2

การสกัดและสมบัติของเจลาตินจากเท้าไก่

Extraction and Properties of Gelatin from Chicken Feet

ฝาตีมัะ กรมเมือง

Fateemah Grommuang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Food Technology

Prince of Songkla University

2550

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

หอสมุดกลาง QP801.G45 ฝ63 2550 ฉ. 2
Bib Key 300845
10 มิ.ย. 2550

ชื่อวิทยานิพนธ์	การสกัดและสมบัติของเจลาตินจากเท้าไก่
ผู้เขียน	นางสาวฝาตีมีะ กรมเมือง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.มณี วิทยานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล)

.....กรรมการ

(ดร.มณี วิทยานนท์)

.....กรรมการ

(ดร.ถาวร จันทโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การสกัดและสมบัติของเจลาตินจากเท้าไก่
ผู้เขียน	นางสาวฝาตีมีะ กรมเมือง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

เท้าไก่ประกอบด้วยโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีน ร้อยละ 57.81 และ 5.53 เมื่อนำไปบดและล้างด้วยน้ำเย็นพบว่ามีปริมาณโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 70.81 และ 9.58 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การศึกษาประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนออกจากเท้าไก่บดด้วยการล้างด้วยสารละลาย 5 ชนิด เป็นเวลา 1-7 ชั่วโมง พบว่าการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง มีผลชะล้างไนโตรเจนและไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างมากที่สุด และมีการพองตัวสูงที่สุด จึงถูกเลือกใช้เป็นวิธีการล้างและทำให้พองตัวด้วยด่างไปพร้อมกัน ในขณะที่การล้างด้วยสารละลายผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ร่วมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตร้อยละ 0.3 และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถล้างไนโตรเจนมากที่สุดแต่สูญเสียไฮดรอคซี่โพรลีนน้อยที่สุด ดังนั้นจึงใช้สภาวะดังกล่าวเตรียมตัวอย่างเพื่อนำไปทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้พองตัวโดยใช้กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้นร้อยละ 1-5 เวลา 5-48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส โดยใช้วิธีการพื้นผิวตอบสนอง ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้พองตัวด้วยกรด คือ แช่กรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.14 เป็นเวลา 47 ชั่วโมง 54 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เมื่อนำเท้าไก่บดที่ผ่านการเตรียมทั้ง 2 วิธี คือ (1) ล้างและพองตัวด้วยด่าง (0.5 M NaOH) เป็นเวลา 5 ชั่วโมงและ (2) ล้างด้วย 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH และทำให้พองตัวด้วยกรด (ฟอสฟอริกร้อยละ 2.14 เป็นเวลา 47 ชั่วโมง 54 นาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) ไปศึกษาผลของอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) และเวลา (3-12 ชั่วโมง) ในการสกัดต่อสมบัติของเจลาติน พบว่าเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนสูงขึ้นแต่ความแข็งแรงเจลของเจลาตินที่สกัดได้มีค่าต่ำลง นอกจากนี้ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยใช้เทคนิคอิเลคโตรโฟลิซิส แสดงให้เห็นว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-12 ชั่วโมงไม่มีผลตัดย่อยเปปไทด์สายหลักแอลฟา เบต้าและแกมม่าในเจลาติน ส่วนการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสมีผลตัดย่อยเปปไทด์ส่วนเบต้าของ

เจลาตินในตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด และมีผลตัดย่อยทั้งส่วนเบต้าและแกมม่าของตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างเมื่อใช้เวลาในการสกัดสูงกว่า 7 ชั่วโมง เมื่อเลือกสภาวะในการสกัด 2 สภาวะคือสภาวะที่ให้เจลาตินที่มีค่าความแข็งแรงเจลเท่ากับเจลาตินทางการค้า กับสภาวะที่ให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งได้แก่การสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง กับที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมงตามลำดับ ไปใช้ในการสกัดเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดหรือด่างแล้วทำแห้ง และศึกษาองค์ประกอบและสมบัติเปรียบเทียบกับเจลาตินจากสุกรและโค พบว่าเจลาตินจากเท้าไก่มีปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมันและเถ้า (ร้อยละ 94.81-96 10.51-13.98 0.18-0.65 และ 0.33-1.96 ตามลำดับ) ในช่วงมาตรฐานผลิตภัณฑ์เจลาตินสำหรับใช้เป็นอาหารทางการค้า เจลาตินจากตัวอย่างทั้งที่เตรียมด้วยกรดและด่างที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีค่าความแข็งแรงเจลและมีความหนืดสูงกว่าเจลาตินที่สกัดที่ 80 องศาเซลเซียสและเจลาตินทางการค้า โดยเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดมีความแข็งแรงเจลสูงกว่า แต่มีความหนืดต่ำกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง แต่เจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดมีความแข็งแรงเจลและความหนืดต่ำกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างเมื่อสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส เจลาตินจากเท้าไก่มีความใสต่ำกว่าเจลาตินทางการค้า โดยเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดใสกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง เจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้จากการทดลองนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้ทดแทนเจลาตินในทางการค้าจากสุกรหรือโคได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์ที่ไม่เข้มงวดเกี่ยวกับความใส

Thesis Title	Extraction and properties of gelatin from chicken feet
Author	Miss Fateemah Grommuang
Major Program	Food Technology
Academic Year	2007

Abstract

The protein and hydroxyproline contents of raw chicken feet were 57.81 and 5.53% on dry weight basis, respectively. After grinding and washing, protein and hydroxyproline contents of chicken feet increased to 70.81 and 9.58% respectively. The effectiveness of non collagenous protein removal from raw material using 5 different mixed solutions for 1-7 h was investigated. The results showed that washing with 0.5MNaOH solution removed highest content of nitrogen and hydroxyproline from sample and caused highest swelling percentage. Therefore it was selected as simultaneous washing and swelling process for alkali pretreat method. Meanwhile washing with 0.6MKCl+0.3%STP+0.05MNaOH for 3h resulted in maximum nitrogen removal but minimum hydroxyproline loss. The washed sample was then used for further study in acid pretreat condition (soaking in 1-5% phosphoric acid for 6-48h at 10-30°C) using Response Surface Methodology (RSM). As the result, soaking with 2.14% phosphoric acid for 47h 54 min at 20°C was selected as an optimum condition for acid pretreat method.

The alkali and acid pretreated samples were used to study the effects of extracting temperature (60-80 °C) and time (3-12h) on properties of the extracted gelatin. Results showed that increasing in extracting time and temperature improved the yield but lowered gel strength of the gelatin. The SDS-PAGE petterns indicated that extracting at 60-70 °C for 3-12h did not cause hydrolysis of the major peptide components (α, β, γ) of the obtained gelatin. When extracting temperature increased over 70 °C for more than 7h, β and γ components of gelatin from alkali pretreated sample were hydrolysed while only β component of gelatin from acid pretreated sample was hydrolyzed. From the results, 70°C/5h and 80 °C /12h were chosen as conditions for extracting chicken feet gelatins based on giving the equal gel strength to those of commercial gelatin and highest yield, respectively. The gelatin extracts from both pretreated samples were dried and analysed for their composition and properties in comparison with

commercial pig and beef gelatins. The protein, moisture, fat and ash contents of chicken feet gelatin were confined to the range defined for commercial food grade gelatin. The gel strength and viscosity of gelatin extracted at 70 °C were higher than those of gelatin extracted at 80 °C and commercial gelatin samples. Extracted at 70°C, gelatin from acid pretreated sample had higher gel strength but lower viscosity than those of gelatin from alkali pretreated sample. When extracted at 80°C, gelatin from acid pretreated sample showed lower gel strength and viscosity than those of gelatin from alkali pretreated sample. The clarity of gelatin from acid pretreated sample was higher than that of gelatin from alkali pretreated sample. However gelatin from both pretreatment methods had lower clarity than commercial gelatins indicating a need for additional clearification process.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาของคณาจารย์ บุคคลต่างๆ และความอนุเคราะห์จากหน่วยงาน ดังต่อไปนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ คือ ดร.มณี วิทยานนท์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ ในการทำวิจัยและค้นคว้าและการเขียน รวมทั้งตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ดร. ณวรา จันทรัตน์ ดร. สุนิสา ศิริพงศ์วุฒิกร และดร.ปิยรัตน์ ศิริวงศ์ไพศาล ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านสถิติและเป็นกำลังใจมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สุทธวัฒน์ เบญจกุล ประธานกรรมการสอบ และ ดร. ถาวร จันทโชติ กรรมการสอบ ที่กรุณาตรวจทานวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย และคณะอุตสาหกรรมเกษตร ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้ รวมถึงคณาจารย์ที่อบรมสั่งสอนและให้ความรู้ตั้งแต่เริ่มการศึกษาจนกระทั่งประสบความสำเร็จ ณ วันนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสิ่งที่ดีที่สุดในชีวิต คือ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาวที่สนับสนุนในทุกๆ ด้าน และเป็นกำลังใจมาโดยตลอด รวมทั้งพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ฝาตีมีะ กรมเมือง

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพ	(13)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
1. คอลลาเจน	2
1.1 ลักษณะของคอลลาเจน	2
1.2 ชนิดของคอลลาเจน	4
1.3 องค์ประกอบอะมิโนของโมเลกุลคอลลาเจน	6
2. เจลาติน	7
2.1 ลักษณะของเจลาติน	7
2.2 ชนิดของเจลาติน	7
2.3 องค์ประกอบอะมิโนของเจลาติน	8
2.4 คุณสมบัติทั่วไปของเจลาติน	11
2.5 การผลิตเจลาติน	16
2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่คอลลาเจน	19
2.7 การผลิตและคุณสมบัติของเจลาตินจากแหล่งอื่นๆ	21
วัตถุประสงค์	24
บทที่ 2 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	25
วัสดุ	25
อุปกรณ์	26
วิธีการทดลอง	27
1. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ	27
2. การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลายแตกต่างกัน	27

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้กรดต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาติน โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)	28
4. การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดเจลาตินด้วยน้ำต่อผลผลิตและสมบัติที่สำคัญของเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้	31
5. การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้า	32
6. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ	32
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	33
1. ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลาย แตกต่างกัน	33
2. สภาวะที่เหมาะสมของการใช้กรดต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาติน โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)	40
3. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดเจลาตินต่อผลผลิตและสมบัติที่สำคัญ ของเจลาติน	43
4. ผลผลิตและสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้า	49
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ	58
เอกสารอ้างอิง	59
ภาคผนวก	64
ประวัติผู้เขียน	101

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	ชนิดและแหล่งของคอลลาเจน	5
1-2	องค์ประกอบกรดอะมิโนของเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก	10
1-3	คุณลักษณะทางเคมีของเจลาตินตามข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม	15
2-1	แผนการทดลองสำหรับการทำให้พองตัวด้วยกรดโดยใช้ Central Composite Design (CCD)	30
3-1	องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่ก่อนและหลังการล้าง	34
3-2	พีเอชของสารละลายที่ใช้ในการล้างเท้าไก่บด	38
3-3	ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจและผลการทดสอบทางสถิติของสมการจำลองและความบกพร่องของสมการจำลอง	41
3-4	สมการจำลองสำหรับขั้นตอนการทำให้พองตัวในการสกัดเจลาตินจากเท้าไก่	41
3-5	เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและร้อยละการพองตัวของตัวอย่างเท้าไก่ที่ผ่านการทดลองแช่ที่สภาวะที่เลือกแล้วและที่ได้จากการทำนายโดยสมการจำลอง	42
3-6	ปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง หรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง	49
3-7	องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B)โดยสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)	51
3-8	พีเอชของสารละลายเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)	52

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
3-9	ค่าความใสของสารละลายเจลาตินจากตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)	57
ตารางภาคผนวกที่		
ง1	ความแปรปรวนสำหรับสมการกำลังสองของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้	80
ง2	ความแปรปรวนสำหรับสมการกำลังสองของค่าการพองตัวของเท้าไก่บด	81
จ1	ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อปริมาณไนโตรเจนที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	85
จ2	ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อปริมาณไฮดรอคซี่-โพรลีน ที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	86
จ3	ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อการพองตัวในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	88
จ4	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	90
จ5	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	92
จ6	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส)ในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง	94
จ7	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส)ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง	95

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่		หน้า
จ8	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	97
จ9	ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อ ความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง	99

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	ลักษณะโครงสร้างเกลียว 3 สายของโทรโพคอลลาเจน	3
1-2	ภาพอธิบายลักษณะการจัดเรียงตัวโครงสร้างที่ทับซ้อนกันของเส้นใยคอลลาเจน ซึ่งมีผลให้เกิดลักษณะแถบให้เห็นโดยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน	3
1-3	การเกิดครอสลิงค์ในคอลลาเจนโดยหมู่ข้างเคียงของโซ่	4
1-4	องค์ประกอบกรดอะมิโนและสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเป็นกรดมีหมู่ไฮดรอคซี่ มีขั้วและไม่มีขั้วของคอลลาเจน Type I $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	6
1-5	การเปลี่ยนแปลงจากคอลลาเจนเป็นเจลาติน	8
1-6	ความสัมพันธ์ระหว่างความแข็งแรงเจลกับเวลา	11
3-1	ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ) คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	36
3-2	ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน (ร้อยละ) คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	37
3-3	การพองตัว (ร้อยละ) ของตัวอย่างเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลาย 5 ชนิดที่แตกต่างกันที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	39
3-4	ผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) และด่าง (B) แล้วสกัดที่อุณหภูมิ60-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-12 ชั่วโมง	44
3-5	ผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) และด่าง (B) แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-12 ชั่วโมง	45
3-6	ความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) (ที่ความเข้มข้นโปรตีน 160 mg/ml พีเอช 4.8) หรือด่าง (B) (ที่ความเข้มข้นโปรตีน 200 mg/ml พีเอช 7.0) และสกัดที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เวลา 3-12 ชั่วโมง	47
3-7	รูปแบบเปปไทด์ของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด(A) หรือด่าง (B) แล้วสกัดที่ 60- 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3-12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับคอลลาเจน Type I จากเท้าไก่และโปรตีนมาตรฐาน	48

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-8	ความแข็งแรงเจลและความหนืดของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวโดยการแช่กรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบ กับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)	54
3-9	รูปแบบเปปไทด์ของเจลาตินจากเท้าไก่และเจลาตินทางการค้าเปรียบเทียบกับคอลลาเจน Type I จากเท้าไก่และโปรตีนมาตรฐาน	56
ภาพภาคผนวกที่		
ก5	กราฟมาตรฐานไฮดรอคซี่โพรลีน	72
ก6	กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)	73
ง1	แผนภาพคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกและเวลาในการแช่ต่อปริมาณโปรตีนของเท้าไก่บดที่สกัดได้โดยมีอุณหภูมิเป็นตัวแปรคงที่ที่ 20 องศาเซลเซียส	82
ง2	แผนภาพคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกและเวลาในการแช่ต่อร้อยละการพองตัวของเท้าไก่บดโดยมีอุณหภูมิเป็นตัวแปรคงที่ที่ 20 องศาเซลเซียส	83
ง3	สภาวะที่เหมาะสมจากการซ้อนทับรูปแผนภาพคอนทัวร์ภาพที่ภาคผนวก ง 1 และ ง2 โดยบริเวณที่แรเงาแสดงสภาวะที่มีปริมาณโปรตีนและค่าการพองตัวมากกว่า 40 กรัมและร้อยละ 290 ตามลำดับ	84
จ2	อิทธิพลร่วมของเวลากับชนิดของสารละลายต่อปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	87
จ3	อิทธิพลร่วมของเวลากับชนิดของสารละลายต่อปริมาณการพองตัวในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง	89
จ4	อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียสในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	91
จ5	อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิต ไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	93

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพภาคผนวกที่		หน้า
จ7	อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง	96
จ8	อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด	98
จ9	อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง	100

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

เท้าไก่เป็นวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปไก่ ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนประมาณร้อยละ 9.07 (Liu *et al.*, 2001) จากข้อมูลสถิติแสดงแนวโน้มการเพิ่มปริมาณการส่งออกเนื้อไก่สดแช่แข็งในช่วงปีพุทธศักราช 2544-2546 จาก 296,425.35 เป็น 331,044.81 ตัน และถึงแม้ว่าการแพร่ระบาดของโรคไข้หวัดนกมีผลให้ปริมาณการส่งออกไก่สดแช่แข็งในปีพุทธศักราช 2547 และ 2548 ลดลง แต่การส่งออกเนื้อไก่สุกยังคงมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจาก 116,650.47 ตันเป็น 263,418.95 ตัน (กรมปศุสัตว์, 2549) แสดงว่าปริมาณวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปไก่ยังคงมีเพิ่มขึ้น เจลาตินเป็นผลิตภัณฑ์จากโปรตีนคอลลาเจนที่ถูกย่อยสลาย (hydrolysis) บางส่วน ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเภสัชกรรม อุตสาหกรรมถ่ายภาพและอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Kolodziejska *et al.*, 2004) โดยทั่วไปเจลาตินผลิตจากหนังและกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น สุกรและโค แต่เนื่องจากปัญหาการแพร่ระบาดของโรควัวบ้า มีผลทำให้ผู้บริโภคปฏิเสธผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องสำอางที่ใช้เจลาตินจากโคเป็นส่วนประกอบ ส่วนเจลาตินจากสุกรเป็นข้อจำกัดทางศาสนาของชนชาติที่ไม่ยอมรับในการบริโภคสุกร ดังนั้นเท้าไก่ซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมสัตว์ปีกจึงเป็นแหล่งเจลาตินทางเลือกที่สำคัญสำหรับอุตสาหกรรมที่ต้องใช้เจลาตินเป็นส่วนประกอบ

การผลิตเจลาตินในทางการค้าโดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนหลัก คือ การเตรียมวัตถุดิบให้มีคอลลาเจนมากที่สุดโดยการกำจัดองค์ประกอบอื่นๆออกไปและการทำให้คอลลาเจนพองตัว การสกัดด้วยน้ำ การทำให้บริสุทธิ์และการทำแห้ง วิธีที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียมขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบ ซึ่งโดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 วิธี คือการเตรียมตัวอย่างด้วยกรดกับการเตรียมตัวอย่างด้วยด่าง กรดมักใช้ในการเตรียมหนังหมูและกระดูกที่ผ่านการกำจัดไขมันและแร่ธาตุแล้ว ส่วนด่างมักใช้กับหนังโค จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมทั้งสองวิธีมาสกัดที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆขึ้นกับอุณหภูมิในการหดตัว (Shrinkage temperature) ของวัตถุดิบนั้นๆ เจลาตินที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด เรียกว่า Type A มีค่า pI ประมาณ 7.5-9 และเจลาตินที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างด้วยด่างเรียกว่า Type B มีค่า pI ประมาณ 4.8-5 (Jones, 1977) เมื่อ Lim และคณะ (2001) ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้พองตัวด้วยด่างต่อสมบัติของเจลาตินจากเท้าไก่โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแช่ด่างคือ แช่ด้วย

สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (CaOH) ร้อยละ 3.6 เป็นเวลา 8 วัน แล้วสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงเนื่องจากให้ผลผลิตสูงสุดและมีความแข็งแรงเจลเท่ากับ 330 กรัมและมีความหนืดเท่ากับ 7.5 cp นอกจากชนิดของวัตถุดิบที่แตกต่างกันมีผลต่อสมบัติของเจลาตินแล้ว ตัวแปรอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นของสารละลายที่ใช้แช่ รวมถึงอุณหภูมิและเวลาในการสกัดก็มีผลต่อสมบัติของเจลาตินเช่นกัน ซึ่งการวางแผนการทดลองแบบ RSM เป็นวิธีที่เหมาะสมกับงานทดลองที่มีหลายๆตัวแปร และต้องการหาสภาวะร่วมที่ดีที่สุด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ในการศึกษาวิธีการผลิตโดยใช้ RSM และศึกษาสมบัติของเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้ เพื่อหาแนวทางการใช้ประโยชน์ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือของอุตสาหกรรมการแปรรูปไก่ของประเทศไทยต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. คอลลาเจน

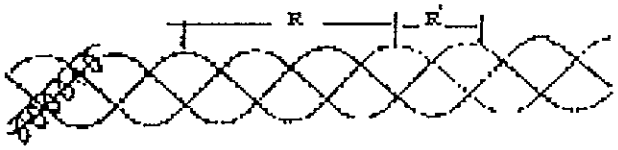
1.1 ลักษณะของคอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีมากที่สุดในโครงสร้างสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคิดเป็นร้อยละ 20-25 ของโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันทั้งหมด โดยพบมากในส่วนกล้ามเนื้อ หนัง กระดูก เอ็นและส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอื่นๆ คอลลาเจนมีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากมีอิทธิพลต่อลักษณะกายภาพของกล้ามเนื้อสัตว์ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆ

โครงสร้างพื้นฐานของเส้นใยคอลลาเจนคือโทรโพคอลลาเจน (tropocollagen) ซึ่งประกอบด้วยสายโซ่โพลีเปปไทด์ 3 สายแต่ละสายเรียกว่า α chain ซึ่งอาจเหมือนหรือแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของคอลลาเจน สายโซ่ทั้ง 3 สายพันเกลียวในลักษณะที่เรียกว่า triple helix (ดังแสดงในภาพที่ 1-1) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 300 กิโลดาลตัน โทรโพคอลลาเจนเป็นโปรตีนที่ยาวที่สุดคือมีความยาวประมาณ 280 นาโนเมตร และมีรัศมีประมาณ 1.4-1.5 นาโนเมตร

ในการจัดเรียงตัวเป็นเส้นใยคอลลาเจน แต่ละโมเลกุลของโทรโพคอลลาเจนจะวางเหลื่อมกับโทรโพคอลลาเจนอีกโมเลกุลที่อยู่ข้างเคียงประมาณหนึ่งในสี่ ทำให้เกิดเป็นลายขวางบนเส้นใยคอลลาเจน ดังแสดงภาพที่ 1-2 เมื่อมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบของโทรโพคอลลาเจนมากขึ้น เส้นใยคอลลาเจนจะมีความแข็งแรงมากขึ้น โดยพันธะโควาเลนซ์ระหว่างโทรโพคอลลาเจน เมื่อสัตว์มีอายุมากขึ้นคอลลาเจนจะเกิดการครอสลิงค์กันระหว่างโซ่พอลีเปปไทด์ของโทรโพ-คอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น โดยวิธีคอนเดนเซชันของหมู่แอลดีไฮด์ (condensation of aldehyde groups)

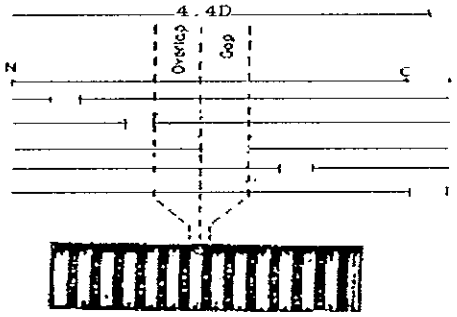
เรียกว่า แอลดอลคอนเดนเซชัน (Aldol condensation) หรือโดยการเกิด Schiff base เมื่อแอลดีไฮด์ทำปฏิกริยากับหมู่อะมิโน ปฏิกิริยาเหล่านี้แสดงดังภาพที่ 1-3 การเกิดครอสลิงค์ในคอลลาเจนทำให้ความเหนียวของเนื้อเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามอายุ โดยทั่วไปพบว่าสัตว์ที่อายุอ่อนกว่าจะมีคอลลาเจนในกล้ามเนื้อมากกว่าแต่คอลลาเจนของสัตว์ที่แก่กว่าจะมีการครอสลิงค์เกิดขึ้นมากกว่า ซึ่งจะทำให้มีค่าการอุ้มน้ำต่ำและยากต่อการละลาย (Zayas, 1996)



ภาพที่ 1-1 ลักษณะโครงสร้างเกลียว 3 สายของโทรโพคอลลาเจน (R=8.7 nm, R'=2.9 nm)

Figure 1-1 Triple- helical structure of tropocollagen (R=8.7 nm, R'=2.9 nm)

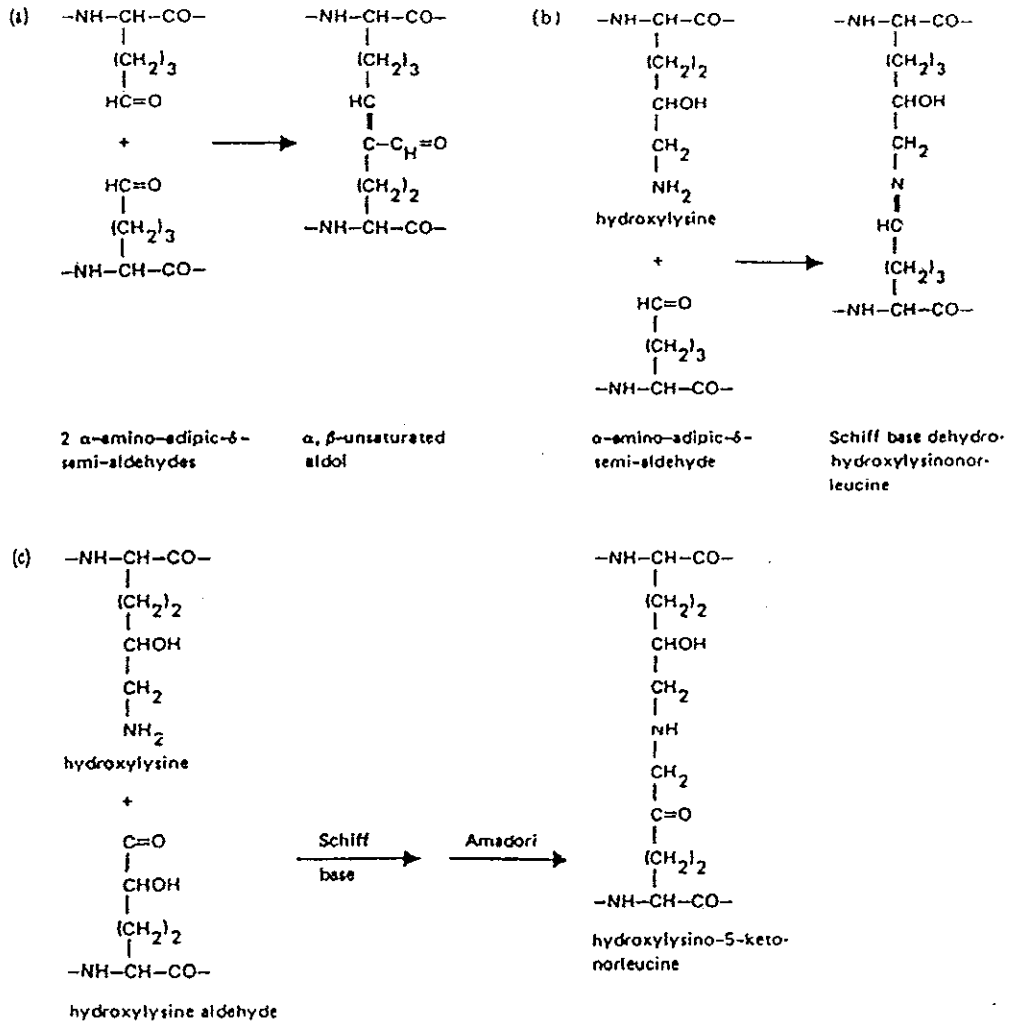
ที่มา: Belitz และ Grosch (1999)



ภาพที่ 1-2 ภาพอธิบายลักษณะการจัดเรียงโครงสร้างที่ทับซ้อนกันของเส้นใยคอลลาเจนซึ่งมีผลให้เกิดลักษณะแถบให้เห็นโดยภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

Figure 1-2 Illustration of the overlap structure of the collagen fiber responsible for the banding pattern of a negatively stained collagen fiber as seen by electron microscopy

ที่มา: Foegeding และคณะ (1999)



ภาพที่ 1-3 การเกิดครอสลิงค์ในคอลลาเจนโดยหมู่ข้างเคียงของโซ่ (a) แอลดอลคอนเดนเซชันตามด้วยการสูญเสียน้ำ (b) การเกิด Schiff base ไลซีนจะทำปฏิกิริยาในลักษณะที่เหมือนกับไฮดรอกซี่ไลซีน (c) การเกิด Schiff base ได้เป็นผลิตภัณฑ์ Amadori

Figure 1-3 Cross- link formation in collagen by side chain group. (a) Aldol condensation followed by loss of water. (b) Schiff base formation lysine reacts in a manner analogous to hydroxylysine. (c) Schiff base formation followed by Amadori rearrangement

ที่มา: Foegeding และคณะ (1999)

1.2 ชนิดของคอลลาเจน

ข้อมูลปัจจุบันระบุว่าคอลลาเจนแบ่งออกได้อย่างน้อย 14 ชนิด (Liu *et al.*, 2001) ขึ้นกับแหล่งของคอลลาเจน โดยชนิดที่มีมาก ได้แก่ Type I Type II Type III และ Type IV

คอลลาเจน Type I ประกอบด้วย $\alpha 1$ 2 สาย และ $\alpha 2$ 1 สาย $[\alpha 1\,(I)]_2\,[\alpha 2\,(I)]$ มักพบในส่วนของหนัง เอ็น กระดูก และกระจกตา คอลลาเจน Type II มักพบในกระดูกอ่อน ประกอบด้วย $\alpha 1$ 3 สาย $[\alpha 1\,(II)]_3$ ส่วนคอลลาเจน Type III มักพบในชั้นผิวหนังของตัวอ่อนและระบบหัวใจและหลอดเลือดซึ่งประกอบด้วย $\alpha 1$ 3 สาย $[\alpha 1\,(III)]_3$ และสำหรับ Type IV มักพบในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เมมเบรน ประกอบด้วย $\alpha 1$ 3 สาย $[\alpha 1\,(IV)]_3$ แสดงดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 ชนิดและแหล่งของคอลลาเจน

Table 1-1 Type and source of the collagen

Type	Peptide chain[a]	Molecular composition	Occurence
I	$\alpha 1$, $\alpha 2$	$[\alpha 1\,(I)]_2\alpha 2(I)$	Skin, tendon, bones, muscle (epimysium)
II	$\alpha 1$	$[\alpha 1\,(I)]_3$	Cartilage
III	$\alpha 1$	$[\alpha 1(III)]_3$	Fetal skin, cardiovascular system, synovial membranes, inner organ, muscle(perimysium)
IV	$\alpha 1$, $\alpha 2$	$[\alpha 1(IV)]_3(?)$[b] (?)	Basal membranes, capsule of lens, glomeruli Placental membrane, lung, muscle (endomysium)
V	αA, αB, $\alpha C(?)$	$[\alpha 1B]_2\alpha A$ หรือ (αB)	Placental membrane, cardiovascular system, lung, muscle (endomysium), secondary component of many tissue

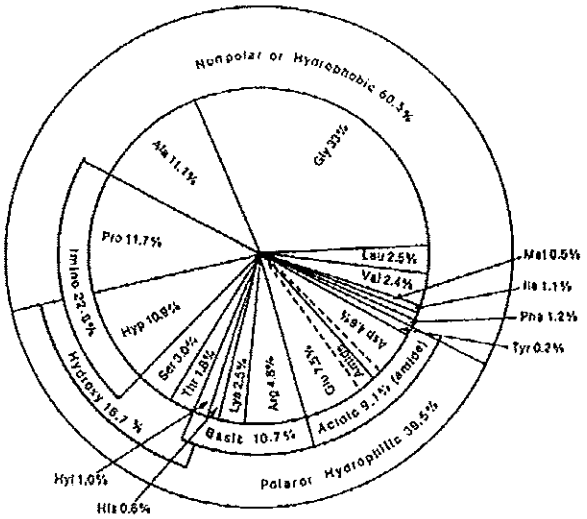
[a] Since the α chain of varius types of collagen differ, they are called $\alpha 1\,(I)$, $\alpha 1\,(II)$, αA, αB และ αC

[b] Not completely elucidated.

ที่มา: Belitz และ Grosch (1999)

1.3 องค์ประกอบอะมิโนของโมเลกุลคอลลาเจน

องค์ประกอบกรดอะมิโนของคอลลาเจนแตกต่างจากโปรตีนชนิดอื่นๆ กล่าวคือ ประกอบด้วยไกลซีน โพรลีน และไฮดรอคซี่โพรลีนในปริมาณสูง แต่ไม่มีทริพโตเฟนอยู่เลย ส่วนซิสเตอีนจะมีเฉพาะในคอลลาเจน Type III และ Type IV และกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบที่มีเฉพาะใน Type I และ Type II คือเมธไธโอนีนเท่านั้น ภาพที่ 1-4 แสดงปริมาณองค์ประกอบของกรดอะมิโนในคอลลาเจน Type I จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าคอลลาเจนประกอบด้วยไกลซีนร้อยละ 33 โพรลีนประมาณร้อยละ 12 อะลานีนและไฮดรอคซี่โพรลีนมีปริมาณใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 11 กรดอะมิโนไฮดรอคซี่ไลซีน ฮิสติดีน ฟีนิลอะลานีน ไอโซลิวซีน ไทโรซีนและกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์อีกรวมกันประมาณร้อยละ 1 โดยมีสัดส่วนกรดอะมิโนที่มีขั้ว (polar) ประมาณร้อยละ 30.5 และกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (non polar) ประมาณร้อยละ 60.5 การจัดเรียงลำดับกรดอะมิโนในสายโซ่พอลีเปปไทขึ้นกับ α chain ที่แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปร้อยละ 50-60 ของ α chain มีลำดับกรดอะมิโนประกอบด้วย Gly-X-Y โดย X มักจะเป็นกรดอะมิโนโพรลีน ส่วน Y จะเป็นกรดอะมิโนไฮดรอคซี่โพรลีน (Asghar and Henrickson, 1982)



ภาพที่ 1-4 องค์ประกอบกรดอะมิโนและสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีความเป็น กรดมีหมู่ไฮดรอคซี่ มีขั้วและไม่มีขั้วของคอลลาเจน Type I $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$

Figure 1-4 Diagrammatic representation of the amino acid composition and relative proportion of acidic, hydroxyl, polar and non polar amino acids of type I collagen $[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$]

ที่มา: Asghar และ Henrickson (1982)

2. เจลาติน

2.1 ลักษณะของเจลาติน

เจลาตินเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายบางส่วนของคอลลาเจนนั่นคือ บางพันธะของคอลลาเจนจะถูกทำลายในขั้นตอนการผลิตหรือสกัด เส้นใยคอลลาเจนในธรรมชาติจะเกิดการหดตัวเมื่อได้รับความร้อน ซึ่งอุณหภูมิในการหดตัว (Ts) จะแตกต่างกันตามแหล่งของคอลลาเจนนั้นๆ เช่น คอลลาเจนในปลามีค่า Ts ที่ประมาณ 45 องศาเซลเซียส ในขณะที่ Ts ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ที่ 60-65 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิในการให้ความร้อนสูงกว่า Ts โมเลกุลที่พันกันเป็นเกลียว 3 สาย (triple helix) จะถูกทำลายคลายตัวเป็นเกลียวแบบสุ่ม (random coil) ที่ละลายได้ในน้ำ เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงจะเกิดการจัดเรียงตัวใหม่ ซึ่งลักษณะโครงสร้างโมเลกุลที่เกิดขึ้นใหม่ขึ้นกับความเข้มข้นของเจลาตินและอัตราการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (ΔT) โดยเจลาตินที่มีระดับความเข้มข้นต่ำมักสร้างพันธะภายในโมเลกุลที่พับทบกันไปมา (back-pleat) ของโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว (single-strands) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นเจลาตินสูงและอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้าๆจะเกิดเป็นโครงสร้างเกลียว 3 สายของคอลลาเจนในธรรมชาติแต่หากอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว โครงสร้างของเจลาตินจะมีลักษณะผสมผสานของทั้งแบบที่เป็นสวนเกลียว 3 สายและส่วนที่คลายเกลียวเป็น random coils (Belitz and Gross, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 1-5

2.2 ชนิดของเจลาติน

ผลิตภัณฑ์เจลาตินแบ่งออกได้เป็นหลายชนิด โดยทั่วไปอาจแบ่งตามลักษณะ (สถานะ) การใช้งานหรือตามการผลิตดังต่อไปนี้

2.2.1 ชนิดของเจลาติน แบ่งตามลักษณะได้ดังนี้ (มอก. 2531)

- ชนิดแห้ง มีลักษณะเป็นแผ่น ชิ้น เกล็ดหรือผงมีสีเหลืองอ่อน
- ชนิดเหลว มีลักษณะเหลวข้น ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน

2.2.2 ชนิดของเจลาตินแบ่งตามลักษณะการใช้งาน

- เจลาตินที่ใช้ในการบริโภค (Edible gelatin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีโลหะหนักเจือปน เช่น สารตะกั่ว เจลาตินที่เหมาะกับการบริโภคต้องพบสารตะกั่วไม่เกิน 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

- เจลาตินที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Industrial gelatin) สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของเจลาตินชนิดนี้มีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมประยุกต์ เช่น เจลาตินที่ใช้ในสำหรับผลิตกระดาษที่ไม่มีคาร์บอน

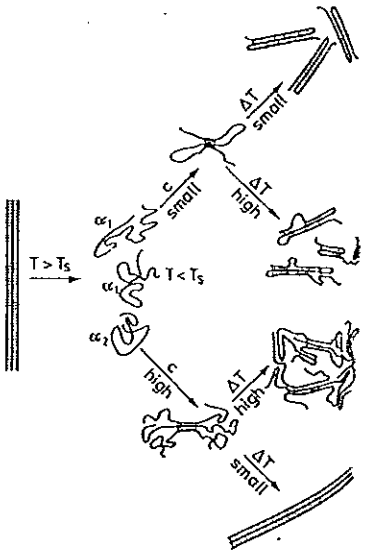
- เจลาตินที่ใช้ในอุตสาหกรรมถ่ายภาพ (Photographic gelatin)

- กาว (Glue) เป็นเจลาตินที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการยึดติด

2.2.3 ชนิดของเจลาตินแบ่งตามวิธีการเตรียมวัตถุดิบ (Hinterwaldner, 1977)

- เจลาติน Type A เป็นเจลาตินที่ใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบก่อนการสกัด มักใช้กับการผลิตเจลาตินจากหนังหมูเป็นหลัก เพราะคอลลาเจนในหนังหมูมีการ cross link น้อยกว่าเจลาตินในหนังโค กรดที่ใช้ได้แก่ ไฮโดรคลอริก ซัลฟูรัส ซัลฟูริกและฟอสฟอริก ที่มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 5 หรือมีพีเอชเท่ากับ 3.5-4.5 โดยแช่ที่อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-48 ชั่วโมง

- เจลาติน Type B เป็นเจลาตินที่ผลิตโดยใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบก่อนการสกัด มักใช้กับหนังและกระดูกของโค โดยใช้ความเข้มข้นของไลม์ (lime) ร้อยละ 2-5 เป็นเวลาประมาณ 8-12 สัปดาห์สำหรับหนังโค ส่วน ossein จะใช้เวลาสั้นกว่าหนังโค ที่อุณหภูมิไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 1-5 การเปลี่ยนแปลงจากคอลลาเจนเป็นเจลาติน Ts=อุณหภูมิในการหดตัวของเส้นใยคอลลาเจน T=อุณหภูมิ C=ความเข้มข้นของเจลาติน

Figure 1-5 Collagen conversion into gelatin (Ts= shrinkage temperature of collagen fiber, T= temperature, C= concentration of gelatin)

ที่มา: Belitz and Gross (1999)

2.3 องค์ประกอบอะมิโนของเจลาติน (Eastoe and Leach, 1977)

องค์ประกอบอะมิโนของเจลาตินขึ้นอยู่กับแหล่งของวัตถุดิบและกรรมวิธีการผลิต โดยทั่วไปองค์ประกอบอะมิโนของเจลาตินกับคอลลาเจนที่มาจากแหล่งเดียวกันจะใกล้เคียงกันมาก

แต่วิธีการผลิตที่แตกต่างกันมีผลทำให้องค์ประกอบอะมิโนแตกต่างกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนังโค ซึ่งองค์ประกอบอาจเปลี่ยนแปลงคือ

- ปริมาณเอไมด์ (amide content) เจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบจะสูญเสียหมู่เอไมด์ของแอสพาราจีนและกลูตามีนมากกว่าเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบ ทำให้หมู่ข้าง (side chain) ของเจลาตินมีหมู่คาร์บอกซิลอิสระเพิ่มขึ้น ทำให้ค่า pI ลดต่ำลง ส่วนเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบมักทนทานต่อการสูญเสียหมู่เอไมด์ ยกเว้นตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรดเป็นระยะเวลานาน เช่น กระดูกที่ผ่านการกำจัดแร่ธาตุแล้ว (ossein) อาจมีการสูญเสียหมู่เอไมด์เช่นเดียวกัน

- การเปลี่ยนแปลงหมู่ข้างของอาร์จินีน (conversion of arginine side chain) จะเกิดขึ้นในเจลาตินที่เตรียมโดยการแช่ด่าง โดยหมู่ยูเรียจะแยกออก (split off) ทำให้อาร์จินีน ($C_6H_{14}N_4O_2$) เปลี่ยนแปลงเป็นออร์นิธีน ($C_5H_2N_2O_2$) แต่ปฏิกิริยานี้จะเกิดน้อยกว่าการสูญเสียหมู่เอไมด์ กรณีที่ปฏิกิริยาเกิดขึ้นมากๆจะทำให้เจลาตินที่สกัดได้มีอาร์จินีนน้อยกว่าคอลลาเจนที่มาจากแหล่งเดียวกันมาก

- สัดส่วนโดยรวมขององค์ประกอบกรดอะมิโน (overall balance of amino acid composition) เจลาตินจะมีองค์ประกอบของอะมิโนหลัก เช่น ไกลซีน โพรลีน ไฮดรอคซี่โพรลีน มากกว่าคอลลาเจนแต่จะมีปริมาณองค์ประกอบอะมิโนที่เป็นส่วนน้อย เช่น ไฮดรอคซี่ไลซีน ฮิสติดีน ฟีนิลอะลานีน ไอโซลิวซีน ไทโรซีน น้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากในกระบวนการผลิตเจลาตินมีการกำจัดโปรตีนอื่นๆและบางส่วนของสายคอลลาเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบออกไป นอกจากนี้พบว่าเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบสูญเสียไฮดรอคซี่โพรลีนมากกว่าแต่สูญเสียไทโรซีนน้อยกว่าเจลาตินที่ใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบ

อย่างไรก็ตามเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดและด่างอ่อนในการเตรียมวัตถุดิบจะมีองค์ประกอบกรดอะมิโนใกล้เคียงกับคอลลาเจนจากแหล่งเดียวกัน จากตารางที่1-2 จะเห็นว่าองค์ประกอบของเจลาตินจากแหล่งต่างๆ อาจมีปริมาณกรดอะมิโนชนิดเดียวกันที่แตกต่างกันบ้าง แต่มีสัดส่วนขององค์ประกอบหลักเหมือนกัน คือประกอบด้วยไกลซีนมากที่สุด รองลงมาคือ อะลานีนและไฮดรอคซี่โพรลีน

ตารางที่ 1-2 องค์ประกอบกรดอะมิโนของเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์ปีก (g/1000g ตัวอย่าง)

Table 1-2 Amino acid composition of mammalian and avian gelatins (g/1000g sample)

Amino acid	Pig skin	Ox skin[a]	Ox bone[a]	Chicken tendon[a]
Alanine	111.7	112.0	116.6	114.6
Glycine	330	333	335	331
Valine	25.9	20.1	21.9	19.8
Leucine	24.0	23.1	24.3	23.8
Isoleucine	9.5	12.0	10.8	10.9
Proline	131.9	29.0	124.2	129.5
Phenylalanine	13.6	12.3	14.0	14.3
Tyrosine	2.6	1.5	1.2	3.4
Serine	34.7	36.5	32.8	28.6
Threonine	17.9	16.9	18.3	19.1
Methionine	3.6	5.5	3.9	6.2
Arginine	49.0	46.2	48.0	44.8
Histidine	4.0	4.5	4.2	4.5
Lysine	26.6	27.8	27.6	19.0
Aspartic acid	45.8	46.0	46.7	48.1
Glutamic acid	72.1	70.7	72.6	74.1
Hydroxyproline	90.7	97.6	93.3	98.5
Hydroxylysine	6.4	5.5	4.3	9.6
Amide[b]	41.5	7.5	15.7	40.1
Recovery by wt.(%)	97.2	99.8		98.8
Total N(%)	18.3	18.1		17.8
Recovery of N(%)	101.5	100.9		103.3
Process	acid	alkali	alkali	acid

[a] Leach (1957), recalculated in this form by Eastoe and Leach (1958)

[b] No. of molecules of NH_3 released during hydrolysis per 1000 total residues

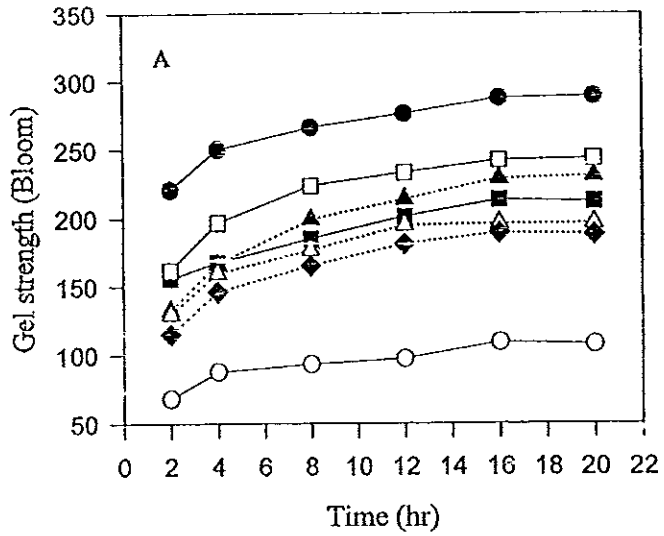
ที่มา: Eastoe และ Leach (1977)

คุณสมบัติทั่วไปของเจลาติน (Wainewright, 1977)

(1) ความแข็งแรงของเจล (bloom strength) คือ ค่าแรงที่ใช้ในการกดผิวหน้าของเจลลึกลงไป 4 มิลลิเมตร โดยเจลที่เตรียมจากสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 6.67 (โดยน้ำหนัก) แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ค่าแรงที่ได้มีหน่วยเป็นกรัมบลูม (grams Bloom) หรือบลูม (Bloom) วัดโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Bloom gelometer (Wainewright, 1977) โดยทั่วไปเจลาตินในทางการค้ามีค่าความแข็งแรงเจลประมาณ 90-300 กรัม (Jones, 1977) ปัจจัยที่มีผลต่อค่าความแข็งแรงเจลของเจลาตินคือ

(1.1) พีเอช ความแข็งแรงเจลของเจลาตินทุกชนิดจะลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5 และสูงกว่า 9 ส่วนในช่วงพีเอช 5-9 เจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบจะมีค่าความแข็งแรงเจลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ส่วนเจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบให้ผลตรงกันข้ามกัน

(1.2) เวลาและอุณหภูมิในการเกิดเจล เจลมักจะเกิดที่ช่วงอุณหภูมิต่ำ โดยพบว่าเมื่อเวลานานขึ้นเจลก็จะมีความแข็งแรงมากขึ้น จนถึงจุดที่เกิดเจลสมบูรณ์ ดังภาพที่1-6



ภาพที่ 1-6 ความสัมพันธ์ระหว่างความแข็งแรงเจลกับเวลา

Figure 1-6 Increase of rigidity of gelatin gels with time (●=300 bloom pig skin gelatin, ○ = 100 bloom pig skin gelatin, ■ = Knox., □ = 230 bloom pig bone gelatin, △ = 200 bloom fish skin gelatin, ▲ = 190 bloom fish skin gelatin)

ที่มา: Choi และ Regenstein (2000)

(1.3) องค์ประกอบของโมเลกุลอื่นๆ การที่มีองค์ประกอบอื่นๆในสารละลายเจลาติน จะมีผลต่อความแข็งแรงเจล โดยพบว่า การเติมสารประกอบพวกซูโครสมีผลทำให้ความ

แข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้น ในขณะที่การเติมสารละลายอิเลคโตรไลต์มีผลทำให้ความแข็งแรงของเจลลดลง

(1.4) สภาวะในการสกัด เจลาตินที่สกัดที่ความร้อนสูง พีเอชสูง จะมีความแข็งแรงเจลต่ำ และเจลาตินที่สกัดในสภาวะเป็นด่างจะมีความแข็งแรงเจลต่ำกว่าเจลาตินที่สกัดในสภาวะเป็นกรด

(1.5) ชนิดและแหล่งของวัตถุดิบ แหล่งของเจลาตินที่แตกต่างกันจะมีองค์ประกอบอะมิโนแตกต่างกัน เจลาตินที่มีกรดอะมิโนโพรลีน ไฮดรอคซี่โพรลีนและไกลซีนสูงจะมีความแข็งแรงเจลสูง (Cho *et al.*, 2006; Muyonga *et al.*, 2004) เนื่องจากกรดอะมิโนดังกล่าวช่วยเพิ่มพันธะไฮโดรเจน (Arnesen and Gildberg, 2002) Gilsenan และ Ross-Murphy (2000) รายงานว่าเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีปริมาณอิมิโน (โพรลีนและไฮดรอคซี่โพรลีน) ประมาณร้อยละ 24 สูงกว่า เจลาตินจากปลาซึ่งมีอิมิโนประมาณร้อยละ 16-18

(1.6) วิธีการตรวจวัดค่า การวัดความแข็งแรงเจลของเจลาตินมักแสดงเป็นค่า Bloom strength ซึ่งมีวิธีวัดมาตรฐานที่กำหนดโดย British standard (B.S.) 757 มีวิธีการคือ เตรียมตัวอย่างสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 6.67±0.01 กรัม โดยใช้เจลาตินผงที่มีความชื้นร้อยละ 7-15 นำมาทำให้พองตัวโดยละลายเจลาตินกับน้ำกลั่น ควรปล่อยให้เจลาตินเกิดการพองตัวจนถึงจุดสมดุล ใช้เวลาประมาณ 15 นาทีถึง 2 ชั่วโมงทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคของตัวอย่าง ตัวอย่างที่พองตัวสมบูรณ์จะละลายได้เร็ว ใช้ความร้อนต่ำและลดการสูญเสียสภาพของเจลาติน ถ้าไม่ทำให้เจลาตินพองตัวก่อน ในขั้นตอนการละลายอนุภาคของเจลาตินจะจับตัวเป็นกลุ่มก้อนในขณะอุ่นในน้ำ และเมื่อให้ความร้อนนานขึ้นกลุ่มก้อนเหล่านี้จะละลายแต่จะเกิดการสูญเสียสภาพได้ เมื่อเจลาตินพองตัวแล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 นาที คนให้ตัวอย่างละลายให้หมด ระวังอย่างให้เกิดฟอง หลังจากเตรียมสารละลายแล้วให้ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 15 นาทีก่อนเก็บที่อุณหภูมิต่ำ ข้อกำหนดเกี่ยวกับเส้นผ่านศูนย์กลางของภาชนะบรรจุสารละลายเจลาตินที่ใช้วัด British Standard (B.S.) 757 และ the Standard methods of the Gelatin Manufacturers Institute of America (G.M.I.A) กำหนดให้เส้นผ่านศูนย์กลางภายในของภาชนะเท่ากับ 59±1 มิลลิเมตร ส่วนความสูงไม่ได้กำหนด แต่ให้ผิวของเจลต่ำกว่า shoulder ของภาชนะ ก้นภาชนะต้องเรียบ การเซ็ตเจล B.S. 757 และ G.M.I.A. กำหนดให้เซ็ตเจลที่อุณหภูมิ 10±0.1 องศาเซลเซียส และผิวเจลต้องราบ ถ้าผิวเจลเอียงอาจมีผลต่อความเที่ยงตรงในการวัด ระยะเวลาในการเซ็ตเจลคือ 16-18 ชั่วโมง ก่อนการวัดควรตรวจสอบ platform ให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม ในการวัดควรให้ gelometer plunger อยู่ตรงกลางของเจล ระยะทางในการกดคือ 4 มิลลิเมตร โดย Gelometer Plunger Angus และ Wainewright (1962, อ้างโดย Wainewright, 1977) รายงานว่า ความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ของ gelometer plunger

คือ: diameter±0.0005 in, radius of curvature (ส่วนโค้ง) คือ 0.014-0.017 in นอกจากนี้ความเที่ยงตรงในค่าที่วัดได้ขึ้นกับช่วงความแข็งแรงเจล โดย Fysh และ Ward (1953, อ้างโดย Wainewright, 1977) รายงานว่าค่าความแข็งแรงเจลในช่วง 100-300 กรัม มีความเที่ยงตรงสูงสุด

(2) ความหนืด (Viscosity) เป็นค่าความหนืดที่วัดจากสารละลายเจลาตินความเข้มข้นร้อยละ 6.67 (โดยน้ำหนัก) ด้วย Ostwald Viscometer ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ค่าความหนืดที่ได้มีหน่วยเป็น millipoise (mps) โดยทั่วไปเจลาตินทางการค้ามีค่าความหนืดระหว่าง 15-70 mps เจลาตินที่มีความหนืดต่ำจะให้เจลที่เปราะ (brittle gel) ส่วนเจลาตินที่มีความหนืดสูงจะให้เจลที่เหนียว ปัจจัยที่มีผลต่อความหนืด

(2.1) พีเอชและสารอิเลคโตรไลท์ ความหนืดจะมีค่าต่ำที่สุดที่พีเอชเท่ากับ pI และเมื่อพีเอชห่างจากจุด pI มากขึ้น ความหนืดก็จะเพิ่มขึ้น การเติมสารอิเลคโตรไลท์จะทำให้ความหนืดลดลงที่ทุกๆพีเอชเนื่องจากเป็นการลดแรงระหว่างประจุ อย่างไรก็ตามในสารละลายเจลาตินที่มีความเข้มข้นสูง ผลของพีเอชต่อความหนืดจะมีค่าลดลง

(2.2) อุณหภูมิและความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน ความหนืดของเจลาตินขึ้นกับความเข้มข้นของเจลาติน โดยเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น ค่าความหนืดของเจลาตินจะสูงขึ้นและเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความหนืดจะลดลง

(3) พีเอช หรือค่าความเป็นกรด-ด่างของเจลาติน วัดจากสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1.0 (โดยน้ำหนัก) โดยใช้ pH meter ค่าพีเอชของเจลาตินขึ้นกับวิธีการผลิต โดยเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.8-5.0 หากพีเอชต่ำกว่านี้ควรปรับให้อยู่ในช่วงนี้เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพ ส่วนเจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบมีพีเอชอยู่ในช่วง 4.7-7.5

(4) pI pI ของเจลาตินขึ้นกับวิธีในการผลิต สำหรับเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบค่า pI จะอยู่ระหว่าง 6.0-9.5 ส่วนเจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบมีค่า pI อยู่ในช่วง 4.8-5.2

(5) สี และ ความใส สีและความใสของเจลาตินขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบและวิธีการผลิตแต่ไม่มีผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาติน สีของเจลาตินจะต้องไม่บดบังลักษณะปรากฏในอาหารที่มีเจลาตินเป็นส่วนประกอบ โดยทั่วไปเจลาตินจะมีสีเหลืองอ่อน

คุณสมบัติมาตรฐานของเจลาตินทางการค้า (มอก. 2531)

คุณลักษณะที่กำหนดเป็นมาตรฐานสินค้าโดยมาตรฐานอุตสาหกรรม (มอก. 2531) มีดังนี้

(1) ลักษณะทั่วไป

(1.1) ชนิดแห้ง มีลักษณะเป็นแผ่น ชิ้น เกล็ดหรือผง มีสีเหลืองอ่อน

(1.2) ชนิดเหลว มีลักษณะเหลวข้น ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน

(2) กลิ่นและรส ต้องมีกลิ่นและรสตามธรรมชาติของผลิตภัณฑ์ ไม่มีกลิ่นและรสแปลกปลอม

(3) การละลายและการทำปฏิกิริยา

(3.1) สำหรับชนิดแห้งละลายได้ในน้ำร้อน ไม่ละลายในน้ำเย็นแต่จะอ่อนนุ่ม พองตัว และอุ้มน้ำได้ 5 ถึง 10 เท่าของน้ำหนักเดิม

(3.2) ไม่ละลายในอีเทอร์ คลอโรฟอร์ม และเอทานอลร้อยละ 96 โดยปริมาตร

(3.3) สารละลายเจลาตินจะทำปฏิกิริยากับสารละลายเมอร์คูรีกรดไนทริกเกิดตะกอนสีขาว และเมื่ออุ่นตะกอนจะเปลี่ยนเป็นสีแดงอิฐ

(4) คุณลักษณะทางเคมี ต้องเป็นไปตามที่กำหนดในตารางที่ 1-3 โดยคิดจากน้ำหนักแห้ง ยกเว้น ลำดับที่1 8 และ10 ให้คิดจากน้ำหนักตัวอย่างในสภาพที่ได้รับ

ตารางที่ 1-3 คุณลักษณะทางเคมีของเจลาตินตามข้อกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม

Table 1-3 Industrial standards characteristic for commercial gelatin

No.	Characteristic	Industrial		
		Phamacy	Food	
			Dry	Liquid
1	Gelatin content (wt%)	-	-	$\geq$ 30
2	Arsenic (mg/kg)	$\leq$ 1	$\leq$ 1	$\leq$ 1
3	Copper (mg/kg)	$\leq$ 30	-	-
4	Zinc (mg/kg)	$\leq$ 100	-	-
5	Lead (mg/kg)	$\leq$ 5	$\leq$ 5	$\leq$ 5
6	Heavy metal (mg/kg)	-	$\leq$ 50	$\leq$ 50
7	Sulferdioxide (mg/kg)	$\leq$ 40	$\leq$ 40	$\leq$ 40
8	Loss weight due to baking (%)	16	16	-
9	Ash (%)	$\leq$ 0.18	$\leq$ 0.18	$\leq$ 0.18
10	gel strength	*	*	*
11	- total organism (colony/g)	$\leq$ 1000	$\leq$ 1000	$\leq$ 10000
	- fungus (colony/g)	-	$\leq$ 10	$\leq$ 100
	- *Escherichia Coli* (g MPN)	< 3	< 3	< 3
	- *Salmonella* (in 25 g sample)	**	**	**
	- *Clostridium perfringens* (per g)	-	**	**

* depend up on the requirements of stakeholder

** not allowed

ที่มา : สำนักงานผลิตภัณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรม, 2531

2.5 การผลิตเจลาติน

2.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ (Hinterwaldner, 1977a)

โดยทั่วไปวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเจลาตินในโรงงานอุตสาหกรรม คือกระดูกและหนังของโคและสุกร แต่เนื่องจากในวัตถุดิบเริ่มต้นมีองค์ประกอบอื่นๆที่ไม่ต้องการ และอาจเจือปนในผลิตภัณฑ์เจลาติน เช่นแร่ธาตุ ไขมัน ในกระดูกหรือขน ไขมันและโปรตีนอื่นๆในหนัง จึงจำเป็นต้องมีขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อนสกัด เพื่อกำจัดองค์ประกอบเหล่านั้นโดยวิธีการที่ใช้ขึ้นกับแหล่งของวัตถุดิบ ดังนี้

(1) การเตรียมกระดูก

- การแยกประเภทและลดขนาด (Assorting and size reduction) กระดูกมีหลายประเภท เช่น collected bones เป็นกระดูกที่เก็บรวบรวมจากแม่ค้า ซึ่งมีปริมาณเล็กน้อยและมีหลายขนาด กระดูกเหล่านี้มักมีสิ่งปนเปื้อนอยู่มาก และไขมันบางส่วนอาจถูกไฮโดรไลซ์และสูญเสียผลผลิตเนื่องจากเก็บรักษาเป็นเวลานาน ดังนั้นกระดูกประเภทนี้จะใช้ผลิตกาวมากกว่าเจลาติน slaughterhouse bone เป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเจลาติน เพราะไม่มีการปนเปื้อนและมีความสด กระดูกจะถูกนำมานำมาลดขนาดให้มีขนาดประมาณ 1-8 เซนติเมตร จากนั้นนำมากำจัดไขมันและแร่ธาตุต่อไป

- การกำจัดไขมัน (Degreasing) โดยทั่วไปในกระดูกมักใช้ตัวทำละลายเบนซิน (Benzene) และคลอริเนตไฮโดรคาร์บอน (chlorinatehydrocarbons) สกัดที่ 80 -130 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 56-84 psig ซึ่งไอของสารละลายจะผ่านตัวอย่างที่ต้องการสกัดภายในเครื่องมือสกัดไขมันที่มีการออกแบบโดยเฉพาะ เมื่อลดอุณหภูมิต่ำลงไอจะกลั่นตัวเป็นของเหลว จากนั้นก็จะแยกไขมันออกแล้วนำตัวทำละลายกลับมาใช้ใหม่ได้

- การกำจัดแร่ธาตุ (Demineralization) เป็นการกำจัดแคลเซียมและธาตุอื่นๆออกจากกระดูก มักใช้กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้นร้อยละ 2-6 ผสมกับสารละลายฟอสเฟตแช่กระดูกที่อุณหภูมิ 0-15 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาที่เหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง ความเข้มข้นของกรดและอุณหภูมิในการแช่ จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำสะอาดจนพีเอชเป็นกลาง นอกจากนี้ยังมีกรดชนิดอื่นๆที่สามารถกำจัดแร่ธาตุได้ เช่น H_2SO_3, H_2SO_4 และ H_3PO_4 แต่ไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากต้นทุนสูง ตัวอย่างที่ได้เรียกว่า ossein

(2) การเตรียมหนัง

หนังโคที่ถูกส่งมายังโรงงานผลิตเจลาตินมีหลายรูปแบบ เช่น หนังโคที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ หนังโคที่ตัดขนแล้ว หนังโคสดหรือหนังโคที่ผ่านการแช่เกลือ วัตถุดิบเหล่านี้อาจนำมาเก็บรักษาหรือผลิตเจลาตินเลย ก่อนการผลิตหนังโคจะถูกนำมาล้างทำความสะอาด จากนั้นกำจัดขนออก (dehair) และลดขนาดส่วนในหนังสุกรและหนังแกะซึ่งมีปริมาณไขมันอยู่สูง การผลิตเจลาติน

ในปัจจุบันได้หลีกเลี่ยงปัญหาที่เกิดจากไขมัน โดยกำจัดไขมันก่อนการสกัด

2.5.2 การทำให้พองตัว (swelling process)

เป็นขั้นตอนที่ทำให้เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) คลายตัว ง่ายต่อการสกัดในขั้นตอนต่อไป วิธีที่มักใช้ในการเตรียมหนังและกระดูกของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น โคและสุกร มี 3 วิธี คือ

(1) การใช้กรด (acid process)

โดยทั่วไปกรดอ่อนจะไม่มีผลต่อการทำลายโครงสร้างของคอลลาเจน เช่น ปลาย N-terminal ปริมาณเอไมด์ และกรดอะมิโน ค่า pI ของเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบมีค่าประมาณ 8.0-9.4 แต่ถ้าใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงและเวลาในการแช่นาน เช่น ossein ค่า pI จะลดลงมีค่าประมาณ 5 เพราะหมู่เอไมด์ถูกทำลาย กรดที่ใช้ได้แก่ ไฮโดรคลอริก ซัลฟูรัส ซัลฟูริกและฟอสฟอริก ที่มีความเข้มข้นไม่เกินร้อยละ 5 หรือพีเอชประมาณ 3.5-4.5 อุณหภูมิ 15-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-48 ชั่วโมง แล้วนำมาสกัดที่ พีเอชประมาณ 4 การใช้กรดมักใช้กับหนังหมูและกระดูกที่ผ่านการกำจัดไขมันและแร่ธาตุแล้ว (ossein) เจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการทำให้พองตัว เรียกว่า เจลาติน type A

(2) การใช้ด่าง (liming or alkali process)

ข้อดีของการเตรียมวัตถุดิบโดยการแช่ด่างคือ สามารถกำจัดส่วนประกอบอื่นที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non collagenous protein) มากกว่าเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบ เนื่องจากโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและมิวโคโปรตีนมีค่า pI ประมาณ 4 ซึ่งละลายได้ดีที่พีเอชเป็นด่าง ทำให้เจลาตินที่ได้จากการใช้ด่างในการเตรียมวัตถุดิบมีความบริสุทธิ์มากกว่าเจลาตินที่ได้จากการใช้กรดในการเตรียมวัตถุดิบ นอกจากนี้การแช่ด่างที่มีความเข้มข้นสูงจะทำลายครอสลิงค์ระหว่างโมเลกุล (intermolecular crosslink) และครอสลิงค์ภายในโมเลกุล (intramolecular crosslink) แต่ไม่ทำลายโครงสร้างแบบเฮลิกซ์ (triple helix) ของคอลลาเจน (Zimmer and kuhn, 1963, อ้างโดย Johns and Courts, 1977) ทำให้เกิดการไฮโดรไลซิสของโปรตีน ทำให้มีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มักใช้กับหนังโคและ ossein โดยใช้ความเข้มข้นของไลม์ (lime) ร้อยละ 2-5 เวลาในการแช่ตัวอย่างประมาณ 8-12 สัปดาห์สำหรับหนังโค ส่วน ossein จะใช้เวลาสั้นกว่าหนังโค อุณหภูมิในการแช่ไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส เจลาตินที่ได้มีค่า pI ต่ำกว่าเจลาตินที่ได้จากการเตรียมตัวอย่างด้วยกรด คือประมาณ 4.8-5.0 เนื่องจากการแช่ในด่างจะทำให้เกิดการสูญเสียหมู่เอไมด์ของกลูตามีนและแอสพาราจีน เจลาตินที่ได้จากวัตถุดิบที่ผ่านการใช้ด่างในการทำให้พองตัว เรียกว่า เจลาติน type B

(3) การใช้เอนไซม์ (the enzymatic process)

เป็นการใช้เอ็นไซม์ตัดย่อยคอลลาเจน เอนไซม์ที่ใช้ เช่น Pronase ใน 0.4M-$CaCl_2$

โดยบริษัท Japan Leather (Hinterwaldner, 1977b) รายงานว่าการใช้เอนไซม์มีข้อดีกว่าการใช้ด่าง ดังนี้

- ใช้เวลาสั้นกว่า
- ให้ผลผลิตสูงกว่า
- เจลาตินที่ได้มีค่าความแข็งแรงเจลสูงกว่า
- ไม่ต้องทำให้ระเหยหรือทำให้เข้มข้น
- เจลาตินที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงกว่า

2.5.3 การสกัดเจลาติน (Hinterwaldner, 1977b)

การเปลี่ยนแปลงคอลลาเจนเป็นเจลาตินจะต้องทำลายพันธะไฮโดรเจน (H-bond) ซึ่งเป็นพันธะที่สำคัญในการทำให้โมเลกุลของคอลลาเจนมีความคงตัว โดยวิธีที่ใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมคือ นำวัตถุดิบที่ผ่านการแช่กรดหรือด่าง (pretreated raw material) มาให้ความร้อนเกินอุณหภูมิการหดตัว (T_s) ของคอลลาเจน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบ โดยในตอนต้นของการสกัดจะให้ความร้อนต่ำ จากนั้นค่อยๆเพิ่มอุณหภูมิ ส่วนพีเอชในการสกัดคือ 4-7 เพราะถ้าพีเอชเป็นด่างจะทำให้เจลาตินที่ได้มีความแข็งแรงเจลต่ำ นอกจากนี้เจลาตินที่มีข้อจำกัดในปริมาณเถ้า เช่นเจลาตินที่ใช้ในอุตสาหกรรมถ่ายภาพ จะต้องมีการกำจัดเถ้าด้วย ซึ่งสามารถทำได้ 2 วิธี คือ

- ล้าง pretreated raw material และสกัดด้วยน้ำ DI
- นำสารละลายเจลาตินที่สกัดได้กรองผ่าน anion และ cation exchanger

จากนั้นอาจมีการกำจัดสี โดยใช้สารละลายต่างๆฉีดพ่นไปในสารละลายเจลาติน ซึ่งสารละลายที่ใช้ในการกำจัดสี เช่น ซัลไฟด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

2.5.4 การทำให้บริสุทธิ์และการทำแห้ง

เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการผลิตเจลาติน ซึ่งประกอบด้วย

(1) การกรอง (Filtration) การกรองเป็นการทำให้เจลาตินใสขึ้นและกำจัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆออกจากสารละลายเจลาติน ทำให้สารละลายเจลาตินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น ปัจจุบันมีเครื่องกรองหลายประเภทที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเจลาติน เช่น เมมเบรน เซลลูโลส (Gusmer Enterprises, 2005; Sartorius, 2004)

(2) การระเหย (The Evaporation of gelatin liquors) เป็นการทำให้สารละลายเจลาตินมีความเข้มข้นมากขึ้น โดยการระเหยด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ

(3) การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง (Sterilization) เป็นการทำให้เจลาตินปลอดเชื้อ

วิธีที่ใช้โดยทั่วไป คือให้ความร้อนอุณหภูมิ 120-130 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง แต่วิธีนี้มีข้อเสียคือ ทำให้คุณภาพของเจลาตินลดลง จึงมีการปรับปรุงวิธีการโดยให้ความร้อนอย่างรวดเร็วอุณหภูมิ 140-142 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 วินาที ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวไม่ทำให้เกิดการสูญเสียคุณภาพของเจลาติน

(4) การทำแห้ง (Drying) เป็นการกำจัดน้ำออกจากสารละลายเจลาติน วิธีที่ใช้มีหลายวิธี เช่น ให้ความร้อนผ่านท่อ ทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (freeze dry)

(5) การบดและร่อน (Grinding and sifting of gelatin) เพื่อให้ขนาดของชิ้นหรือผงเจลาตินตรงตามต้องการและมีความสม่ำเสมอ ขนาดมีผลต่ออัตราการละลายและยังมีผลต่อการกำหนดราคาของผลิตภัณฑ์เจลาติน

(6) การเก็บรักษา (Storage of gelatin) ผลิตภัณฑ์เจลาตินผงควรเก็บรักษาที่สภาวะแห้งและอุณหภูมิไม่สูง เพื่อรักษาคุณภาพและให้มีอายุการเก็บรักษายาวนาน

2.6 งานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collagenous protein)

ในกรณีวัตถุดิบชนิดอื่นๆ ที่มีองค์ประกอบแตกต่างไปจากหนังหรือกระดูก อาจมีการใช้สารละลายชนิดต่างๆ ช่วยในการละลายหรือกำจัดออกไป เช่นโปรตีนไมโอไฟบริล (myofibrillar protein) โปรตีนฮีม (hemoprotein) และไขมัน สารละลายที่ใช้ได้แก่ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และสารประกอบฟอสเฟต Bonifer และ Froning (1996) ศึกษาถึงการล้างหนังไก่ด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7 หรือ สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 พีเอช 8.4 โดยใช้หนังไก่ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส นำมาละลายที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส แล้วล้างด้วยสารละลายข้างต้น อัตราส่วนตัวอย่าง:สารละลายเท่ากับ 1:3 จากนั้นหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 800xg ที่ 5 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที เพื่อกำจัดไขมันและโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำ (water soluble protein) พบว่า หนังไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายทั้งสองชนิดมีปริมาณไขมันลดลงประมาณร้อยละ 59 แต่มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 237 โดยประสิทธิภาพการกำจัดไขมันด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต และสารละลายโซเดียมคลอไรด์มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p<0.05$) ในขณะที่การศึกษาของ Shahidi และคณะ(1992) ในการล้างเนื้อไก่ที่ได้จากการแยกกระดูกด้วยเครื่องจักร (Mechanically Deboned Chicken Meat : MDCM) โดยใช้ สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 (พีเอช 7.8) น้ำ (พีเอช 5.2 หรือ 7.2) และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.5 (พีเอช 6.9) ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที พบว่าสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตมีประสิทธิภาพใน

ฝ่ายทรัพยากร
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

การกำจัดเม็ดสี (hemoprotein) จาก MDCM ร้อยละ 75.5 และกำจัดไขมันได้ร้อยละ 18.7 สูงกว่าการใช้ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0.5 และน้ำตามลำดับ นอกจากนี้ Dawson และคณะ (1988) เปรียบเทียบการใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5 (pH 7.9) น้ำและสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ร้อยละ 0.1 (pH 5.1) ในการล้าง MDCM เพื่อกำจัดสี โดยกวนตัวอย่าง:สารละลายในอัตราส่วน 1:4 ที่ความเร็วรอบ 100 rpm อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วพบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต มีประสิทธิภาพในการกำจัดสีสูงกว่าการใช้สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ โดยตัวอย่างที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตมีค่า L* สูงกว่า Dawson และคณะ (1989) ได้ศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นร้อยละ 0.75 (พีเอชเท่ากับ 8) ในการกำจัดไขมันและสีออกจาก MDCM โดยใช้ตัวอย่าง:สารละลายในอัตราส่วนเท่ากับ 1:4 กวนที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น พบว่าไขมันลดลงประมาณร้อยละ 86 โปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 5.09 ค่า L* เพิ่มขึ้นร้อยละ 36 a* ลดลงร้อยละ 82 Yang และ Froning (1992) ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอไฟบริลและปริมาณคอลลาเจนใน MDCM ระหว่างการล้างด้วยน้ำ สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5 ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส 20 นาที พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต เพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไมโอไฟบริลใน MDCM เมื่อเปรียบเทียบกับ MDCM ที่ไม่ผ่านการล้าง

นอกจากนี้ Boles และคณะ (2000) พบว่าการใช้เกลือร่วมกับฟอสเฟสมีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนเช่นกัน โดยในการศึกษาถึงการสกัดโปรตีนจากกระดูกวัวโดยใช้สารละลาย 4 ชนิด ได้แก่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 4 ร่วมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STP) ร้อยละ 0.3 เตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (TTP) ร้อยละ 0.3 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับฟอสเฟตทั้งสองชนิด หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ มีประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนมากกว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์อย่างเดียว โดยสารละลายที่ประกอบด้วยฟอสเฟตทั้งสองชนิดจะทำให้เกิดการพองตัว (swelling) ของโปรตีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนละลายได้ดีขึ้น Maki และ Froning (1987) ศึกษาถึงการสกัดโปรตีนโดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 และโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตร้อยละ 12 ในเนื้อไก่งวง พบว่า การใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตจะสามารถสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิกเพิ่มขึ้นจาก 13.89 mg/ml เป็น15.01 mg/ml และโปรตีนไมโอไฟบริลเพิ่มขึ้นจาก 3.11 mg/ml เป็น 3.24 mg/ml และไม่พบปฏิกิริยาทางเคมีต่อกันในสารเคมีทั้งสองชนิด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Paterson และคณะ (1988) ที่ว่าการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (0.1-1.0 โมลาร์) และสารละลายเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟต (10 มิลลิโมลาร์) ร่วมกับ

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ สามารถเพิ่มการสกัดโปรตีนและเพิ่มการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อวัวได้ โดยสารละลายเตตระโซเดียมไพโรฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มพีเอชและความแข็งแรงไอออนิก ทำให้แอกโตไมโอซินแยกเป็นแอกตินและไมโอซิน ทำให้เกลือสามารถละลายโปรตีนได้มากขึ้น จึงเพิ่มการสกัดโปรตีนมากขึ้น ซึ่งการรวมกันของสารทั้งสองชนิดจะให้ผลส่งเสริมกัน

นอกจากนี้ชนิดของฟอสเฟตที่ใช้ก็มีผลต่อการสกัดโปรตีน โดย Froning และ Sackett (1985) แช่เนื้อไก่งวงในสารละลายฟอสเฟตชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 10 (โซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต และ/หรือฟอสเฟตผสม) ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 พบว่า สารละลายผสมระหว่างโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟตและโซเดียมเฮกซะเมตาฟอสเฟต สามารถเพิ่มการสกัดโปรตีนไมโอไฟบริลได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบฟอสเฟตตัวอื่นๆที่ใช้ ในขณะที่ Xiong และ Kupski (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อไก่เมื่อใช้สารประกอบฟอสเฟตชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ร่วมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 0.1-1 โมลาร์) พบว่าสารละลายไพโรฟอสเฟต และไตรพอลิฟอสเฟตให้ผลเหมือนกันคือสามารถช่วยในการสกัดโปรตีน ในขณะที่ออร์โธฟอสเฟตให้ผลเหมือนกับชุดควบคุม แต่เฮกซะเมตาฟอสเฟตสามารถสกัดโปรตีนในระดับปานกลาง นอกจากนี้พบว่าความสามารถในการสกัดโปรตีนจะสูงขึ้นเมื่อใช้เกลือที่ระดับความเข้มข้นสูงจนถึง 0.6 โมลาร์ หลังจากนั้นประสิทธิภาพการสกัดเริ่มคงที่

2.7 การผลิตและคุณสมบัติของเจลาตินจากแหล่งอื่นๆ

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ เช่นเท้าไก่ โครงกระดูกไก่งวงแยกด้วยเครื่องจักร (Mechanically deboned turkey residue: MDTR) กระดูกและหนังปลาชนิดต่างๆ ซึ่งพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติของเจลาตินที่ผลิตได้ได้แก่ สภาวะในการแช่ให้พอง (ชนิดของสารละลาย ความเข้มข้น เวลาและอุณหภูมิในการแช่) และสภาวะในการสกัด (เวลาและอุณหภูมิ) โดยคุณสมบัติสำคัญที่มีการศึกษาคือ ความแข็งแรงเจล ความหนืด และรูปแบบเปปไทด์ ซึ่งวัตถุดิบแต่ละชนิดจะมีสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแตกต่างกัน

Cho และคณะ (2004) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากกระดูกอ่อนของปลาฉลาม โดยมีตัวแปรหรือปัจจัยที่ศึกษาคือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียม-ไฮดรอกไซด์และเวลาในการแช่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัด ที่มีผลต่อผลผลิต พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมตัวอย่างคือ การแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1.6 โมลาร์ เป็นเวลา 3.16 วัน แล้วนำมาสกัดที่ 65 องศาเซลเซียส เวลา 3.44 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลาตินที่สกัดได้ทำแห้งด้วยลมร้อน (hot air dryer) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อนำเจลาตินที่สกัด

ได้มาเปรียบเทียบคุณสมบัติกับเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เห็นว่าเจลาตินที่สกัดจากกระดูกอ่อนปลาฉลามมีความแข็งแรงเจลต่ำกว่าเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เนื่องจากมีปริมาณโพรลีนและไฮดรอคซี่โพรลีนต่ำกว่า และมีความขุ่นสูง อาจเนื่องจากในขั้นตอนการทำแห้งเกิดการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อน (aggregate) ของโปรตีนโมเลกุลสูง ในขณะที่ Linus และ Rakesh (1997) ศึกษาถึงการสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินจากเศษเนื้อที่แยกได้จากโครงกระดูกไก่งวงด้วยเครื่องจักร (Mechanically deboned turkey residue: MDTR) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อ ไขมันและเศษกระดูกเล็กๆ โดยล้างตัวอย่างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปแช่ด้วยกรดไฮโดรคลอริกร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากล้างกรดออกนำตัวอย่างมาสกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 55 70 และ 85 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าเจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีความแข็งแรงเจลและความหนืดมากที่สุด เนื่องจากเจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีปริมาณโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสูงกว่าเจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิอื่นๆ โดยการตรวจสอบด้วย Sodium Dodecyl Sulfate Polyacylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และพบว่าเจลาตินที่ได้องค์ประกอบเป็นโปรตีนส่วนใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 45 กิโลดาลตัน ซึ่งใกล้เคียงกับเจลาตินจากหนังโค แต่มีความแข็งแรงและความหนืดต่ำกว่า กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบในเจลาตินจาก MDTR คือ ไกลซีน โพรลีน และอะลานิน อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดสูงขึ้น ผลผลิตเจลาตินจะสูงขึ้นแต่ความแข็งแรงเจลและความหนืดจะลดลง Lim และคณะ (2001) ที่สกัดเจลาตินจากเท้าไก่โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) โดยแช่เท้าไก่ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆคือร้อยละ 1 2.5 และ 5 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 2 และ 3 สัปดาห์ สกัดด้วยน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแช่ด่างคือแช่ด้วยสารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 3.6 เป็นเวลา 8 วัน เนื่องจากให้ผลผลิต ความแข็งแรงของเจลและความหนืดสูง นอกจากนี้ Kim และคณะ (2000) ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากเท้าไก่ โดยใช้ RSM ในช่วงอุณหภูมิระดับต่างๆ คือ 50 65 และ 80 องศาเซลเซียส และเวลา 1 2.5 และ 4 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ปริมาณผลผลิตเจลาตินจะเพิ่มสูงขึ้นด้วยแต่ความหนืดลดลง โดยสรุปว่าสภาวะที่ดีที่สุดในการสกัดคืออุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส 3 ชั่วโมง 40 นาที

รายงานการศึกษาการผลิตเจลาตินจากหนังปลาจะมีการใช้ทั้งกรดและด่างในการเตรียมวัตถุดิบ และสกัดที่อุณหภูมิต่ำกว่าวัตถุดิบชนิดอื่นๆ Cho และคณะ (2005) รายงานผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาทูน่า โดยวางแผนการทดลองแบบ CCD และมีปัจจัยที่ศึกษา คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และเวลาในการแช่ อุณหภูมิและเวลาในการสกัด พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด คือแช่ตัวอย่างในสารละลาย

โซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1.89 เป็นเวลา 2.87 วัน แล้วนำมาสกัดที่ 58.15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4.72 ชั่วโมง เนื่องจากมีปริมาณเจลาตินและความแข็งเจลสูง โดยเมื่ออุณหภูมิในการสกัดเพิ่มขึ้นจาก 60 เป็น 75 องศาเซลเซียส ความแข็งแรงเจลจะลดลง เนื่องจากโปรตีนเสียสภาพมากขึ้น แต่ปริมาณเจลาตินสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น Zhou และ Regenstein (2004) ศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลา Pollock โดยมีปัจจัยที่ศึกษา 7 ตัวแปร อุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นของด่างที่ใช้แช่ เวลา อุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดที่ใช้สกัด อัตราส่วนของตัวอย่างกับน้ำในการสกัด ที่มีผลต่อผลผลิต (yield) ความแข็งแรงของเจลและความหนืดโดยใช้ RSM พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อการสกัดเจลาตินได้แก่ อุณหภูมิและความเข้มข้นของด่างที่ใช้แช่ อุณหภูมิและความเข้มข้นของกรดที่สกัด โดยสภาวะที่เหมาะสมซึ่งให้ผลผลิต ความแข็งแรงของเจลและความหนืดสูงสุด ได้แก่ตัวอย่างที่แช่ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ 0.25 โมลาร์ อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส แล้วสกัดด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.09 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส Gimenez และคณะ(2005) ศึกษาถึงการสกัดเจลาตินจากหนังปลา Dover Sole *(Solea vulgaris)* โดยทำให้พองตัวด้วยกรดอะซิติก 50 มิลลิโมลาร์ และแลกติก 10 25 และ 50 มิลลิโมลาร์ แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน พบว่า เจลาตินที่ทำให้พองตัวด้วยกรดทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ให้ผลผลิตเจลาติน (gelatin yield) ปริมาณใกล้เคียงกัน และเจลาตินที่ทำให้พองตัวด้วยกรดแลกติกความเข้มข้น 25 มิลลิโมลาร์ให้ผลผลิตน้อยที่สุด ส่วนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ไม่สามารถสกัดเจลาตินได้ และพบว่าปริมาณโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนของเจลาตินที่ผ่านการทำให้พองตัวด้วยกรดแลกติกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์มีค่าสูงกว่าการใช้กรดอะซิติก ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และกรดแลกติก 25 มิลลิโมลาร์ แต่เจลาตินที่เตรียมโดยทำให้พองตัวด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์มีค่าความแข็งแรงเจลสูงสุด ทั้งนี้เพราะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสูงกว่า Gudmundsson และ Hafsteinsson (1997) ศึกษาถึงการสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาคอด (Cod) โดยแช่ด้วยสารละลายชนิดต่างๆ ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดซัลฟูริกและกรดซิตริก แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลาข้ามคืน พบว่า เจลาตินที่เตรียมโดยแช่ด้วยกรดซัลฟูริกและโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.1-0.2 ให้ผลผลิตสูงสุด นอกจากนี้สายพันธุ์ปลาที่ใช้ก็มีผลต่อคุณสมบัติของเจลาตินที่ผลิตได้ด้วยด้วย โดย Jamilah และ Harvinder (2002) ศึกษาถึงการสกัดและคุณสมบัติของเจลาตินจากหนังปลา 2 สายพันธ์ คือ black tilapia *(Oreochromis mossambi)* และ red tilapia *(Oreochromis nilotica)* โดยแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 0.2 เป็นเวลา 40 นาทีตามด้วยกรดซัลฟูริกร้อยละ 0.2 และกรดซิตริกร้อยละ 1 จากนั้นสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง กรองแล้วทำแห้งด้วยวิธีระเหิด (freeze dry) จากนั้นศึกษาคุณสมบัติต่างๆ พบว่าเจลาตินจากหนังปลา black tilapia มีความแข็งแรงของเจล ความ

หนืดและจุดหลอมเหลว (melting point) สูงกว่า red tilapia เพราะว่ามีสัดส่วนโดยรวมขององค์ประกอบกรดอะมิโนสูงกว่า ในขณะที่ Gomez Guillen และคณะ (2002) ศึกษาถึงการสกัดและคุณสมบัติของปลาชนิดต่างๆได้แก่ Sole Megrim Cod และ Hake โดยทำให้พองตัวด้วยกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ข้ามคืน พบว่าปลา Sole และ Magrim มีความแข็งแรงของเจลสูงกว่าปลา Cod และ Hake อาจเป็นเพราะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงสูงกว่า

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการล้างโปรตีนออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลายแตกต่างกัน
2. ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้กรดฟอสฟอริกต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาติน โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)
3. ศึกษาผลของการสกัดเจลาตินด้วยน้ำที่อุณหภูมิและเวลาต่างๆต่อผลผลิตและคุณสมบัติที่สำคัญของเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้
4. ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้า

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

- วัตถุดิบและการเตรียมวัตถดิบ

- เท้าไก่เนื้อ อายุประมาณ 45 วัน ผลิตโดยบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ จำกัด จัดจำหน่ายโดย เทสโก้ โลตัส และคาร์ฟู เก็บรักษาโดยการแช่เย็นอุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 3 วัน นำมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำเย็น แล้วบดด้วยเครื่องบดเนื้อผ่านรูขนาด 4 มิลลิเมตร จากนั้นล้างด้วยน้ำกรองอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนเท้าไก่บด:น้ำ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เท่ากับ 1:10 หลายๆครั้งจนน้ำล้างมีสีเดียวกับน้ำกรอง แล้วเหวี่ยงแยกน้ำล้างออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า บรรจุถุงพอลิเอทธิลีนและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป ภายในเวลาไม่เกิน 6 เดือน

- เจลาตินทางการค้าจากหนังโคและหมู (Type B) ผลิตโดยบริษัท The Gelatin Group ประเทศนิวซีแลนด์ และบริษัท Hangzhou Qunli Gelatin Chemical จำกัด ประเทศจีนตามลำดับ

- สารเคมี

- สารเคมี (analytical grade) ที่ใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่

(1) Sulfuric acid

(2) Sodium hydroxide

(3) Boric acid

(4) Hydrochloric acid

(5) indicator (methyl red, methylene blue and bromocresol green)

(6) Petroleum ether

(7) Chloramines T

(8) 4-dimethylaminobenzaldehyde

(9) Perchloric acid

(10) N-propanol

(11) Sodium acetate trihydrate

(12) Citric acid

(13) Acetic acid

(14) Potassium sulfate

(15) Copper sulfate

(16) Sodium Potassium Tartrate

(17) Acryamide/bisacrylamide 30%

(18) Tris-Hydrochloric

(19) Glycerol

(20) Sodium dodesyl Sulphate

(21) Bromophenol Blue

(22) Coomassie Billiant Blue

(23) Methanol

- สารเคมี (commercial grade) ที่ใช้ในขั้นตอนการผลิตเจลาติน ได้แก่

(1) Sodium tripolyphosphate

(2) Potassium chloride

(3) Sodium bicarbonate

(4) Sodium hydroxide

(5) Phosphoric acid

อุปกรณ์

(1) เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ LMS รุ่น Vs-8480SR-L ประเทศเกาหลี

(2) เครื่องหมุนเหวี่ยง ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5415C ประเทศเยอรมัน

(3) เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้า ยี่ห้อ Grandimpianti รุ่น CE21K ประเทศอิตาลี

(4) อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น W760 ประเทศเยอรมัน

(5) เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ Toshobar รุ่น JIS C4004 ประเทศญี่ปุ่น

(6) เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-1000 ประเทศญี่ปุ่น

(7) ตู้อบไฟฟ้า ยี่ห้อ Memmert รุ่น D-91126 ประเทศเยอรมัน

(8) เครื่องบดเนื้อยี่ห้อ Chuang zone รุ่น CZ-112A ประเทศไต้หวัน

(9) Aspirator ยี่ห้อ CE รุ่น A-36 ประเทศญี่ปุ่น

(10) อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WBI 45 ประเทศเยอรมัน

(11) ตู้อบลมร้อนชนิดถาดหมุน ผลิตโดย ภาควิชาเทคโนโลยีวัสดุภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(12) อุปกรณ์ย่อยและกลั่นโปรตีน ยี่ห้อ FOSS TECATOR รุ่น 2006 และ 2200 ประเทศสวีเดน

(13) อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ยี่ห้อ Selecta รุ่น 6003286 ประเทศสเปน

(14) เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Precisa รุ่น BJ 1000 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

(15) เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อMettler toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

(16) เตาเผา (muffle furnace) ยี่ห้อ NEY รุ่น Vulcan 3-1750 ประเทศสหรัฐอเมริกา

(17) เครื่องมือวิเคราะห์เนื้อสัมผัส ยี่ห้อ Stable Microsystem รุ่น XT2i ประเทศอังกฤษ

(18) เครื่องมือวิเคราะห์ค่าสี ยี่ห้อ Hunter Lab รุ่น color flex ประเทศ สหรัฐอเมริกา

(19) เครื่องมือวิเคราะห์พีเอช (pH meter) ยี่ห้อ Sartorius รุ่น 12DVC ประเทศเยอรมัน

(20) เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ thermospectronic รุ่น 4001/4 ประเทศสหรัฐอเมริกา

(21) เครื่องมือวิเคราะห์ความหนืด ยี่ห้อ Schott รุ่น 50904 ประเทศเยอรมัน

(22) ชุดอิเล็คโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล ยี่ห้อ Biorad รุ่น Mini ProteinIII ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1. การตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

สุ่มตัวอย่างเท้าไก่บดก่อนและหลังล้างด้วยน้ำเย็นจัดไปตรวจสอบปริมาณขององค์ประกอบทางเคมี ได้แก่

- ความชื้น (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก1)
- โปรตีน โดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก2)
- ไขมัน โดยวิธี soxhlet (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก3)
- เถ้า (AOAC, 2000) (ภาคผนวก ก4)
- คอลลาเจน ดัดแปลงวิธีของ Kolar (1990) (ภาคผนวก ก5)

2. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลายแตกต่างกัน

นำเท้าไก่บดที่ล้างด้วยน้ำเย็นจัดแล้ว มากวนในสารละลายต่างๆ ดังนี้

- สารละลายผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ร่วมกับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตร้อยละ 0.3 และโซเดียมไบคาร์บอเนตร้อยละ 0.5 (0.6 M KCl+0.3%STP+0.5% $NaHCO_3$)

- สารละลายผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต ร้อยละ 0.5 (0.6 M KCl + 0.5% $NaHCO_3$)

- สารละลายผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ร่วมกับโซเดียมไตรโพลี-ฟอสเฟตร้อยละ 0.3 และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ (0.6 M KCl+ 0.3%STP +0.05 M NaOH)

- สารละลายผสมโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.05 โมลาร์ (0.6 M KCl+ 0.05 M NaOH)

- สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ (0.5 M NaOH)

โดยใช้อัตราส่วนเท้าไก่บด : สารละลายเท่ากับ 1: 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นกรองโดยใช้ aspirator ผ่านผ้าขาวบางเพื่อแยกสารละลายออก นำเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายแล้วมาชั่งน้ำหนักและคำนวณการพองตัว (ภาคผนวก ค1) วิเคราะห์ปริมาณ ไนโตรเจน (ภาคผนวก ก2) และไฮดรอกซี่-โพรลีน (ภาคผนวก ก5)

เลือกสภาวะ (ชนิดสารละลายและเวลา) ในการล้างที่สามารถกำจัดปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างมากที่สุดและสูญเสียคอลลาเจนน้อยที่สุด สำหรับขั้นตอนการทำให้พองตัวด้วยกรดต่อไปและ สภาวะที่มีค่าการพองตัวสูงสุด สำหรับการล้างและทำให้พองตัวด้วยด่าง

3. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้กรดต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาตินโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology, RSM)

เตรียมเท้าไก่บดโดยการล้างด้วยวิธีที่เลือกจากข้อที่ 2 เฉพาะตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด นำมาล้างด้วยน้ำหลายๆครั้งจนน้ำล้างมีพีเอช 6.5-7 แล้วเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงแบบตะกร้าเพื่อแยกน้ำออก จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายกรดฟอสฟอริกอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อให้เส้นใยคอลลาเจนคลายตัว โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้คือ

3.1 การกำหนดชุดการทดลองโดยมีปัจจัยที่ศึกษาคือ

- อุณหภูมิในการแช่ 10 -30 องศาเซลเซียส (X1)
- เวลาในการแช่ 6 – 48 ชั่วโมง (X2)
- ความเข้มข้นกรดร้อยละ 1 – 5 (X3)

เมื่อใช้ Central Composite Design (CCD) กำหนดชุดการทดลองจะได้ชุดการทดลอง 15 ชุด ซึ่งมีสภาวะการทดลองดังแสดงในตารางที่ 2-1 และการทดลองที่จุดกึ่งกลาง (0, 0, 0) 5 ชุด (ชุดการทดลองที่ 1 5 7 13 17 และ 20)

3.2 ทำการทดลองตามสภาวะการทดลองที่กำหนดจากข้อ 3.1 โดยแช่ตัวอย่างในกรดตามสภาวะที่กำหนดแต่ละชุดการทดลองแล้วกรองแยกส่วนของของเหลวและของแข็ง นำส่วนของแข็งไปชั่งน้ำหนักและคำนวณร้อยละการพองตัว (โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อที่ 2) แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดจนมีพีเอช 6.5-7 จากนั้นนำมาตรวจสอบประสิทธิภาพการสกัดโดยเติมน้ำ 2 เท่า แล้วให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นกรองแยกส่วนของเหลว นำส่วนของเหลวมาวิเคราะห์โปรตีน (ภาคผนวก ก6)

3.3 นำข้อมูลผลการทดลอง (response) จากข้อ 3.2 ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA (analysis of variance) และวิเคราะห์สมการถดถอย (regression model) เพื่อหาสมการจำลองที่บอกถึงน้ำหนักอิทธิพลของปัจจัยที่ศึกษาต่อผลลัพธ์ที่ต้องการ ตลอดจนตรวจสอบความน่าเชื่อถือของสมการในเบื้องต้น โดยพิจารณาจากค่า R^2 (สัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ: Coefficient of Determination) ซึ่งโดยทั่วไปสมการที่มักนำไปใช้ควรมีค่า R^2 อย่างน้อย 0.75 (Haaland 1989; Hu, 1999 อ้างโดย อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2544) นอกจากนี้ควรพิจารณาถึง Residual และ Lack of fit ด้วย โดย Residual ควรมีการกระจายตัวแบบปกติ และความแปรปรวนจาก Lack of fit ให้พิจารณาถึง F-ratio และ p-value จะต้องไม่มีนัยสำคัญ (Myers and Montgomery, 1995) จากนั้นสร้างแผนภาพคอนทัวร์ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ (Response) ที่ต้องการกับตัวแปรที่ศึกษา โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert version 6 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA)

3.4 พิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการแช่กรด โดยนำกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลลัพธ์ได้แก่ ปริมาณโปรตีนและการพองตัว กับตัวแปรที่ศึกษาจากข้อ 3.1 ได้แก่อุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นของกรดที่ใช้แช่ มาซ้อนทับกันโดยกำหนดระดับที่ให้ปริมาณโปรตีน และการพองตัวสูงสุดที่มีการซ้อนทับกันคือสภาวะร่วมที่เหมาะสม จากนั้นนำสภาวะที่เหมาะสมมาทวนสอบความแม่นยำ

3.5 ทวนสอบความแม่นยำของสมการจากข้อ 3.3 โดยทำการทดลองตามสภาวะที่เลือกจากข้อ 3.4 แล้วนำผลที่ได้เปรียบเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากสมการจำลอง หากความแตกต่างระหว่างค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากสมการมีน้อยและยอมรับได้ เช่นไม่เกินร้อยละ 10 แสดงว่าสมการนั้นสามารถใช้ในการทำนายและหาจุดที่เหมาะสมได้ (Hu, 1999 อ้างโดย สุจินดา ศรีวัฒนะ, 2548)

ตารางที่ 2-1 แผนการทดลองสำหรับการทำให้พองตัวด้วยกรด โดยใช้ Central Composite Design (CCD)

Table 2-1 Experimental design of acid swelling process obtained from Central Composite Design (CCD)

run	coded level			actual level		
	X1	X2	X3	Temperature(°C)	Time(h)	Concentration(%)
1	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00
2	1.000	-1.000	1.000	26.00	14.50	4.19
3	-1.000	-1.000	-1.000	14.00	14.50	1.81
4	0.000	-1.682	0.000	20.00	5.98	3.00
5	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00
6	0.000	1.682	0.000	20.00	48.02	3.00
7	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00
8	1.682	0.000	0.000	30.09	27.00	3.00
9	1.000	1.000	-1.000	26.00	39.50	1.81
10	1.000	1.000	1.000	26.00	39.50	4.19
11	0.000	0.000	1.628	20.00	27.00	5.00
12	-1.000	1.000	-1.000	14.00	39.50	1.81
13	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00
14	1.000	-1.000	-1.000	26.00	14.50	1.81
15	0.000	0.000	-1.682	20.00	27.00	1.00
16	-1.000	1.000	1.000	14.00	39.50	4.19
17	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00
18	-1.000	-1.000	1.000	14.00	14.50	4.19
19	-1.682	0.000	0.000	9.91	27.00	3.00
20	0.000	0.000	0.000	20.00	27.00	3.00

4. การศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดเจลาตินด้วยน้ำต่อผลผลิตและสมบัติที่สำคัญของเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้

4.1 การเตรียมตัวอย่างเท้าไก่บดที่ผ่านการแช่กรดและด่าง ตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรด เตรียมโดยการล้างและทำให้พองตัวด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 1 และ 2 ส่วนตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด่าง เตรียมโดยการล้างและทำให้พองตัวด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 1 จากนั้นนำตัวอย่างที่ทำให้พองด้วยวิธีทั้งสองล้างด้วยน้ำเย็นหลายๆครั้งจนเป็นกลาง โดยวัดจากน้ำล้างให้มีพีเอช 6-7

4.2 การสกัดเจลาติน ทำได้โดยการเติมน้ำ 2 เท่าของน้ำหนักตัวอย่างสำหรับตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรด และ 2.5 เท่าสำหรับตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด่าง เนื่องจากการพองตัวของตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรดมากกว่าตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด่าง จากนั้นให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 5 7 9 และ 12 ชั่วโมง แล้วกรองแยกกากออกจากของเหลวด้วย aspirator ผ่านผ้าขาวบาง นำส่วนของเหลวไปตรวจวิเคราะห์ต่อไป

4.3 การตรวจวิเคราะห์

4.3.1 ตัวอย่างเริ่มต้นโดยสุ่มตรวจสอบ

- โปรตีน (ภาคผนวก ก6)
- ไฮดรอคซี่โพรลีน (ภาคผนวก ก5)

4.3.2 สารละลายเจลาตินที่สกัดได้ นำไปตรวจสอบ

- โปรตีน (ภาคผนวก ก6) แล้วคำนวณประสิทธิภาพการสกัดโปรตีน (ภาคผนวก ค2)
- ไฮดรอคซี่โพรลีน (ภาคผนวก ก5) แล้วคำนวณประสิทธิภาพการสกัดไฮดรอคซี่โพรลีน (ภาคผนวก ค2)
- ความแข็งแรงของเจล (Bloom strength) โดยดัดแปลงวิธีของ British Standard Method (1975 อ้างโดย Wainewright, 1977) (ภาคผนวก ข1)
- รูปแบบและสัดส่วนของโปรตีนขนาดต่างๆ โดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ตามวิธีของ Laemmli (1970) (ภาคผนวก ข5)

คัดเลือกสภาวะการสกัดของตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมแต่ละวิธี (กรดหรือด่าง) ที่ให้เจลาตินที่มีความแข็งแรงของเจลเทียบเท่ากับเจลาตินทางการค้าที่ความเข้มข้นเท่ากัน หรือมีประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนสูง สำหรับการศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้าต่อไป

5. การศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้า

เตรียมเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดโดยล้าง แช่กรดหรือด่างและสกัดด้วยสภาวะที่เลือกจากข้อที่ 4 แล้วนำสารละลายเจลาตินที่ได้ไประเหยให้เข้มข้นขึ้นในสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เจลาตินเซ็ตตัวแล้วบดเป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบลมร้อนชนิดถาดหมุนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดเป็นผง นำเจลาตินผงที่ได้ไปตรวจสอบองค์ประกอบและสมบัติเปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้า ดังนี้

- องค์ประกอบทางเคมีของเจลาติน คือ ความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า และปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน ตามวิธีที่ใช้ในข้อ 1
- ความแข็งแรงของเจล (Bloom strength) ด้วยเครื่อง Texture Analyzer (ภาคผนวก ข1)
- ความหนืด (viscosity) โดย Oswald Viscometer (ภาคผนวก ข2)
- พีเอช (ภาคผนวก ข3)
- ความใส ด้วยเครื่อง Spectophotometer (ภาคผนวก ข4)
- รูปแบบและสัดส่วนของโปรตีนขนาดต่างๆ ด้วย SDS-PAGE (ภาคผนวก ข5)

6. การวางแผนการทดลองและวิเคราะห์ทางสถิติ

6.1 การทดลองข้อ 2 4 และ 5 วางแผนวิธีการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Complete Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละชุดการทดลอง นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเพื่อเปรียบเทียบและหรือศึกษาผลของปัจจัยโดย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม Statistical Package for Social Sciences Version10.0 (SPSS for window) (SPSS, Inc. Chicago, USA.)

นอกจากนี้เพื่อการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของปัจจัยในข้อ 2 และ 4 ได้จัดชุดการทดลองแบบ factorial ในแผนการทดลองแบบ CRD (Factorial in CRD) และวิเคราะห์ผลของความแปรปรวน (ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย DMRT ดังแสดงรายละเอียดในภาคผนวก จ

6.2 วิธีการทดลองข้อที่ 3 วางแผนการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) โดยใช้โปรแกรม Design Expert version 6 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลายแตกต่างกัน

1.1 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่

เท้าไก่ประกอบด้วยไฮดรอคซี่โพรลีนและไขมันร้อยละ 1.57 และ 9.28 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนสูงกว่า แต่มีไขมันต่ำกว่าการรายงานของ Liu และคณะ (2001) (ร้อยละ 1.20 และ 12.04 ตามลำดับ) ทั้งนี้อาจเนื่องจากพันธุ์ของไก่และสภาวะการเลี้ยงแตกต่างกัน เมื่อนำเท้าไก่ไปล้างด้วยน้ำเย็น พบว่าปริมาณโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 57.81 เป็น 70.81 และจากร้อยละ 5.53 เป็น 9.58 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ เนื่องจากไขมันถูกกำจัดออกจากเท้าไก่ทำให้โปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนในเท้าไก่กับแหล่งของเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่าปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนในเท้าไก่มีค่าต่ำกว่าในหนัง เอ็น กระดูก ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ร้อยละ 1.79-7.08) (Johns, 1997) และเมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุเศษเหลืออื่นๆที่นำมาใช้เป็นแหล่งของเจลาติน พบว่าปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนในเท้าไก่ (ร้อยละ 1.57) มีค่าต่ำกว่า ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนในหนังปลาตาหวาน (bigeye snapper) (ร้อยละ 1.95) แต่มีค่าสูงกว่าในก้างปลา (ร้อยละ 0.57) (Kittiphattanabawon *et al.*, 2005)

ตารางที่ 3-1 องค์ประกอบทางเคมีของเท้าไก่ก่อนและหลังการล้าง

Table 3-1 Chemical composition of raw and washed chicken feet

Composition	Content (% wet wt.)[a]		Content (% dry wt.)	
	raw	ground-washed	raw	ground-washed
Moisture	71.65±2.82	60.33±2.27	-	-
Protein[b]	16.38±0.29	28.06±0.12	57.81±1.01	70.81±0.30
Fat	9.28±0.20	4.07±0.08	32.75±0.69	10.25±0.20
Ash	2.56±0.16	6.71±0.41	9.03±0.57	16.92±1.04
Hydroxyproline	1.57±0.02	3.81±0.07	5.53±0.08	9.58±0.20

[a] Mean± S.D. from triplicate determination

[b] The convertion factor for calculation from nitrogen was 6.25

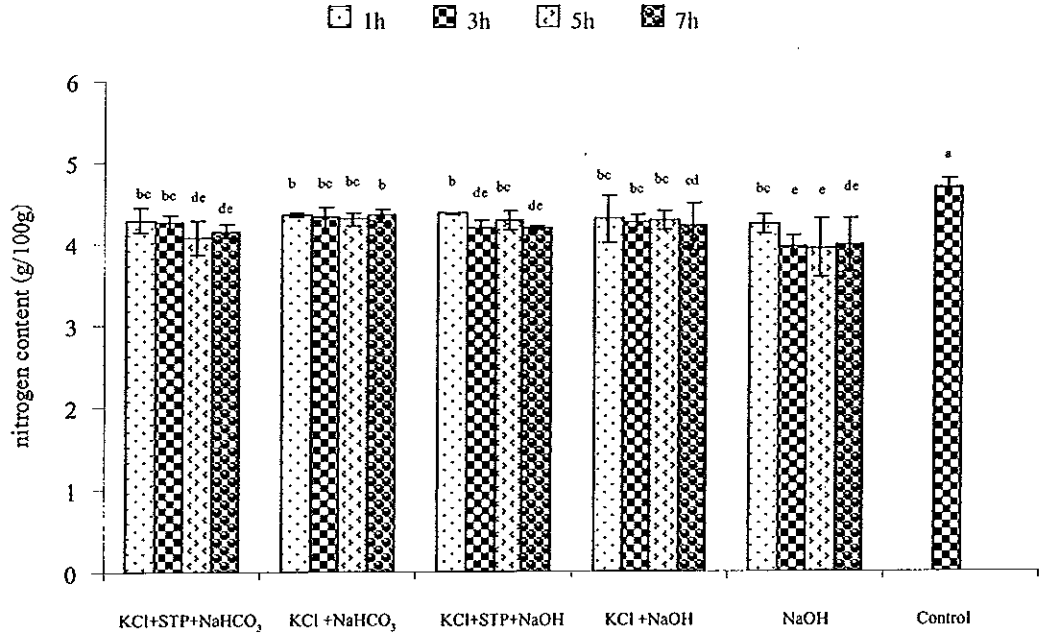
1.2 ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนออกจากวัตถุดิบด้วยสารละลายแตกต่างกัน

1.2.1 ผลของเวลาและชนิดของสารละลายที่ใช้ล้างต่อประสิทธิภาพการล้างโปรตีน

ภาพที่ 3-1 แสดงการลดลงของปริมาณไนโตรเจนของเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายทุกชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงว่าสารละลายที่ใช้มีประสิทธิภาพในการกำจัดโปรตีนอื่นๆออกจากเท้าไก่บด โดยเมื่อเวลาในการล้างเพิ่มขึ้น ปริมาณไนโตรเจนในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ มีแนวโน้มลดลงชัดเจนที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารละลายดังกล่าวมีพีเอชสูงที่สุด (pH= 13.34) (ตาราง 3-2) ทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงมากกว่าสารละลายอื่นๆ โดยที่พีเอชของสารละลายห่างจาก pI ของโปรตีนจะเพิ่มแรงผลักระหว่างประจุของโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น (Damodaran, 1996) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการล้างโปรตีนโดยใช้โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STP) ร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนตและเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ พบว่าการใช้โซเดียมไตรโพลี-ฟอสเฟตร่วมกับโซเดียมไบคาร์บอเนต มีประสิทธิภาพในการล้างกำจัดโปรตีนในเท้าไก่บดสูงกว่าการไม่ใช้โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเมื่อเวลาในการล้างมากกว่า 3 ชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโซเดียม ไบคาร์บอเนต มีประสิทธิภาพในการกำจัดเฮโมโปรตีนและไขมัน (Bonifer and Froning, 1996; Yang and Froning, 1992; Shahidi *et al.*, 1991; Dawson *et al.*, 1988) ส่วนการใช้เกลือร่วมกับฟอสเฟตจะให้ผลเสริมในการสกัดโปรตีนไมโอไฟบริลลา (Maki and Froning, 1987)

เนื่องจากโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตจะช่วยเพิ่มพีเอชและความแรงไอออน ทำให้แอกโตไมโอซีนแยกเป็นแอกตินและไมโอซิน ทำให้เกลือสามารถละลายโปรตีนได้มากขึ้น จึงเพิ่มการสกัดโปรตีนมากขึ้น (Boles *et al.*, 2000 อ้างโดย Trout and Schmidt, 1983) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการล้างโปรตีนโดยใช้โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต (STP) ร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์และเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ พบว่าการใช้โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตร่วมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกจากเท้าไก่บดทั้งนี้เนื่องจากสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มีพีเอชสูง (ตาราง 3-2) ผลของความเป็นด่างอาจบดบังผลของโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการล้างโปรตีนโดยใช้ด่างที่แตกต่างกัน พบว่ากรณีไม่มีโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนของสารละลายด่างทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเมื่อเวลาในการล้างนาน 7 ชั่วโมง ส่วนกรณีที่มีโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบด้วย ประสิทธิภาพการกำจัดโปรตีนออกจากเท้าไก่บดของสารละลายด่างทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกันเฉพาะที่เวลาในการล้าง 1 และ 7 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ทางสถิติถึงอิทธิพลของเวลาและชนิดของสารละลายต่อประสิทธิภาพการล้างโปรตีนโดยใช้ปริมาณไนโตรเจนที่เหลืออยู่ในตัวอย่างเป็นตัวบ่งชี้ พบว่าเวลาและชนิดของสารละลายที่ใช้ล้างมีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่เหลือในเท้าไก่ แต่ไม่มีอิทธิพลร่วมกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) (ตารางภาคผนวก จ1)



ภาพที่ 3-1 ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ) คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Figure 3-1 Nitrogen content (%) remained in ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

g/100 g sample = nitrogen content in 100g of sample before washing

$KCl+STP+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05% $NaHCO_3$

$KCl+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.05% $NaHCO_3$

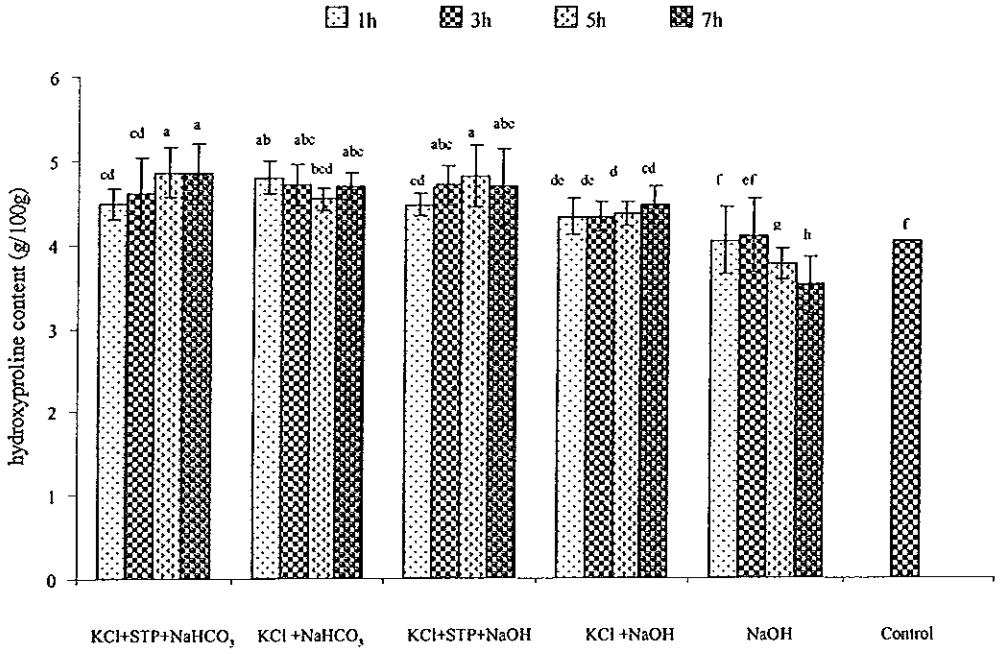
KCl+STP+NaOH = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH

KCl+NaOH = 0.6 M KCl+0.05 M NaOH

NaOH = 0.5 M NaOH

Control = chicken feet before washing

a, b, c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).



ภาพที่ 3-2 ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน (ร้อยละ) คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Figure 3-2 Hydroxyproline content (%) remained in ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

g/100 g sample = hydroxyproline content in 100g of sample before washing

$KCl+STP+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05% $NaHCO_3$

$KCl+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.05% $NaHCO_3$

KCl+STP+NaOH = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH

KCl+NaOH = 0.6 M KCl+0.05 M NaOH

NaOH = 0.5 M NaOH

Control = chicken feet before washing

a, b, c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).

ตาราง 3-2 พีเอชของสารละลายที่ใช้ในการล้างเท้าไก่บด

Table 3-2 pH of solution used for washing the ground chicken feet samples

Solution	pH
0.6 M KCl+0.3% STP+0.05% $NaHCO_3$	8.45
0.6 M KCl+0.05% $NaHCO_3$	8.63
0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH	12.55
0.6 M KCl+0.05 M NaOH	12.47
0.5 M NaOH	13.34

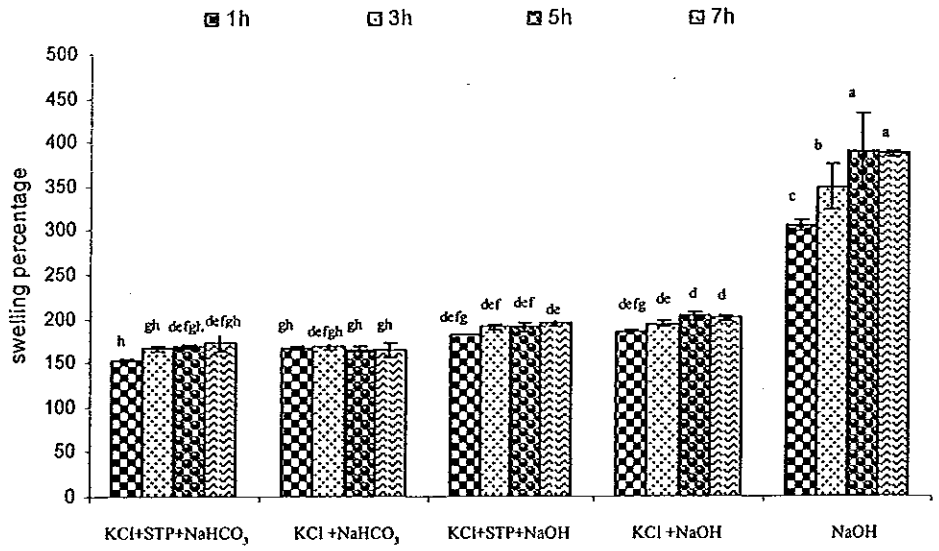
1.2.3 ผลของเวลาและชนิดของสารละลายที่ใช้ล้างต่อการพองตัว

จากภาพที่ 3-3 จะเห็นว่าเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ มีค่าการพองตัวสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายอื่นๆ เนื่องจากสารละลายดังกล่าวมีพีเอชสูงที่สุด โดยที่พีเอชของสารละลายห่างจาก pI ของโปรตีนจะเพิ่มแรงผลักระหว่างประจุของโปรตีน น้ำแทรกเข้าไปในโมเลกุลของโปรตีน ทำให้การพองตัวเพิ่มขึ้น (Damodaran, 1996) เมื่อเปรียบเทียบผลของการใช้โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต(STP) ร่วมกับด่างและเกลือโพแทสเซียมคลอไรด์ต่อการพองตัวของเท้าไก่บด พบว่าสารละลายโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตไม่มีผลต่อการพองตัวของเท้าไก่บดและเท้าไก่บดที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นส่วนประกอบมีค่าการพองตัวสูงกว่าเท้าไก่บดที่ล้างด้วยสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตเป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นด่างแก่ จึงมีค่าการแตกตัวของ OH^- สูงกว่าโซเดียมไบคาร์บอเนตซึ่งเป็นด่างอ่อน ส่งผลให้ค่าพีเอชของสารละลายดังกล่าวสูงกว่า

ผลการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมของเวลาและชนิดของสารละลายที่ใช้ล้างต่อการพองตัวของเท้าไก่บด (ตารางภาคผนวก จ3) พบว่าเวลาและชนิดของสารละลายมีผลต่อการพองตัวและเกิดอิทธิพลร่วมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) กล่าวคือ การพองตัวของเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายทั้งหมดคงที่เมื่อเวลาในการล้างเพิ่มขึ้น ยกเว้นการพองตัวของเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ (0.5M NaOH) ที่มีแนวโน้มสูงขึ้น (ภาพภาคผนวก จ3)

เมื่อพิจารณาสภาวะที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดไนโตรเจนออกจากตัวอย่างมากที่สุด ในขณะที่สูญเสียไฮดรอคซี่โพรลีนน้อยที่สุด พบว่าเท้าไก่ที่ล้างด้วยสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมคลอไรด์กับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตและโซเดียมไบคาร์บอเนตที่เวลาในการล้าง 5 กับ 7 ชั่วโมง กับสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมคลอไรด์กับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตและ

โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เวลาในการล้าง 3 กับ 7 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพการล้างโปรตีนไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากสารละลายผสมระหว่างโพแทสเซียมคลอไรด์กับโซเดียมไตรโพลีฟอสเฟตและโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เวลาในการล้าง 3 ชั่วโมงมีการพองตัวสูงกว่า ดังนั้นจึงเลือกใช้สารละลายดังกล่าวในการล้างตัวอย่างก่อนการทำให้พองตัวด้วยกรดในขั้นตอนต่อไป ในขณะเดียวกันสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ ซึ่งมีผลชะล้างโปรตีนมากที่สุด แต่ทำให้เกิดการพองตัวสูงสุด ดังนั้นจึงเลือกสภาวะดังกล่าวในการเตรียมตัวอย่างด้วยการล้างและทำให้พองตัวด้วยด่าง



ภาพที่ 3-3 การพองตัว (ร้อยละ) ของตัวอย่างเท้าไก่ที่ผ่านการล้างด้วยสารละลาย 5 ชนิดที่แตกต่างกันที่ เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Figure 3-3 Swelling power (%) of ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

$KCl+STP+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05% $NaHCO_3$

$KCl+NaHCO_3$ = 0.6 M KCl+0.05% $NaHCO_3$

KCl+STP+NaOH = 0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH

KCl+NaOH = 0.6 M KCl+0.05 M NaOH

NaOH = 0.5 M NaOH

a, b, c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).

2. สภาวะที่เหมาะสมของการใช้กรดต่อประสิทธิภาพการสกัดเจลาตินโดยใช้ Response Surface Methodology (RSM)

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้พองตัวด้วยการใช้กรดฟอสฟอริกที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-5 เวลาในการแช่ 6-48 ชั่วโมงและอุณหภูมิ 10-30 องศาเซลเซียส (ตาราง 2-1) โดยใช้ Response Surface Methodology (RSM) พบว่าสมการจำลองของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้และการพองตัวมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square) เท่ากับ 0.7998 และ 0.8424 (ตาราง 3-3) ซึ่งอาจอธิบายได้ว่าปริมาณโปรตีนและการพองตัวเป็นผลมาจากอิทธิพลของอุณหภูมิ เวลาและความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกที่ใช้แช่ร้อยละ 79.98 และ 84.24 ตามลำดับ ส่วนที่เหลืออีก 20.02 และ 15.76 เป็นผลจากตัวแปรอื่นๆที่ไม่ทราบ สมการที่มีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจสูงย่อมมีความแม่นยำของการนำสมการไปใช้เพื่อทำนายหรือคาดคะเนผลลัพธ์สูง โดยทั่วไปสมการที่นำไปใช้ควรมีค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจอย่างน้อย 0.75 (Haaland 1989; Hu, 1999 อ้างโดยอิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล, 2544) เมื่อนำสมการโพลีโนเมียลกำลังสอง (quadratic polynomial equation) (ตาราง 3-4) ของปริมาณโปรตีนและการพองตัวมาสร้างแผนภาพคอนทัวร์ โดยกำหนดให้อุณหภูมิเป็นตัวแปรคงที่ เนื่องจากอุณหภูมิไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนและการพองตัว (ตารางภาคผนวก ง2 และ ง4 ตามลำดับ) พบว่าปริมาณโปรตีนส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 35.82-40.38 กรัม และมีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเวลาในการแช่นานขึ้นในช่วง 32-48 ชั่วโมง โดยความเข้มข้นของกรดในช่วงร้อยละ 1.2-5 ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ ส่วนการพองตัวมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นกรดเพิ่มขึ้นในช่วงร้อยละ 2.6-3.2 โดยเวลาในการแช่ไม่มีผลต่อค่าการพองตัว ดังภาพภาคผนวก ง1 และง2 ตามลำดับ เมื่อนำแผนภาพคอนทัวร์มาซ้อนทับกันจะได้สภาวะร่วมที่มีปริมาณโปรตีนและการพองตัวมากกว่า 40 กรัมจากตัวอย่างเริ่มต้น 70 กรัม และร้อยละ 290 ตามลำดับ (ภาพภาคผนวก ง3) เมื่อสุ่มบางจุดจากสภาวะร่วมที่ได้ ได้แก่ 2.47% 20 °C 46h 28min, 2.57% 20 °C 47h 54 min, 2.14% 20 °C 47h 54 min และ 2.40% 20 °C 47h 19 min มาทดสอบความแม่นยำของสมการ โดยทำการทดลองตามสภาวะข้างต้น พบว่าค่าที่ได้จากการทดลองกับค่าที่ได้จากการคำนวณมีค่าต่างกันต่ำกว่าร้อยละ 10 (ตารางที่ 3-5) จึงเลือกใช้สมการดังกล่าวในการกำหนดสภาวะที่เหมาะสม คือสภาวะที่มีโปรตีนสูงสุดและค่าการพองตัวสูงสุดได้แก่ แช่ด้วยกรดฟอสฟอริกร้อยละ 2.14 เวลา 47h 54 min อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองขั้นตอนต่อไป

ตาราง 3-3 ค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจและผลการทดสอบทางสถิติของสมการจำลองและความบกพร่องของสมการจำลอง

Table 3-3 Coefficient of determination (R^2) and significant test results for lack of fit and model

Response	R-Squared	Lack of fit	Model
protein	0.7998	0.4524	0.0146*
swelling	0.8424	0.5963	0.0051*

* significant level ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3-4 สมการจำลองสำหรับขั้นตอนการทำให้พองตัวในการสกัดเจลาตินจากเท้าไก่

Table 3-4 Response surface model for swelling process of gelatin extraction from chicken feet

Response	Equation
Swelling (Y_1)	Y_1= +362.34820 -0.15935*temp-1.24562*time -40.77909conc. +3.48259E-003*temp^2+0.018022*time^2+5.47260*conc.^{2} +0.021517*temp*time -0.30235*temp*conc. +0.043445*time*conc.
Protein content (Y_2)	Y_2= +60.17094 -1.57992*temp-1.52073*time +5.61556conc. +0.024516*temp^2 +0.014994*time^2-1.16562*conc.^{2} +0.027383*temp*time -0.015231*temp*conc. +0.077899*time*conc.

ตารางที่ 3-5 เปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและร้อยละการพองตัวของตัวอย่างเท้าไก่ที่ผ่านการทดลองแช่ที่สภาวะที่เลือกแล้วและที่ได้จากการทำนายโดยสมการจำลอง

Table 3-5 Comparison of predicted and observed values for protein content and swelling power of chicken feet samples

condition	Swelling power (%)			Protein content (%)		
	Predicted value	Observed value[A]	Difference (%)	Predicted value	Observed value[A]	Difference (%)
2.47%P 46h 28 min	284.31	287.33±4.15[b]	1.06	42.00	40.51±0.1[ab]	3.55
2.57%P 47h 54 min	284.00	288.11±9.36[b]	1.45	43.28	40.77±0.42[a]	5.80
2.14%P 47h 54 min	292.16	305.45±6.57[a]	4.55	41.49	40.80±0.07[a]	1.66
2.40%P 47h 19 min	286.40	308.65±2.51[a]	7.77	42.25	40.10±0.06[b]	5.09

[A] Mean± S.D. from triplicate determination

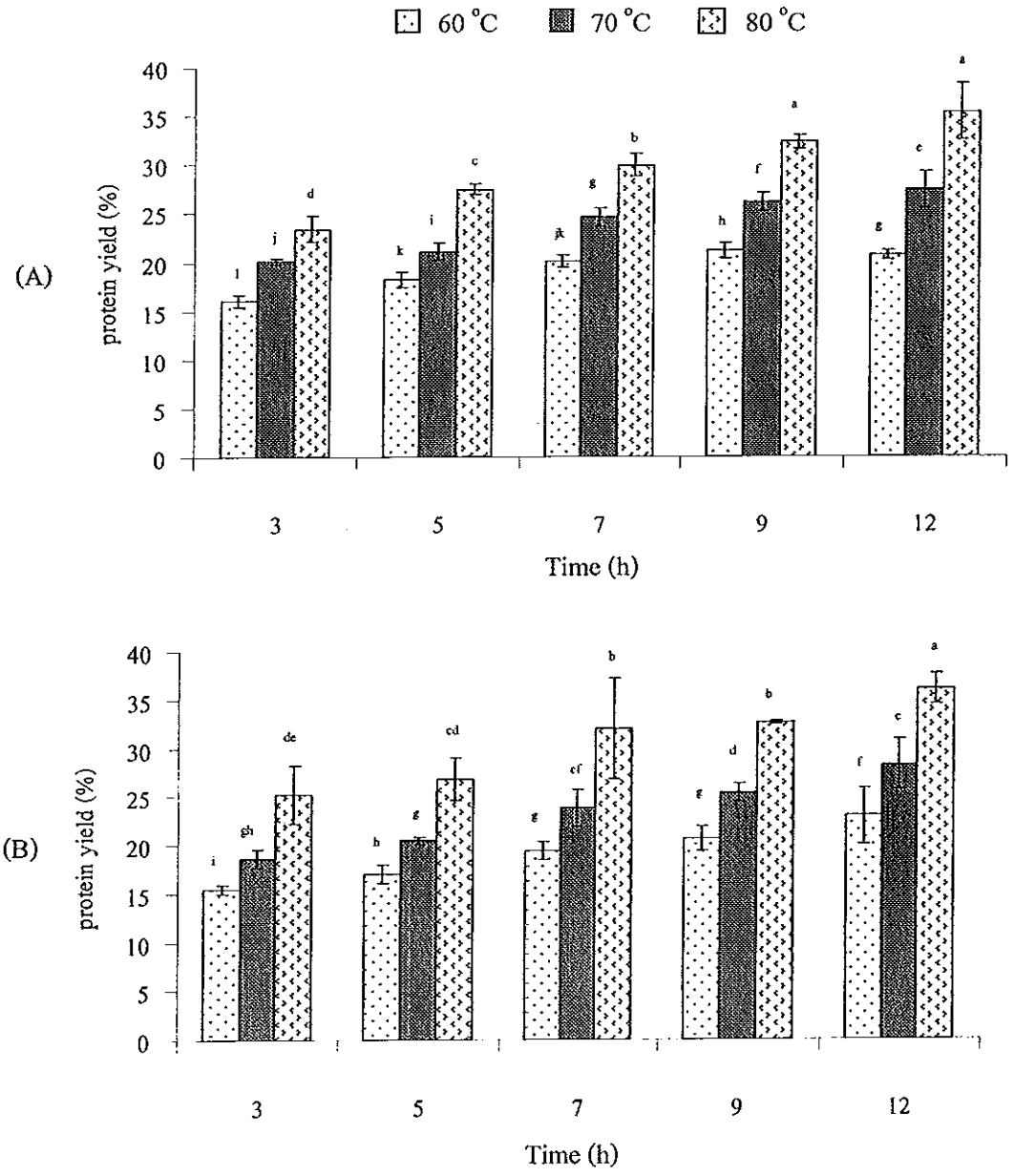
[a, b] Mean in the same column with the different superscript are significantly different ($p<0.05$).

3. ผลของอุณหภูมิและเวลาในการสกัดเจลาตินต่อผลผลิตและสมบัติที่สำคัญของเจลาติน

3.1 ผลของเวลาและอุณหภูมิในการสกัดต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีน

จากภาพที่ 3-4 และ 3-5 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนจากเท้าไก่ที่เตรียมด้วยกรดหรือด่างมีค่าสูงขึ้นเมื่อเวลาและอุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น เนื่องจากเมื่อเวลาและอุณหภูมิสูงขึ้น การสลาย (break down) ของเส้นใยคอลลาเจนจะมากขึ้นเจลาตินจึงถูกสกัดออกมามากขึ้น (Linus *et al.*, 1997) เมื่อเปรียบเทียบอิทธิพลของการเตรียมตัวอย่างต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีน พบว่าประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนของเจลาตินที่เตรียมด้วยกรดและด่างมีค่าใกล้เคียงกัน ที่เวลาและอุณหภูมิเดียวกัน

จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติถึงอิทธิพลของเวลาและอุณหภูมิในการสกัดต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีน จากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด (0.6 M KCl+0.3% STP+0.05 M NaOH และ 2.14% phosphoric acid) หรือด่าง (0.5 M NaOH) (ตารางภาคผนวก จ4 และ จ5) พบว่าเวลาและอุณหภูมิในการสกัดตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีน และมีอิทธิพลร่วมกัน ($p<0.05$) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่การสกัดที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (ภาพที่ ภาคผนวก จ4 และ จ5) ส่วนการสกัดตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง เวลาและอุณหภูมิมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและ ไฮดรอคซี่โพรลีน แต่อุณหภูมิและเวลามีอิทธิพลร่วมเฉพาะต่อประสิทธิภาพการสกัดไฮดรอคซี่โพรลีน (ตารางภาคผนวก จ6 และ จ7) โดยพบว่าประสิทธิภาพในการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น ในขณะที่ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น (ภาพที่ภาคผนวก จ7)

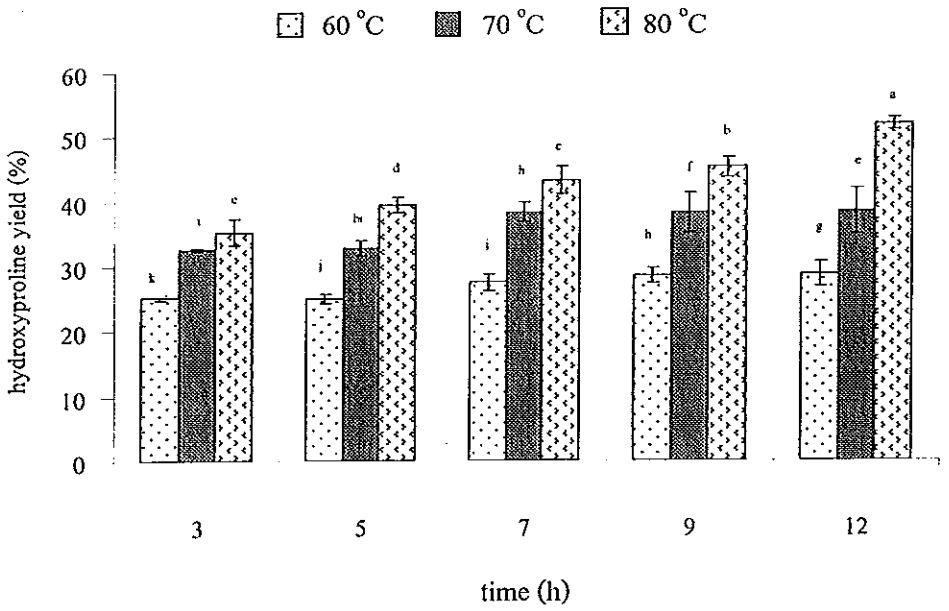


ภาพที่ 3-4 ผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-12 ชั่วโมง

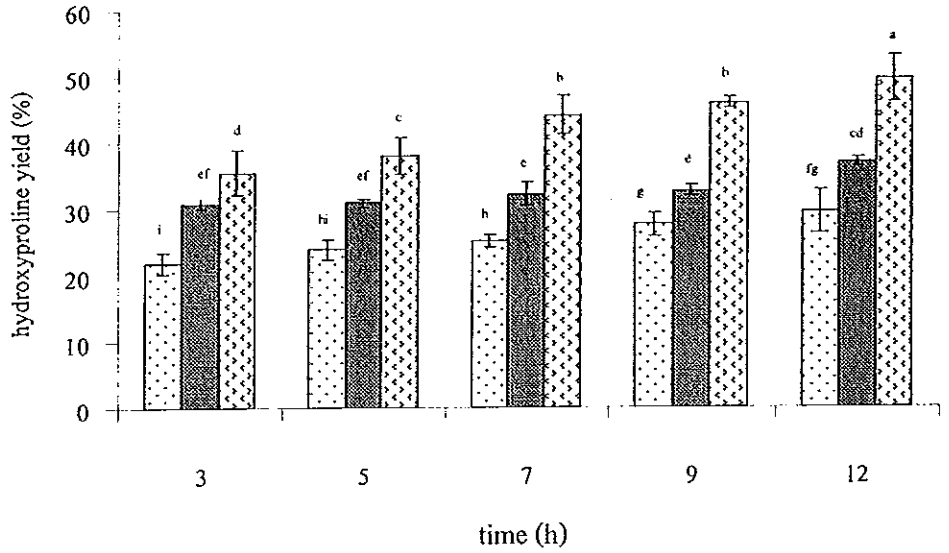
Figure 3-4 Protein yield from extraction of acid (A) or alkali (B) swollen ground chicken feet at 60-80 °C for 3-12 hours

a,b,c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).

(A)



(B)



ภาพที่ 3-5 ผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) แล้วสกัดที่อุณหภูมิ 60 - 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3-12 ชั่วโมง

Figure 3-5 Hydroxyproline yield from extraction of acid (A) or alkali (B) swollen ground chicken feet at 60-80°C for 3-12 hours

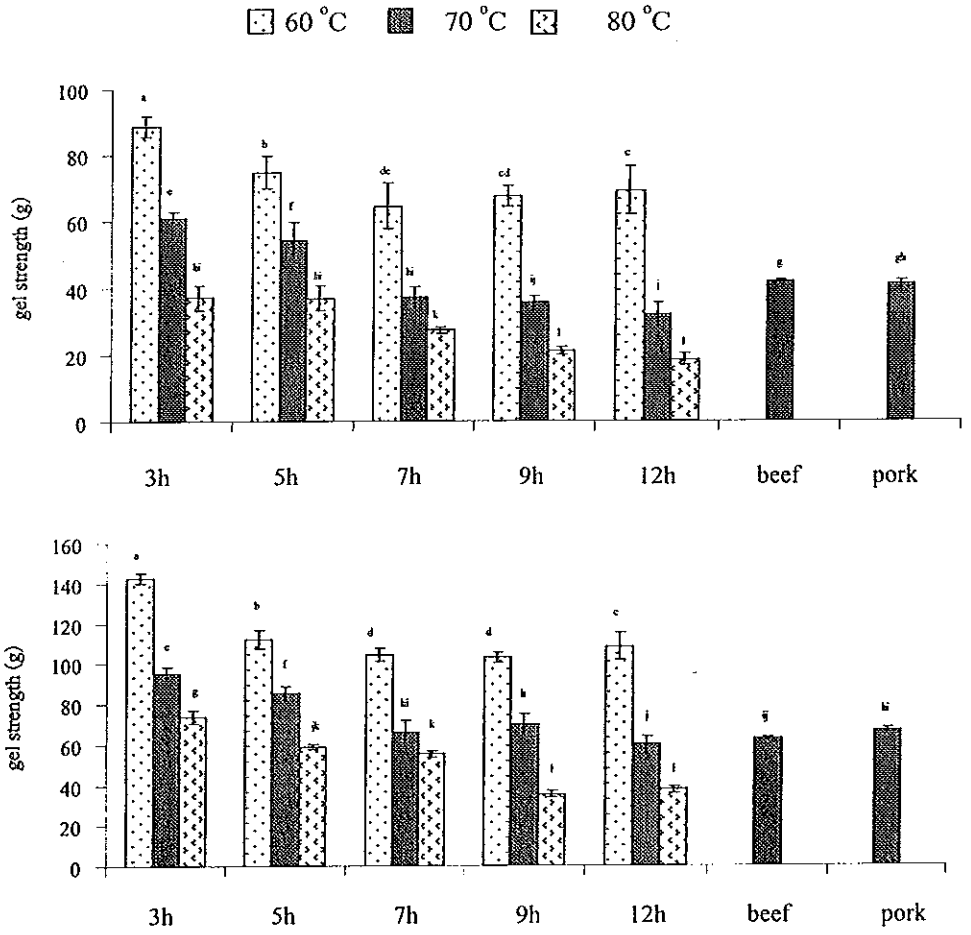
a,b,c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).

3.2 ผลของเวลาและอุณหภูมิในการสกัดต่อความแข็งแรงของเจลและรูปแบบโปรตีนของเจลาตินที่สกัดได้

การศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิต่อความแข็งแรงเจลโดยนำสารละลายเจลาตินที่สกัดได้มาปรับความเข้มข้นให้เท่ากัน คือ 160 mg/ml สำหรับเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดและ 200 mg/ml สำหรับเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง พบว่าเวลาและอุณหภูมิในการสกัดตัวอย่างทั้งสองชนิดมีผลต่อความแข็งแรงของเจล และมีอิทธิพลร่วมกัน ($p<0.05$) (ตารางภาคผนวก จ8 และ จ9) ที่เวลาในการสกัดเท่ากัน เจลาตินจากการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสมีความแข็งแรงของเจลต่ำสุด และที่อุณหภูมิในการสกัดเดียวกัน ความแข็งแรงเจลของเจลาตินที่สกัดได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาในการสกัดนานขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อเวลาเพิ่มจาก 3-7 ชั่วโมง (ภาพที่ 3-6) ทั้งนี้เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิในการสกัดสูงขึ้น โปรตีนถูกทำลายเป็นสายสั้นลง ทำให้ความแข็งแรงของเจลต่ำลง (Cho *et al.*, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Linus และ Rakesh (1997) พบว่าเจลาตินที่สกัดจากเศษเนื้อโครงกระดูกไก่งวงแยกด้วยเครื่องจักร (Mechanically deboned turkey residue) ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสมีความแข็งแรงของเจลต่ำกว่าเจลาตินจากการสกัดที่อุณหภูมิ 55 หรือ 70 องศาเซลเซียส

เมื่อศึกษาผลของเวลาและอุณหภูมิในการสกัดต่อรูปแบบของโปรตีนที่สกัดได้ พบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 60 และ 70 องศาเซลเซียสเวลา 3-12 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการตัดย่อยเปปไทด์หลักของโปรตีนทั้งเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดและด่าง เนื่องจากรูปแบบของสายเปปไทด์หลักที่สกัดได้อันประกอบด้วยแถบสาย แอลฟา เบต้า และแกมม่ามีลักษณะไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3-7) ส่วนการสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส มีผลย่อยสลายเปปไทด์ส่วนเบต้าของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด และมีผลตัดย่อยทั้งส่วนเบต้าและแกมม่า ของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างโดยเฉพาะที่เวลา 9 และ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 3-7) ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนได้รับความร้อนมากเกินไป พันธะต่างๆจึงถูกทำลาย

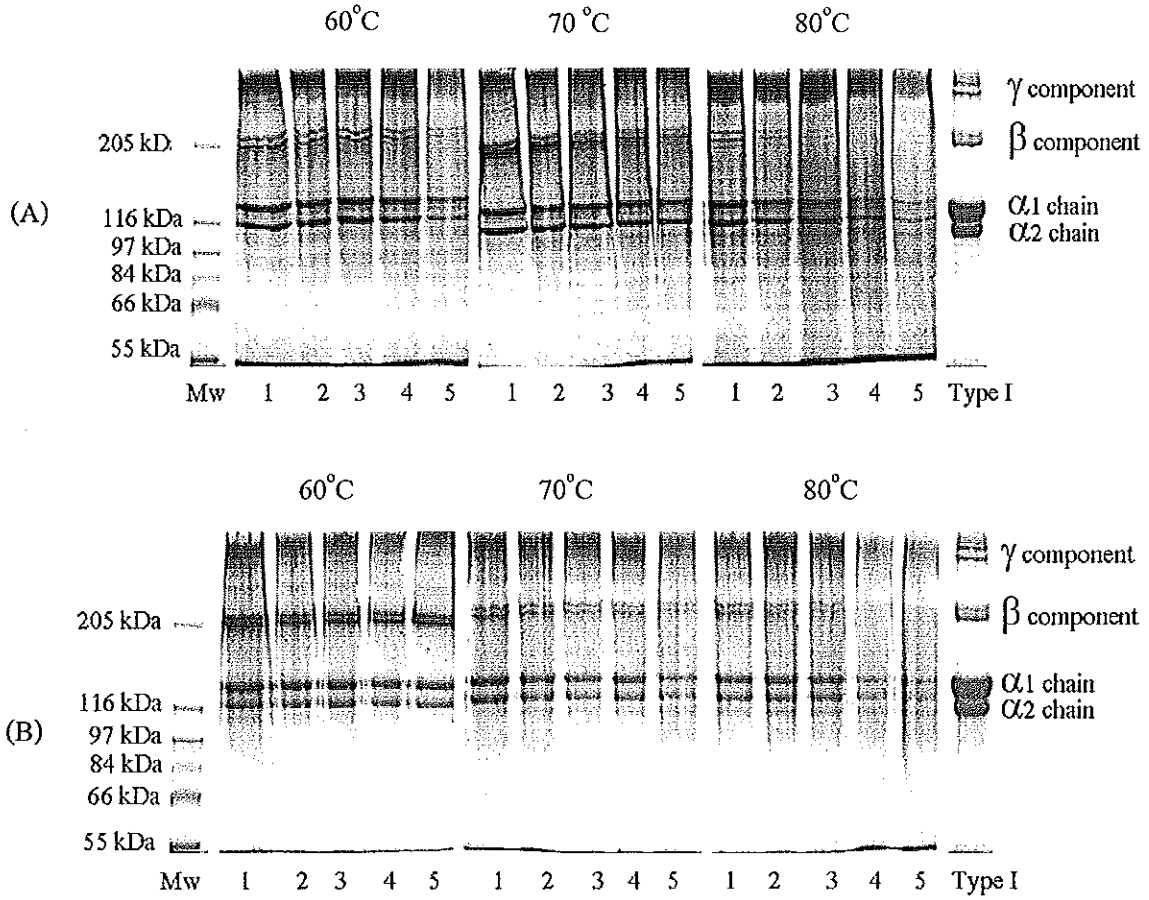
เมื่อพิจารณาผลการทดลองข้างต้นจึงเลือกสภาวะในการสกัด 2 สภาวะ โดยสภาวะแรกพิจารณาความแข็งแรงของเจลที่เทียบเท่ากับความแข็งแรงเจลของเจลาตินทางการค้าที่พีเอชและความเข้มข้นเท่ากันคือการสกัดที่ 70 องศาเซลเซียส 5 ชั่วโมง และสภาวะที่สองพิจารณาผลผลิตโปรตีนและไฮดรอคซี่โพรลีนสูงสุด ซึ่งได้แก่การสกัดที่ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง สภาวะที่เลือกนำไปใช้เตรียมตัวอย่างเจลาตินเพื่อตรวจสอบสมบัติเปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้าต่อไป



ภาพที่ 3-6 ความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) (ที่ความเข้มข้นโปรตีน 160 mg/ml พีเอช 4.8) หรือด่าง (B) (ที่ความเข้มข้น 200 mg/ml พีเอช 7.0) และสกัดที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส เวลา 3-12 ชั่วโมง

Figure 3-6 Gel strength (g) of chicken feet gelatin extracted at 60-80 °C for 3-12 hours from acid treated sample (A) (at 160 mg/ml pH 4.8) and alkali treated sample (B) (at 200 mg/ml pH 7.0)

a,b,c Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).



ภาพที่ 3-7 รูปแบบเปปไทด์ของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) แล้วสกัดที่ 60 70 และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 3-12 ชั่วโมง (lane 1-5) เปรียบเทียบกับคอลลาเจน Type I (Type I) จากเท้าไก่และโปรตีนมาตรฐาน (Mw)

Figure 3-7 Electrophoregram of peptides of gelatins from acid (A) or alkali (B) treated chicken feet extracted at 60 70 and 80 °C for 3, 5, 7, 9 and 12 hours (Lane 1-5, respectively) compared to collagen Type I from chicken feet (Type I) and high molecular weight marker (Mw)

4. ผลผลิตและสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้กับเจลาตินทางการค้า

4.1 ผลผลิตโปรตีน (Protein yield)

ข้อมูลจากตารางที่ 3-6 แสดงให้เห็นว่าการสกัดที่อุณหภูมิสูงให้ปริมาณผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้สูงกว่า (ร้อยละ 44.03-51.21) การสกัดที่อุณหภูมิต่ำ (ร้อยละ 25.32-33.04) โดยปริมาณผลผลิตโปรตีนของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างมีค่าสูงกว่าของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด ซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองที่ได้ข้อ 3.1 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปริมาณตัวอย่างที่ใช้สกัดมีปริมาณมาก จึงเห็นความแตกต่างมากขึ้น

ในการศึกษาผลของสภาวะในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้จากตัวอย่างเท้าไก่นี้ ใช้ค่าปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้แทนค่าโปรตีน เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดจากความแตกต่างของ แฟกเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดและด่าง นอกจากนี้ใช้การคำนวณผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้แทนการคำนวณผลผลิตในรูปน้ำหนักของเจลาตินผงที่ผลิตได้ เพื่อลดปัญหาค่าคลาดเคลื่อนอันเกิดจากการสูญเสียในขั้นตอนการทำให้เข้มข้นและการทำแห้ง

ตารางที่ 3-6 ปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็น เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

Table 3-6 Nitrogen recovery of gelatin extracted from acid (A) or alkali (B) treated chicken feet at 70°C for 5 hours or 80°C for 12 hours

Gelatin	Nitrogen recovery (%)[A]
A70	25.32±0.00[d]
A80	44.03±1.73[b]
B70	33.04±3.67[c]
B80	51.21±3.12[a]

[A] Means± S.D. from triplicate determination

[a,b,c,d] Means with the different superscript are significantly different ($p<0.05$).

Nitrogen recovery (%) = extracted nitrogen*100/nitrogen content in raw material

4.2 องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ผลิตได้

องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจากเท้าไก่เปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้าซึ่งผลิตจากหนังโคและสุกร ในตารางที่ 3-7 แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีนของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ผลิตได้ทุกตัวอย่าง และปริมาณโปรตีนของเจลาตินทางการค้ามีค่าใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) แต่เจลาตินจากเท้าไก่มีปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนสูงกว่าเจลาตินทางการค้า ($p<0.05$) (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าเจลาตินจากเท้าไก่ที่ผลิตได้มีความบริสุทธิ์ของโปรตีนคอลลาเจนสูงกว่าเจลาตินทางการค้า ปริมาณเถ้าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งบ่งบอกถึงความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์เจลาติน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เจลาตินจากเท้าไก่ที่เตรียมโดยการแช่กรด (A70 และA80) มีปริมาณเถ้าสูงกว่าเจลาตินที่เตรียมโดยการแช่ด่าง (B70 และ B80) และเจลาตินทางการค้า ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากปริมาณกระดูกคงเหลือในตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด้วยกรดนั้นมีมากกว่าในตัวอย่างที่ผ่านการแช่ด่างซึ่งกระดูกร่อนหลุดไปมาก ร่วมกับค่าพีเอชต่ำระหว่างการสกัด ตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดจึงส่งเสริมการละลายของแคลเซียมจากกระดูกสู่สารสกัด อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาองค์ประกอบหลัก คือ ปริมาณโปรตีน ความชื้น เถ้าและไขมันของเจลาตินผงที่ผลิตได้มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 94.81-96.00 (โดยน้ำหนักเปียกและใช้แฟกเตอร์ 6.25) 10.51-13.98 0.33-1.96 และ 0.18-0.65 ตามลำดับ พบว่าเป็นปริมาณที่อยู่ในช่วงกำหนดโดยมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมญี่ปุ่น (K6503-1996) คือ ปริมาณโปรตีนมากกว่าร้อยละ 85 เถ้าน้อยกว่าร้อยละ 2 ความชื้นร้อยละ 8-14 และไขมันและอื่นๆ น้อยกว่าร้อยละ 1 (Japanese Industrial Standard อ้างโดย Cho *et al.*, 2004)

ตารางที่ 3-7 องค์ประกอบทางเคมีของเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) โดยสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)

Table 3-7 Chemical composition of gelatin extracted from acid (A) or alkali (B) pretreated at 70°C for 5 hours or 80 °C for 12 hours compared to beef and pork skin gelatins

gelatin	Proximate composition* (% wet basis)				Hydroxyproline[1]
	protein**[1]	fat	ash	moisture	
A 70	93.70±0.30^{c}	0.65±0.03^{a}	1.71±0.16^{b}	10.51±0.10^{d}	19.54±1.01^{bc}
A 80	93.76±1.43^{c}	0.25±0.02^{e}	1.96±0.10^{a}	11.23±0.81^{c}	20.21±0.97^{ab}
B 70	97.22±1.86^{ab}	0.22±0.02^{cd}	0.33±0.00^{e}	13.98±0.32^{a}	20.92±0.90^{a}
B 80	95.81±1.32^{abc}	0.18±0.00^{d}	0.35±0.01^{e}	12.76±0.14^{b}	19.31±0.72^{c}
Beef	97.94±0.53^{a}	0.56±0.04^{b}	0.38±0.01^{e}	12.46±0.12^{b}	18.20±0.48^{d}
pork	95.07±1.43^{bc}	0.70±0.04^{a}	0.47±0.03^{e}	13.89±0.01^{a}	18.50±0.85^{d}

* Mean ± S.D. from triplicate determination

** The conversion factor for calculation from nitrogen was 5.46 and 5.51 for acid and alkali swollen, respectively. (Leach and Eastoe, 1977)

[1] values calculated in dry basis

^{a,b,c,d} Means in the same column with the different superscript are significantly different ($p<0.05$).

4.3 พีเอชของสารละลายเจลาติน

จากผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชของสารละลายเจลาตินในตารางที่ 3-8 พบว่าพีเอชของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดมีค่า 4.36-4.56 ส่วนพีเอชของสารละลายเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างมีค่า 6.17-6.21 ในขณะที่พีเอชของสารละลายเจลาตินทางการค้ามีค่า 5.26-5.39 เนื่องจากพีเอชของสารละลายเจลาตินขึ้นอยู่กับพีเอชเริ่มต้นของตัวอย่างก่อนสกัด ดังนั้นจึงแสดงว่าการล้างกรดหลังการแช่ไม่สมบูรณ์ ทำให้ค่าพีเอชระหว่างการสกัดอยู่ในช่วงกรด ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องถึงปริมาณผลผลิตและสมบัติของเจลาตินที่สกัดได้ อย่างไรก็ตามค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์เจลาตินที่ได้อยู่ในช่วงพีเอชของเจลาติน Type A และ B ทางการค้าคือ 3.8-5.0 และ 4.7-7.5 ตามลำดับ (Jones, 1977)

ตารางที่ 3-8 พีเอชของสารละลายเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวด้วยกรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)

Table 3-8 pH of gelatin solution extracted from acid (A) or alkali (B) pretreated at 70°C for 5 hours or 80°C for 12 hours compared to beef and pork skin gelatins

Gelatin solution 1%	pH*
A 70	4.36 ± 0.00^{f}
A 80	4.56 ± 0.01^{e}
B70	6.17 ± 0.01^{b}
B 80	6.21 ± 0.01^{a}
beef	5.39 ± 0.00^{c}
pork	5.26 ± 0.00^{d}

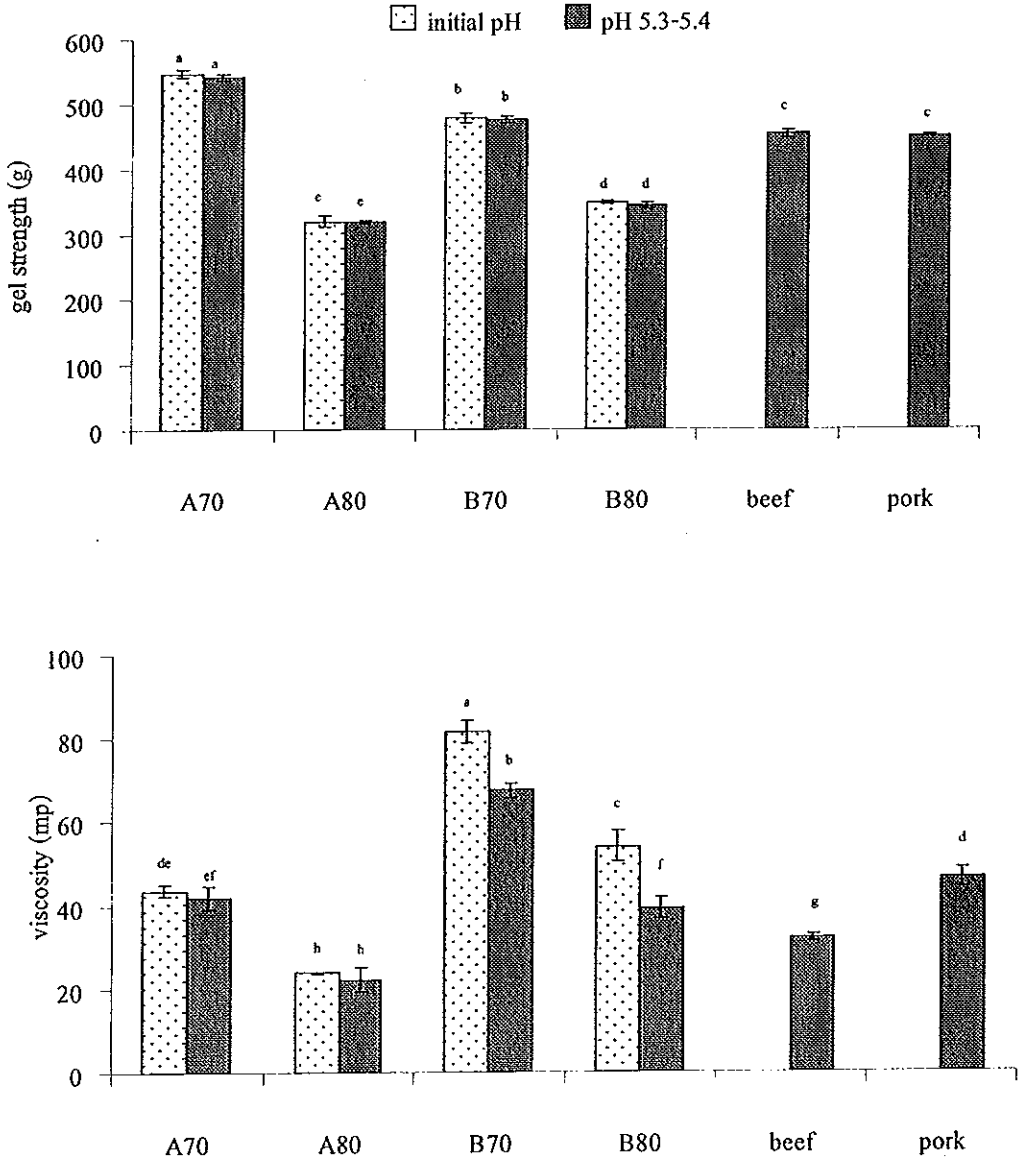
* Mean± S.D. from triplicate determination

[a,b,c,d] Means with the different superscript are significantly different ($p<0.05$)

4.4 ความแข็งแรงเจลและความหนืด

ความแข็งแรงเจลและความหนืดของเจลาตินที่สกัดได้จากเท้าไก่บดที่ผ่านการทำให้พองตัวด้วยกรดหรือด่าง แล้วสกัดที่สภาวะต่างกันในภาพที่ 3-8 แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิในการสกัด (70 หรือ 80 องศาเซลเซียส) มีผลต่อความแข็งแรงเจลและความหนืดของเจลาตินที่สกัดได้ โดยเจลาตินทั้งที่เตรียมด้วยกรดหรือด่างแล้วสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (A70 และ B70) มีความแข็งแรงเจลและความหนืดสูงกว่าเจลาตินที่สกัดที่ 80 องศาเซลเซียส (A80 และ B80) เนื่องจากที่อุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้นมีผลตัดย่อยโปรตีนเป็นสายสั้นๆมากขึ้น ทำให้ความแข็งแรงเจลและความหนืดลดลง (Cho *et al.*, 2005; Linus and Rakesh, 1997) เมื่อเปรียบเทียบผลของการเตรียมตัวอย่างต่อความแข็งแรงเจลและความหนืดของเจลาติน พบว่าที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด (A70) มีความแข็งแรงของเจลสูงกว่า แต่มีความหนืดต่ำกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง (B70) ทั้งนี้อาจเนื่องจากเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างมีสัดส่วนของโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง β และ γ มากกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด (ภาพที่ 3-9) Stainsby (1977) อธิบายว่าขนาดโมเลกุลมีผลต่อการเกิดเจลของเจลาติน โดยโมเลกุลขนาด 15,000 ดาลตัน เป็นขนาดสั้นที่สุดที่สามารถเกิด

เจลได้ ความสามารถและคุณสมบัติของเจลจะดีขึ้นเมื่อขนาดโมเลกุลเพิ่มขึ้นจนถึง 90,000 ดาลตัน เมื่อโมเลกุลขนาดใหญ่กว่าที่กล่าวนี้ มักมีผลลดความแข็งแรงเจลลง ทั้งนี้เนื่องจากเจลาตินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงประกอบด้วยโพลีเปปไทด์หลายสายที่เชื่อมกันด้วยพันธะโควาเลนซ์ ซึ่งช่วยทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโซ่ภายในโมเลกุลเดียวกันเมื่อระบบเย็นลง ด้วยเหตุนี้จึงเป็นการลดโอกาสการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุล ซึ่งมีผลต่อการสร้างโครงข่ายของโปรตีน ทำให้ความแข็งแรงของเจลลดลง นอกจากนี้ Cole (2002) รายงานว่าขนาดของแถบโปรตีนแอลฟา เป็นปัจจัยกำหนดความแข็งแรงเจล ส่วนแถบโปรตีนเบต้าและแกมม่า ส่งเสริมความหนืดมากกว่าความแข็งแรงเจล สำหรับเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างมีความแข็งแรงเจลและความหนืดสูงกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดเมื่อสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส อาจมีผลจากสัดส่วนน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน ภาพที่ 3-9 แสดงแถบโปรตีนแอลฟา เบต้าและแอลฟาของโปรตีนในเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างชัดเจนกว่าในเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด ซึ่งแทบมองไม่เห็นแถบโปรตีนอยู่เลย การที่โปรตีนมีลักษณะเป็นสายสั้นๆจะทำให้ความสามารถในการจับเกาะเกี่ยวกันของโปรตีนในการเกิดเจลมีน้อย ทำให้ความแข็งแรงเจลต่ำ (Gomez-Guillen *et al.*, 2002) นอกจากสภาวะในการสกัดมีผลต่อความแข็งแรงเจลและความหนืดแล้ว เมื่อนำเจลาตินจากเท้าไก่มาปรับพีเอชให้ใกล้เคียงกับพีเอชของเจลาตินทางการค้า (พีเอช 5.3-5.4) พบว่าพีเอชในช่วงดังกล่าวไม่มีผลต่อความแข็งแรงเจล ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Ledward (2003) ที่ว่าพีเอชในช่วง 4-9 ไม่มีผลต่อความแข็งแรงเจล แต่มีผลต่อความหนืดของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง โดยพบว่าความหนืดของเจลาตินลดลงเมื่อปรับพีเอชจาก 6.21-6.16 เป็น 5.4-5.5 ซึ่งขัดแย้งกับการรายงานของ Cho และคณะ (2006) ที่ว่าโดยทั่วไปเจลาตินส่วนใหญ่จะมีความหนืดต่ำที่พีเอช 6-8 ทั้งนี้อาจเนื่องจากแหล่งของเจลาตินและสภาวะการผลิตแตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสทั้งสองชนิด (A70 และ B70) มีความแข็งแรงเจลสูงกว่าเจลาตินทางการค้าจากโคและสุกร บ่งชี้ว่าเจลาตินที่สกัดได้ในสภาวะดังกล่าวสามารถทดแทนเจลาตินทางการค้าได้



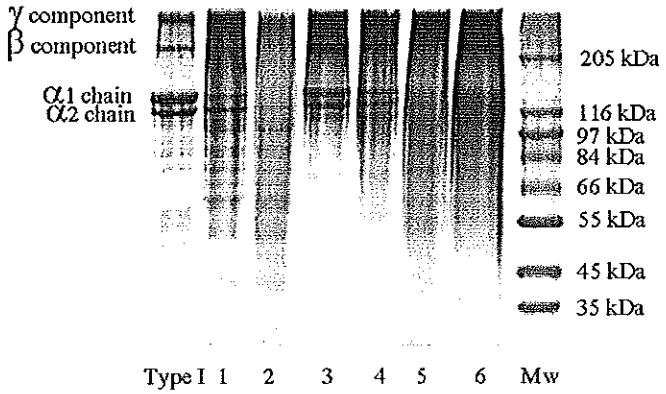
ภาพที่ 3-8 ความแข็งแรงเจลและความหนืดของสารละลายเจลาตินจากเท้าไก่ที่ทำให้พองตัวโดยการแช่กรด (A) หรือด่าง (B) และ สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)

Figure 3-8 Gel strength and viscosity of gelatin solution from chicken feet produced from acid (A) or alkali (B) swollen and extracted at 70°C for 5 hours or 80 °C for 12 hours compared to beef and pork skin gelatins

a,b,c,d Different letters on data bar denote the significant difference ($p<0.05$).

4.5 รูปแบบของโปรตีน

จากการศึกษาผลของสภาวะในการสกัดต่อรูปแบบของโปรตีนในตัวอย่างเจลาตินผงที่สกัดได้ เปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้าโดยใช้เทคนิคเจลอิเล็กโตรโฟริซิส (PAGE) พบว่าเจลาตินจากเท้าไก่ที่เตรียมด้วยกรดและด่างมีรูปแบบโปรตีนแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเจลาตินจากการสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (A70 และ B70) ปรากฏแถบโปรตีนแอลฟา 1 และ 2 และเบต้าและแกมม่าชัดเจนกว่าเจลาตินจากการสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ส่วนแถบโปรตีนของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างและสกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (B80) ปรากฏแถบโปรตีนดังกล่าวเล็กน้อย แต่ชัดเจนกว่าแถบโปรตีนของเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด (A80) ซึ่งแทบจะไม่มีแถบโปรตีนดังกล่าวอยู่เลยเช่นเดียวกับเจลาตินทางการค้า อันเป็นผลมาจากสภาวะพีเอชในการสกัดจากข้อ 4.2 สภาพพีเอชในการสกัดตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรดมีค่าต่ำกว่าพีเอชการสกัดตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง ส่วนเจลาตินทางการค้ามีสภาวะการสกัด การทำให้เข้มข้นและการทำแห้งที่ต่างไปจากการทดลอง และอาจมีผลต่อลักษณะแถบโปรตีนของเจลาตินที่สกัดได้



ภาพที่ 3-9 รูปแบบเปปไทด์ของเจลาตินจากเท้าไก่และเจลาตินทางการค้าเปรียบเทียบกับคอลลาเจน Type I (Type I) จากเท้าไก่และโปรตีนมาตรฐาน (Mw) Lane 1-2: เจลาตินจากเท้าไก่ที่เตรียมด้วยกรดและสกัดที่ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง Lane 3-4: เจลาตินจากเท้าไก่ที่เตรียมด้วยด่างและสกัดที่ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมง และ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง Lane 5-6 เจลาตินจากโคและสุกร ตามลำดับ

Figure 3-9 Electrophoregram of peptides in chicken feet and commercial gelatins compare to collagen Type I from chicken feet (Type I) and hign molecular weight marker (Mw), lane1-2: acid pre-swollen chicken feet gelatin extracted at 70°C for 5 hours and 80 °C for 12hours, lane3-4: alkali pre-swollen chicken feet gelatin extracted at 70°C for 5 hours and 80 °C for 12hours, lane 5-6: beef and pork skin gelatin, respectively

4.6 ความใส

ตารางที่ 3-9 แสดงค่าความใสของตัวอย่างเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้เปรียบเทียบกับเจลาตินทางการค้า โดยเจลาตินจากเท้าไก่ทุกตัวอย่างมีความใสน้อยกว่าเจลาตินทางการค้า อาจเนื่องจากเจลาตินทางการค้าผ่านขั้นตอนการทำให้เจลาตินใส ในขณะที่การทดลองนี้ไม่มีขั้นตอนดังกล่าว เจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยกรด (A70 และ A80) มีความใสมากกว่าเจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่าง (B70 และ B80) ทั้งนี้อาจเนื่องจากสกัดในสภาวะที่พีเอชใกล้เคียงกับ pI ของโปรตีนอื่นๆที่ไม่ใช่คอลลาเจนและมิวโคโปรตีน ทำให้โปรตีนเหล่านี้ตกตะกอน ในขณะที่เจลาตินจากตัวอย่างที่เตรียมด้วยด่างถูกสกัดในสภาวะเป็นกลาง ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ละลายปะปนได้ (Eastoe and Leach, 1977) และเมื่อพิจารณาถึงผลของสภาวะในการสกัดต่อความใสของสารละลายเจลาติน พบว่าเจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (A70 และ B70) มีค่าความใสสูงกว่าเจลาตินที่สกัดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส (A80 และ B80) เพราะอุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้นจะเพิ่มการจับตัว (aggregate) ของโปรตีนทำให้ความขุ่นเพิ่มขึ้น (Cho *et al.*, 2004)

ตารางที่ 3-9 ค่าความใสของสารละลายเจลาตินจากตัวอย่างที่ผ่านการแช่กรด (A) หรือด่าง (B) และสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมงหรือ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังโค (beef) และหนังสุกร (pork)

Table 3-9 Transmittance of 1% gelatin solution extracted from produced from acid (A) or alkali (B) swollen chicken feet and extracted at 70°C for 5 hours or 80 °C for 12 hours compared to beef and pork skin gelatins

gelatin	transmittance (%)*
A70	90.2±0.1 [c]
A80	77.13±0.12 [d]
B70	74.1±0.1 [e]
B80	64.1±0.1 [f]
beef	98.67±0.15 [a]
pork	93.6±0.00 [b]

* Mean± S.D. from triplicate determination

[a,b,c,d] Means with the different superscript are significantly different ($p<0.05$).

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาวิธีการผลิตเจลาตินจากเท้าไก่ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการกำจัดโปรตีนอื่นๆ ออกจากวัตถุดิบ การทำให้พองตัว การสกัดและการทำแห้ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างและการทำให้พองตัวด้วยกรด คือล้างเท้าไก่บดด้วยสารละลาย 0.6M KCl+0.3% STP+0.05M NaOH เวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้พองตัวโดยแช่ด้วยกรดฟอสฟอริกร้อยละ 2.14 เวลา 47 ชั่วโมง 54 นาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในขั้นตอนการล้างและทำให้พองตัวด้วยด่าง คือการใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 โมลาร์ เวลา 5 ชั่วโมง เวลาและอุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้นมีผลเพิ่มปริมาณผลผลิตโปรตีน แต่ลดความแข็งแรงเจลของเจลาตินที่สกัดได้ จึงได้เลือกสภาวะในการสกัดที่ให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด (80 ^{0}C/12h) และสภาวะที่ให้เจลาตินที่มีความแข็งแรงเจลเทียบเท่ากับเจลาตินทางการค้า(70 ^{0}C/5h) ตัวอย่างที่เตรียมด้วยวิธีทั้งสองเมื่อนำไปสกัดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เวลา 5 ชั่วโมงและ 80 องศาเซลเซียส เวลา 12 ชั่วโมง และทำแห้งมีองค์ประกอบใกล้เคียงกับเจลาตินทางการค้าที่ผลิตจากหนังโคและสุกร คือมีปริมาณโปรตีนทั้งหมดใกล้เคียงกับเจลาตินทางการค้า แต่มีปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนสูงกว่าเล็กน้อย เจลาตินจากเท้าไก่ทั้งที่เตรียมด้วยกรดหรือด่างที่สกัดที่ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 ชั่วโมงมีความแข็งแรงเจลและมีความหนืดใกล้เคียงหรือสูงกว่าเจลาตินทางการค้า จึงเป็นไปได้ที่จะนำเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดที่สภาวะดังกล่าวมาใช้ทดแทนเจลาตินทางการค้าเพื่อให้เกิดประโยชน์เชิงพาณิชย์มากขึ้น อย่างไรก็ตามเจลาตินจากเท้าไก่ที่สกัดได้ในการศึกษาครั้งนี้ยังมีผลผลิตต่ำ (ร้อยละ 25.32-51.21) และมีความใสน้อยกว่าเจลาตินทางการค้า ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดการนำไปใช้ ดังนั้นควรเพิ่มขั้นตอนการทำให้ใส เช่น การกรองด้วยเมมเบรน รวมทั้งเพิ่มผลผลิตโดยการสกัดซ้ำ

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2549. ข้อมูลสถิติปศุสัตว์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.dld.go.th/home/stat_L3 (12 ตุลาคม 2549)

สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. 2531. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเจลาติน. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ

สุจินดา ศรีวัฒนะ. 2548. แบบหุ่นจำลองและสูตรอาหารที่เหมาะสม. ว. อาหาร. 3: 168-176.

อิศรพงษ์ พงษ์ศิริกุล. 2544. การวิเคราะห์รีเกรสชัน (Regression Analysis). *ใน* การวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปสำหรับอุตสาหกรรมเกษตร. หน้า 83-106. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่.

AOAC. 2000. Official Method of Analysis. 16thEd. Association of Official Analytical Chemists. Washington.

Arnesen, J.A. and Gildberg, A. 2002. Preparation and characterization of gelatine from the skin of harp seal (*Phoca groendlandica*). Bioresource Technol. 82: 191-194.

Asghar, A. and Henrickson, R. L. 1982. Chemical, Biochemical, Functional and Nutritional Characteristics of Collagen in Food Systems. *In* Advances in Food Research. Vol 28. (Chichester, C. O., ed.). p. 287-309. Academic Press. New York.

Belitz, H. D. and Grosch, W. 1999. Meat. *In* Food Chemistry. p. 540-547. Springer Verlag. Berlin.

Boles, J. A., Rathgeber, B. M. and Shand, P. J. 2000. Recovery of proteins from beef bone and the functionality of these proteins in sausage batters. Meat Sci. 55: 223-231.

Bonifer, L.B. and Froning, G. W. 1996. Chicken skin composition as affected by aqueous washing. J. Food Sci. 61: 895-898.

Cho, S. M., Kwak, K.S., Park, D.C., Gu, Y.S. Ji, C.I., Jang, D.H., Lee, Y.B. and Kim S.B. 2004. Processing optimization and functional properties of gelatin from shark (*Isurus oxyrinchus*) cartilage. Food Hydrocolloid. 18: 573-579.

Cho, S. M., Gu, Y.S. and Kim, S.B. 2005a. Extracting optimization and physical properties of yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloid. 19: 221-229.

Cho, S. H., Jahncke, M. L., Chin, K. B., Eun, J. B. 2006. The effect of processing conditions on the some properties of gelatin from skate (*Raja Kenojei*) skins. Food Hydrocolloid. 20: 810-816.

Choi, S. S. and Regenstein, J.M. 2000. Physicochemical and sensory characteristics of fish gelatin. Food Chem and Toxicol. 65: 194-199.

Cole, B. 2002. Gelatin (Online). Available: http://www.gelatin.co.za.gltn1.html (20 may 2007)

Copeland, R.A. 1994. Method for Protein Quantitation. *In* Methods for Protein Analysis: A Practical Guide to Laboratory Protocol. p. 40-43. Chapman&Hall. New York.

Damodaran, S. 1996. Amino Acids, Peptides and Protein. *In* Food Chemistry. 3 rd Ed. (Fennema, O. R., ed.). p. 321-372. Marcel Dekker, Inc. New York.

Dawson, P. L., Sheldon, B. W. and Ball H. R. 1988. Extraction of lipid and pigment components from mechanically deboned chicken meat. J. Food Sci. 53: 1615-1617.

Dawson, P. L., Sheldon, B. W. and Ball, H. R.1989. Pilot plant washing procedure to remove fat and color components from mechanically deboned chicken meat. Poultry Sci. 68: 749-753.

Eastoe, J. E. and Leach, A. A. 1977. Chemical Constitution of Gelatin. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 73-105. Academic Press. London.

Foegeding, E., Lanier, C. and Hultin, O. 1999. Characteristics of Edible Muscle Tissues. *In* Food Chemistry. 3 rd Ed. (Fennema, O. R., ed.). p. 901-906. Marcel Dekker, Inc. New York.

Froning, G. W. and Sackett, B. 1985. Effect of salt and phosphates during tumbling of turkey breast muscle on meat characteristics. Poultry Sci. 64: 1328-1333.

Gacula, M. C. 1993. Product optimization. *In* Design and Analysis of Sensory Optimization. p. 137-145. Food & Nutrition Press, Inc. Trumbull.

Gilsenan, P. M. and Ross Murphy, S. B. 2000. Rheology characterization of gelatins from mammalian and marine sources. Food Hydrocolloid. 14: 191-195.

Gimenez, B., Gomez-Guillen, M. C. and Montero, P. 2005. Storage of dried fish skins on quality characteristics of extracted gelatin. Food Hydrocolloid. 19: 958-963.

Gomez-Guillen, M.C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M.D., Ulmo, N., Lizarbe, M.A. and Montero, P. 2002. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloid. 16: 25-34.

Gudmundsson, M. and Hafsteinsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. J. Food Sci. 62: 37-47.

Gusmer Enterprises. 2005. Gelatin (Online). Available: http://www. Gusmerenter prises. Com/ (8 January 2007)

Hinterwaldner, R. 1977a. Raw Material. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 295-312. Academic Press. London.

Hinterwaldner, R. 1977b. Technology of Gelatin Manufacture. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 315-361. Academic Press. London.

Jamilah, B. and Harvinder, K. G. 2002. Properties of gelatin from skins of fish-black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis noilotica*). Food Chem. 77: 81-84.

Johns, P. 1977. The Structure and Composition of Collagen Containing Tissues. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 31-66. Academic Press. London.

Jones, N. R. 1977. Uses of Gelatin in Edible Product. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 365-373. Academic Press. London.

Kolar, K. 1990. Colorimetric determination of hydroxyproline as measure of collagen content in meat and meat products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73: 54-57.

Kim, K. O., Lim J. and Shin W. S. 2000. Optimizing extraction conditions of chicken feet gelatin dessert formula with response surface methodology (Online). Available: http://ift.conflex.com/2000/techprogram/paper_2954.htm. (21 April 2003)

Kolodziejska, I., Kaczorowski, K., Piotrowska, B. and Sadowska, M. 2004. Modification of the properties of gelatin from skins of Baltic cod (*Gadus morhua*) with transglutaminas. Food Chem. 86: 203-209.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T. and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem. 89: 363-372.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 277: 680-685.

Leach, A. A. and Eastoe, J. E. 1977. The Chemical Examination of Gelatin. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 475-506. Academic Press. London.

Ledward, D. A. 2003. Gelation of Gelatin. *In* Functional Properties of Food Macromolecules. (Mitchell, J. R. and Ledward, D. A., eds.). p. 171-201. Elsevier Applied Science. London.

Lim, J., Oh, S. and Kim, K. O. 2001. The effects of processing conditions on the properties of chicken feet gelatin. Food Sci Biotechnol. 10: 638-645.

Linus, G. and Rakesh, K. 1997. Production and characterization of gelatinous protein extracts from turkey deboner residue. Process Biochem. 32: 309-318.

Liu, D. C., Lin, Y. K. and Chen, M. T. 2001. Optimum condition of extracting collagen from Chicken feet and it characteristics. J. Anim. Sci. 14: 1638-1644.

Maki, A. A. and Froning, G. W. 1987. Effect on the quality characteristics of turkey breast muscle of tumbling whole in the presence of salt and phosphate. Poultry Sci. 66: 1180-1183.

Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. and Duodu, K. G. 2004. Extraction and physico-chemical characterization of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. Food Hydrocolloid. 18: 581-592.

Myers, R. H. and Montgomery, D. C. 1995. Building Empirical Model. *In* Response Surface Methodogy: Process and Product Optimization Using Designed Experiments. p. 42-54. John Wiley&Sons, Inc. New York.

Paterson, B.C., Parrish, F.C., JR. and Stromer, M. H. 1988. Effects of salt and pyrophosphate on physical and chemical properties of beef muscle. J. Food Sci. 53: 1258-1265.

Shahidi, F., Synowiecki, J. and Onodenalor, A. C. 1992. Effects of aqueous washings on colour and nutrient quality of mechanically deboned chicken meat. Meat Sci. 32: 289-297.

Sartorius, A. G. 2004. Gelatin Membrane Filters (Online). Available: http://www. Sartorius.com (8 January 2007)

Satterlee, L. D., Froning, G. W. and Janky, D.M. 1971 Influence of skin content on composition of mechanically deboned poultry meat. J. Food Sci. 36: 979-981.

Stainsby, G. The Physical Chemistry of Gelatin in Solution. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 109-135. Academic Press. London.

Wainewright, F. W. 1977. Physical Tests for Gelatin and Gelatin Products. *In* The Science and Techology of Gelatin. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 507-532. Academic Press. London.

Xiong, Y.L. and Kupski, D. R. 2000. Monitoring phosphate marinade penetration in tumbled chicken fillets using a thin slicing, dry-tracing method. Poultry Sci. 78: 1048-1052.

Yang, T. S. and Froning, G. W. 1992. Changes in myofibrillar protein and collagen content of mechanically deboned chicken meat due to washing and screening. Poultry Sci. 71: 1221-1227.

Zhou, P. and Regenstein, J. M. 2004. Optimization of extraction conditions for Pollock skin Gelatin. J. Food Sci. 69: 393-398.

Zayas, F. 1996. Gelling Properties of Proteins. *In* Functionality of Proteins in Food. p. 334-336. Springer. New York.

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างเจลาตินและเท้าไก่บด

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. เครื่องบดผสมตัวอย่าง (Blender)
2. ตู้อบไฟฟ้า ยี่ห้อ Memmert รุ่น D-91126 ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. ภาชนะหาความชื้น (ถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา)
4. โถดูดความชื้น
5. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีการ

1. อบถ้วยอะลูมิเนียมพร้อมฝา ในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง วางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบซ้ำเป็นเวลา 30 นาทีจนทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ประมาณ 1-2 กรัม ใส่ลงในถ้วยอะลูมิเนียมเกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่ว
3. นำไปอบในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100±5 องศาเซียลเซียส ค้างคืน นำออกมาวางให้เย็นในโถดูดความชื้นนาน 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนได้น้ำหนักที่แน่นอนชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณปริมาณความชื้นจากสูตร

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(W_1-W_2)\times 100}{W_1}$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W_2 = น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยโปรตีน (Kjeldahl tube)
2. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
3. อุปกรณ์ย่อยและกลั่นโปรตีน ยี่ห้อ FOSS TECATOR รุ่น 2006 และ 2200 ตามลำดับ ประเทศสวีเดน
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
6. ปิเปต ขนาด 5 และ 10 มิลลิลิตร
7. บิวเรต ขนาด 25 มิลลิลิตร
8. กระดาษกรอง
9. กระบอกตวงขนาด 20 และ 50 มิลลิลิตร

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยาใช้คอปเปอร์ซัลเฟต 1 ส่วนผสมกับ โพแทสเซียมซัลเฟต 9 ส่วน
3. โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 และร้อยละ 20
4. กรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
5. กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นมาตรฐาน 1 นอร์มัล เตรียมโดยชั่งโซเดียมเทตราบอเรต (Borax) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน (4 ตำแหน่ง) 4 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 50 มิลลิลิตร ทำซ้ำ 3 ขวด แต่ละขวดเติม 2-3 หยด ของเมทิลเรด (อินดิเคเตอร์) แล้วไตเตรตกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่เตรียมไว้ สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูที่จุดยุติสามารถคำนวณความเข้มข้นที่แน่นอนของกรดไฮโดรคลอริกจากสูตร

ความเข้มข้นของสารละลายไฮโดรคลอริก = $\frac{W_1}{W_2 x 0.1907}$

W_1 = น้ำหนักของโซเดียมเทตราบอเรต (กรัม)

W_2 = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตรเตรท (มิลลิลิตร)

กรัมสมมูลของโซเดียเทตราบอเรต = 190.72

6. อินดิเคเตอร์ เตรียมโดย ก. ชั่ง 0.125 กรัม เมทธิลเรด และ 0.2 กรัมเมทิลีนบลู (Methylene blue) ละลายในเอทธานอล 100 มิลลิลิตร ข. ชั่ง 0.1 กรัมโบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green) ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำมาผสมกันในอัตราส่วน ก: ข เท่ากับ 5:1

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองให้ได้น้ำหนักแน่นอน (4 ตำแหน่ง) ประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดลงในขวดย่อยโปรตีน
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 20 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และย่อยที่อุณหภูมิ 400 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายใส แล้วตั้งทิ้งให้เย็น
4. เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตรในหลอดย่อยโปรตีน
5. ต่อหลอดย่อยโปรตีนในส่วนของเครื่องกลั่นโปรตีน และวางขวดรูปชมพู่ที่เติมกรดบอริกปริมาตร 40 มิลลิตรแล้ววางที่ตำแหน่งรับสารละลายของเครื่องกลั่น โดยให้ปลายจุ่มในสารละลายกรดบอริก เติมอินดิเคเตอร์ 2 หยด ทำการกลั่นโปรตีนตามโปรแกรมที่ตั้งไว้ ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 40 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร และกลั่นเป็นเวลา 4 นาที
6. ไตเตรทของเหลวที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐานจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวอมฟ้าเป็นสีชมพูที่จุดยุติ นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณปริมาณไนโตรเจนหรือปริมาณโปรตีน
7. ทำ blank โดยใช้กระดาษกรองไม่ใส่ตัวอย่างแล้วทำตามข้อ 2-6

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{1.4007 \times N \times (Vs - Vb)}{W}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (ร้อยละ)} = \frac{1.4007 \times N \times (Vs - Vb) \times F}{W}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมาตรฐาน (นอร์มอล)

Vs = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb = ปริมาตรของสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)

W = น้ำหนักตัวอย่าง(กรัม)

F= แฟกเตอร์ (6.25 สำหรับตัวอย่างเท้าไก่บด 5.51 และ 5.46 สำหรับตัวอย่างเจลาตินผงที่ผ่านการแช่กรดและด่าง ตามลำดับ)

3. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยวิธี Soxhlet Extraction Method (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxhlet apparatus) ยี่ห้อ Selecta รุ่น 6003286 ประเทศสเปน
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (Extraction thimble)
3. เครื่องบดผสมตัวอย่าง (Blender)
4. ตู้อบไฟฟ้า ยี่ห้อ Memmert รุ่น D-91126 ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. โถดูดความชื้น
6. เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
7. เครื่องระเหยสุญญากาศ ยี่ห้อ EYELA รุ่น SB-1000 ประเทศญี่ปุ่น

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดก้อนกลมในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง วางให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักแล้วนำไปอบซ้ำเป็นเวลา 30 นาที จนทราบน้ำหนักที่แน่นอน (4 ตำแหน่ง)
2. นำตัวอย่างที่ผ่านการหาความชื้นแล้วมาชั่งให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (4 ตำแหน่ง) ประมาณ 2-3 กรัม ในกระดาษกรอง ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดตัวอย่างใส่ลงในซอคแลต
4. เทปิโตรเลียมอีเทอร์ในขวดก้อนกลม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
5. ประกอบหลอดใส่ตัวอย่าง และขวดก้อนกลมเข้ากับเครื่องสกัดไขมันแล้วทำการสกัดไขมัน 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่น ด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบ 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคแลต แล้วระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยแบบสุญญากาศ

7. นำขวดหาไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
8. ชั่งน้ำหนักแล้วอบซ้ำครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนัก 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้นก่อนอบ}}$$

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. เตาเผา (muffle furnace) ยี่ห้อ Ney รุ่น Vulcan3-1750 ประเทศสหรัฐอเมริกา
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีการ

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ปิดสวิตซ์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้งครั้งละประมาณ 1 ชั่วโมงและกระทำเช่นข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักทั้ง 2 ครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างให้ได้น้ำหนักแน่นอน (4 ตำแหน่ง) ประมาณ 1 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผาอุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส และกระทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา x100}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

5. วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน (ดัดแปลงจาก Kolar, 1990)

อุปกรณ์

1. หลอดทดลองขนาดเล็กและขนาดกลาง
2. ไมโครปิเปตขนาด 50 และ 1000 ไมโครลิตร
3. Vortex mixer ยี่ห้อ VORTEX GENIE รุ่น G-560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ thermospectronic รุ่น 4001/4 ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. อ่างควบคุมอุณหภูมิ oil bath ยี่ห้อ Memmert รุ่น WBI45 ประเทศเยอรมัน
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ water bath ยี่ห้อ Memmert รุ่น W760 ประเทศเยอรมัน

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 นอร์มอล
2. Acetate-Citrate buffer pH 6.0 เตรียมโดย ชั่งโซเดียมอะซิเตทไตรไฮเดรท มา 60 กรัม กรดซิตริก 23 กรัม โซเดียมไฮดรอกไซด์ 17 กรัม และกรดอะซิติกปริมาตร 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 6 หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสีชาแล้วเก็บในตู้เย็น
3. Ehrlish ' s Reagent : ชั่ง 4-dimethyllaminobenzaldehyde 2.5 กรัม ปิเปตกรดเปอร์คลอริกมา 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปต n-propanol มา 16 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)
4. สารละลาย Chloramine T : ชั่ง Chloramine T มา 1.410 กรัม แล้วปิเปต n-propanol และน้ำกลั่นมาอย่างละ 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน เติม Acetate-Citrate buffer pH 6.0 จนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น (ใช้ภายใน 1 สัปดาห์)
5. สารละลายไฮดรอคซี่โพรลีนมาตรฐานความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

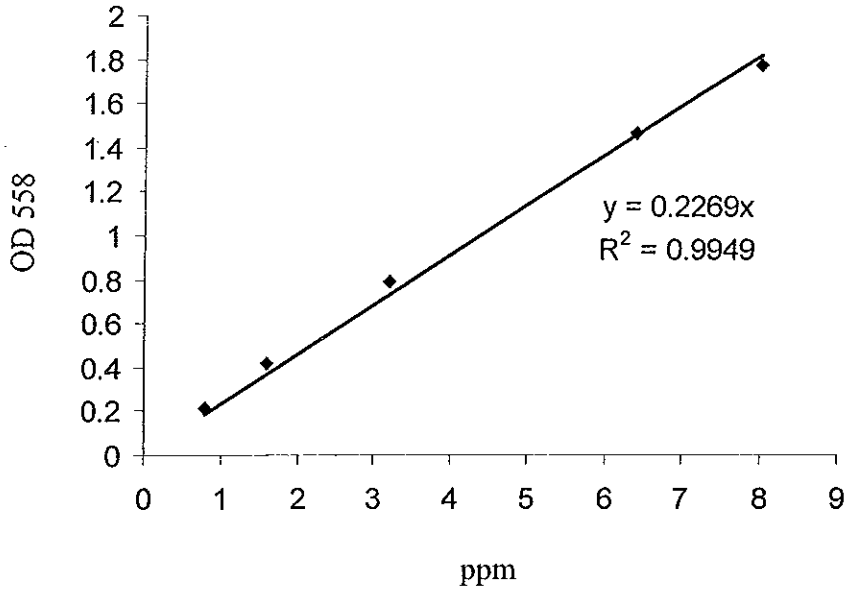
วิธีทดลอง

ขั้นตอนการย่อย

1. ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวนำมา 2 มิลลิลิตร ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ถ้าตัวอย่างเป็นของแข็งไม่ต้องอบ ตัวอย่างเท้าไก่บดใช้ประมาณ 1 กรัม ตัวอย่างเจลาตินผงใช้ประมาณ 0.1 กรัม
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 7 นอล์มาล 10 มิลลิลิตร
3. นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. นำมาปรับ pH เป็น 6 และปรับปริมาตรให้เป็น 500 มิลลิลิตร กรองใช้เฉพาะส่วนใส

ขั้นตอนการวัดหาปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน

1. ปีเปตสารละลายตัวอย่างที่กรองได้ 50- 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองและเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร
2. ปีเปต Chloramine T ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ทำการ ผสมด้วยเครื่อง Vortex mixer ทันที ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 นาที
3. ปีเปต Ehrlish' s Reagent ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ผสมด้วยเครื่อง Vortex mixer ทันที บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร
5. คำนวณหาปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานดังภาพภาคผนวก ก5
6. ทำแบลงค์เช่นเดียวกับข้อ 1-5 แต่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง



ภาพภาคผนวก ก5 กราฟมาตรฐานไฮดรอคซี่โพรลีน

Figure-Appendix A5 Standard curve of hydroxyproline

7. คำนวณแปอร์เซ็นต์ไฮดรอคซี่โพรลีน

จากสูตร $\frac{50A}{MV}$

เมื่อ A = ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนจากข้อ 5

V = ปริมาตรที่ใช้วิเคราะห์ในข้อ 1 (ไมโครลิตร)

M = น้ำหนักหรือปริมาตรตัวอย่าง (กรัมหรือมิลลิลิตร)

8. การคำนวณปริมาณคอลลาเจนจากค่าไฮดรอคซี่โพรลีน

ปริมาณคอลลาเจน = ปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน x 7.57 (Satterlee *et al.*, 2001)

วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีน

ดูดสารละลายไฮดรอคซี่โพรลีนมาตรฐานความเข้มข้น 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 0.5 1 2 4 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 10 มิลลิลิตรจะได้สารละลายไฮดรอคซี่โพรลีนความเข้มข้น 0.8 1.6 3.2 6.4 และ 8 ไมโครกรัมตามลำดับ จากนั้นวิเคราะห์ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 2-4

6. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเร็ต (Copeland, 1994)

อุปกรณ์

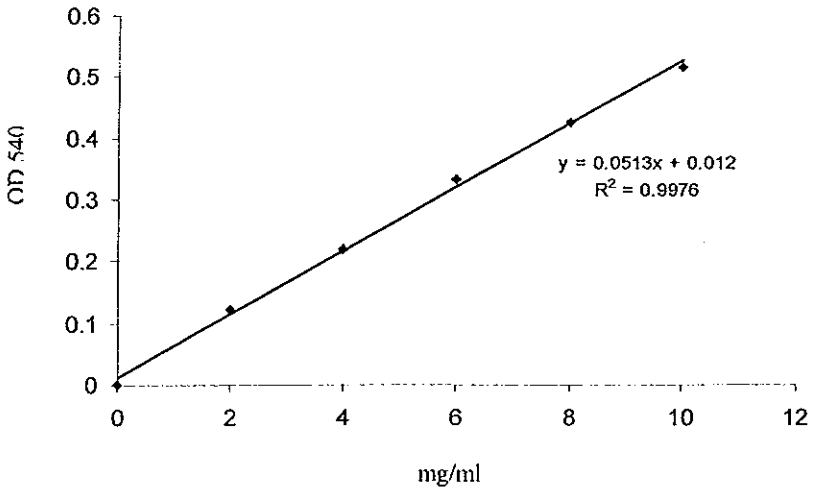
1. หลอดทดลองขนาดเล็ก
2. นาฬิกาจับเวลา
3. Vortex mixer ยี่ห้อ VORTEX GENIE รุ่น G-560E ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ thermospectronic รุ่น 4001/4 ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท (ชั่ง CuSO4.5H2O 1.5 กรัม โซเดียมโพแตสเซียมทาเตรต 6.0 กรัม เติมน้ำจนมีปริมาตร 500 มิลลิลิตร กวนจนเป็นเนื้อเดียวกัน เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 10 จำนวน 300 มิลลิลิตรในขณะกวน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร)

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 คำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยอ่านจากกราฟมาตรฐาน BSA ดังภาพที่ภาคผนวก ก6
4. ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างแล้วทำตามข้อ 2 และ 3



ภาพภาคผนวก ก6 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine Serum Albumin (BSA)

Figure-Appendix A6 Bovine Serum Albumin standard curve

การเตรียมโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serium Albumin (BSA)

ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 200 300 400 และ 500 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 ไมโครลิตร เติมสารละลายไบยูเรต 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์คุณสมบัติของเจลาติน

1. การวัดค่าความแข็งแรงเจลของเจลาติน ดัดแปลงจาก British Standard Method (1975, อ้างโดย Wainewright, 1977)

อุปกรณ์

1. ถ้วยแก้วขนาด 50 มิลลิลิตร
2. กระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร
3. แท่งแก้วคน
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า
5. เครื่อง Texture Analyzer ยี่ห้อ Stable Microsystem รุ่น XT2i ประเทศอังกฤษ

วิธีการ

การเตรียมเจล

กรณีตัวอย่างเจลาตินผง เตรียมสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 6.67 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยละลายเจลาติน 6.67 กรัมกับน้ำกลั่น ปล่อยให้เจลาตินพองตัวจนถึงจุดสมดุล แล้วนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งใส่ถ้วยแก้วปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปิดฟอยด์แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 18 ชั่วโมง ส่วนกรณีเป็นสารละลายเจลาตินที่ได้จากการสกัด นำไปแบ่งใส่ถ้วยแก้วปริมาตร 30 มิลลิลิตร ปิดฟอยด์ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16- 18 ชั่วโมง

การวัดค่าความแข็งแรงเจล

ตั้งเครื่อง Texture Analyzer – XT2 ที่ Mode Measure Force in Compression

Option: Return to Start

Pre-Test Speed : 0.5 mm/s

Test Speed : 0.5 mm/s

Post-Test Speed : 0.5 mm/s

Distance : 4.0 mm

โดยใช้หัววัด P/0.5 และใช้ Load Cell ขนาด 5 กิโลกรัม

2. การวิเคราะห์ความหนืด (Lim *et al.*, 2001)

อุปกรณ์

1. เครื่องมือวิเคราะห์ความหนืด ยี่ห้อ Schott รุ่น 50904 ประเทศเยอรมัน
2. ขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร
3. Heating Magnetic stirrer ยี่ห้อ Velp รุ่น ARE ประเทศสหรัฐอเมริกา
4. เครื่องชั่งไฟฟ้า ทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น AL 204 ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายเจลาตินร้อยละ 6.67 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เทสารละลายลงในกระเปาะของอุปกรณ์ตำแหน่ง A
2. นำจุกยางครอบไว้ที่ตำแหน่ง B ดูดสารละลายให้เลื่อนที่ขึ้นไปอยู่เหนือระดับตำแหน่ง C
3. จับเวลาการไหลของสารละลายเริ่มจับเวลา t =0 และ t=t ใดๆ เมื่อสารละลายเคลื่อนจาก C ถึง D ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
4. ทำการทดลองซ้ำข้อ 2 และข้อ3 จำนวน 3 ครั้ง
5. นำเวลาที่บันทึกได้ทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปแทนค่าในสมการความหนืดของสาร
6. สมการหาความหนืดของสารมีดังนี้ (Lim *et al.*, 2001)

$Pa = Dkt_{mean}$

k = ค่าคงที่ มีค่าเท่ากับ 0.01 (mm^2s^{-2})

t_{mean} = เวลาเฉลี่ยที่สารละลายใช้ในการเคลื่อนที่จาก C ถึง D (s)

$D = m/v$ ($kg.m^3$)

เมื่อ m = มวลของสารละลายซึ่งหาได้จากการนำสารละลายปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (kg)

v = ปริมาตรของสารละลาย (m^3)

3. การวัดพีเอช ดัดแปลงจาก British Standard Method (1975, อ้างโดย Wainewright, 1977)

อุปกรณ์

1. บิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เครื่องมือวิเคราะห์พีเอช ยี่ห้อ Sartorius รุ่น 12DVC ประเทศเยอรมัน

วิธีการ

เตรียมสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ใช้น้ำกลั่นอุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ละลายผงเจลาติน นำไปวัดพีเอชด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4. การวัดความใสของสารละลายเจลาติน (ดัดแปลงจาก Cho *et al.*, 2004)

อุปกรณ์

1. บิกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนสี ยี่ห้อ thermospectronic รุ่น 4001/4 ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการ

เตรียมสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ด้วยน้ำกลั่น ละลายผงเจลาตินที่อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส นำไปวัดค่า %Transmittantce ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

5. การวิเคราะห์รูปแบบและขนาดโปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulfate (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบมินิเจล ยี่ห้อ Biorad รุ่น Mini ProteinIII ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารเคมี

1. Acrylamide/bis 30%
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. Sample buffer (non reducing buffer) เตรียมโดย

- 50 mM Tris-HCl pH 6.8	2.5 มิลลิลิตร
- กลีเซอรอล	2 มิลลิลิตร
- 10% SDS	4 มิลลิลิตร
- เบต้า-เมอแคปโตเอทานอล	1 มิลลิลิตร
- โบรโมฟีนอลบลู	0.3 กรัม

6. Running buffer, ไม่ปรับ pH เตรียมโดย
   - Tris HCl 9 กรัม
   - ไกลซีน 43.2 กรัม
   - SDS 3 กรัม

   ละลายในน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 600 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ก่อนใช้เจือจาง 5 เท่า
7. โปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุล High Molecular Weight ยี่ห้อ Sigma ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 45 55 66 84 97 116 และ 205 KDa
8. สีย้อมโปรตีน Coomassie Billiant Blue R-250
9. Staining Solution: ละลาย Coomassie Billiant Blue R-250 0.5 กรัมในเมธานอล 150 มิลลิลิตร คนจนละลายหมด แล้วเติมกรดอะซิติก 50 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
10. Fixing solution: ผสมเมธานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 10 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
11. Destain solution: ผสมเมธานอล 30 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 10 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำสารละลายเจลาตินไปหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 9000 rpm นำส่วนใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเร็ต จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 4 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร แล้วนำมาผสมกับ Sample buffer (อัตราส่วน 1:1) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ผสม Sample buffer ไปให้ความร้อนในอุณหภูมิน้ำเดือด 3 นาทีแล้วนำไปหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบ 9000 rpm

2. การเตรียม running gel

สารเคมี	5%	7%
30% Acrylamide/bis	1.67 ml	2.38
1.5M Tris-HClbuffer pH 8.8	2.5 ml	2.5
10% SDS	100ul	100
น้ำกลั่น	5.67 ml	5.02
10% Ammonium persulfate	50 ul	50
TEMED	5 ul	5

3. การเตรียม stacking gel

สารเคมี	4%
30% Acrylamide/bis	0.665 ml
0.5M Tris-HClbuffer pH 6.8	1.25 ml
10% SDS	50 ul
น้ำกลั่น	3 ml
10% Ammonium persulfate	25 ul
TEMED	3 ul

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส จากนั้นเติม electrod buffer ให้เต็ม chamber จากนั้นโหลดตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 จำนวน 15 ไมโครลิตร ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสเข้ากับ power supply เปิดกระแสไฟฟ้า 30 แอมแปร์ จนสีของโบรโมฟีนอลบลู เคลื่อนถึงจนเกือบสุดปลายกระจก จึงหยุดการให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล

โดยแช่ใน fixing solution 45 นาทีจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น แล้วนำมาย้อมใน staining solution ประมาณ 3 ชั่วโมงหรือค้างคืน แล้วแช่ใน destaining solution ประมาณ 10 นาที

ภาคผนวก ค การคำนวณค่าต่างๆ

1. การคำนวณปริมาณการพองตัว

$$\text{ปริมาณการพองตัว (ร้อยละ)} = \frac{W_1 x100}{W_2}$$

เมื่อ W_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังล้าง (กรัม)

W_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนล้าง (กรัม)

2. การคำนวณประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนหรือไฮดรอคซี่โพรลีน

$$\text{ประสิทธิภาพการสกัด (ร้อยละ)} = \frac{P_1 x100}{P_2}$$

เมื่อ P_1 ปริมาณโปรตีน (biuret) หรือไฮดรอคซี่โพรลีนที่สกัดได้ (กรัม)

P_2 ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างบดหลังล้างด้วยน้ำเย็น (biuret) หรือไฮดรอคซี่-โพรลีนเริ่มต้น (กรัม)

3. การคำนวณผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้

$$\text{ผลผลิตโปรตีนที่สกัดได้ (ร้อยละ)} = \frac{P_1 x100}{P_2}$$

เมื่อ P_1 ปริมาณไนโตรเจนที่สกัดได้ (กรัม)

P_2 ปริมาณไนโตรเจนในตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

ภาคผนวก ง ผลการวิเคราะห์ RSM โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Design Expert Software (Version 6.0)

ตารางภาคผนวก ง1 ความแปรปรวนสำหรับสมการกำลังสองของปริมาณโปรตีนที่สกัดได้

Table-appendix D1 Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model representing protein extraction

Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	203.51	9	22.61	4.44	0.0146
A	4.38	1	4.38	0.86	0.3757
B	10.54	1	10.54	2.07	0.1808
C	3.42	1	3.42	0.67	0.4317
A^2	11.23	1	11.23	2.20	0.1685
B^2	79.10	1	79.10	15.53	0.0028
C^2	39.27	1	39.27	7.71	0.0196
AB	33.74	1	33.74	6.62	0.0277
AC	0.095	1	0.095	0.019	0.8943
BC	10.74	1	10.74	2.11	0.1771
Residual	50.94	10	5.09		
Lack of Fit	26.90	5	5.38	1.12	0.4524
Pure Error	24.04	5	4.81		
Cor Total	254.45	19			

R-Square = 0.7998

A = temperature

B = time

C = concentration

ตารางภาคผนวก ง2 ความแปรปรวนสำหรับสมการกำลังสองของค่าการพองตัวของเท้าไก่บด

Table-appendix D2 Analysis of variance (ANOVA) for the quadratic model representing swelling of ground chicken feet

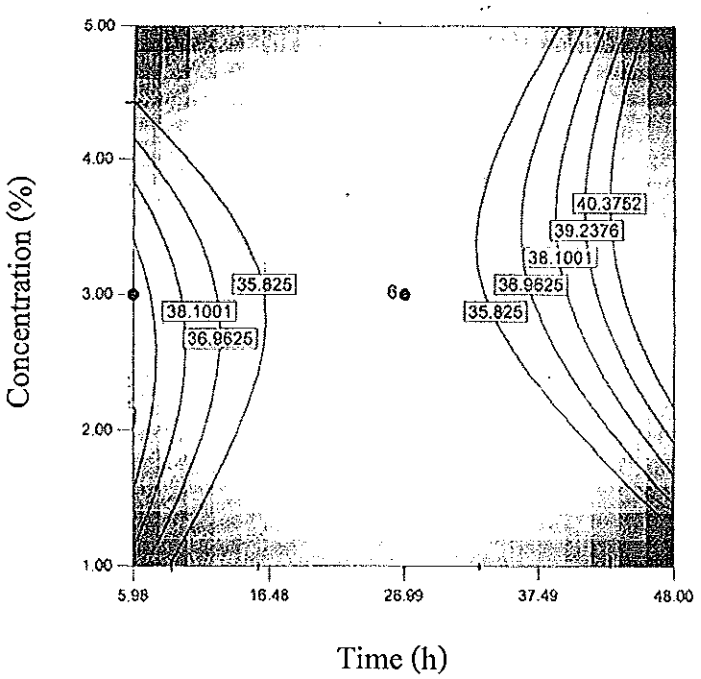
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob>F
Model	4352.84	9	483.65	5.94	0.0051
A	0.37	1	0.37	4.545E-003	0.9476
B	177.27	1	177.27	2.18	0.1709
C	3177.19	1	3177.19	39.01	<0.0001
A^2	0.23	1	0.23	2.782E-003	0.9590
B^2	114.27	1	114.27	1.40	0.2636
C^2	865.52	1	865.52	865.52	10.63
AB	20.83	1	20.83	20.83	0.26
AC	37.28	1	37.28	37.28	0.46
BC	3.34	1	3.34	3.34	0.041
Residual	l814.35	10	81.44	81.44	
Lack of Fit	360.69	5	72.14	72.14	0.80
Pure Error	453.67	5	90.73	90.73	
Cor Total	5167.20	19			

R-Square 0.8424

A = temperature

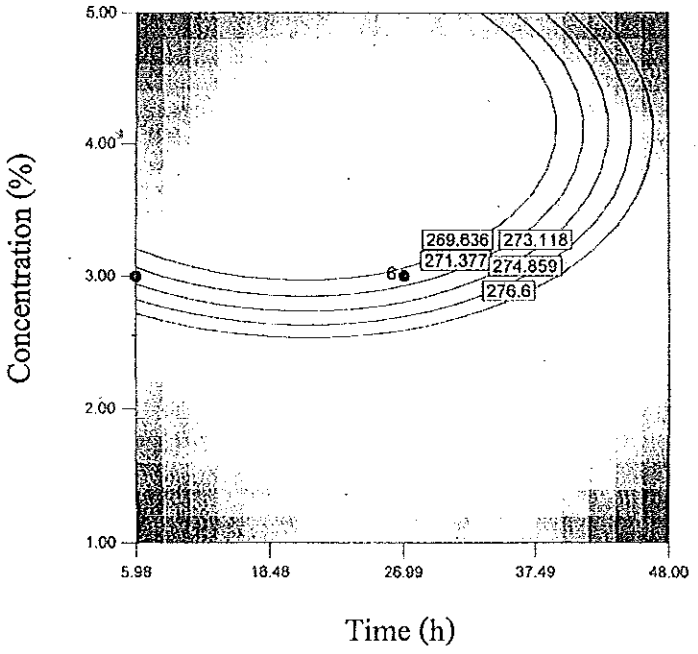
B = time

C = concentration



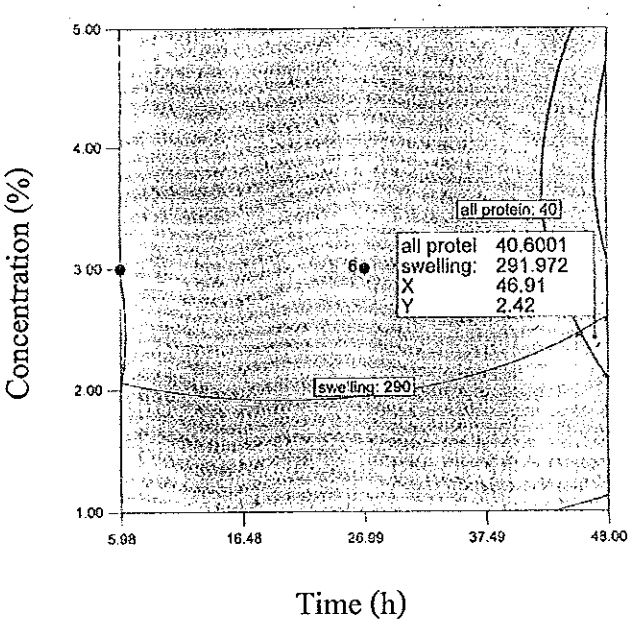
ภาพที่ภาคผนวก ง1 แผนภาพคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกและเวลาในการแช่ต่อปริมาณโปรตีนของเท้าไก่บดที่สกัดได้ โดยมีอุณหภูมิเป็นตัวแปรคงที่ที่ 20 องศาเซลเซียส ตัวเลขที่แสดงในแผนภาพเป็นปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (กรัม /70 กรัมตัวอย่าง)

Figure-Appendix D1 Contour plots showing relationship between effect of soaking time and phosphoric concentration on protein content in extracts under constant temperature (20 ^{o}C), the number inside the contours represent protein content (g/70 g sample)



ภาพที่ภาคผนวก ง2 แผนภาพคอนทัวร์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างผลของความเข้มข้นของกรดฟอสฟอริกและเวลาในการแช่ต่อร้อยละการพองตัวของเท้าไก่บดโดยมีอุณหภูมิเป็นตัวแปรคงที่ที่ 20 องศาเซลเซียส ตัวเลขที่แสดงในแผนภาพเป็นร้อยละการพองตัวของเท้าไก่บด

Figure-Appendix D2 Contour plots showing relationship between effect of soaking time and phosphoric concentration for swelling percentage of ground chicken feet under constant temperature (20°C), the number inside the contours represent swelling percentage



ภาพที่ภาคผนวก ง3 สภาวะที่เหมาะสมจากการซ้อนทับรูปแผนภาพคอนทัวร์ภาพที่ภาคผนวก ง1 และ ง2 โดยบริเวณที่แรเงาแสดงสภาวะที่มีปริมาณโปรตีนและการพองตัวมากกว่า 40 กรัมและร้อยละ 290 ตามลำดับ

Figure-Appendix D3 Optimum condition after overlaying contour plots of those in Figure-Appendix D1 and D2. White area indicates regions providing swelling and protein content of higher than 290% and 40g, respectively

ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS (version 10.0)

ตารางที่ภาคผนวก จ1 ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อปริมาณไนโตรเจนที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

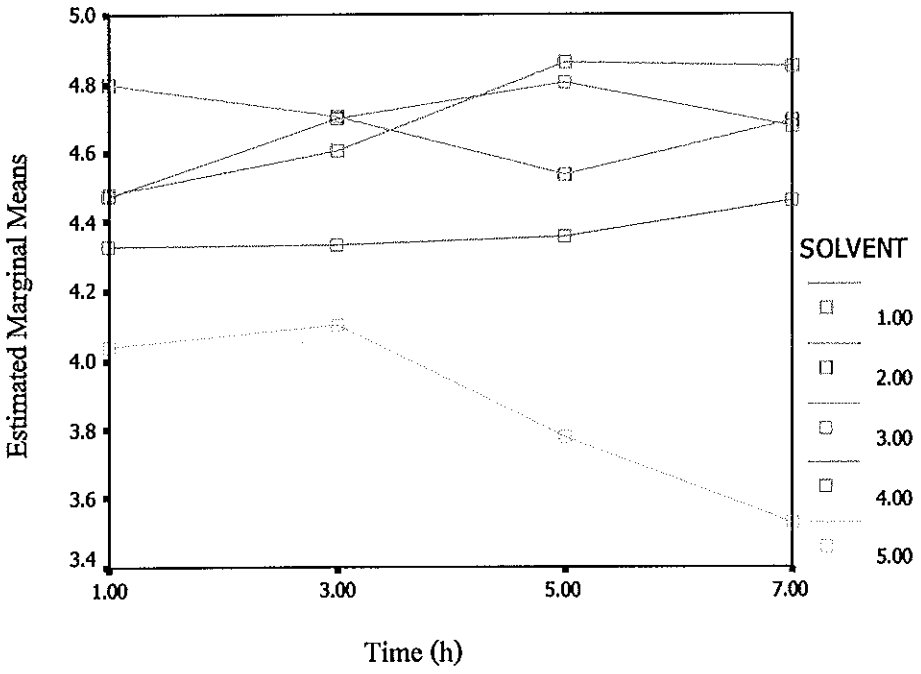
Table-Appendix E1 Analysis of variance of time and solution on nitrogen content (%) remained in ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	1.642[a]	19	8.642E-02	18.950	0.001
Intercept	1774.731	1	1774.731	57414.776	0.000
Solvent	1.046	4	0.262	74.655	0.000
Time	0.326	3	0.109	3.591	0.017
Solvent*Time	0.270	12	2.248E-02	0.744	0.705
Error	2.418	80	3.023E-02		
Total	1778.791	100			
Corrected Total	4.060	99			

ตารางที่ภาคผนวก จ2 ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อปริมาณไฮดรอคซี่-โพรลีนที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Table-Appendix E2 Analysis of variance of time and solution on hydroxyproline content (%) remained in ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	29.874[a]	19	1.572	18.950	0.000
Intercept	4763.910	1	4763.910	57414.776	0.000
Solvent	24.778	4	6.149	74.655	0.000
Time	0.155	3	5.160E-02	0.622	0.602
Solvent*Time	4.942	12	0.412	4.963	0.000
Error	18.254	220	8.297E-02		
Total	4812.038	240			
Corrected Total	48.128	239			



ภาพที่ภาคผนวก จ2 อิทธิพลร่วมของเวลากับชนิดของสารละลายต่อปริมาณไฮดรอคซี่โพรลีนที่คงเหลือในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Figure-Appendix E2 Interaction effect of time and solution type on hydroxyproline content (%) remained in ground chicken feet after washing for 1-7 hours.

Solvent

1.00 = 0.6MKCl+0.3%STP+0.5%$NaHCO_3$

2.00 = 0.6MKCl +0.5%$NaHCO_3$

3.00 = 0.6MKCl+0.3%STP+0.05MNaOH

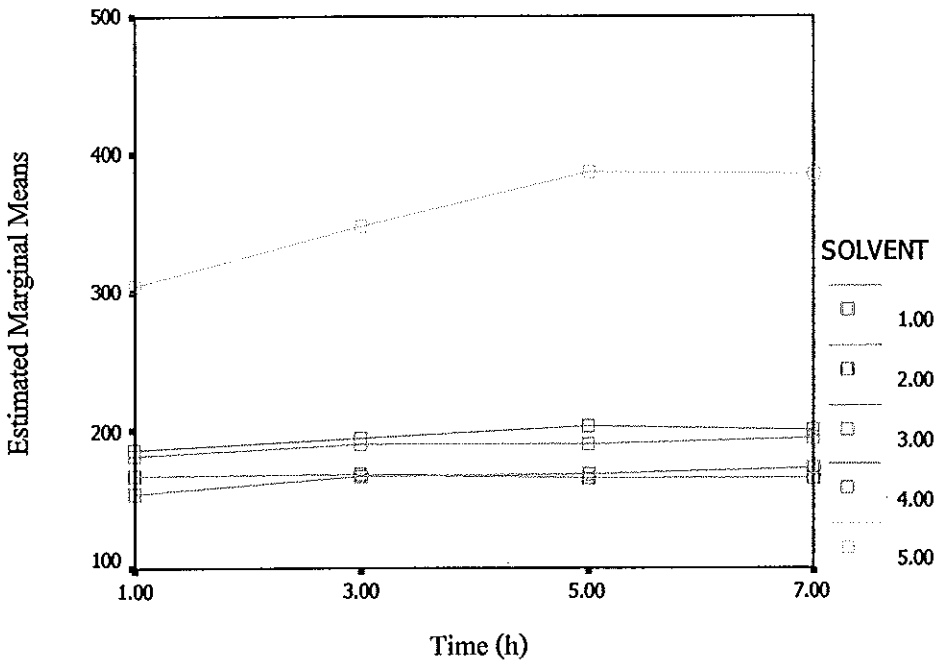
4.00 = 0.6MKCl +0.05MNaOH

5.00 = 0.5MNaOH

ตารางที่ภาคผนวก จ3 ความแปรปรวนของเวลาและชนิดของสารละลายต่อการพองตัวในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างด้วยสารละลายที่แตกต่างกัน 5 ชนิดที่เวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Table-Appendix E3 Analysis of variance of time and solution on swelling power (%) of ground chicken feet after washing with 5 different solutions for 1-7 hours

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	326237.693[a]	19	17170.405	121.892	0.000
Intercept	2762695.656	1	2762695.656	19612.222	0.000
Solvent	310987.137	4	77746.784	551.920	0.000
Time	6300.373	3	2100.124	14.909	0.000
Solvent*Time	8950.184	12	745.849	5.295	0.000
Error	5634.641	40	140.866		
Total	3094567.990	60			
Corrected Total	331872.334	59			



ภาพที่ภาคผนวก จ3 อิทธิพลร่วมของเวลากับชนิดของสารละลายต่อปริมาณการพองตัวในเท้าไก่บดที่ผ่านการล้างเป็นเวลา 1 3 5 และ 7 ชั่วโมง

Figure -Appendix E3 Interaction effect of time and solution type on swelling power (%) of ground chicken feet after washing for 1-7 hours

Solvent

1.00 = 0.6MKCl+0.3%STP+0.5%$NaHCO_3$

2.00 = 0.6MKCl +0.5%$NaHCO_3$

3.00 = 0.6MKCl+0.3%STP+0.05MNaOH

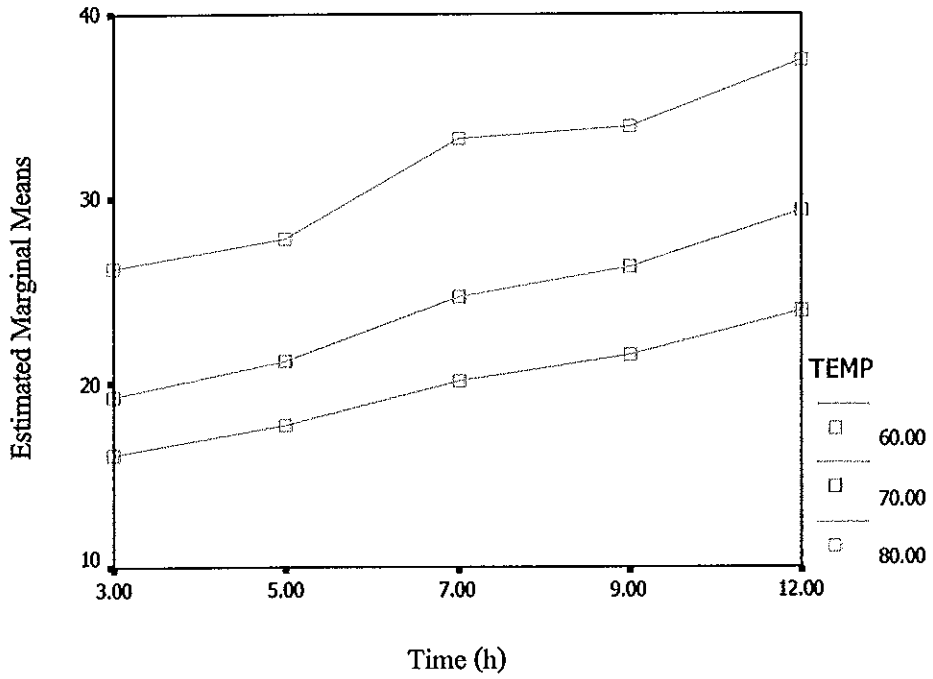
4.00 = 0.6MKCl +0.05MNaOH

5.00 = 0.5MNaOH

ตารางที่ภาคผนวก จ4 ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Table-Appendix E4 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) extracted on protein yield from acid swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4260.284[a]	14	304.306	597.138	0.000
Intercept	59466.894	1	59466.894	116691.58	0.000
Solvent	3621.277	2	1810.639	3553.007	0.000
Time	626.405	4	156.601	307.298	0.000
Solvent*Time	12.602	8	1.575	3.091	0.005
Error	38.221	75	0.510		
Total	63765.398	90			
Corrected Total	4298.504	89			



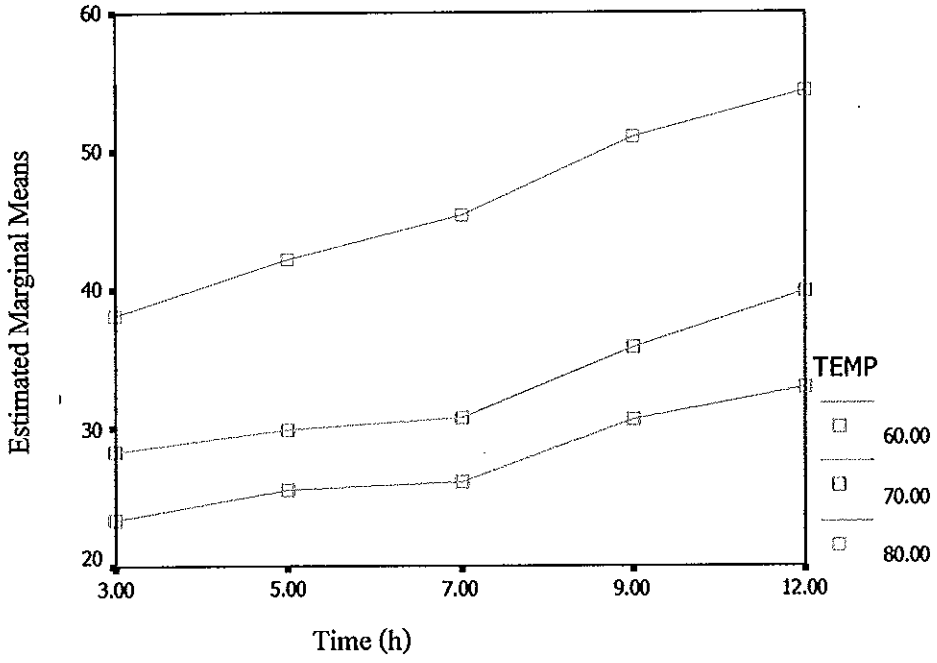
ภาพที่ภาคผนวด จ4 อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Figure-Appendix E4 Interaction effect of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on protein yield from acid swollen ground chicken feet

ตารางที่ภาคผนวก จ5 ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Table-Appendix E5 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on hydroxyproline yield from acid swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7446.703	14	531.907	132.933	0.000
Intercept	113972.874	1	113972.874	28483.809	0.000
Solvent	5484.039	2	2742.020	685.279	0.000
Time	1850.602	4	462.651	115.624	0.000
Solvent*Time	112.061	8	14.008	3.501	0.002
Error	300.099	75	4.001		
Total	121719.676	90			
Corrected Total	7746.802	89			



ภาพที่ภาคผนวด จ5 อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอกซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Figure-Appendix E5 Interaction effect of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on hydroxyproline yield from acid swollen ground chicken feet

ตารางที่ภาคผนวก จ6 ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตโปรตีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง

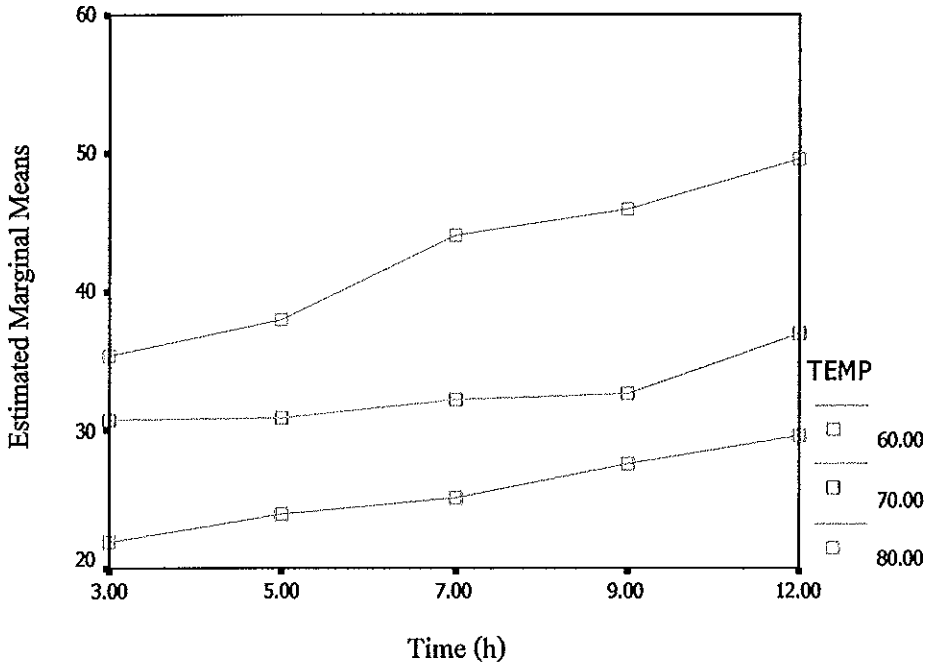
Table-Appendix E6 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 ^{o}C) on protein yield from alkali swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	4588.694	14	327.764	72.524	0.000
Intercept	79654.440	1	79654.440	17624.996	0.000
Solvent	3018.122	2	1509.061	333.907	0.000
Time	1522.765	4	380.691	84.235	0.000
Solvent*Time	47.807	8	5.976	1.322	0.239
Error	542.328	120	4.519		
Total	84785.462	135			
Corrected Total	5131.022	134			

ตารางที่ภาคผนวก จ7 ความแปรปรวนของเวลา(3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส)ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอคซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง

Table-Appendix E7 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature(60-80 °C) on hydroxyproline yield from alkali swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	21866.908	14	1561.922	90.376	0.000
Intercept	403511.674	1	403511.674	23347.939	0.000
Solvent	17290.071	2	8645.036	500.218	0.000
Time	3838.926	4	959.731	55.532	0.000
Solvent*Time	737.911	8	92.239	5.337	0.000
Error	1296.190	75	17.283		
Total	426674.773	90			
Corrected Total	23163.099	89			



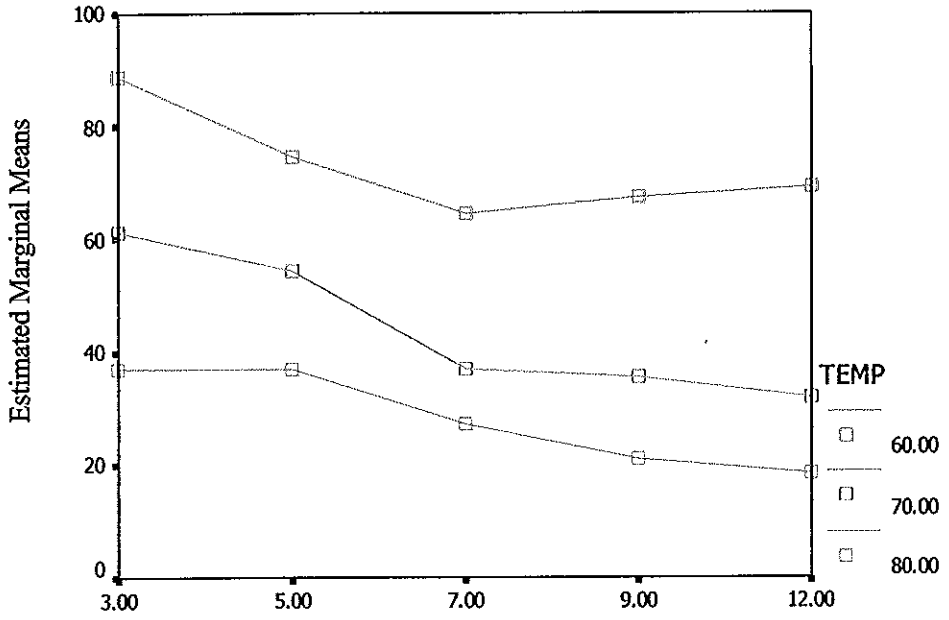
ภาพที่ภาคผนวค จ7 อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อผลผลิตไฮดรอดซี่โพรลีนจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง

Figure-Appendix E7 Interaction effect of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on hydroxyproline yield from alkali swollen ground chicken feet

ตารางที่ภาคผนวก จ8 ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส)ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Table-Appendix E8 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on gel strength (g) of chicken feet gelatin from acid swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	58489.413	14	4177.815	267.840	0.000
Intercept	315539.355	1	315539.355	20229.235	0.000
Solvent	46469.304	2	23234.652	1489.574	0.000
Time	10642.640	4	2660.660	170.575	0.000
Solvent*Time	1377.468	8	172.184	11.039	0.000
Error	1871.782	120	15.598		
Total	375900.550	135			
Corrected Total	60361.195	134			



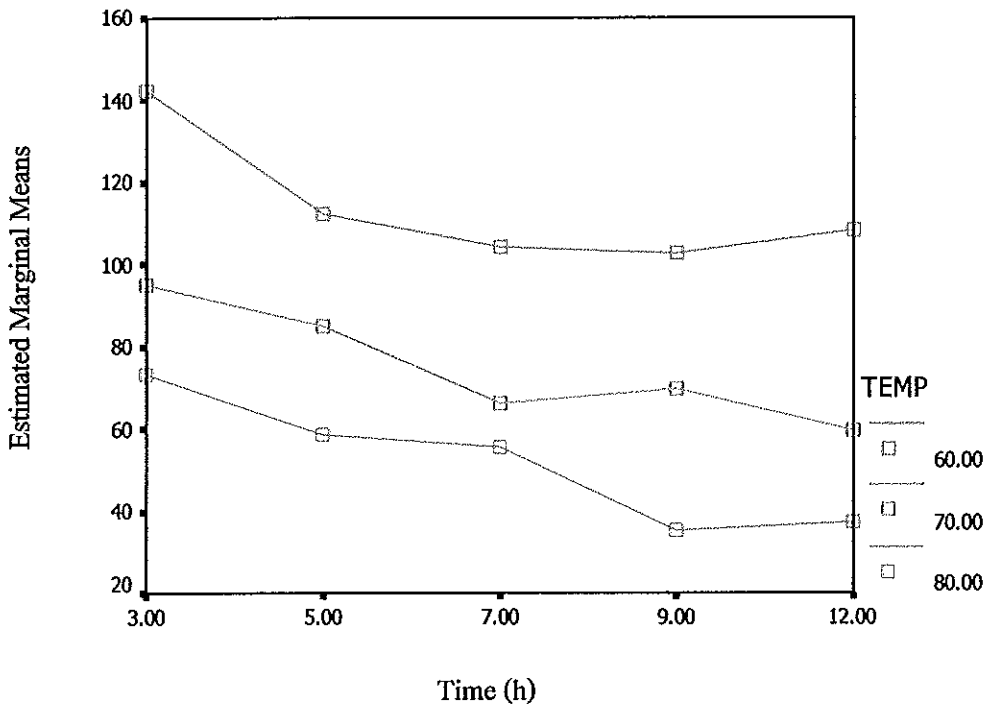
ภาพที่ภาคผนวก จ8 อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยกรด

Figure-Appendix E8 Interaction effect of extracting time (3-12h) and temperature (60-80 °C) on gel strength (g) of chicken feet gelatin from acid swollen ground chicken

ตารางที่ภาคผนวก จ9 ความแปรปรวนของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส)ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง

Table-Appendix E5 Analysis of variance of extracting time (3-12h) and temperature (60-80°C) on gel strength (g) of chicken feet gelatin from alkali swollen ground chicken feet

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	114328.675	14	8166.334	580.047	0.000
Intercept	870848.719	1	870848.719	61855.560	0.000
Solvent	88079.648	2	44039.824	3128.107	0.000
Time	23190.166	4	5797.542	411.794	0.000
Solvent*Time	3058.861	8	382.358	27.159	0.000
Error	1689.450	120	14.079		
Total	986866.843	135			
Corrected Total	116018.125	134			



ภาพที่ภาคผนวก จ9 อิทธิพลร่วมของเวลา (3-12 ชั่วโมง) และอุณหภูมิ (60-80 องศาเซลเซียส) ในการสกัดต่อความแข็งแรงเจลของเจลาตินจากตัวอย่างเท้าไก่บดที่ทำให้พองตัวด้วยด่าง

Figure-Appendix E9 Interaction effect of extracting time (3-12h) and temperature (60-80^{O}C) on gel strength (g) of chicken feet gelatin from alkali swollen ground chicken feet

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวฝาตีมัะ กรมเมือง

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4682015

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2545

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

การเผยแพร่ในการประชุมวิชาการ

Grommuang, F., Vittayanont, M. and Kijroongrojana, K. 2006. Extraction and Characterization of Gelatin from Chicken feet. Poster presentation at the First PSU-UNS Joint International Conference on Bioscience: Food Agriculture, and the environment, Songkhla.

Grommuang, F., Vittayanont, M. and Kijroongrojana, K. 2006. "Extraction and Characterization of Gelatin from Chicken feet", in The First PSU-UNS Joint International Conference on Bioscience: Food Agriculture, and the environment. p. 255-262. Nissapa, A. *et al*,. Haytai : Faculty of Natural Resource, Prince of Songkla University.