 10 25 และ 50% ต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร บ่มเป็นระยะเวลา 0 2 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่า ค่าความข้น ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ABTS, scavenging activity assay, metal chelation, และ hydroxyl radical scavenging activity ของตัวอย่างที่เติมเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสทางการค้าไม่มีความแตกต่างกับตัวอย่างควบคุม (ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมา : PPH) (ตารางที่ 8)

จากนั้นจึงได้ทดลองใช้เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสผสม TG-B (Activa® TG-B strong adhesive type, Ajinomoto Co., Japan) ซึ่งมีทรานกลูตามิเนสผสมผสมกับ tri-sodium citrate และเกลืออื่นๆ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1% ต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร บ่มที่ 0 และ 4 ชั่วโมง พบว่า ค่าความข้น ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ABTS, scavenging activity assay, metal chelation, และ hydroxyl radical scavenging activity ของตัวอย่างที่บ่ม 4 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่เวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) (ตารางที่ 9) ทั้งนี้งานวิจัยได้มีตัวอย่างควบคุมโปรตีนเคซีนเพื่อตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสผสม พบว่าค่าความข้นเพิ่มขึ้นและปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนลดลง แสดงให้เห็นถึงการเชื่อมโยงข้ามด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส งานวิจัยนี้จึงพบว่าเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสมีประสิทธิภาพการเชื่อมโยงโปรตีนซึ่งมีโมเลกุลขนาดใหญ่ได้ดี แต่ไม่สามารถเชื่อมโยงเปปไทด์สายสั้นได้

2) การเชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

งานวิจัยได้ศึกษาการเชื่อมโยงเปปไทด์ในไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ด้วยสารประกอบฟีนอลิก ประกอบด้วยกรดกาลิก (gallic acid : GA) และกรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid : CGA) ที่ความเข้มข้น 1 5 และ 10% ของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของไฮโดรไลเซตหยาบ พบว่าการเติม GA และ CGA มีแนวโน้มเพิ่มปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) เช่นเดียวกับโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10) และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนในไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) พบว่า GA และ CGA ไม่มีผลเพิ่มปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ($p \geq 0.05$) ขณะที่ในโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบว่า GA มีผลเพิ่มปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ($p < 0.05$) ขณะที่ CGA มีแนวโน้มลดปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 8 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไฮดรอลิเซตจากโปรตีนปลาสาหร่ายที่เตรียมจากอะมาโน ฟิ ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ระยะเวลา (h)	ค่าความขุ่น	ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (mg/ml)	ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (mg/ml)	ABTS scavenging activity assay (mM Trolox equivalents)	metal chelation (mM EDTA)	Hydroxyl radical scavenging activity (% inhibition)
Control (PPH)	0	0.113±0.00	2.16±0.11	0.65±0.04	0.93±0.01 ¹	0.33±0.01 ²	18.89±1.81 ³
	2	0.142±0.01	1.20±0.03	0.71±0.00	0.76±0.28	0.33±0.01	23.16±2.31
	4	0.194±0.01	1.97±0.01	0.69±0.01	1.11±0.00	0.37±0.07	20.06±0.00
	6	0.235±0.02	2.05±0.04	0.70±0.02	1.21±0.01	0.34±0.01	18.93±1.51
PPH+mTGase (10 : 100)	0	0.125±0.00	1.66±0.42	0.70±0.01	0.95±0.01	0.64±0.00	26.08±2.62
	2	0.160±0.01	1.18±0.01	0.70 ±0.01	0.80±0.02	0.62±0.06	25.86±0.55
	4	0.202±0.01	2.62±0.06	0.70±0.00	1.15±0.02	0.63±0.02	28.30±4.75
	6	0.243±0.01	2.01±0.02	0.75±0.02	1.27±0.01	0.67±0.02	29.19±1.58
PPH+mTGase (25 : 100)	0	0.124±0.01	2.25±0.03	0.72±0.00	0.97±0.02	0.67±0.02	28.28±3.63
	2	0.167±0.01	1.22±0.04	0.74±0.01	0.82±0.12	0.65±0.04	26.25±0.05
	4	0.196±0.02	2.18±0.10	0.74±0.04	1.18±0.05	0.64±0.03	29.53±0.65
	6	0.252±0.02	2.15±0.05	0.77±0.00	1.02±0.09	0.68±0.00	26.56±0.23
PPH+mTGase (50 : 100)	0	0.130±0.02	2.31±0.07	0.77±0.00	1.06±0.02	0.62±0.04	27.14±0.25
	2	0.180±0.02	1.18±0.02	0.76±0.01	0.83±0.02	0.64±0.00	27.53±0.25
	4	0.197±0.01	2.22±0.50	0.72±0.00	0.90±0.02	0.63±0.01	29.22±2.09
	6	0.267±0.04	2.12±0.01	0.76±0.01	1.32±0.02	0.65±0.00	28.07±7.60

PPH หมายถึง ไฮดรอลิเซตจากโปรตีนปลาสาหร่ายที่ย่อยสลายด้วยอะมาโน ฟิ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, ¹ การทดสอบค่า ABTS scavenging activity assay ของสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสที่ 10, 25, และ 50% ของปริมาณโปรตีนใน PPH อยู่ในช่วง 0.07-0.10 mM Trolox equivalents, ² การทดสอบค่า metal chelation ของสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสที่ 10, 25, และ 50% ของปริมาณโปรตีนใน PPH อยู่ในช่วง 0.40-48 mM EDTA, ³ การทดสอบค่า Hydroxyl radical scavenging activity ของสารละลายเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสที่ 10, 25, และ 50% ของปริมาณโปรตีนใน PPH อยู่ในช่วง 7.74-13.39 %inhibition

ตารางที่ 9 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสผสม (TB-B) และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไฮดรอกซิลเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกรที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ระยะเวลา (h)	ค่าความ ขุ่น	ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิ โน (mg leucine)	ปริมาณโปรตีนที่ ละลายน้ำได้ (mg)	ABTS scavenging activity assay (mM Trolox equivalents)	Hydroxyl radical scavenging activity (% inhibition)
PPH	-	0.095±0.09	104.28±1.2	291.5±17.0	1.39±0.03	38.8±1.4
TG-B (1%)	-	0.122±0.12	8.68±1.0	257.5±14.9	0.21±0.01	32.8±2.3
PPH+1% TG- B	0	0.232±0.23	123.08±4.6	450.9±24.9	1.56±0.10	41.7±1.6
	4	0.174±0.17	120.86±5.0	424.6±5.3	1.62±0.05	40.5±0.4
TG-B (3%)	-	0.233±0.23	78.64±3.3	793.4±19.2	0.58±0.07	48.1±4.7
PPH+3% TG- B	0	0.372±0.37	135.87±3.5	1027.9±43.5	1.69±0.05	51.3±2.7
	4	0.271±0.27	151.10±6.0	991.1±60.2	1.77±0.03	41.9±1.0
Casein	-	0.159±0.16	7.44±4.24	402.9±36.3	N.D.	N.D.
TG-B (0.5%)	-	0.048±0.05	3.59±0.66	136.3±3.6	N.D.	N.D.
Casein+3% TG-B	0	0.146±0.15	4.29±0.43	263.5±11.2	N.D.	N.D.
	1	0.528±0.53	2.29±0.50	262.4±2.4	N.D.	N.D.

PPH หมายถึง ไฮดรอกซิลเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกรที่ย่อยสลายด้วยอะมาโน พี เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, TG-B หมายถึง ACTIVA® TG-B STRONG ADHESIVE TYPE, N.D., not determined

ตารางที่ 10 การเชื่อมโยงเปปไทด์ด้วยกรดกาลิกและกรดคลอโรจีนิกและฤทธิ์ต้านออกซิเดชันไฮดรอกซิลจากโปรตีนพลาสมาสุกรที่เตรียมจากอะมาโน พี ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง

ตัวอย่าง	ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (mg/ml)	ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (mg leucine)	ABTS scavenging activity assay (IC ₅₀)	Hydroxyl radical scavenging activity (μg)
ไฮดรอกซิล				
PPH	55.25±3.06 ^b	808.35±17.31	132.21 ^f	3,508.83 ^e
PPH+1%GA	53.55±3.08 ^b	776.54±10.70	6.58 ^d	2,047.29 ^d
PPH+5%GA	52.78±15.32 ^b	779.21±26.31	2.11 ^b	3,777.22 ^f
PPH+10%GA	80.13±4.01 ^a	781.51±13.05	1.71 ^a	3,979.72 ^g
PPH+1%CGA	59.15±1.41 ^b	812.94±19.38	9.81 ^e	1,352.50 ^a
PPH+5%CGA	71.23±1.70 ^a	822.40±48.59	3.48 ^c	1,565.67 ^b
PPH+10%CGA	79.27±4.09 ^a	836.34±41.68	3.35 ^c	1,748.50 ^c
โปรตีนพลาสมา				
PP	59.16±3.78 ^b	72.43±3.97 ^{b,c}	274.58 ^g	323.73 ^d
PP+1%GA	60.08±0.61 ^b	75.79±2.43 ^{b,c}	207.62 ^f	228.88 ^b
PP+5%GA	74.19±1.73 ^a	77.54±3.25 ^b	77.06 ^b	380.95 ^e
PP+10%GA	71.30±5.61 ^a	87.53±1.60 ^a	35.86 ^a	2,527.78 ^g
PP+1%CGA	60.18±1.55 ^b	70.54±4.14 ^{b,c}	191.82 ^e	1,167.44 ^f
PP+5% CGA	77.18±1.89 ^a	69.98±2.02 ^{b,c}	172.51 ^d	249.50 ^c
PP+10% CGA	74.64±2.88 ^a	67.87±2.28 ^c	107.22 ^c	218.74 ^a

อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

PPH หมายถึง ไฮดรอกซิลจากโปรตีนพลาสมาสุกรที่ย่อยสลายด้วยอะมาโน พี เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, GA หมายถึง กรดกาลิก (gallic acid : GA), CGA หมายถึง กรดคลอโรจีนิก (chlorogenic acid : CGA)

เมื่อวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านออกซิเดชันพบว่า การเติม GA และ CGA มีผลเพิ่ม ABTS scavenging activity ทั้งไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 10) โดยตัวอย่าง PPH ที่เติม GA เข้มข้น 1, 5, และ 10% มีค่า IC50 ของ ABTS scavenging activity คือ 6.58, 2.11, และ 1.71 ตามลำดับ ขณะที่ CGA มีค่า IC50 ของ ABTS scavenging activity คือ 9.81, 3.48, และ 3.35 ตามลำดับ ทั้งนี้ IC50 ของ ABTS scavenging activity ในไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) คือ 132.21 ซึ่งแนวโน้มการเพิ่มฤทธิ์ ABTS scavenging activity พบได้ในลักษณะเดียวกับโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP)

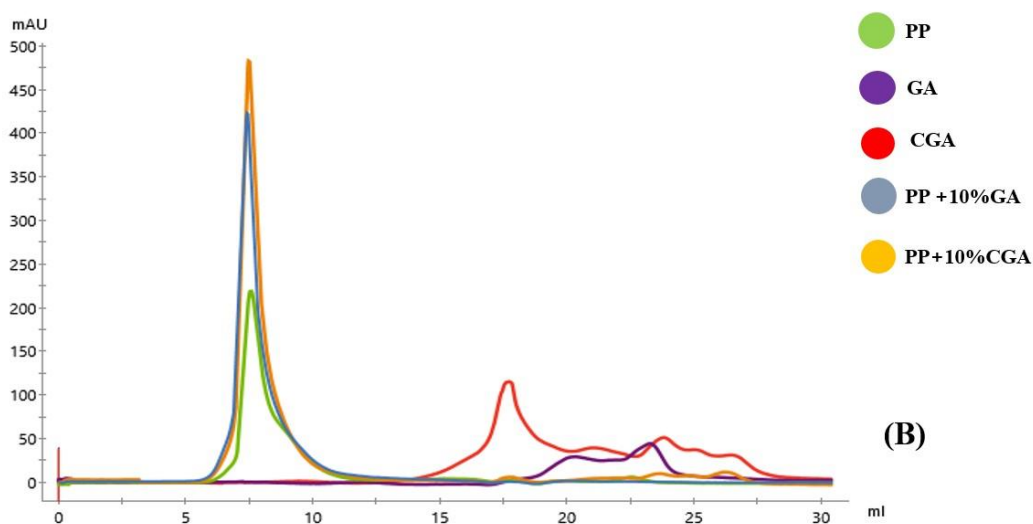
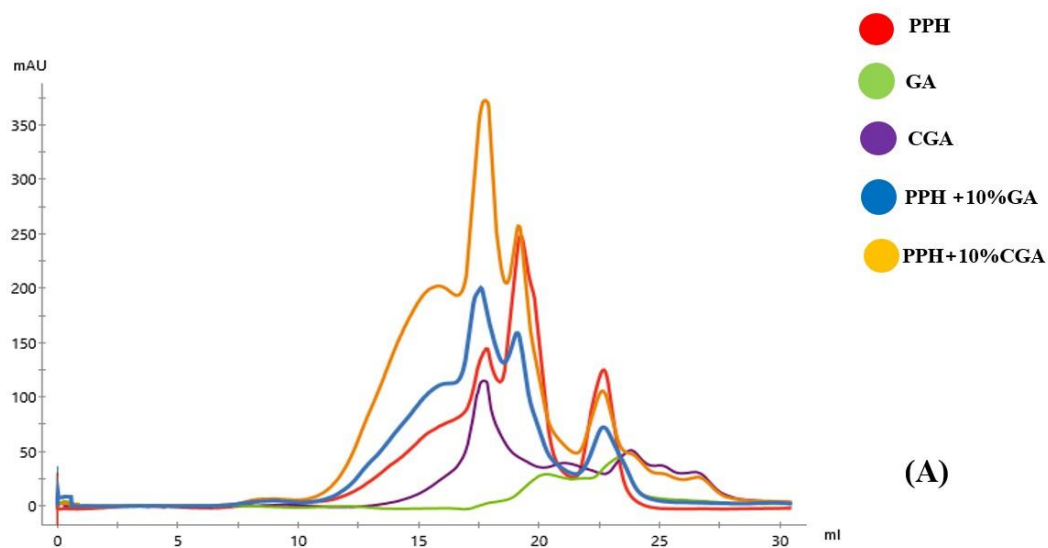
ส่วนฤทธิ์การต้านออกซิเดชัน hydroxyl radical scavenging activity พบว่า 1% 5% และ 10% CGA มีผลต่อการเพิ่มฤทธิ์การต้านออกซิเดชันทั้งในไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ($p < 0.05$) ขณะที่ GA พบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10% เพิ่ม hydroxyl radical scavenging activity ได้ทั้งไฮโดรไลเซตหยาบที่ผลิตจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (PPH หรือ PH) (ตารางที่ 10)

3) โครมาโตแกรม size exclusion chromatography ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรและโปรตีนพลาสมาจากสุกร ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

เนื่องจากศึกษาการเชื่อมโยงไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ด้วยสารประกอบฟีนอลิกไม่สามารถตรวจวัดขนาดโมเลกุลที่สูงขึ้นได้จากการวัดค่าความหนืด เพราะ GA และ CGA ให้สีเข้มที่รบกวนการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร งานวิจัยจึงใช้เทคนิค size exclusion chromatography ที่อาศัยหลักการแยกสารตามขนาดโมเลกุล สารที่มีขนาดโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าจะตรวจวัดได้ก่อน (peak จะปรากฏทางซ้ายมือของโครมาโตแกรม) และสารที่มีขนาดโมเลกุลขนาดเล็กกว่าจะตรวจวัดได้ภายหลัง (peak จะปรากฏทางขวามือของโครมาโตแกรม)

จากการวิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดโมเลกุลในไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) (เส้นสีแดง) (ภาพที่ 2A) พบว่า elution volume ของพีคขนาดใหญ่ปรากฏาที่ที่ 19 ขณะที่ PPH ที่เติม GA (เส้นสีน้ำเงิน) และ CGA (เส้นสีเหลือง) พบพีคขนาดใหญ่ปรากฏาที่ที่ 15 แสดงให้เห็นว่า GA และ CGA สามารถเชื่อมโยงเปปไทด์ในไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ได้

เมื่อพิจารณาการเชื่อมโยงโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ด้วยสารประกอบฟีนอลิกพบว่าโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) (เส้นสีเขียว) และ PP ที่เติม GA (เส้นสีเทา) และ CGA (เส้นสีเหลือง) มี elution volume ที่เท่ากัน แตกต่างกันที่ขนาดของ peak (ภาพที่ 2B)



ภาพที่ 2 โครมาโตแกรมของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก เมื่อวิเคราะห์ด้วย size exclusion chromatography

4) สมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรและโปรตีนพลาสมาจากสุกร ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ ประกอบด้วย การเกิดโฟม อิมัลชัน และเจล ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกรและโปรตีนพลาสมาจากสุกร ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก แสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 สมบัติเชิงหน้าที่ ผิวประจุ ของไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่เตรียมจากอะมาโน พีและโปรตีนพลาสมาสุก ที่เชื่อมโยงด้วยกรดกาลิกและกรดคลอโรเจนิค

ตัวอย่าง	โฟม		อิมัลชัน		
	ความสามารถการเกิดโฟม (%) foaming capacity)	ความคงตัวของโฟม (%) foaming stability)	ความสามารถการเกิดอิมัลชัน (EAI, m ² /g)	และความคงตัวของอิมัลชัน (%ES)	ผิวประจุ (zeta potential, mV)
ไฮดรอลิเซต					
PPH	12.0±5.66 ^b	4.0±0.00 ^c	0.60±0.03 ^c	57.11±7.65 ^d	-25.20±1.19 ^{a,b}
PPH+1%GA	16.0±5.66 ^b	12.0±0.00 ^b	0.52±0.01 ^c	62.82±1.32 ^{c,d}	-24.95±2.14 ^{a,b}
PPH+5%GA	10.0±2.83 ^b	8.0±0.00 ^c	0.47±0.03 ^c	90.61±7.30 ^a	-24.08±1.50 ^a
PPH+10%GA	14.0±2.83 ^b	8.0±0.00 ^c	0.49±0.01 ^c	59.86±0.87 ^{c,d}	-23.93±0.80 ^a
PPH+1%CGA	30.0±2.83 ^a	12.0±0.00 ^b	0.50±0.01 ^c	77.64±3.23 ^{a,b}	-27.53±0.61 ^b
PPH+5%CGA	26.0±2.83 ^a	12.0±0.00 ^a	0.67±0.03 ^a	73.57±6.38 ^{b,c}	-29.50±1.02 ^b
PPH+10%CGA	12.0±0.00 ^b	12.0±0.00 ^a	0.68±0.02 ^a	68.32±1.18 ^{b,c,d}	-28.15±0.53 ^b
โปรตีนพลาสมา					
PP	58.0±2.83 ^a	24.0±5.66	0.95±0.01 ^e	42.28±0.68 ^{b,c}	-23.78±2.43 ^a
PP+1%GA	20.0±0.00 ^b	22.0±2.83	0.98±0.00 ^e	49.07±2.30 ^{a,b}	-28.48±2.64 ^a
PP+5%GA	30.0±2.83 ^b	32.0±11.31	1.21±0.02 ^c	52.91±5.18 ^a	-34.78±0.31 ^{c,d}
PP+10%GA	16.0±0.00 ^b	18.0±8.49	1.84±0.01 ^a	37.88±0.44 ^c	-32.25±0.87 ^{b,c}
PP+1%CGA	22.0±8.49 ^b	20.0±11.31	0.97±0.03 ^e	38.44±1.04 ^c	-31.03±1.76 ^b
PP+5% CGA	18.0±8.49 ^b	20.0±5.66	1.16±0.02 ^d	57.17±6.23 ^a	-35.95±0.70 ^d
PP+10% CGA	32.0±11.31 ^b	22.0±8.49	1.46±0.02 ^b	25.48±1.41 ^d	-35.08±0.58 ^d

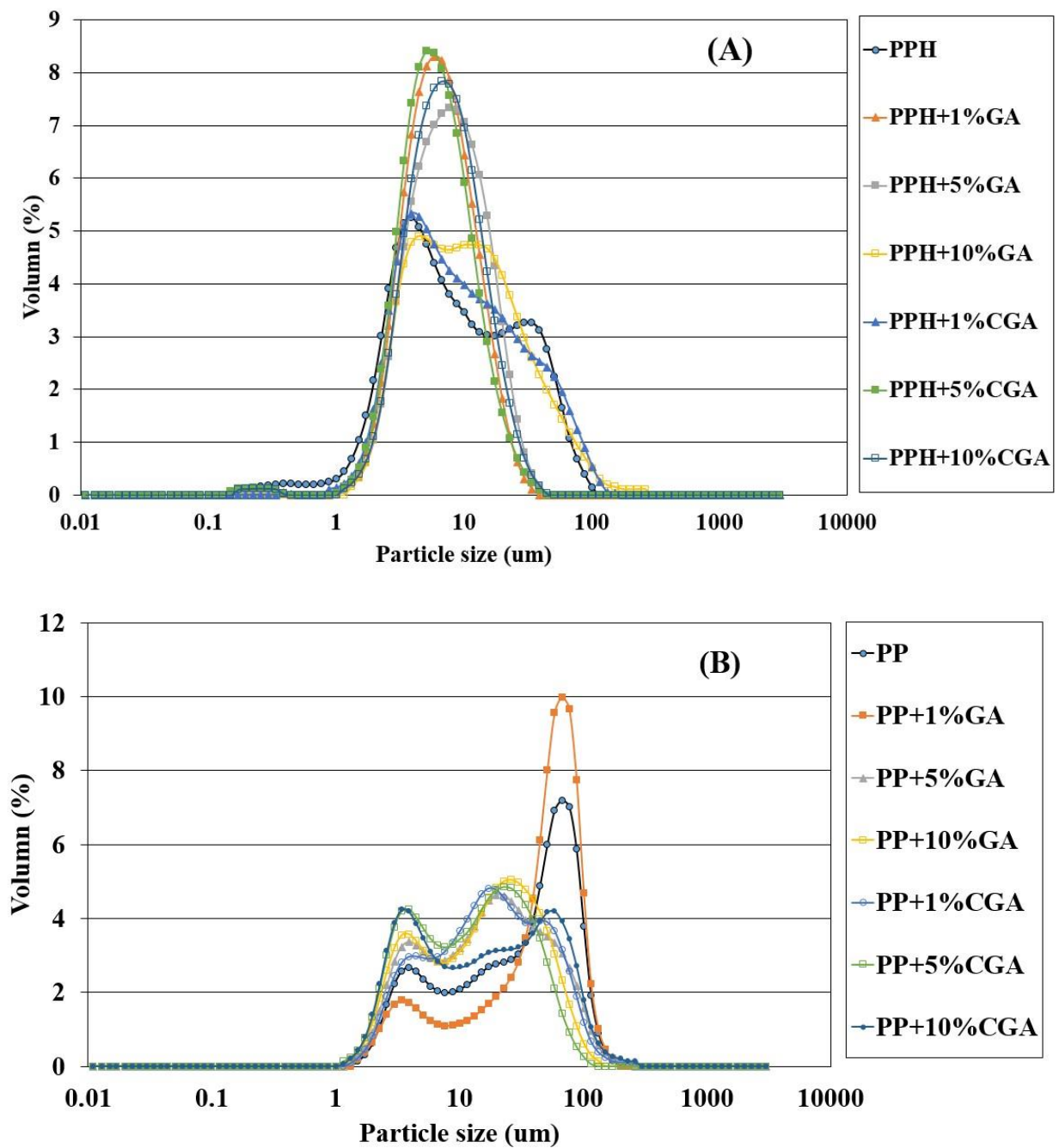
อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05), PPH หมายถึง ไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกที่ย่อยสลายด้วยอะมาโน พี เป็นเวลา 6 ชั่วโมง, GA หมายถึง กรดกาลิก (gallic acid : GA), CGA หมายถึง กรดคลอโรเจนิค (chlorogenic acid : CGA)

4.1) โฟม (foaming) ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) มีความสามารถเกิดโฟมต่ำ (12%) เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) (58%) (ตารางที่ 11) โดย 1% และ 5% CGA มีผลต่อการเพิ่มความสามารถการเกิดโฟมของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ($p < 0.05$) ขณะที่ GA ไม่มีผลใด ๆ ($p \geq 0.05$) ทั้งนี้ GA และ CGA มีผลต่อการเพิ่มความคงตัวของโฟมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ได้เล็กน้อยจาก 4% เป็นประมาณ 8-12% ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) ส่วนผลของ GA และ CGA ต่อความสามารถการเกิดโฟมของโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบว่า GA และ CGA ลดความสามารถในการเกิดโฟมลง ($p < 0.05$) จาก 58% เป็น 16-32% โดยประมาณ แต่ไม่มีผลใด ๆ ต่อความคงตัวของโฟม ($p > 0.05$) (ตารางที่ 11)

4.2) อิมัลชัน (emulsion) ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน ($0.6 \text{ m}^2/\text{g}$) ต่ำกว่าโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ($0.95 \text{ m}^2/\text{g}$) (ตารางที่ 11) โดย 1% GA, 5%GA, 10% GA และ 1% CGA ลดความสามารถการเกิดอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ลง ($p < 0.05$) แต่ 5% CGA และ 10% CGA พบว่ามีผลเพิ่มความสามารถการเกิดอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) เมื่อพิจารณาความคงตัวของอิมัลชันพบว่า GA และ CA ช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ได้ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ผิวประจุ (surface charge) พบว่า CGA มีผลเพิ่มประจุลบของอิมัลชันได้ จากค่า -25 mV ในไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) เมื่อเติม CGA ค่าประจุลบจะเพิ่มขึ้นเป็น -28 ถึง -29 mV (ตารางที่ 11)

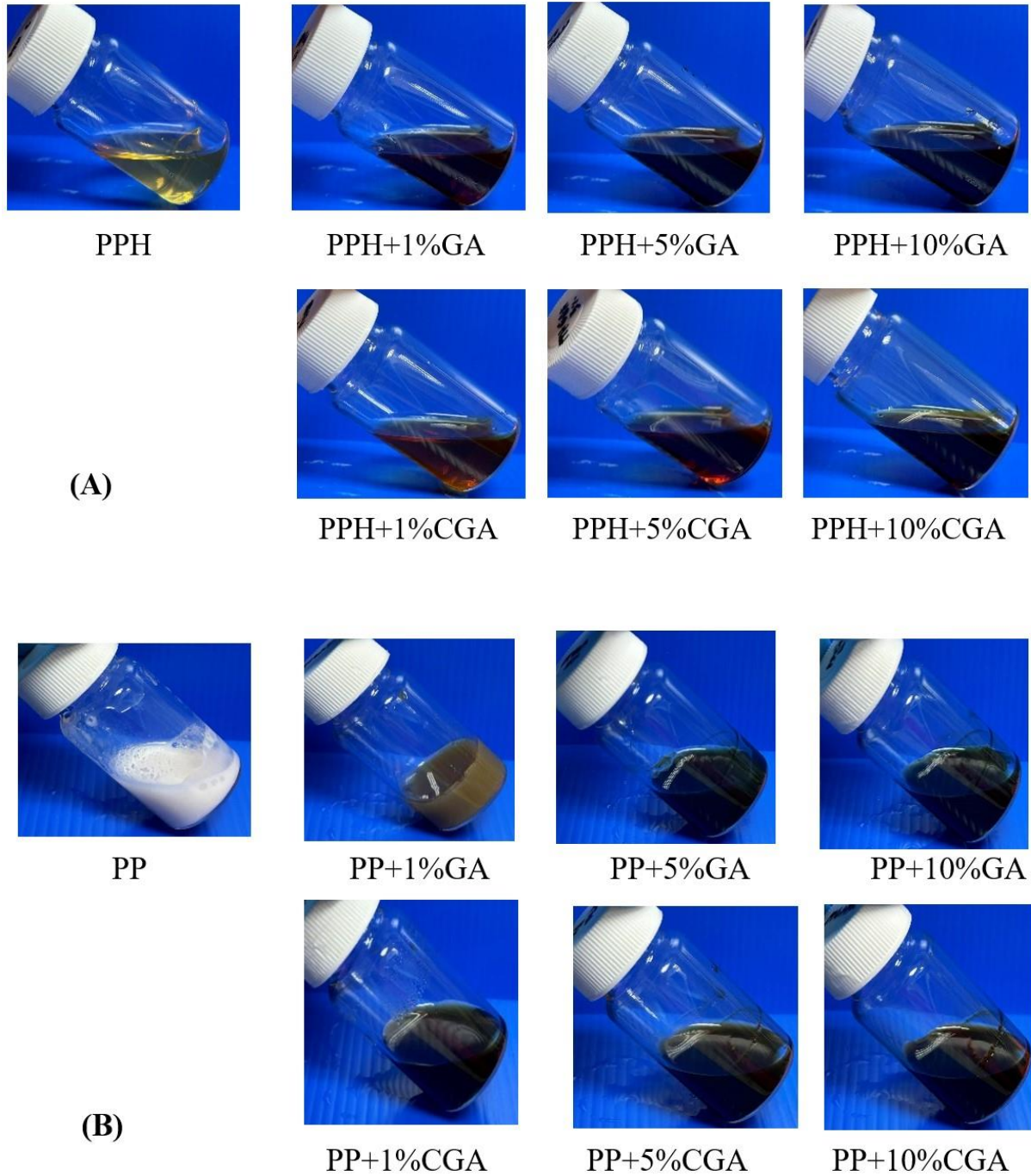
ส่วนผลของสารประกอบฟีนอลิกต่ออิมัลชันของโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบว่า 5%GA, 10%GA, 5%CGA, และ 10%CGA เพิ่มความสามารถการเกิดอิมัลชันได้ ($p < 0.05$) โดยที่ 5% GA และ 5% CGA ช่วยเพิ่มความคงตัวของอิมัลชันได้ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 11) เมื่อพิจารณาผิวประจุ (surface charge) ในระบบอิมัลชันพบว่า GA และ CGA มีผลเพิ่มประจุลบของอิมัลชันได้ จากค่า -24 mV โปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) เมื่อเติม GA และ CGA ค่าประจุลบจะเพิ่มขึ้นเป็น -28 ถึง -36 mV (ตารางที่ 11)

เมื่อนำอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) วิเคราะห์การกระจายตัวของขนาดเม็ดไขมัน (fat droplet) พบว่า ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และ PPH ที่เติม 1% CGA มีขนาดเม็ดไขมันอยู่ในช่วงประมาณ $50\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$ และเมื่อเติม 1% GA, 5% GA, 10% GA, 5% CGA, และ 10% CGA พบว่าขนาดเม็ดไขมันมีแนวโน้มลดลงอยู่ในช่วง $10 \text{ }\mu\text{m}$ (ภาพที่ 3A) ขณะที่อิมัลชันของโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบว่า โปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) และ PP ที่เติม 1% GA มีขนาดเม็ดไขมันอยู่ในช่วง $100 \text{ }\mu\text{m}$ แต่เมื่อเติม 5% GA, 10% GA, 1% CGA, 5% CGA, และ 10% CGA พบว่าขนาดเม็ดไขมันมีแนวโน้มลดลง อยู่ในช่วง $5\text{-}100 \text{ }\mu\text{m}$ (ภาพที่ 3B)



ภาพที่ 3 การกระจายตัวของเม็ดไขมันในอิมัลชันของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

4.3) การเกิดเจล ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และ PPH ที่เติม GA และ CGA ไม่พบลักษณะการเป็นเจล (gel setting) (ภาพที่ 3A) ขณะที่โปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบลักษณะการเป็นเจล (gel setting) ที่เติม 1% GA (ภาพที่ 3B)

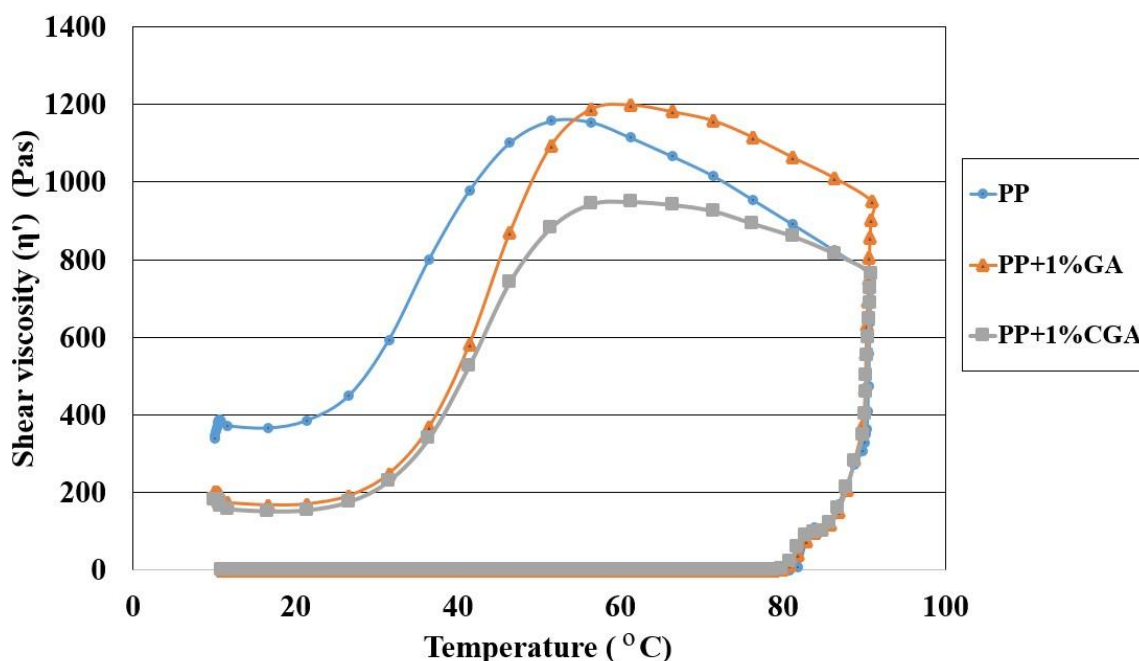


ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเจลของของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (A) และโปรตีนพลาสมาจากสุกร (B) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

5) รีโอโลยีของโปรตีนพลาสมาจากสุกรเชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบฟีนอลิก

เมื่อนำโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ที่เชื่อมโยงข้ามด้วย 1% GA และ 1% CGA วิเคราะห์สมบัติทางรีโอโลยีโดยเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 90 องศาเซลเซียส จากนั้นจึงทำให้เย็นพบว่า โปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) มีค่าความหนืดเฉือน (shear viscosity) เกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำ

กว่า PP ที่เติม 1% GA และ 1% CGA โดยพบที่อุณหภูมิประมาณ 21 องศาเซลเซียส ขณะที่ PP ที่เติม 1% GA และ 1% CGA ตรวจพบที่อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 5) เมื่อเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปเรื่อย ๆ โพรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) พบค่าความหนืดเหนียวสูงสุดที่อุณหภูมิ 51 องศาเซลเซียส ขณะที่ PP ที่เติม 1% GA และ 1% CGA พบที่อุณหภูมิ 61 และ 56 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้ค่าความหนืดเหนียวสูงสุดที่ตรวจสอบมีลำดับดังนี้ $PPH+1\% GA > PPH > PPH+1\% CGA$ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ค่าความหนืดเหนียวของโปรตีนพลาสมาจากสุกรที่เชื่อมโยงข้ามด้วยสารประกอบพีนอลิก

ส่วนที่ 3 การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

1) ค่าสี ค่าเนื้อสัมผัส และการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนของก้อนเลือด

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันเริ่มต้นจากการศึกษาสถานะการผลิตก้อนเลือดจากผงเลือดสุกรที่ทำแห้งด้วยวิธีการแผ่เยือกแข็ง เนื่องจากทางห้องปฏิบัติการไม่สามารถจัดการการนำเลือดสุกรจากโรงฆ่าสัตว์มาผลิตก้อนเลือดได้โดยตรง จึงได้ศึกษาจากการคั้นสภาพผงเลือดสุกรให้เป็นน้ำเลือดที่มีปริมาณโปรตีนเท่ากับน้ำเลือดสุกรสด และศึกษาเปรียบเทียบน้ำเลือดคั้นสภาพ น้ำเลือดคั้นสภาพที่เจือจางด้วยน้ำ 0.5 เท่า และ 1 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที พบว่า น้ำเลือดคั้นสภาพได้น้ำเนื้อสัมผัสที่แข็งแรงใกล้เคียงก้อนเลือดทางการค้าจึงใช้เป็นตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 12 ค่าสี ค่าเนื้อสัมผัส และการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนของก้อนเลือดที่เติมไฮดรอลิเซตจากโปรตีนพลาสมาสุกร สารประกอบฟีนอลิก และทรานกลูตามิเนส

ตัวอย่าง	Color			Texture		Cooking loss (%)
	L*	a*	b*	Gel strength (g)	Deformation (mm)	
Control	44.36±0.68 ^a	7.68±1.27	6.87±1.17 ^{a,b}	9.57±0.64	2.82±0.17 ^{a,b}	33.67±1.24 ^c
1% PPH	40.12±1.43 ^b	9.45±0.88	8.37±0.98 ^a	9.93±0.81	2.69±0.23 ^{a,b}	29.97±0.77 ^a
5% PPH	39.79±0.24 ^b	9.50±0.43	7.61±0.34 ^{a,b}	10.00±0.82	2.50±0.30 ^b	31.55±1.05 ^{a,b}
10% PPH	39.03±0.90 ^b	9.83±2.21	7.62±1.45 ^{a,b}	10.20±0.87	2.79±0.07 ^{a,b}	32.53±1.15 ^{a,b}
1% GA	43.00±1.93 ^a	7.34±1.26	5.84±1.09 ^b	11.00±0.75	2.74±0.11 ^{a,b}	32.35±1.23 ^{a,b}
1% CGA	43.72±1.28 ^a	8.35±1.86	7.86±1.90 ^{a,b}	10.40±6.00	2.83±0.07 ^{a,b}	29.75±0.60 ^a
0.5% TG-K	38.37±1.43 ^b	9.17±0.63	7.29±0.54 ^{a,b}	10.90±1.82	2.86±0.12 ^a	37.48±3.75 ^d

อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของก้อนเลือดที่เติมไฮดรอลิเซตจากโปรตีนปลาสมาสูกร สารประกอบฟีนอลิก และทรานกลูตามิเนส ในระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

	ตัวอย่าง	Initial	Gastric	Intestinal
ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (mg/g sample)	Control	3.29±0.16 ^e	113.89±0.61 ^e	285.29±4.91 ^e
	1% PPH	5.49±0.09 ^c	116.97±0.65 ^d	340.96±1.48 ^c
	5% PPH	6.54±0.07 ^b	123.00±1.04 ^c	345.96±1.09 ^b
	10% PPH	10.32±0.05 ^a	127.43±0.34 ^b	366.04±2.63 ^a
	1% GA	2.41±0.14 ^f	117.94±1.77 ^d	300.60±1.27 ^d
	1% CGA	4.21±0.48 ^d	121.66±1.42 ^c	339.16±1.78 ^c
	0.5% TG-K	3.18±0.07 ^e	133.17±1.36 ^a	363.49±1.14 ^d
ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (mg/g sample)	Control	0.73±0.01 ^e	18.62±0.19 ^e	131.68±0.83 ^a
	1% PPH	2.26±0.06 ^c	18.32±0.11 ^f	65.26±1.42 ^e
	5% PPH	2.68±0.09 ^b	22.94±0.29 ^c	85.26±0.97 ^d
	10% PPH	4.84±0.05 ^a	24.04±0.12 ^a	104.49±0.91 ^b
	1% GA	0.65±0.02 ^e	18.00±0.07 ^g	87.76±0.70 ^c
	1% CGA	0.68±0.04 ^e	21.61±0.14 ^d	83.53±0.56 ^d
	0.5% TG-K	1.38±0.03 ^d	23.46±0.09 ^b	104.36±1.67 ^b

ตารางที่ 13 ต่อ

	ตัวอย่าง	Initial	Gastric	Intestinal
ABTS scavenging activity assay (mM Trolox eq.)	Control	4.50±0.28 ^e	36.21±0.36 ^e	22.85±0.27 ^b
	1% PPH	6.00±0.42 ^d	34.53±0.21 ^f	17.76±0.21 ^f
	5% PPH	9.90±0.36 ^b	37.85±0.83 ^c	21.35±0.27 ^d
	10% PPH	15.86±0.21 ^a	39.03±0.61 ^b	20.54±0.41 ^e
	1% GA	15.54±0.48 ^a	41.21±0.34 ^a	2.73±0.28 ^g
	1% CGA	6.82±0.21 ^c	38.30±0.57 ^{b,c}	31.99±0.59 ^a
	0.5% TG-K	5.68±0.14 ^d	42.25±0.99 ^a	22.08±0.42 ^c
Hydroxyl radical scavenging activity (μg)	Control	4.90±0.06 ^c	28.48±1.76 ^d	13.82±1.03 ^c
	1% PPH	3.46±0.47 ^d	32.83±0.52 ^c	15.82±0.29 ^b
	5% PPH	5.28±0.41 ^c	35.43±1.99 ^a	11.88±0.40 ^d
	10% PPH	8.04±0.53 ^a	33.36±0.37 ^{a,b}	13.53±0.64 ^c
	1% GA	3.46±0.03 ^d	22.03±1.64 ^e	11.20±0.32 ^d
	1% CGA	1.02±0.28 ^e	27.88±0.28 ^d	17.73±1.72 ^a
	0.5% TG-K	6.59±0.73 ^b	33.82±0.85 ^{a,b}	15.78±0.71 ^b

อักษรยกที่แตกต่างกัน แสดงถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในคอลัมน์เดียวกัน (p<0.05)

ตัวอย่าง Control (Enzyme) ที่ไม่มีเลือดและมีเอนไซม์ในระบบการย่อยอาหารจำลอง หลังจากการผ่าน gastric และ intestinal มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (0.90±0.06 mg/ml และ 4.69±0.05 mg/ml ตามลำดับ) ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (not detected และ 1.07±0.03 mg/ml ตามลำดับ) ABTS scavenging activity assay (4.86±0.14 mM trolox eq และ 9.59±0.21 mM trolox eq ตามลำดับ) และ hydroxyl radical scavenging activity (7.74±0.8 0μg และ 7.76±1.35μg ตามลำดับ)

จากการศึกษาพบว่า การเติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH) และ เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K ลงในก้อนเลือดมีผลลดค่าความสว่างของก้อนเลือดลง ($p < 0.05$) ขณะที่ 1% GA และ 1% CGA ไม่มีผลต่อค่าความสว่างของก้อนเลือดสุกร ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 12) การเติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH), GA, CGA, และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K ไม่มีผลต่อค่าความเป็นสีแดง (a^*) ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 12) เช่นเดียวกับค่าความเป็นสีเหลือง (b^*) ที่การเติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH), GA, CGA, และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K มีผลเพียงเล็กน้อย (ตารางที่ 12)

เมื่อวิเคราะห์คุณภาพเนื้อสัมผัสพบว่า การเติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH), GA, CGA, และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K ไม่มีผลต่อความแข็งแรงของเจล (gel strength) ($p > 0.05$) และมีผลต่อการเปลี่ยนรูป (deformation) เพียงเล็กน้อย ($p < 0.05$) (ตารางที่ 12) ทั้งนี้การเติม 1% PPH และ 1% CGA มีส่วนช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนของก้อนเลือดได้ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 12)

2) ฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของก้อนเลือดที่เติมไฮโดรไลเซตจากโปรตีนปลาสุกร สารประกอบฟีนอลิก และทรานกลูตามิเนส เมื่อผ่านระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์ (in vitro gastrointestinal digestion)

งานวิจัยได้นำก้อนเลือดทำการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์เพื่อติดตามฤทธิ์ด้านออกซิเดชันของก้อนเลือดสุกร โดยให้ initial แทนตัวอย่างอาหารก่อนบริโภค gastric แทนตัวอย่างภายหลังจากการย่อยในระบบกระเพาะอาหารจำลอง และ intestinal แทนตัวอย่างภายหลังจากการย่อยในระบบลำไส้เล็กจำลอง พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของก้อนเลือดที่เติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH), GA, CGA, และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K เพิ่มขึ้นในส่วน gastric และ intestinal เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโน (ตารางที่ 13)

เมื่อพิจารณาฤทธิ์ด้านออกซิเดชันพบว่า การเติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนปลาของเลือดสุกร (PPH) มีผลเพิ่ม ABTS scavenging activity ในก้อนเลือด ($p < 0.05$) แต่เมื่อย่อยผ่าน gastric และ intestinal แล้วพบว่า ABTS scavenging activity มีค่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p \geq 0.05$) ขณะที่การเติม 1% GA และ 1% CGA มีผลเพิ่ม ABTS scavenging activity ในก้อนเลือด ($p < 0.05$) เช่นกัน แต่ก้อนเลือดที่เติม 1% CGA พบว่าเมื่อผ่าน gastric และ intestinal มีค่า ABTS scavenging activity สูงกว่าตัวอย่างควบคุม ($p < 0.05$) ทั้งนี้ก้อนเลือดที่เติมเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K พบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่ม ABTS scavenging activity ในก้อนเลือด ($p > 0.05$) (ตารางที่ 13)

ส่วนของฤทธิ์ hydroxyl radical scavenging activity พบว่าก้อนเลือดที่เติม 1% CGA เมื่อผ่าน gastric และ intestinal แล้ว พบว่ามีค่า hydroxyl radical scavenging activity สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

เล็กน้อย ($p < 0.05$) ขณะที่ก้อนเลือดที่เติมไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH), CGA, และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส TG-K พบว่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุม ($p \geq 0.05$) (ตารางที่ 13)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไฮโดรไลเซตหยาบที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่า เอนไซม์อะมานโอ พี (amano P) เป็นชนิดเอนไซม์ที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) โปรตามิกซ์ (protamex) เพปซิน (pepsin) อะมานโอ เอ็ม (amono M) และโปรติเอสหยาบ จากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. 37 เนื่องจากมีปริมาณหมู่อัลฟาอะมิโนและระดับการย่อยสลายสูงที่สุด ($p < 0.05$) และไฮโดรไลเซตหยาบที่ได้มีค่าฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ABTS scavenging activity และ hydroxyl radical scavenging activity สูง ($p < 0.05$) โดยเวลาที่เหมาะสมในการผลิตคือ 6 ชั่วโมง เมื่อทำบริสุทธิ์ไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ด้วยคอลัมน์ reverse-phase chromatography (RPC) พบว่า fraction 2 และ fraction 4 มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูง และเปปไทด์ที่มีค่า predicted scavenging activity ใน fraction 2 คือ DCCAWWPPACY, SSSGGGGGGYQRSS, KPYPQ, GPAGGPAGRP, และ EGYSP และใน fraction 4 คือ PPDPKYPPGHVPGP, LVHGPHVYC, MNPVDHPHGGWTKPVSM, DTFPHYKPHDDR, และ VPGPLPGHVP

การปรับปรุงฤทธิ์ต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร พบว่าเอนไซม์ทรานกลูตามิเนสไม่สามารถเชื่อมโยงเปปไทด์ในไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) ได้ ขณะที่กรดกลูคิก (GA) และกรดคลอโรเจนิก (CGA) ทำให้เปปไทด์ในไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ABTS scavenging activity สูงขึ้น ($p < 0.05$) เมื่อวิเคราะห์การเกิดโฟม อิมัลชัน และเจล พบว่า GA และ CGA ไม่มีผลช่วยให้ความสามารถการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมจากไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) และโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) ให้ดีขึ้น ($p < 0.05$) แต่ช่วยปรับปรุงความสามารถการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชันให้ดีขึ้นได้ ($p < 0.05$) รวมถึงการเติม 1% GA ลงในโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PP) มีส่วนช่วยส่งเสริมการเกิดเจลได้

การพัฒนาผลิตภัณฑ์ต้นแบบก้อนเลือดสุกรที่มีเปปไทด์ออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน พบว่าการเติม 1% PPH และ 1% CGA ช่วยลดการสูญเสียน้ำหนักหลังการให้ความร้อนของก้อนเลือดได้ ($p < 0.05$) และการเติม 1% CGA ทำให้ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ABTS scavenging activity ในก้อนเลือดมีค่าสูงขึ้นเมื่อผ่านระบบย่อยอาหารจำลองของมนุษย์

5.2 ข้อเสนอแนะ

- 1) งานวิจัยควรพัฒนาต่อยอดในระดับการผลิตในระดับกึ่งอุตสาหกรรม (pilot scale)

2) ควรศึกษาเพิ่มเติมในบทบาทด้าน protein functionality เนื่องจากผงไฮโดรไลเซตหยาบจากโปรตีนพลาสมาของเลือดสุกร (PPH) สามารถใช้เป็นสารปรับปรุงคุณภาพของอาหารได้

บรรณานุกรม

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256–1262. <https://doi.org/10.1021/jf60226a042>
- Álvarez, C., Rendueles, M., & Díaz, M. (2012). Production of Porcine Hemoglobin Peptides at Moderate Temperature and Medium Pressure under a Nitrogen Stream. Functional and Antioxidant Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(22), 5636–5643. <https://doi.org/10.1021/jf300400k>
- Álvarez, C., Tiwari, B. K., Rendueles, M., & Díaz, M. (2016). Use of response surface methodology to describe the effect of time and temperature on the production of decoloured, antioxidant and functional peptides from porcine haemoglobin by sub-critical water hydrolysis. *LWT*, 73, 280–289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.024>
- AOAC. (2000). *Official method of analytical chemists* (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
- Bah, C. S. F., Carne, A., McConnell, M. A., Mros, S., & Bekhit, A. E.-D. A. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. *Food Chemistry*, 202, 458–466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.020>
- Benjakul, S., Visessanguan, W., & Srivilai, C. (2001). GEL PROPERTIES OF BIGEYE SNAPPER (PRIACANTHUS TAYENUS) SURIMI AS AFFECTED BY SETTING AND PORCINE PLASMA PROTEINS. *Journal of Food Quality*, 24(5), 453–471. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2001.tb00622.x>
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>
- Bhatt, N., Prasad, R. K., Singh, K., & Panpalia, G. M. (2010). Stability study of O/W emulsions using zeta potential. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 2(1), 512–527.

- Chen, Y., Jiang, S., Chen, Q., Liu, Q., & Kong, B. (2019). Antioxidant activities and emulsifying properties of porcine plasma protein hydrolysates modified by oxidized tannic acid and oxidized chlorogenic acid. *Process Biochemistry*, 79, 105– 113. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.12.026>
- Chinprahast, N., Jantawat, P., & Kristavce, D. (1995). Functional Properties of Vacuum-dried, Freeze-dried and Spray-dried Porcine Blood Plasma. *ASEAN Food Journal*, 10(1), 10–14.
- Dàvila, E., Saguer, E., Toldrà, M., Carretero, C., & Parés, D. (2007). Surface functional properties of blood plasma protein fractions. *European Food Research and Technology*, 226(1–2), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s00217-006-0527-2>
- Decker, E. A., & Welch, B. (1990). Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3) , 674– 677. <https://doi.org/10.1021/jf00093a019>
- Deng, H., Zheng, J., Zhang, F., Wang, Y., & Kan, J. (2014). Isolation of angiotensin I-converting enzyme inhibitor from pepsin hydrolysate of porcine hemoglobin. *European Food Research and Technology*, 239(6), 933–940. <https://doi.org/10.1007/s00217-014-2290-0>
- Dion-Poulin, A., Laroche, M., Doyen, A., & Turgeon, S. L. (2020). Functionality of Cricket and Mealworm Hydrolysates Generated after Pretreatment of Meals with High Hydrostatic Pressures. *Molecules*, 25(22) , 5366. <https://doi.org/10.3390/molecules25225366>
- Dudonné, S., Vitrac, X., Coutière, P., Woillez, M., & Mérillon, J.-M. (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5) , 1768– 1774. <https://doi.org/10.1021/jf803011r>
- Hall, F. G., Jones, O. G., O’Haire, M. E., & Liceaga, A. M. (2017). Functional properties of tropical banded cricket (*Gryllodes sigillatus*) protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 224, 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.138>
- Jin, S.-K., Choi, J.-S., & Kim, G.-D. (2021). Effect of porcine plasma hydrolysate on physicochemical, antioxidant, and antimicrobial properties of emulsion-type pork sausage during cold storage. *Meat Science*, 171, 108293. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2020.108293>

- Lafarga, T., Rai, D. K., O'connor, P., & Hayes, M. (2016). Generation of Bioactive Hydrolysates and Peptides from Bovine Hemoglobin with *In Vitro* Renin, Angiotensin-I-Converting Enzyme and Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitory Activities: GENERATION OF BIOACTIVE HYDROLYSATES AND PEPTIDES. *Journal of Food Biochemistry*, 40(5), 673–685. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12259>
- Li, Q., Fu, Y., Zhang, L., Otte, J., & Lametsch, R. (2020). Plastein from hydrolysates of porcine hemoglobin and meat using Alcalase and papain. *Food Chemistry*, 320, 126654. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126654>
- Liceaga-Gesualdo, A. M., & Li-Chan, E. C. Y. (1999). Functional Properties of Fish Protein Hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 64(6), 1000–1004. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1999.tb12268.x>
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry*, 118(2), 403–410. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.013>
- Lowry, Oliver H., Rosebrough, Nira J., Farr, A. L., & Randall, Rose J. (1951). PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)52451-6)
- Luo, H., Guo, C., Lin, L., Si, Y., Gao, X., Xu, D., Jia, R., & Yang, W. (2020). Combined Use of Rheology, LF-NMR, and MRI for Characterizing the Gel Properties of Hairtail Surimi with Potato Starch. *Food and Bioprocess Technology*, 13(4), 637–647. <https://doi.org/10.1007/s11947-020-02423-y>
- Minekus, M., Alming, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., Carrière, F., Boutrou, R., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Egger, L., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A., ... Brodtkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113–1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Montero Castillo, P. M., Marrugo Ligardo, Y. A., & Julio González, L. C. (2015). Protein Quality of Rice Drinks Fortified with Bovine and Porcine Blood Plasma. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 68(1), 7487–7496. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v68n1.47835>
- Nowak, B., & Von Mueffling, T. (2006). Porcine Blood Cell Concentrates for Food Products: Hygiene, Composition, and Preservation. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2183–2192. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.9.2183>

- Olsen, T. H., Yesiltas, B., Marin, F. I., Pertseva, M., García-Moreno, P. J., Gregersen, S., Overgaard, M. T., Jacobsen, C., Lund, O., Hansen, E. B., & Marcatili, P. (2020). AnOxPePred: Using deep learning for the prediction of antioxidative properties of peptides. *Scientific Reports*, 10(1), 21471. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78319-w>
- Parés, D., Saguer, E., Saurina, J., Suñol, J. J., & Carretero, C. (2006). Functional Properties of Heat Induced Gels from Liquid and Spray-Dried Porcine Blood Plasma as Influenced by pH. *Journal of Food Science*, 63(6), 958–961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15832.x>
- Ramos-Clamont, G., Fernandez-Michel, S., Carrillo-Vargas, L., Martinez-Calderon, E., & Vazquez-Moreno, L. (2003). Functional Properties of Protein Fractions Isolated from Porcine Blood. *Journal of Food Science*, 68(4) , 1196– 1200. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb09624.x>
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9– 10) , 1231– 1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Saguer, E., Fort, N., Parés, D., Toldrà, M., & Carretero, C. (2007). Improvement of gelling properties of porcine blood plasma using microbial transglutaminase. *Food Chemistry*, 101(1), 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.050>
- Sakanaka, S., & Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95(2), 243–249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.11.056>
- Seo, H.-W., Jung, E.-Y., Go, G., Kim, G.-D., Joo, S.-T., & Yang, H.-S. (2015). Optimization of hydrolysis conditions for bovine plasma protein using response surface methodology. *Food Chemistry*, 185, 106– 111. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.03.133>
- Silva, V. D. M., & Silvestre, M. P. C. (2003). Functional properties of bovine blood plasma intended for use as a functional ingredient in human food. *LWT - Food Science and Technology*, 36(7), 709–718. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(03\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(03)00092-6)
- Song, N., Tan, C., Huang, M., Liu, P., Eric, K., Zhang, X., Xia, S., & Jia, C. (2013). Transglutaminase cross-linking effect on sensory characteristics and antioxidant

- activities of Maillard reaction products from soybean protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 136(1), 144–151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.100>
- Sorapukdee, S., & Narunatsopanon, S. (2017). Comparative Study on Compositions and Functional Properties of Porcine, Chicken and Duck Blood. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2) , 228– 241. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.228>
- Stone, A. K., Tanaka, T., & Nickerson, M. T. (2019). Protein quality and physicochemical properties of commercial cricket and mealworm powders. *Journal of Food Science and Technology*, 56(7), 3355–3363. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03818-2>
- Sun, Q., & Luo, Y. (2011). Porcine Hemoglobin Hydrolysate Prepared with Pepsin: Antioxidant Activities and Their Mechanisms. *International Journal of Food Properties*, 14(4), 840–853. <https://doi.org/10.1080/10942910903453405>
- Sun, Q., Luo, Y., Shen, H., & Hu, X. (2011). EFFECTS OF pH, TEMPERATURE AND ENZYME TO SUBSTRATE RATIO ON THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PORCINE HEMOGLOBIN HYDROLYSATE PREPARED WITH PEPSIN: ANTIOXIDANT ACTIVITY OF HEMOGLOBIN HYDROLYSATE. *Journal of Food Biochemistry*, 35(1) , 44– 61. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.2010.00365.x>
- Sun, Q., Luo, Y., Shen, H., Li, X., & Yao, L. (2012). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide from porcine haemoglobin hydrolysate: A novel antioxidant peptide from porcine haemoglobin hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(1) , 148– 154. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02820.x>
- Sun, Q., Shen, H., & Luo, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 53–60. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0>
- Tarté, R. (2011). Meat protein ingredients. In *Handbook of Food Proteins* (pp. 56–91). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857093639.56>
- Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P., & Mehta, N. (2018). Effects of inclusion of porcine blood hydrolysate on physico-chemical quality, oxidative and microbial stability of pork batter stored at (4 ± 1 °C). *Journal of Food Science and Technology*, 55(12), 4758–4769. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3409-2>

- Verma, A. K., Chatli, M. K., Kumar, P., & Mehta, N. (2019). Antioxidant and Antimicrobial Efficacy of Peptidic Hydrolysate Obtained from Porcine Blood. *Agricultural Research*, 8(1), 116–124. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0350-6>
- Visessanguan, W., Benjakul, S., & An, H. (2000). Porcine Plasma Proteins as a Surimi Protease Inhibitor: Effects on Actomyosin Gelation. *Journal of Food Science*, 65(4), 607–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb16058.x>
- Wang, F.-S., & Lin, C.-W. (1994). Molecular Forces Involved in Heat-Induced Porcine Blood Curd. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(5) , 1085– 1088. <https://doi.org/10.1021/jf00041a007>
- Wang, P., Xu, X., Huang, M., Huang, M., & Zhou, G. (2014). Effect of pH on heat-induced gelation of duck blood plasma protein. *Food Hydrocolloids*, 35, 324– 331. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.015>
- Yang, J., Huang, J., Dong, X., Zhang, Y., Zhou, X., Huang, M., & Zhou, G. (2020). Purification and identification of antioxidant peptides from duck plasma proteins. *Food Chemistry*, 319, 126534. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126534>
- Yang, J., Huang, J., Zhu, Z., & Huang, M. (2020). Investigation of optimal conditions for production of antioxidant peptides from duck blood plasma: Response surface methodology. *Poultry Science*, 99(12) , 7159– 7168. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.060>
- Yoshihara, Y., & Yokoyama, S. (2021). Effects of soybean curd residue and rice bran on lamb performance, health, and meat quality. *Veterinary and Animal Science*, 11, 100166. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100166>
- Zheng, Z., Si, D., Ahmad, B., Li, Z., & Zhang, R. (2018). A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate. *Food Research International*, 106, 410– 419. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.12.078>
- Zheng, Z., Wei, X., Shang, T., Huang, Y., Hu, C., & Zhang, R. (2018). Bioconversion of duck blood cell: Process optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *BMC Biotechnology*, 18(1), 67. <https://doi.org/10.1186/s12896-018-0475-5>
- Zou, Y., Yang, H., Li, P. P., Zhang, M. H., Zhang, X. X., Xu, W. M., & Wang, D. Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. *Poultry Science*, 98(4), 1925– 1933. <https://doi.org/10.3382/ps/pey502>

สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. (2565). สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญและแนวโน้มปี 2565. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ .
<https://www.oae.go.th/assets/portals/1/files/journal/2565/231225652566.pdf>