



การผลิตเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสำหรับ
การพัฒนาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ
**Production of Gelatin and Gelatin Hydrolysate from Fish Skin for
Development of Healthy Drinks**

สินีนาด สุขไกว
Sineenath Sukkwai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Food Science and Technology
Prince of Songkla University**

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสำหรับ การพัฒนาเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ
ผู้เขียน	นางสาวสินีนาด สุขไกว
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาทูหวานพันธุ์หนังหนาที่ผ่านการแช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.025 นอร์มอล เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนนำไปสกัดที่อุณหภูมิ 80, 90, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 2, 3 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 110, 120, 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณผลผลิตในรูปของไฮดรอกซีโพรลีนเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 120, 130 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด (ร้อยละ 76.36, 68.44 และ 68.24 ตามลำดับ) รูปแบบโปรตีนที่ศึกษาโดย Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) แสดงให้เห็นถึงการย่อยสลายของเจลาตินระหว่างการสกัดที่อุณหภูมิ 100-130 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบเจลาตินที่สกัดจากหนังปลา 3 ชนิด ได้แก่ ปลาทูหวานพันธุ์หนังหนา ปลาทรายแดงและปลาปากคมที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าหนังปลาทูหวานพันธุ์หนังหนาให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด ($p < 0.05$) และมีคะแนนการยอมรับด้านกลิ่นมากที่สุด ($p < 0.05$) โดยเจลาตินดังกล่าวเมื่อผ่านการอบแห้งจะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 90.92 ความชื้นร้อยละ 4.65 ไขมันร้อยละ 1.47 และไขมันร้อยละ 0.05 และเมื่อนำไปทดสอบสมบัติเชิงหน้าที่พบว่าความสามารถในการละลายสูงกว่าร้อยละ 85 ในช่วงพีเอช 1-10 และมีค่าความแข็งแรงของเจล 62.6 กรัม โดยความสามารถในการเกิดโฟมเพิ่มขึ้น ขณะที่ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$)

เมื่อนำเจลาตินสกัดจากหนังปลาทูหวานพันธุ์หนังหนาที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมาย่อยด้วยเอนไซม์แบบ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นแรกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่

อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที และย่อยด้วย เอนไซม์นิวเทรสในขั้นที่สองที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 90 นาทีและย่อยด้วย นิวเทรส 30 นาทีจะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุด ($p < 0.05$)

การศึกษาการลดกลิ่นคาวในเจลาตินโดยการล้างหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาด้วยน้ำ 4 ครั้งหรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 น้ำหนักต่อปริมาตร) 2 ครั้งตามด้วยน้ำ 2 ครั้ง พบว่าเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาที่ล้างด้วยน้ำมีคะแนนกลิ่นคาวต่ำที่สุด ($p < 0.05$) โดยใช้การทดสอบแบบ multisample difference test นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 ไม่สามารถลดระดับกลิ่นไม่พึงประสงค์ของเจลาตินไฮโดรไลเซสได้ ($p > 0.05$) โดยสารประกอบที่ส่งผลต่อกลิ่นคาวของเจลาตินเป็นสารประกอบที่มีซัลเฟอร์ (ไดเมทิลไดซัลไฟด์และไดเมทิลไตรซัลไฟด์) เป็นองค์ประกอบ ขณะที่เจลาตินไฮโดรไลเซสซึ่งมีกลิ่นคล้ายเอนไซม์นิวเทรสจะเป็นสารกลุ่มเอมีนและไพราซีน ทั้งนี้เจลาตินไฮโดรไลเซสที่ผ่านการอบแห้งจะประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 83.14 ความชื้นร้อยละ 6.65 ไขมันร้อยละ 8.54 และไขมันร้อยละ 0.04 โดยมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH และ ABTS เท่ากับ 4.92 และ 482.69 ไมโครโมล TE/กรัมโปรตีน และมีค่าความสามารถในการจับโลหะเท่ากับ 0.44 ± 0.04 มิลลิกรัม EDTA eq/มิลลิกรัมโปรตีนและไม่พบค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (FRAP) เจลาตินไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการละลายสูงกว่าร้อยละ 95 ที่พีเอช 1-10 ค่าความสามารถในการเกิดโฟมจะเพิ่มขึ้นและความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลเซสเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) จากนั้นนำเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ได้ไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในการศึกษาขั้นต่อไป

จากการสำรวจแนวความคิดผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเซสโดยการสัมภาษณ์ผู้ตอบแบบสอบถามเพศหญิงในเขตจังหวัดสงขลาจำนวน 200 คนพบว่าผู้บริโภคต้องการผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมน้ำเบอร์รี่โดยมีเนื้อผลไม้ผสมอยู่ จึงทำการศึกษาอัตราส่วนของน้ำผลไม้ที่เหมาะสมโดยใช้แผนการทดลองแบบผสม จากนั้นเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างน้ำส้มและเบอร์รี่ (ร้อยละ 100: 0, 75: 25, 50: 50, 25: 75 และ 0: 100) ด้วยมาตราความชอบ 9 คะแนน พบว่าไม่มีความแตกต่างของคะแนนความชอบในด้านลักษณะปรากฏ, สี, กลิ่น, รสชาติ, ความหนืดและ

ความชอบโดยรวมระหว่างตัวอย่าง ($p>0.05$) ทั้งนี้ น้ำผลไม้ที่มีสัดส่วนระหว่างน้ำส้มและเบอร์รี่ เป็นร้อยละ 50: 50 มีแนวโน้มว่าจะได้รับคะแนนความชอบรวมสูงที่สุด (7.28) เมื่อนำน้ำผลไม้ ผสมดังกล่าวมาเสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 และ 3.0 พบว่าคะแนนความชอบในด้านกลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวม ลดลง เมื่อความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) รวมทั้งส่งผลให้ค่าพีเอช ค่าสี และค่าความหนืดสูงขึ้น ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 มีคะแนน ความชอบในทุกคุณลักษณะไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p>0.05$)

จากการทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคเพศหญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปในเขตจังหวัด สงขลาจำนวน 200 คนต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสร้อยละ 0.25 พบว่าผู้บริโภคมีความชอบต่อผลิตภัณฑ์ด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น ความหนืด รสชาติและ ความชอบโดยรวมเฉลี่ย 6.91, 7.15, 7.04, 7.44 และ 7.45 ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยมาตรา ความชอบแบบ 9 คะแนน โดยผู้บริโภคร้อยละ 35.7 คิดว่า ‘จะซื้อแน่นอน’ และมีคะแนนความ ตั้งใจซื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.16 และหากมีข้อมูลบ่งชี้เพิ่มเติมให้ผู้บริโภคทราบถึงคุณประโยชน์ของ เจลาตินไฮโดรไลสที่เสริมในผลิตภัณฑ์พบว่าผู้บริโภคที่ตอบว่า ‘จะซื้อแน่นอน’ จะเพิ่มขึ้นเป็น ร้อยละ 54.1 โดยมีคะแนนความตั้งใจซื้อเพิ่มขึ้นเป็น 4.37

Thesis Title	Production of Gelatin and Gelatin Hydrolysate from Fish Skin for Development of Healthy Drinks
Author	Miss Sineenath Sukkwai
Major Program	Food Science and Technology
Academic Year	2011

Abstract

Bigeye snapper skin was pretreated with 0.025 N NaOH for 2 h and 0.02 M acetic acid for 2 h. Gelatins from pretreated fish skin, extracted at 80, 90, 100°C for 1, 2, 3 h and 110, 120, 130°C for 30 min, were compared. Hydroxyproline (Hyp) yield of gelatin increased with increasing extraction temperature and time ($p < 0.05$). The samples extracted at 120 or 130°C for 30 min and 100°C for 3 h showed the highest Hydroxyproline (Hyp) yield (76.36, 68.44 and 68.24%, respectively). Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) pattern of gelatin indicated that hydrolysis of gelatin occurred during extraction at 100 to 130°C. The comparison of gelatin extracted from bigeye snapper, threadfin bream and lizardfish skins at 120°C for 30 min was conducted. Bigeye snapper skin exhibited the highest gelatin yield and the highest odour acceptance score (5.40) ($p < 0.05$) determined by 9-point hedonic scale. After drying, the bigeye snapper skin gelatin contained 90.92 % protein, 4.65 % moisture, 1.47 % ash and 0.05 % fat. Solubility of the gelatin was greater than 85 % at pH 1-10 and bloom strength was 62.6 g. The foaming ability increased and emulsifying property decreased with increasing gelatin concentrations ($p < 0.05$).

Gelatin hydrolysate was produced by 2-step enzymatic hydrolysis of gelatin extracted from bigeye snapper skin at 120 °C for 30 min. Firstly, the gelatin was hydrolyzed by 5 % Alcalase at 55 °C pH 8 for 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min, followed by 5 % Neutrase at 55 °C pH 7 for 0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 min. The antioxidative activity result showed that the gelatin hydrolysate hydrolyzed by Alcalase for 90 min and Neutrase for 30 min yield the

highest 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging activity ($p < 0.05$).

To reduce fishy odour of the gelatin, washing fish skin with water for 4 times or NaCl solution (0.5, 1.0, 1.5 and 2.0 % w/v) for 2 times followed by water for 2 times were compared. The multisample difference test result revealed that gelatin extracted from fish skin washed with water for 4 times had the lowest fishy odour ($p < 0.05$). Nevertheless, adding activated carbon (0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 % w/v) in gelatin hydrolysate before drying had no effect on fishy odour reduction ($p > 0.05$). The sulfur-containing compounds (dimethyl disulfide and dimethyl trisulfide) were the most important volatile compound affecting fishy odour in gelatin, while gelatin hydrolysate having Neutrase-like odour contained amine and pyrazine volatile compounds. The dried gelatin hydrolysate was composed of 83.14 % protein, 6.65 % moisture, 8.54 % ash and 0.04 % fat. Antioxidative activities of the gelatin hydrolysate including metal chelating, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and ABTS radical scavenging activities were 0.44 mg EDTA eq/mg protein, 4.92 and 482.69 μmol trolox equivalent/ g protein, respectively. However, no ferric reducing power (FRAP) was detected. Solubility of gelatin hydrolysate was greater than 95 % at pH 1-10. The foaming ability increased and emulsifying property decreased with increasing gelatin hydrolysate concentrations ($p < 0.05$).

To investigate a gelatin hydrolysate fortified food product concept, female consumers ($n=200$) with the age of 18 years and over from Songkhla province were used. The product concept was blend orange and berry juice with fruit pulp. A mixture experiment was used to optimize fruit juice formulation. The formulations of blend fruit juice with different ratios of orange to berry (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 and 0:100) were compared with 9-point hedonic scale. There were no significant differences in appearance, odour, viscosity, flavour and overall acceptance score among the samples ($p > 0.05$). However, the overall liking score of the sample with orange to berry ratio of 50:50 tended to obtain the highest score (7.28).

The gelatin hydrolysates at levels of 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.0 and 3.0 % were fortified in the blend fruit juice (50:50). Odour, taste and overall acceptance scores of the blend fruit juice decreased and pH, L*, a*, b* as well as viscosity increased with increasing gelatin hydrolysate concentrations ($p < 0.05$). However, no significant differences in all sensory attributes between the sample added with 0.25 % gelatin hydrolysate and the control ($p < 0.05$) were observed.

The consumer test of the blend fruit juice fortified with 0.25 % gelatin hydrolysate for female consumers ($n=200$) with the age of 18 years and higher from Songkhla province was carried out. A 9-point hedonic scale results showed that average acceptance scores of appearance, odour, viscosity, taste and overall liking were 6.91, 7.15, 7.04, 7.44 and 7.45 respectively. Purchase intent score of the blend fruit juice demonstrated that 35.7 % consumers were 'definitely would buy the product' and average score was 4.16. After they had been informed about the health benefit of gelatin hydrolysate fortified in the product, the average purchase intent score was increased to 4.37 ($p < 0.05$) and 54.1 % consumers were 'definitely would buy the product'.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(13)
รายการภาพประกอบ	(16)
บทที่ 1	1
บทนำตั้งเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
คอลลาเจน	3
องค์ประกอบและโครงสร้าง	3
ชนิดของคอลลาเจน	4
เจลาติน	5
องค์ประกอบของเจลาตินจากปลา	5
วิธีการสกัดเจลาตินจากปลา	8
สมบัติของเจลาตินจากปลา	11
การใช้ประโยชน์ของเจลาตินในอาหาร	16
เจลาตินไฮโดรไลเสท	16
วิธีการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลา	16
คุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเจลาตินไฮโดรไลเสท	20
สมบัติการมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของเจลาตินไฮโดรไลเสท	24
การเกิดกลิ่นคาวในปลา	26
วิธีการลดกลิ่นคาว	28
วัตถุประสงค์	29
บทที่ 2 วัสดุและวิธีการวิจัย	30
1. วัสดุดิบและสารเคมี	30
2. เครื่องมือและอุปกรณ์	31
3. วิธีการวิจัย	32
3.1 การเตรียมตัวอย่างหนังปลา	32

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.2 การปฏิบัติเบื้องต้นตัวอย่างหนังปลา	32
3.3 การศึกษาสภาวะและเวลาในการสกัดเจลาตินที่เหมาะสม	32
3.4 การศึกษาผลของชนิดหนังปลาต่อผลผลิตและกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลา	34
3.5 การศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลา	35
3.6 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินเพื่อผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท	36
3.7 การศึกษาผลของการใช้ถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลา	37
3.8 การวิเคราะห์ชนิดของสารที่ระเหยได้ของตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสท	38
3.9 การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลา	39
3.10 พัฒนาสูตรและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ	39
3.11 การศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคกับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาดาวหวานที่พัฒนาขึ้น	41
3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ	41
บทที่ 3 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	42
1. การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเจลาติน	42
2. การศึกษาผลของชนิดหนังปลาต่อผลผลิตและกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลา	45
3. องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาดาวหวานพันธุ์หนังหนา	47
4. การศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลาดาวหวานพันธุ์หนังหนา	53

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท	54
6. การศึกษาผลของการใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา	59
7. องค์ประกอบและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา	60
8. การวิเคราะห์ชนิดของสารที่ระเหยได้ของตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสท	67
9. การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา	71
10. การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท	82
11. การยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา	91
บทที่ 4 บทสรุปและข้อเสนอแนะ	99
สรุป	99
ข้อเสนอแนะ	101
เอกสารอ้างอิง	102
ภาคผนวก	120
ภาคผนวก ก การเตรียมกรวยกรอง	120
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี	121
ภาคผนวก ค การทดสอบทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่	146
ภาคผนวก ง การทดสอบทางประสาทสัมผัส	150
ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์ ANOVA จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Design Expert เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำส้มและน้ำเบอร์รี่	152
ภาคผนวก ฉ ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัสและแบบสำรวจ	158
ประวัติผู้เขียน	173

รายการตาราง

ตาราง		หน้า
1	Collagen and their distribution	4
2	Amino acid content in some fish gelatins compared to pork gelatin	8
3	Different methods of controlling the degree of hydrolysis of protein hydrolysate	19
4	Compounds and odour descriptions analysed by GC of sea fig	27
5	Extraction conditions of gelatin from bigeye snapper skin	33
6	Pretreatment process for fish skin	34
7	The augmented simplex-lettice design for fruit juice	40
8	Hydroxyproline yield (Hyp yield) of gelatins extracted by different conditions	43
9	Fishy odour and acceptance score of gelatins extracted from different fish skins	47
10	Proximate analysis and properties of gelatin extracted from bigeye snapper skin	49
11	Emulsifying properties of gelatin from bigeye snapper skin extracted at 120°C for 30 min at various concentrations	53
12	Fishy odour score of gelatin extracted from bigeye snapper skin washed by NaCl solution at various concentrations	54
13	Odour score of gelatin and gelatin hydrolysates treated by activated carbon (AC) at various concentrations	60
14	Proximate analysis and antioxidant properties of gelatin hydrolysate	63
15	Emulsifying properties of gelatin hydrolysate from bigeye snapper skin extracted at 120°C for 30 min at various concentrations	66
16	Volatile compounds in gelatin (G) and gelatin hydrolysate (GH)	68
17	Demographic and socioeconomic characteristic of respondents	72
18	Functional food consuming behavior of respondents	74

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
19	Type of food product used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product	77
20	Fruit/ vegetable juice used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product	77
21	The number of fruit/ vegetable used for developing of gelatin hydrolysate supplemented fruit/ vegetable blend juice	78
22	Characteristic of fruit/ vegetable juice supplemented with gelatin hydrolysate	78
23	Herb/ spice beverage used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product	79
24	The number of herb/ spice used for developing of gelatin hydrolysate supplemented herb/spice or mixed herb/spice beverage	79
25	Instant drinking powder used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product	80
26	Milk product used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product	80
27	Flavour of gelatin hydrolysate supplemented milk product	81
28	Flavour of gelatin hydrolysate supplemented ice cream	81
29	Acceptance score of fruit juice with various ratios of orange and berry juice	85
30	Chemical and physical properties of fruit juice with various ratios of orange and berry juice	86
31	Acceptance score of fruit juice added with 0-2 % gelatin hydrolysate	87
32	Chemical and physical properties of fruit juice added with 0-2 % gelatin hydrolysate	88
33	Acceptance score of fruit juice added with 0-0.75 % gelatin hydrolysate	89

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง		หน้า
34	Chemical and physical properties of fruit juice added with 0-0.75 % gelatin hydrolysate	90
35	Demographic and socioeconomic characteristic of consumer test for gelatin hydrolysate supplemented blend fruit juice	92
36	Functional food consuming behavior of consumers	94
37	Acceptance score of gelatin hydrolysate supplement blend fruit juice	97
38	Frequency of consumer purchase intent of gelatin hydrolysate supplement blend fruit juice	97
39	Preparation of standard Trolox solution for DPPH radical scavenging activity determination	128
40	Preparation of standard Trolox solution for ABTS radical scavenging activity determination	131
41	Preparation of standard Trolox solution for ferric reducing antioxidant power determination	132
42	Preparation of standard EDTA solution for Metal chelating activity determination	134
43	Preparation of standard BSA solution for Biuret method	136
44	Preparation of standard Hydroxyproline solution	139
45	Preparation of standard L-leucine solution	141
46	GC/MS condition for flavor analysis	145
47	Fishy odour score of standard gelatin	151
48	ANOVA for Mixture Linear Model (Appearance)	152
49	ANOVA for Mixture Quadratic Model (Colour)	153
50	ANOVA for Mixture Linear Model (Flavour)	154
51	ANOVA for Mixture Linear Model (Viscosity)	155
52	ANOVA for Mixture Cubic Model (Taste)	156
53	ANOVA for Mixture Linear Model (Overall)	157

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	Triple-helical structure of collagen	4
2	Denaturation of collagen	5
3	Protein patterns of the gelatin from sole (a), mergrim (b), cod (c), hake (d), and squid (e)	7
4	Hydrolysis of a peptide bond by protease	17
5	SDS-PAGE pattern of gelatin from bigeye snapper skin extracted at different temperature and time under non reducing condition. I: type I collagen	45
6	Foaming properties of gelatin from bigeye snapper skin extracted at 120°c for 30 min at different concentration (0.1 – 3.0 %)	51
7	Degree of hydrolysis of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Alcalase at various times	56
8	ABTS radical scavenging activity of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Alcalase at various times	56
9	Degree of hydrolysis of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Neutrase at various times	58
10	ABTS radical scavenging activity of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Neutrase at various times	58
11	Foaming properties of gelatin hydrolysate from bigeye snapper skin	66
12	Buchner's funnel with activated carbon layer	120
13	Standard curve for DPPH radical scavenging activity determination	129
14	Standard curve for ABTS radical scavenging activity determination	131
15	Standard curve for ferric reducing antioxidant power determination	133
16	Standard curve for Metal chelating activity determination	135
17	Standard curve for Biuret method	137
18	Standard curve for hydroxyproline content determination	139
19	Standard curve for Degree of Hydrolysis determination	141

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

อาหารทะเลเป็นสินค้าส่งออกที่มีความสำคัญของไทย โดยผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่มีปลาเป็นวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่มีมูลค่าการส่งออกสูง จากข้อมูลสถิติสินค้าส่งออกที่รวบรวมโดยศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์ (2555) แสดงให้เห็นว่าสินค้าส่งออกในกลุ่มเนื้อปลาสดแช่เย็นและแช่แข็งมีมูลค่าการส่งออกสูงเป็นอันดับ 7 ของสินค้าส่งออกในกลุ่มสินค้าเกษตรกรรม โดยในปี 2554 มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 12,398.56 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบส่วนแบ่งทางการตลาดพบว่าประเทศไทยมีส่วนแบ่งการตลาดเป็นอันดับหนึ่ง (ร้อยละ 28) ปลาที่นิยมนำมาผลิตซูริมีที่จัดว่ามีคุณภาพดีที่สุดของไทย คือ ปลาทรายแดง ส่วนปลาอื่นๆ ที่นิยมรองลงมา ได้แก่ ปลาดาทู ปลาทูน่า ปลาทรายดำ ปลาดาทู ปลาดู ปลาดูหางเหลือง ปลาดูขาว ปลาโฮก ปลาไส้ก้อ ปลาฤๅษี ปลาปากคม ปลาเม็ดย่น เป็นต้น และจากกระบวนการผลิตที่จะต้องนำปลามาตัดหัว ควักไส้ แล่เนื้อปลาที่ได้ออกจากส่วนก้างและหนังปลาด้วยเครื่องแยกเนื้อ โดยพบว่าในระหว่างกระบวนการผลิตจะมีเศษเหลือจากการผลิต เช่น หัวปลา ก้าง หนัง เศษเนื้อและอวัยวะภายในสูงถึงประมาณร้อยละ 40-60 โดยเฉพาะส่วนของหนังมีปริมาณร้อยละ 4 (Archer, 2001) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของปลาและความสดของปลารวมถึงกรรมวิธีที่ใช้ในการแยกเนื้อออกมา (มีทนา แสงจินดาวงษ์ และคณะ, 2552) วัสดุเศษเหลื่อดังกล่าวทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้นในการกำจัดหรือหากจะมีการนำไปใช้ประโยชน์ก็จะกลายเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าต่ำ เช่น อาหารสัตว์ ดังนั้นหากมีการศึกษาเพื่อนำวัสดุเหล่านี้ไปใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้นก็จะสามารถแก้ปัญหาข้างต้นได้

การสกัดเจลาตินจากวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาเป็นแนวทางหนึ่งในการสร้างมูลค่าแก่วัสดุเศษเหลือ โดยอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้เจลาติน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ประเภทเจลาติน เช่น เยลลี่ การใช้เจลาตินในการทำเครื่องดื่มและน้ำผัก/ผลไม้ใส (Vine *et al.*, 1999; Lee and Lee, 1999) รวมถึงการใช้เจลาตินสารให้ความคงตัว (stabilizer) สารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) สารให้ความหนืด (thickener) และสารให้เนื้อสัมผัส (texturizer) ทำให้มีการใช้เจลาตินในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น ขนมหวาน ลูกกวาด ลูกอม แคลปซูล เกรวีชนิดขงและไอศกรีม (Igoe, 1983; McCormick, 1987; McWilliam, 2001) นอกจากนี้ยังมีอุตสาหกรรมอื่น ๆ ที่ไม่ใช่

อาหาร เช่น ฟิล์ม อิมัลชัน และกาว (Burghagen, 1999) เจลาตินส่วนใหญ่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมดังกล่าวมาข้างต้นนี้มักได้มาจากการสกัดหนังโค กระบือและสุกร เจลาตินจากหนังสุกรเป็นข้อจำกัดของผลิตภัณฑ์อาหารที่เป็นฮาลาล (Halal) และโคเชอร์ (Kosher) อีกทั้งการระบาดของโรควัวบ้าและโรคปากและเท้าเปื่อยในโคกระบือทำให้การใช้เจลาตินจากแหล่งดังกล่าวเป็นไปอย่างจำกัดและต้องเฝ้าระวัง ดังนั้นการผลิตเจลาตินจากหนังปลาและอาหารทะเลจึงได้รับความสนใจมากขึ้น ตัวอย่างเช่นงานวิจัยที่ศึกษาการสกัดคอลลาเจนและเจลาตินจากหนังและกระดูกของปลาตาหวาน (Kittiphattanabawon *et al.*, 2006) การสกัดเจลาตินจากหนังของปลาแอทแลนติก แซลมอน (Arnesen and Gildberg, 2007) การศึกษาการใช้เอนไซม์เปปซินร่วมกับกรดอะซิติกในการสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาตาหวาน (Nalinanon *et al.*, 2007) นอกจากนี้เจลาตินที่สกัดได้จะมีการนำไปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมแล้ว จากการศึกษาของนักวิจัยหลายท่านยังพบว่าการนำเจลาตินที่ผลิตจากหนังปลาหรือสัตว์ทะเลมาเตรียมเป็นเจลาตินไฮโดรไลสียังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (Kim *et al.*, 2001; Dávalos *et al.*, 2004; Mendis *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008; Phanturat *et al.*, 2010; Alamán *et al.*, 2011a; Alamán *et al.*, 2011b; Gómez-Guillén *et al.*, 2011) รวมทั้งเป็น ACE inhibitor peptide ที่มีกิจกรรมสูงและสามารถใช้ลดความดันโลหิต (Zhao *et al.*, 2007; Alamán *et al.*, 2011a) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการใช้คอลลาเจนหรือเจลาตินไฮโดรไลสียในการปรับปรุงความหนาแน่นและความแข็งแรงของกระดูก (Nomura *et al.*, 2005) อีกทั้งมีความเกี่ยวข้องกับข้อต่อของร่างกาย การงอกของเล็บและสภาพผิว รวมถึงช่วยลดอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อเสื่อม (Eggerslüss, 1999; Moskowitz, 2000; Lupien, 2002)

การใช้ประโยชน์ของเจลาตินไฮโดรไลสียในอาหารได้รับความสนใจในยุโรป สหรัฐอเมริกาและเอเชียมากขึ้น โดยการผลิตในรูปผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ได้แก่ เครื่องดื่มชนิดพร้อมดื่มที่มีส่วนผสมของเจลาตินไฮโดรไลสีย วิตามินและเกลือแร่ที่สำคัญต่อสภาวะข้อและกระดูก อาหารเพื่อสุขภาพ เช่น โปรตีนธัญพืชแบบแท่ง โยเกิร์ต เจลลี่ เม็ดยาแบบเคี้ยว โปรตีนสำหรับนักกีฬาและอาหารสำหรับกลุ่มผู้บริโภคที่สนใจด้านความงามของผิว เล็บและสภาพผิว รวมทั้งการนำไปใช้ในอาหารสมดุลและลดความอ้วน ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณเกลือต่ำและปราศจากน้ำตาล (Eggerslüss, 1999)

ผลิตภัณฑ์เสริมคอลลาเจนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมทั้งในกลุ่มบุคคลที่รักสุขภาพ รวมถึงกลุ่มที่บริโภคเพื่อความงาม ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่ในท้องตลาด เช่น ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มคอลลาเจนสำหรับผิว ‘สก็อต คอลลาเจน-อี’ ที่เน้นกลุ่มผู้บริโภคเป็นผู้หญิงอายุ 25 – 30 ปี และ ‘สก็อต คอลลาเจน-เอ็ม วิธ ซิงค์’ เน้นกลุ่มผู้บริโภคเป็นผู้ชายวัยทำงานหรือผลิตภัณฑ์

เครื่องคั่วคอลลาเจนจากหอยเป่าฮื่อผสมน้ำทับทิมตรากิฟารินซึ่งมีกลุ่มผู้บริโภคเป็นผู้หญิงที่ต้องการดูแลผิวพรรณ เป็นต้น นอกจากนี้ผลการสรุปภาวะการลงทุนใน 14 จังหวัดภาคใต้ของสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการลงทุนยังแสดงให้เห็นว่ามีโครงการผลิตคอลลาเจนจากสัตว์ทะเลที่ได้รับอนุมัติการลงทุน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าคอลลาเจนจากสัตว์ทะเลได้รับความสนใจมากขึ้นทั้งจากภาคอุตสาหกรรมและผู้บริโภค (หนังสือพิมพ์ประชาชาติธุรกิจ สรุปข่าวการตลาด, 2555; กิฟาริน, 2555; ศูนย์เศรษฐกิจการลงทุนภาคที่ 5 สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการลงทุน, 2555)

อย่างไรก็ตามการนำเจลาตินจากปลามาใช้ประโยชน์ในอาหารยังมีข้อจำกัดเนื่องจากมีสีคล้ำและมีกลิ่นคาว (Wasswa *et al.*, 2007; Choi and Regenskin, 2000) จึงมีความสนใจในการศึกษากระบวนการสกัดเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยต้องการหาวิธีที่สามารถลดกลิ่นและสีที่ไม่พึงประสงค์ รวมถึงการหาสภาวะที่ให้ผลผลิตสูงสุดและศึกษาแนวทางการนำเจลาตินไฮโดรไลสที่ได้มาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ ซึ่งจะทำได้สามารถเพิ่มศักยภาพการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลื่อดังกล่าว

ตรวจเอกสาร

คอลลาเจน

คอลลาเจนเป็นโปรตีนธรรมชาติที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ในสัตว์และเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยมีปริมาณหนึ่งในสามของโปรตีนทั้งหมดในร่างกาย โปรตีนกล้ามเนื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเป็นคอลลาเจนร้อยละ 10 ส่วนในปลาจะมีน้อยกว่านั้น (Foegeding *et al.*, 1996)

องค์ประกอบและโครงสร้าง

คอลลาเจนแต่ละโมเลกุลจะประกอบไปด้วยสามสายโพลีเปปไทด์เรียกว่าสายโซ่แอลฟา (α -chain) หรือโทรโปคอลลาเจน (tropocollagen) สายโซ่แอลฟาทั้งสามสายจะเกิดเป็นโครงสร้างแบบทริเปิลเฮลิคัล (triple helical) ด้วยพันธะไฮโดรเจนดังแสดงในภาพที่ 1 โดยทั่วไปสายโซ่แอลฟาจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีลำดับของ Gly-x-y ซ้ำกันต่อเนื่อง โดย x ส่วนใหญ่เป็นโพรลีนและ y เป็นไฮดรอกซีโพรลีน ความแตกต่างของคอลลาเจนแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับชนิดของสายโซ่แอลฟาที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ $\alpha 1$, $\alpha 2$ หรือ $\alpha 3$ การกระจายของสายโซ่ $\alpha 1$, $\alpha 2$ และ $\alpha 3$ ในโมเลกุลจะแตกต่างกัน ขึ้นกับความแตกต่างของพันธะกรรม (Xiong, 1997;

Gómez-Guillén *et al.*, 2011) การแบ่งชนิดของคอลลาเจนตามสายโซ่แอลฟาและแหล่งที่พบดังแสดงในตารางที่ 1



Figure 1. Triple-helical structure of collagen

Source: Voet *et al.* (2008)

Table 1. Collagen and their distribution

Type	Triple helix	Distribution
I	Two identical $\alpha 1$ (I) chains + one $\alpha 2$ chain	skin, tendon, bone
II	three $\alpha 1$ (I) chains	Intervertebral disc, cartilage
III	three $\alpha 1$ (III) chains	Cardiovascular vessel, uterus
IV	three $\alpha 1$ (IV) chains	basement membrane, kidney glomeruli, lens capsule

Source: Wong (1989)

ชนิดของคอลลาเจน

Xiong (1997) แบ่งชนิดของคอลลาเจนออกเป็น 3 ชนิด ตามโครงสร้างของโมเลกุล ได้แก่

1. คอลลาเจนชนิดเป็นเส้นใย (striated fibrous collagen) ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิด type I, II และ III
2. คอลลาเจนชนิดไม่เป็นเส้นใย (nonfibrous collagen) ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิด type IV หรือ คอลลาเจนที่เป็นเมมเบรน (basement membrane collagen)

3. คอลลาเจนที่เป็นไมโครไฟบริลลา (microfibrillar collagen) ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิด type VI และ VII (matrix microfibrils) type V, IX และ X (pericellular collagen) type VIII และ XI (unclassified)

คอลลาเจนในสัตว์น้ำ เช่น ปลา ลอบสเตอร์และหมีก็จะเป็นคอลลาเจนชนิด type I อยู่ร่วมกับ type III และ type V ในปริมาณเล็กน้อย โดยคอลลาเจนชนิด type I จะมีสัดส่วนมากที่สุด ซึ่งในหนังปลาก็จะประกอบไปด้วยคอลลาเจนชนิดนี้เช่นกัน (Hallett and Bremner, 1988) Kittiphatanabawon (2004) พบว่าคอลลาเจนที่สกัดจากหนังและกระดูกของปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) เป็นคอลลาเจน type I มีองค์ประกอบของสายโซ่แอลฟาสองชนิด ได้แก่ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$

เจลาติน

เจลาตินเป็นส่วนผสมของอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีน โดยเกิดจากการเสียสภาพเนื่องจากความร้อนของคอลลาเจนดังแสดงในภาพที่ 2 โดยระหว่างกระบวนการเปลี่ยนแปลงจากคอลลาเจนไปเป็นเจลาตินจะเกิดการทำลายพันธะระนาบโควาเลนต์ส่วนใหญ่ทั้งที่อยู่ภายในและระหว่างโมเลกุล รวมถึงพันธะเปปไทด์อีกเล็กน้อย ผลจากการทำลายพันธะดังกล่าวทำให้โครงสร้างเกลียวของคอลลาเจนเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบที่เป็นอสัณฐานมากขึ้น (Bigi *et al.*, 1998; Foegeding *et al.*, 1996)

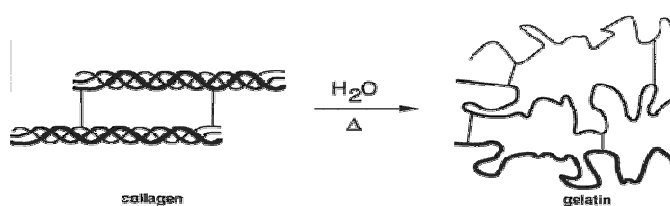


Figure 2. Denaturation of collagen

Source: Hansen and Lee (1991)

องค์ประกอบของเจลาตินจากปลา

เจลาตินเป็นส่วนผสมแบบเฮเทอโรจีนียส (heterogeneous mixture) ของโปรตีน น้ำหนักโมเลกุลสูงที่ละลายน้ำได้ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 80 - 250 กิโลดาลตัน โดยทั่วไปเจลาตินประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 85-90 ความชื้นร้อยละ 8-13 และเถ้าร้อยละ 0.5 - 2 โดยน้ำหนักแห้ง (Wasswa *et al.*, 2007) เจลาตินประกอบด้วยกรดอะมิโน 18 ชนิด โดยมีไกลซีน

เป็นองค์ประกอบหลักประมาณร้อยละ 26 – 34 โพรลีนร้อยละ 10 – 18 ไฮดรอกซีโพรลีน ร้อยละ 7 – 15 อะลานีนร้อยละ 8 – 11 อาร์จินีนร้อยละ 8 – 9 กรดแอสพาร์ติกร้อยละ 6 – 7 และ กรดกลูตามิกร้อยละ 10 – 12 (Hudson, 1994; Poppe, 1997) เจลาตินไม่ใช่แหล่งของโปรตีนที่ สมบูรณ์เนื่องจากไม่มีทริปโตเฟนและมีไอโซลิวซีน ไทโอนีนและเมทไทโอนีนในปริมาณที่ น้อยมาก นอกจากนี้กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ ซิสเทอีนและซิสทีนก็มีอยู่ น้อยมากหรือไม่มีเลย (Potter and Hotchkiss, 1998) โดยสัดส่วนของกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ จะ ขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของคอลลาเจนนั้น ๆ จากตารางที่ 2 แสดงกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน เจลาตินจากหนังปลาชนิดต่าง ๆ เปรียบเทียบกับเจลาตินที่สกัดจากหนังหมู จะเห็นได้ว่าเจลาตินที่ สกัดมาจากหนังปลาจะมีโพรลีน ไฮดรอกซีโพรลีนและและกรดอะมิโนรวมที่น้อยกว่า (ประมาณ ร้อยละ 7-10 ของกรดอะมิโนทั้งหมด) คอลลาเจนจากหนังหมูมาก (ประมาณร้อยละ 14 ของ กรดอะมิโนทั้งหมด) (Nalinanon *et al.*, 2008) ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้คอลลาเจนจากหนังปลามี สมบัติต่าง ๆ เช่น การให้ความหนืดหรือความแข็งแรงของเจลต่ำกว่าเจลาตินจากหนังหมู ทั้งนี้ เนื่องจากกรดอะมิโนดังกล่าวจะเป็นส่วนที่มีไฮโดรเจนเป็นองค์ประกอบมาก ซึ่งมีผลต่อการเกิด พันธะที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติดังกล่าว (Karim and Bhat, 2009) ปริมาณของกรดอะมิโน โดยเฉพาะไฮดรอกซีโพรลีนขึ้นกับสภาพสิ่งแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่และมีผลกระทบต่อความคงตัว ต่อความร้อนของคอลลาเจน โดยคอลลาเจนจากปลาที่อาศัยในน้ำเย็นมีปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ ต่ำกว่า และมีความคงตัวต่อความร้อนที่ต่ำกว่าปลาที่อาศัยในเขตน้ำอุ่น นอกจากนี้ปลาที่อาศัยใน เขตน้ำเย็นยังมีกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl amino acid) ได้แก่ เซอรีนและทรีโอนีนใน ปริมาณสูง (Wasswa *et al.*, 2007) Jongjareonrak (2006) ยังพบว่าเจลาตินที่สกัดจากหนังปลา ตาหวานสองสายพันธุ์ ได้แก่ ปลาตาหวานหนังหนา (*Priacanthus tayenus*) และปลาตาหวานหนัง บาง (*Priacanthus macracanthus*) ประกอบด้วยกรดอะมิโน (โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีน) ใน ปริมาณที่สูง (193 และ 225 रेचिदिव/ 1000 रेचिदिवของกรดอะมิโนทั้งหมด) เมื่อเปรียบเทียบกับ เจลาตินจากปลาชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีปริมาณกรดอะมิโนต่ำ เช่น ปลาคอด, อะลาสกา พอลแลค, ปลาแฮก และปลาเมอร์กิม (156, 150, 173 และ 175 रेचिदिव/ 1000 रेचिदिवของกรดอะมิโนทั้งหมด ตามลำดับ) นอกจากนี้เจลาตินจากหนังปลาทั้งสองชนิดยังประกอบด้วยประกอบด้วยสายโซ่ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ เป็นองค์ประกอบหลัก รวมถึง β และ γ ที่สังเกตได้จากผลการตรวจสอบด้วย Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยปริมาณกรดอะมิโนและโครงสร้าง สายโซ่ดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อสมบัติของเจลาติน เช่น อุณหภูมิในการเกิดเจลและความแข็งแรงของเจล (Karim and Bhat, 2009)

Gómez-Guillén และคณะ (2002) ศึกษาารูปแบบโปรตีนของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลา ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลอง ได้แก่ กลุ่มปลาที่มีลักษณะลำตัวแบน (flat fish) ประกอบด้วยปลาโซล (*Solea vulgaris*) และปลาเมอร์กริม (*Lepidorhombus boscii* (Risso)) กลุ่มปลาที่อาศัยในเขตหนาวประกอบด้วย ปลาคอด (*Gadus morhua*) และปลาแฮก (*Merluccius merluccius*, L.) รวมถึงหิ้งมิก (*Dosidicus gigus*) ใช้อุณหภูมิในการสกัดเจลาติน 45 องศาเซลเซียสสำหรับปลาในสองกลุ่มแรกและ 80 องศาเซลเซียสสำหรับหิ้งมิก ใช้เวลาในการสกัดข้ามคืน นำเจลาตินที่สกัดได้มาศึกษาารูปแบบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 3 จะเห็นว่ามีแถบโปรตีนในตำแหน่งของสายโซ่แกรมมา (γ), เบต้า (β) และแอลฟา (α) องค์ประกอบทั้งสามเกิดจากการเสียดสภาพโครงสร้างทริปเปิลเฮลิกซ์ของคอลลาเจน โดยสายโซ่แกรมมาและเบต้าประกอบด้วยสายโซ่แอลฟา 3 และ 2 สาย ตามลำดับ (Karim and Bhat, 2009) เจลาตินที่สกัดจากหนังปลาแต่ละชนิดมีปริมาณของส่วนประกอบทั้ง 3 แตกต่างกัน โดยเจลาตินจากหนังปลาโซลและเมอร์กริมจะมีปริมาณองค์ประกอบทั้งสามรวมถึงเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมากที่สุด ในขณะที่เจลาตินจากหนังปลาคอด ปลาแฮกและหิ้งมิกจะมีองค์ประกอบดังกล่าว น้อยกว่าแต่กลับมีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำเพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการถูกทำลายของโครงสร้างสายโซ่ระหว่างการสกัด

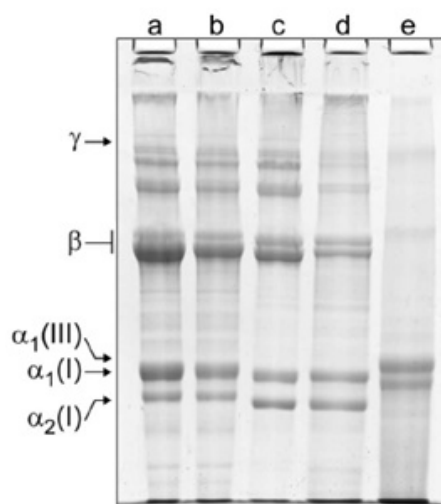


Figure 3. Protein patterns of the gelatin from sole (a), mergrim (b), cod (c), hake (d), and squid (e)

Source: Gómez-Guillén *et al.* (2002)

Table 2. Amino acid content in some fish gelatins compared to pork gelatin (residues/1000 total amino acid residues)

Amino acid	<i>Priacanthus macracanthus</i> ¹	<i>Priacanthus tayenus</i> ²	Cod skin ³	Alaska Pollack skin ³	Hake ³	Mergrim ³	Tilapia skin ³	Pork skin ³
Ala	103	136	96	108	119	123	123	112
Arg	92	60	56	51	54	54	47	49
Asx	61	51	52	51	49	48	48	46
Cys	-	-	0	0	-	-	0	0
Glx	103	78	78	74	74	72	69	72
Gly	193	286	344	358	331	350	347	330
His	12	10	8	8	10	8	6	4
Hyl	-	10	6	6	5	5	8	6
Hyp	91	77	50	55	59	60	79	91
Ile	10	5	11	11	9	8	8	100
Leu	27	24	22	20	23	21	23	24
Lys	38	31	29	26	28	27	25	27
Met	17	12	17	16	15	13	9	4
Phe	21	15	16	12	15	14	13	14
Pro	134	116	106	95	114	115	119	132
Ser	38	36	64	63	49	41	35	35
Thr	32	29	25	25	22	20	24	18
Trp	-	-	0	0	-	-	0	0
Tyr	6	4	3	3	4	3	2	3
Val	21	22	18	18	19	18	15	26
Imino acid	225	193	156	150	173	175	198	223

Source: Modified from Kittiphattanabawon (2004)¹; Jongjareonrak (2006)²; Karim and Bhat (2009)³

วิธีการสกัดเจลาตินจากปลา

สภาวะที่ใช้ในการสกัดเจลาติน ได้แก่ อุณหภูมิ เวลาและพีเอช จะมีอิทธิพลต่อความยาวของสายโพลีเปปไทด์และสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินอย่างมาก รวมทั้งคุณสมบัติของวัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบก็มีผลต่อเจลาตินที่จะสกัดได้เช่นกัน ดังนั้นถึงแม้ว่าการสกัดเจลาตินจะสามารถเลือกใช้กระบวนการได้หลากหลายวิธี แต่ทุกวิธีก็มักจะใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ได้แก่

การใช้สารเคมีที่ระดับความเข้มข้นต่ำหรือกระบวนการสกัดที่อุณหภูมิปานกลางเพื่อรักษาสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินไว้ (Karim and Bhat, 2009)

การสกัดเจลาตินประกอบด้วยขั้นตอน 3 ขั้นตอน คือ 1) การปฏิบัติเบื้องต้น (pretreatment process) เพื่อกำจัดองค์ประกอบที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไปจากวัตถุดิบ 2) กระบวนการสกัด (extraction process) ซึ่งจะเปลี่ยนคอลลาเจนเป็นเจลาตินด้วยความร้อนและน้ำ 3) การทำให้บริสุทธิ์และทำแห้ง (purification and drying) (Karim and Bhat, 2009)

1. การปฏิบัติเบื้องต้น

ขั้นตอนการปฏิบัติเบื้องต้นสามารถแบ่งเจลาตินได้เป็น 2 ชนิด คือ เจลาตินที่เตรียมโดยใช้กระบวนการที่ใช้กรดจะเป็นเจลาตินประเภท A (type A gelatin) ส่วนที่เตรียมด้วยกระบวนการที่ใช้ด่างจะเป็นเจลาตินประเภท B (type B gelatin) ซึ่ง Wasswa และคณะ (2007) ให้รายละเอียดของทั้งสองกระบวนการ ดังนี้

1.1 กระบวนการที่ใช้กรด (acid process)

กระบวนการที่ใช้กรดเป็นกระบวนการที่ใช้กันมากกับหนังหมู หนังปลาและกระดูกบางชนิด โดยหนังปลาจะต้องเอาไขมันออกก่อนโดยหมูนเหียงด้วยถังทรงกระบอกแบบหมุน แล้วให้ความร้อนด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำมาแช่ในสารละลายกรด เช่น กรดไฮโดรคลอริก กรดฟอสฟอริกหรือกรดซัลฟิวริก (กรดอาหาร) ที่มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 1-4 เป็นเวลา 8-30 ชั่วโมง ขั้นตอนนี้จะทำให้วัตถุดิบพองตัวขึ้น 2-3 เท่า วัตถุดิบที่ผ่านการแช่กรดแล้วจะต้องล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดสิ่งปลอมปนออกจากวัตถุดิบ ตัวอย่างงานวิจัยที่ใช้กรดในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้น เช่น Nalinanon และคณะ (2007) ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ เปปซินร่วมกับการใช้กรดอะซิติกเพื่อทำให้หนังปลาดาวพองตัวก่อนนำไปสกัดเจลาตินโดยใช้เปปซิน 15 กิโลยูนิตต่อกรัมของหนังปลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลิตเจลาตินร้อยละ 40.32 ในขณะที่ตัวอย่างที่ไม่เติมเอนไซม์เปปซินให้ผลผลิตร้อยละ 22.16 นอกจากนี้ Jamilah และ Harvinder (2002) ได้ศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังของปลานิลดำ (black tilapia, *Oreochromis mossambicus*) และปลานิลแดง (red tilapia, *Oreochromis nilotica*) โดยล้างวัตถุดิบด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ แช่วัตถุดิบในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 และกรดซिटริก ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงนำไปสกัดโดยใช้น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไปกรองและทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง และจากการศึกษาของ Ahmad และ Benjakul (2011) เกี่ยวกับการใช้กรดอะซิติกและกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ แช่หนังปลาวัว (*Aluterus monoceros*) ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำ

หนังปลาดังกล่าวไปสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าการแช่หนังปลาด้วยกรดฟอสฟอริกมีผลให้ผลผลิตสูงกว่า (ร้อยละ 6.12 และ 11.54 เมื่อใช้เวลาสกัด 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ) เมื่อเทียบกับการใช้กรดอะซิติก (ร้อยละ 5.23 และ 9.18 เมื่อใช้เวลาสกัด 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ)

1.2 กระบวนการที่ใช้ด่าง (alkali process)

การผลิตเจลาตินจากกระดูกจะต้องใช้เวลานานเนื่องจากมีปริมาณแร่ธาตุสูง โดยนำกระดูกมาบด แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 82 – 121 องศาเซลเซียส จากนั้นเหวี่ยงแยกและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 72 – 132 องศาเซลเซียส กระดูกที่จะนำมาสกัดเจลาตินจะต้องกำจัดไขมันออกก่อน แล้วจึงผ่านขั้นตอนการกำจัดแร่ธาตุด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 4-6 ใช้เวลาในขั้นตอนนี้ประมาณ 5 – 7 วัน โดยผงกระดูกที่เอาแร่ธาตุออกแล้วจะเรียกว่า “ออสไซน์” (Ossine) ออสไซน์จะถูกล้างด้วยน้ำหลายๆ ครั้ง แล้วใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ร้อยละ 1-4 ในการปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 12 – 12.7 และแช่ตัวอย่างไว้ 35 – 70 วัน โดยมีการเขย่าและเปลี่ยนสารละลายทุกสัปดาห์ เพื่อกำจัดสารที่ไม่ใช่คอลลาเจน จากนั้นล้างออสไซน์ด้วยน้ำในอัตรา 50 - 100 ปอนด์ต่อปอนด์ของออสไซน์ ระหว่างการล้างจะมีการเติมกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ค่าพีเอชส่วนเกินเป็นกลางแล้วปรับพีเอชให้เป็น 3 หลังผ่านกระบวนการล้างขั้นสุดท้ายพีเอชของตัวอย่างจะอยู่ในช่วง 5 – 7 และสกัดเจลาตินจากออสไซน์โดยใช้น้ำ

2. กระบวนการสกัด (extraction process)

ขั้นตอนการสกัดนั้นมักใช้น้ำร้อนเพื่อสกัดเอาเจลาตินออกมาจากวัตถุดิบหนังปลา อุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดอยู่ในช่วง 40 - 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 - 18 ชั่วโมง (Karim and Bhat, 2009) จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลา skate (Skate) ในช่วงอุณหภูมิ 40 – 70 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง (Cho *et al.*, 2006) หนังปลากราส คาร์ฟ (Grass carp) ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิ 40 – 80 องศาเซลเซียส นาน 1-8 ชั่วโมง (Kasankala *et al.*, 2007) และปลาพอลแลค (Pollack) หรือปลาแปซิฟิก คอด (Pacific cod) ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิ 50 - 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง (Kawahara and Tanihata, 2005) พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกัน คือ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดเจลาตินจะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตที่สูงขึ้น แต่การใช้อุณหภูมิในการสกัดที่สูงขึ้นจะทำให้ได้เจลาตินที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงด้วย ทั้งนี้เนื่องมาจากความร้อนมีผลในการทำลายพันธะภายในสายของเจลาติน ซึ่งส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาติน เช่น ความแข็งแรงของเจลและความหนืดจะลดลง

3. การทำให้บริสุทธิ์และทำแห้ง

ขั้นตอนนี้คือการทำให้เจลาตินอยู่ในรูปแบบที่ต้องการ เช่น การกรองหรือการทำแห้ง เป็นต้น จากขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างที่แบ่งเจลาตินออกเป็น 2 ประเภทส่งผลต่อความแตกต่างในขั้นนี้ด้วยเช่นกัน คือ

3.1 เจลาตินประเภท A (type A gelatin)

สารสกัดเจลาตินที่ได้จะถูกนำมากรองผ่านคอลัมน์แลกเปลี่ยนแอนไอออน – แคทไอออน (anion – cation exchange column) เพื่อลดปริมาณเถ้าและแร่ธาตุ จากนั้นทำให้เข้มข้นด้วยวิธีสุญญากาศหรือวิธีอัลตราฟิลเตรชันให้มีความเข้มข้นร้อยละ 15-30 แล้วกรองก่อนปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 3.5 – 6 จากนั้นระเหยให้มีความเข้มข้นเป็นร้อยละ 50 สเตอริไรซ์ที่อุณหภูมิระหว่าง 120 – 150 องศาเซลเซียส นาน 13 วินาที ทำให้เย็นและจึนรูปเป็นเส้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1/8 นิ้ว ทำแห้งโดยใช้มัลติโซนโอเวนที่ 70 องศาเซลเซียส บดให้ได้ขนาดอนุภาคตามต้องการก่อนการบรรจุและจัดเก็บ โดยเจลาตินที่ได้มีจุดไอโซไอออนิกเท่ากับ 7-9 (Wasswa *et al.*, 2007)

3.2 เจลาตินประเภท B (type B gelatin)

สารละลายเจลาตินที่สกัดได้จะถูกนำมากรองผ่านแผ่นกรองซึ่งประกอบไปด้วยเซลลูโลสและไดอะตอมมาเซียสเอิร์ท (cellulose/diatomaceous earth plate – and – frame) และกำจัดไอออนด้วย แอนไอออนิก – แคทไอออนิกเรซินเบด จากนั้นระเหยเจลาตินจนมีความเข้มข้นร้อยละ 15 – 45 แล้วจึงนำไปกรอง ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5 – 7 และสเตอริไรซ์ที่ 138 – 143 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 – 12 วินาที ทำให้เย็นและทำให้แห้งด้วยลมร้อน 1 – 3 ชั่วโมง นำมาบดเป็นอนุภาคขนาด 80 – 30 เมส ก่อนการบรรจุ กระบวนการผลิตเจลาตินโดยใช้ด่างอาจใช้เวลานานถึง 20 สัปดาห์ โดยเจลาตินที่ได้มีจุดไอโซไอออนิกเท่ากับ 4.8-5 (Wasswa *et al.*, 2007)

สมบัติของเจลาตินจากปลา

- สมบัติทางด้านการไหล (rheological properties)

เจลที่เกิดจากเจลาตินจัดเป็นเจลประเภทกายภาพ (physical gel) เนื่องจากอันตรกิริยาหรือพันธะระหว่างสายโซ่ที่ทำให้เกิดเจลเป็นแรงแวนเดอร์วาลหรือพันธะไฮโดรเจน (Karim and Bhat, 2009) และเจลของเจลาตินสามารถคืนสภาพได้หลังจากที่เจลหลอมละลายด้วยความร้อนแล้ว (thermoreversible gel) เช่นเดียวกับเจลของเคซีน (casine) อะกาโรส (agarose) เพคติน (pectin) และคาราจีแนน (carageenans) (Papon *et al.*, 2007)

ความแข็งแรง (gel strength) และจุดหลอมเหลวของเจล (gel melting point) เป็นสมบัติหลักในการประเมินคุณภาพทางการค้าของเจลาติน ซึ่งขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของ

กรดอะมิโนและอัตราส่วนระหว่างสายโซ่แอลฟา (α) และเบตา (β) ในเจลาติน โดยจะจำเพาะต่อสายพันธุ์ รวมถึงการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะในการแปรรูป (Cho *et al.*, 2004; Gómez-Guillén *et al.*, 2011) ทั้งนี้ Schrieber และ Gareis (2007) กล่าวว่าความแข็งแรงของเจลาตินขึ้นอยู่กับจำนวนเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 100,000 กรัม/โมลและสายโซ่แอลฟาเป็นหลัก โดยเจลาตินที่มีสายโซ่แอลฟาเป็นองค์ประกอบอยู่มากจะให้เจลาตินที่มีความแข็งแรงสูง ในทางกลับกันเปปไทด์ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าหรือต่ำกว่าสายโซ่แอลฟาจะส่งผลให้เจลาตินมีความแข็งแรงลดลง นอกจากนี้โครงสร้างของโปรตีน (configuration of protein) และการเชื่อมต่อของโปรตีน (inter-junction) ในการสร้างโครงข่ายที่แข็งแรงก็มีความสำคัญต่อการเกิดเจลาติน (Ahmed and Benjakul, 2011)

การประเมินคุณภาพเจลาตินทางการค้าจะรายงานค่าความแข็งแรงของเจลาตินด้วยค่าบลูม (Bloom value) ซึ่งค่าบลูมจะแสดงถึงค่าแรงที่หัววัดใช้ในการกดบนผิวหน้าของตัวอย่างที่เตรียมตามวิธีการมาตรฐาน โดยนำสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.67 ขึ้นรูปเป็นทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 เซนติเมตร สูง 2.7 เซนติเมตร นำเจลาตินไปต้มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดค่าความแข็งแรงของเจลาตินด้วยเครื่องวิเคราะห์เนื้อสัมผัส (texture analyzer) ใช้หัววัดทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิตัวอย่างที่ 8-9 องศาเซลเซียส (Schrieber and Gareis, 2007) ซึ่งในอุตสาหกรรมจะใช้เจลาตินที่มีค่าบลูมอยู่ในช่วง 100-300 และโดยส่วนใหญ่เจลาตินที่นิยมใช้จะมีค่าบลูม 250-260 (Holzer, 1996)

เจลาตินของเจลาตินที่สกัดจากปลาจะมีค่าบลูมอยู่ในช่วง 0-270 เมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินจากหมูและวัวซึ่งมีค่าบลูมในช่วง 200-240 จะพบว่าเจลาตินจากปลามีค่าบลูมโดยเฉลี่ยที่ต่ำกว่า (Karim and Bhat, 2009) แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าค่าบลูมของเจลาตินจากหนังปลาทูน่าครีบลีเหลือง (yellow fin tuna) มีค่าสูงถึง 426 (Cho *et al.*, 2005) สำหรับปลาในเขตน้้ำอุ่นบางสายพันธุ์สามารถจะให้เจลาตินที่มีค่าบลูมใกล้เคียงกับเจลาตินจากหนังหมู (Gudmundsson and Hafsteinsson, 1997) เช่น เจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวาน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Priacanthus tayenus* และ *Priacanthus macracanthus* ที่มีค่าบลูมเท่ากับ 227.75 และ 254.10 กรัม (Benjakul *et al.*, 2009) ตามลำดับ ส่วนเจลาตินที่สกัดได้จากปลาที่อาศัยในเขตน้้ำเย็นจะไม่เกิดเป็นเจลาตินสภาวะที่ใช้ในการวัดค่าบลูม (Norland, 1990)

ความแข็งแรงของเจลาตินจากเจลาตินนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโน ได้แก่ โพรลีนและไฮดรอกซีโพรลีนที่เป็นองค์ประกอบในคอลลาเจน ปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวจะแตกต่างกันในปลาแต่ละสายพันธุ์ โดยพบว่าในปลาที่อาศัยในเขตน้้ำอุ่นจะมีปริมาณกรดอะมิโนมากกว่าปลาที่

อาศัยในเขตนาน ทำให้ได้เจลาตินที่มีค่าบวมสูงกว่า (Karim and Bhat, 2009) นอกจากนี้ Badii และ Howell (2006) ยังได้กล่าวถึงอิทธิพลของกรดอะมิโนกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe และ Met) ว่ามีผลทำให้ค่าบวมลดลงได้ โดยเมื่อเปรียบเทียบเจลาตินจากปลาคอดซึ่งไม่เกิดเป็นเจลกับเจลาตินจากปลานิล (tilapia) และปลาหูแหก (horse mackerel) พบว่าเจลาตินของปลาทั้งสองชนิดมีปริมาณกรดอะมิโนดังกล่าวน้อยกว่าเจลาตินจากปลาคอด นอกจากนี้ Gudmunsson และ Hafsteinsson (1997) ยังพบว่าความสามารถในการเกิดเจลของเจลาตินจะลดลงเมื่อมีการใช้กรดหรือด่างที่มีความเข้มข้นสูงในการแปรรูปวัตถุดิบอีกด้วย

คุณสมบัติที่สำคัญของเจลาตินคือความสามารถในการละลายในน้ำและเจลที่สามารถคืนสภาพได้หลังจากผ่านความร้อน (thermoreversible) โดยเจลจะเริ่มหลอมเมื่ออุณหภูมิถึงจุดหลอมเหลว ซึ่งโดยทั่วไปจะต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายมนุษย์ ทำให้เกิดคุณสมบัติที่เรียกว่า ‘ละลายในปาก’ (melt-in-the-mouth) Zhou และคณะ (2006) กล่าวว่าคุณสมบัติการคืนตัวได้ของเจลหลังผ่านความร้อนจะเกิดขึ้นเมื่อเจลาตินมีความเข้มข้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม (อุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลว) คุณสมบัตินี้เกิดจากการที่เจลาตินที่ผ่านความร้อนแล้วและอยู่ในสภาพสายเปปไทด์แบบสุ่ม (random coil) เมื่ออุณหภูมิลดลง โครงสร้างดังกล่าวจะเกิดการขดตัวเพื่อปรับเข้าสู่โครงสร้างเริ่มต้นหรือทริปเปิลเฮลิกซ์ (triple helix) ส่งผลให้เกิดเป็นโครงข่ายสามมิติและทำให้เจลของเจลาตินมีความแข็งแรง (Mackie *et al.*, 1998; Kuijpers *et al.*, 1999)

ความแตกต่างที่สำคัญระหว่างเจลาตินจากปลาและเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือการที่เจลาตินจากปลามีอุณหภูมิในการเกิดเจลและการหลอมเหลวของเจลด้าที่ประมาณ 8-25 และ 11-28 องศาเซลเซียส แต่กลับให้ความหนืดที่สูงกว่า (Leuenberger, 1991) ขณะที่เจลที่เตรียมจากเจลาตินหมูและวัวจะมีจุดเกิดเจลและจุดหลอมเหลวอยู่ที่อุณหภูมิ 20-25 และ 28-31 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ทั้งนี้วัตถุดิบที่ใช้ในการสกัดเจลาตินมีผลต่อคุณสมบัติดังกล่าวอย่างมาก โดย Gilsenan และ Ross-Murphy (2000) ได้เปรียบเทียบสมบัติทางการไหลและจุดหลอมละลายของเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลาชนิดต่าง ๆ พบว่าเจลาตินจากปลาที่อาศัยในเขตน้ำเย็นจะเกิดเจลเมื่อมีความเข้มข้นสูงและมีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการมีกรดอะมิโนในปริมาณต่ำ โดยกรดอะมิโนมีผลต่อการเกิดโครงสร้างแบบสายเกลียว ในขณะที่เจลาตินจากปลาที่อาศัยในเขตน้ำอุ่นจะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับเจลาตินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ Ahmad และ Benjakul (2011) ได้ศึกษาสภาวะในการปฏิบัติต่อหนังปลาวัว (*Aluterus monoceros*) ก่อนนำไปสกัดเจลาติน โดยใช้กรดอะซิติกและกรดฟอสฟอริกที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ เพื่อแช่หนังปลาวัวในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำหนังปลาดังกล่าวไปสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 และ 8 ชั่วโมง พบว่าการแช่หนังปลา

ด้วยกรดฟอสฟอริกมีผลให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงกว่า (ร้อยละ 149.77 และ 121.92 เมื่อใช้เวลาสกัด 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ) เมื่อเทียบกับการใช้กรดอะซิติก (ร้อยละ 56.90 และ 51.73 เมื่อใช้เวลาสกัด 4 และ 8 ชั่วโมงตามลำดับ) โดยเป็นผลมาจากระหว่างการแช่กรดหมู่ฟอสเฟตอาจจะจับกับกรดอะมิโน ส่งผลให้เกิดกระบวนการฟอสฟอริเลชัน (phosphorylation) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไอออนิกระหว่างหมู่ฟอสเฟตและหมู่อะมิโน (NH_2) ของกรดอะมิโน ทำให้เกิดพันธะข้าม (crosslink) ระหว่างโปรตีนเพิ่มขึ้น (Guo *et al.*, 2005 อ้างโดย Ahmad and Benjakul, 2011)

- สมบัติการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และการเกิดโฟม (emulsifying and foaming properties)

เจลาตินมีสมบัติเชิงหน้าที่อื่น ๆ ได้แก่ ความสามารถในการเป็นสารทำให้เกิดโฟม (foaming agent), สารทำให้เกิดอิมัลชัน (emulsifying agent) และสารทำให้เปียก (wetting agent) เนื่องจากที่ผิวหน้าของโมเลกุลเจลาตินมีส่วนที่ไม่ชอบน้ำเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมยา และทางการแพทย์ได้ (Cole, 2000) อย่างไรก็ตามเจลาตินเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ที่มีความสามารถต่ำกว่าสารชนิดอื่น ๆ เช่น โปรตีนที่มีรูปทรงกลม (globular protein) หรือกัมอะราบิก (gum arabic) ดังนั้นการใช้เจลาตินเพียงอย่างเดียวในการเตรียมอิมัลชันจะทำให้เกิดเป็นหยดของเหลว (droplet) ขนาดใหญ่ระหว่างการใช้โสมจินซ์ ส่งผลให้ระบบอิมัลชันเสถียรภาพได้ง่าย จึงควรใช้เจลาตินร่วมกับสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก (anionic) หรือควรปรับปรุงเจลาตินโดยการลดส่วนที่ไม่ชอบน้ำให้อยู่ในสัดส่วนที่เหมาะสม (Olijve *et al.*, 2001; Surh *et al.*, 2005) โดยทั่วไปอิมัลชันที่มีเจลาตินจากปลาเป็นอิมัลซิไฟเออร์จะมีความคงตัวอยู่ในระดับปานกลาง ซึ่ง Surh และคณะ (2006) ได้ศึกษาความคงตัวทางกายภาพของอิมัลชันประเภทน้ำมันในน้ำ (Oil-in-water) โดยใช้เจลาตินปลาที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเจลาตินปลาที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง พบว่าการใช้เจลาตินทั้งสองชนิดที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 4 เพียงพอต่อการทำให้เกิดหยดของเหลวขนาดเล็กที่มีการกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในอิมัลชันได้

- สมบัติการเกิดฟิล์ม (Film-forming properties)

จากรายงานวิจัยที่ผ่านมา (Avena-Bustillos *et al.*, 2006; Jongjareonrak *et al.*, 2006; Gómez-Guillén *et al.*, 2007) พบว่าเจลาตินจากปลาสามารถเกิดฟิล์มได้ดี ซึ่งโดยทั่วไปฟิล์มของเจลาตินจากปลาที่อาศัยในเขตน้ำอุ่น เช่น ปลากระพงแม่น้ำไนล์ (Nile perch) มีความเหนียวและการยึดตัวใกล้เคียงกับฟิล์มของเจลาตินจากวัว (Muyonga *et al.*, 2004) ฟิล์มของเจลาตินปลาจะมีค่าการซึมผ่านของไอน้ำต่ำกว่าเจลาตินหมูและวัว เนื่องจากเจลาตินปลามีโปรตีนและไฮดรอกซีโพรลีนในปริมาณต่ำ ทำให้ขาดหมู่ไฮดรอกซิลที่มีความสามารถในการจับกับ

โมเลกุลของน้ำ (Avena-Bustillos *et al.*, 2006) และด้วยเหตุผลนี้เช่นกันทำให้ฟิล์มของเจลาตินจากปลาน้ำจืดมีค่าการซึมผ่านของไอน้ำสูงกว่าปลาในเขตน้ำเย็น

- สมบัติทางประสาทสัมผัส (Sensory properties)

Choi และ Regenstein (2000) ได้ศึกษาความแตกต่างทางฟิสิกส์เคมีของเจลาตินจากหมูและปลา รวมถึงอุณหภูมิในการหลอมเหลวที่มีต่อคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของเจลาติน โดยใช้การทดสอบเชิงพรรณนา (Quantitative descriptive analysis; QDA) พบว่าตัวอย่างของหวานที่ใช้เจลาตินจากปลาในการเตรียมจะมีกลิ่นไม่พึงประสงค์น้อยและตัวอย่างยังสามารถปลดปล่อยกลิ่นและกลิ่นรสได้ดีกว่าตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้เจลาตินจากหมูเมื่อเตรียมตัวอย่างให้มีค่าความแข็งแรงของเจลเท่ากัน ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่เจลาตินจากปลามีจุดหลอมเหลวต่ำทำให้ละลายในปากได้ง่ายและสามารถปลดปล่อยกลิ่นและกลิ่นรสได้ดีกว่าเจลาตินจากหมูที่ละลายได้ช้ากว่า แต่เมื่อพิจารณาในเรื่องของความหนืดจะพบว่าที่สภาวะเดียวกันตัวอย่างที่เตรียมโดยใช้เจลาตินจากหมูจะมีความหนืดสูงกว่า

จากสมบัติของเจลาตินจากปลาดังได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าในการนำเจลาตินจากปลามาใช้ทดแทนเจลาตินจากหมูและวันนั้นยังมีข้อจำกัดอยู่ ดังนั้น Karim และ Bhat (2009) จึงเสนอแนวทางที่จะลดข้อจำกัดดังกล่าวไว้ 3 ประการ ได้แก่

1. การใช้เอนไซม์ทำให้เกิดการเชื่อมต่อกันของคอลลาเจน (enzymatic crosslinking) เช่น การเติมเอนไซม์ทรานส์ - กลูตามิเนสในเจลาตินจากหนังปลาจะทำให้ความหนืดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลวและความแข็งแรงของเจลดีขึ้น
2. การสร้างระบบผสมระหว่างเจลาตินจากปลากับเจลาตินจากแหล่งอื่น ๆ ที่ให้ความแข็งแรงของเจลสูงหรือไฮโดรคอลลอยด์ของพืช ซึ่งอาจมีผลช่วยเรื่องความแข็งแรงของเจล การเกิดเจลและอุณหภูมิหลอมเหลว
3. การปรับปรุงคุณลักษณะของเจลาตินโดยเติมตัวถูกละลาย เช่น เกลือ โดยนักวิจัยบางกลุ่มเชื่อว่าการเติมเกลือจะทำให้แกนกลางของโมเลกุลเจลาตินไปจับกับไอออนจากเกลือโดยตรง ในขณะที่บางกลุ่มเชื่อว่าไอออนของเกลือจะทำอันตรกิริยากับโมเลกุลอื่น ๆ ที่จับกับน้ำทำให้เกิดการรวมตัวกันของเจลาติน ซึ่งช่วยปรับปรุงเรื่องจุดหลอมเหลวของเจลาตินได้

การใช้ประโยชน์ของเจลาตินในอาหาร

เจลาตินเป็นโปรตีนที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร ยารักษาโรค และการถ่ายภาพ คุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของเจลาตินได้แก่ ไม่มีสีหรือมีสีเหลืองอ่อน โปร่งใส เปราะ ไม่มีรสชาติ เป็นแผ่นบางหรือเป็นผง ละลายได้ในน้ำร้อน กลีเซอรอลและกรดอะซิติก แต่จะไม่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์ (Wasswa *et al.*, 2007) โดยการนำเจลาตินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติเชิงหน้าที่ดังต่อไปนี้ (Johnston-Banks, 1990)

1. เจลาตินให้เจลที่มีคุณภาพสูงแม้จะใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ เจลที่ได้มีลักษณะใสและละลายในปาก (melt-in-the mouth textures)
2. เจลที่มีความเข้มข้นของเจลาตินสูงจะมีเนื้อสัมผัสแบบยืดหยุ่นคล้ายกัม (elastic gum-type) และละลายอย่างช้า ๆ ในปาก
3. เจลาตินมีคุณสมบัติเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และสารให้ความคงตัวแก่ระบบที่ผสมระหว่างของเหลวและของเหลว ของเหลวและอากาศ หรือของเหลวและของแข็ง
4. สารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นต่ำ จะมีคุณสมบัติเป็นสารโพลีอิเล็กโทรไลต์ ซึ่งสามารถตกตะกอนอนุภาคแขวนลอยหรือคอลลอยด์ที่ไม่คงตัวได้
5. เมื่อผสมกับส่วนผสมที่มีลักษณะเป็นผง เจลาตินจะทำหน้าที่เป็นสารเชื่อม (binder) และสารช่วยให้สามารถผลิตเป็นเม็ดยาได้ (tableting aid)

เจลาตินไฮโดรไลเสท

โดยทั่วไปแล้วเจลาตินจากสัตว์น้ำมักผลิตมาจากวัสดุเศษเหลือ เช่น กระดูก, หนัง, ครีบและเกล็ด ซึ่งเราสามารถเพิ่มมูลค่าให้แก่เจลาตินเหล่านั้นได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ได้จะมีสมบัติเชิงหน้าที่ คุณค่าทางอาหารในแง่ของโปรตีน รวมถึงฤทธิ์ทางชีวภาพที่เปลี่ยนไป การย่อยด้วยเอนไซม์จะปลดปล่อยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพออกมาจากโมเลกุลของเจลาตินและจากการที่เปปไทด์มีขนาดเล็กลงจึงอาจส่งผลดีต่อการดูดซึมในระบบทางเดินอาหารอีกด้วย (Fahmi *et al.*, 2004; Je *et al.*, 2007)

วิธีการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลา

การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสทโดยการย่อยวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมประมงด้วยเอนไซม์ต้องอาศัยการควบคุมปัจจัยในกระบวนการ เช่น พีเอช เวลาและอัตราส่วนระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติด้านสารอาหารและสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ส่วนใหญ่มาจาก 3 แหล่ง คือ เอนไซม์ที่ได้จากพืช เช่น ปาเปน (papain) เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เปปซิน (pepsin) และ ทริปซิน (trypsin) (Sathivel *et*

al., 2003) รวมถึงเอนไซม์กลุ่มที่ได้มาจากจุลินทรีย์ ซึ่งมีกิจกรรมคาตาไลติกในพีเอชช่วงกว้างและมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ เช่น อัลคาเลส (Alcalase 2.4L) เป็นต้น (Wasswa *et al.*, 2007) การศึกษาของ Kawahara และ Tanihata (2005) มีขั้นตอนการเตรียมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาอะลาสกา พอลลัค (Alaska Pollack) และปลาแปซิฟิก คอด (Pacific cod) โดยล้างหนังปลาด้วยน้ำเกลือร้อยละ 0.1 – 5 แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด สกัดเจลาตินด้วยน้ำที่มีพีเอชเป็นกลาง ที่อุณหภูมิ 50 – 100 องศาเซลเซียส ย่อยด้วยเอนไซม์ ทำให้เข้มข้นและใช้ถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวและทำแห้ง ในขณะที่ Giménez และคณะ 2008 ได้ศึกษาการสกัดเจลาตินไฮโดรไลสจากปลาโซล (*Solea vulgaris*) และหมึก (*Dosidicus gigus*) โดยย่อยเจลาตินที่ได้จากวัสดุทั้งสองด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นอกจากนั้น Yang และคณะ (2008) ได้ทดลองการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสโดยใช้หนังปลาโคเบีย (cobia) ที่ผ่านการแช่ค้างมาสกัดในรีทอร์ต ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีและนำเจลาตินไฮโดรไลสที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน ปาเปน แพนกรีเอทินและทริปซิน ที่พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 0.5, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

สำหรับการไฮโดรไลซ์เจลาตินเพื่อผลิตเป็นเจลาตินไฮโดรไลสนั้นมีปฏิกิริยาเคมีดังแสดงไว้ในภาพที่ 4 ซึ่งจะเห็นว่าในปฏิกิริยามีการเติมน้ำเข้าไปหนึ่งโมเลกุลเพื่อให้พันธะเปปไทด์แตกออก ทำให้สมมูลมวลของโปรตีนไฮโดรไลสและผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลสสุดท้ายเกิดการเปลี่ยนแปลง ผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลสที่มีระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) ร้อยละ 75 (ร้อยละ 75 ของพันธะเปปไทด์เริ่มต้นถูกตัดออก) จะมีการเติมน้ำเข้าไป 3 โมล เพื่อให้กรดอะมิโนแยกออกมา 4 โมล (Nielsen, 1997)

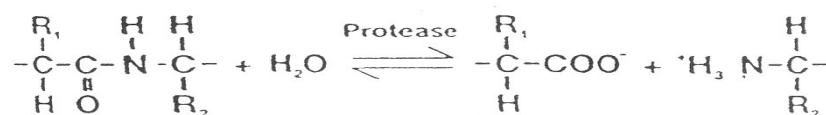


Figure 4. Hydrolysis of a peptide bond by protease

Source : Nielsen (1997)

การตรวจวัดและควบคุมระดับการไฮโดรไลซิส

หนึ่งในปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญต่อการควบคุมผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทคือระดับการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เนื่องจากคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสทจะมีความสัมพันธ์กับค่า DH โดยค่า DH สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$\%DH = \frac{100h}{h_{tot}}$$

เมื่อ h คือ จำนวนของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดออกต่อกรัมโปรตีน
 h_{tot} คือ จำนวนพันธะเปปไทด์ทั้งหมดต่อกรัมโปรตีน (สามารถประมาณได้จากจำนวนกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน)

วิธีการควบคุมระดับไฮโดรไลซิสมีหลายวิธี ดังแสดงในตารางที่ 3 โดย Nielsen (1997) ได้กล่าวถึงเกณฑ์ต่าง ๆ ที่ใช้เลือกวิธีการหาค่า DH ของโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ ความสามารถในการวัดค่า DH ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาตั้งแต่เริ่มจนกระทั่งปฏิกิริยาสิ้นสุด รวมถึงความแม่นยำของวิธีการ ในการเลือกกระบวนการควบคุมอาจเลือก pH-stat, OPA, osmometry, การติดตามการเปลี่ยนแปลงพีเอชหรือความหนืด รวมถึงการไตเตรตกลับสู่พีเอชเริ่มต้น สำหรับวิธีไตเตรตจะต้องพิจารณาว่าการไตเตรตจะไม่เพิ่มความสามารถในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังนั้นจึงต้องมีขั้นตอนหยุดการทำงานของเอนไซม์ก่อน เช่น การใช้ความร้อน เป็นต้น จากวิธีการต่าง ๆ ในตารางมีเพียง pH-stat และ OPA เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับหมู่เอมิโนอิสระที่เกิดจากการไฮโดรไลซิสโดยตรงและใช้คำนวณเป็นค่าระดับการย่อยสลาย สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการใช้วิธี OPA คือ OPA จะไม่เกิดปฏิกิริยากับหมู่เอมิโนของโปรตีนหรือไฮดรอกซีโปรตีนและจะเกิดปฏิกิริยากับซิสเทอีนเพียงบางส่วนเท่านั้น ดังนั้นวิธี pH-stat จึงเป็นวิธีที่มักใช้กันโดยทั่วไป

หลักการของวิธี pH-stat คือ เมื่อพันธะเปปไทด์ถูกตัดออก หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และหมู่เอมิโน (amino group) ที่เป็นอิสระจะกลายเป็นไอออน โดยขึ้นอยู่กับพีเอชของสารละลายที่เกิดปฏิกิริยา ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสจะทำให้เกิดการปลดปล่อยหรือรับ H^+ ของหมู่คาร์บอกซิลหรือหมู่เอมิโน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชในสารละลาย จำนวนของ H^+ จะเท่ากับจำนวนของพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดไป เมื่อการไฮโดรไลซิสเกิดนอกเหนือช่วงค่า pK ของหมู่เอมิโนและคาร์บอกซิล เราจะทราบระดับการย่อยสลายได้โดยการติดตามการเปลี่ยนแปลงพีเอชซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดย H^+ ที่เกิดขึ้นจะถูกไตเตรต

ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ พีเอชจึงถูกรักษาไว้ให้มีค่าเท่ากับพีเอชเริ่มต้นเสมอ เมื่อการไฮโดรไลซิสเกิดที่พีเอชเป็นกลางหรือเป็นด่าง การตัดพันธะเปปไทด์จะทำให้เกิดกรดในปริมาณที่เท่ากันซึ่งสามารถไตเตรตได้ด้วยด่างในปริมาณที่เท่ากัน ปริมาณด่างที่ใช้ในการไตเตรตทั้งหมดจะสัมพันธ์กับจำนวนพันธะที่ถูกตัดไป ในทำนองเดียวกันการย่อยภายใต้สภาวะที่เป็นกรดจะทำให้เกิดด่างเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสามารถไตเตรตได้ด้วยกรดเช่นกัน วิธี pH-stat จึงให้ผลแม่นยำและสามารถติดตามค่า DH ได้อย่างต่อเนื่องในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยา (Nielsen, 1997) แต่การใช้วิธี pH-stat มีข้อเสียในการจำกัดช่วงพีเอชในการทำงานและการเติมด่างหรือกรดในระหว่างที่เกิดปฏิกิริยาระดับการผลิตเชิงการค้า

Table 3. Different methods of controlling the degree of hydrolysis of protein hydrolysate

Method	Principle
pH stat	Keeping pH constant during hydrolysis; amount of titrant is equivalent to DH
OPA	O-Phthaldialdehyde reaction with primary amino groups to form a colored detectable compound
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid reaction with amino groups to form a colored detectable compound
Osmometry	Measurement of freezing point depression, which correlates to DH
Ninhydrin	Ninhydrin reaction with amino groups to form the colored detectable compound
Formole titration	Titration of amino groups with formaldehyde
Soluble nitrogen	Amount of soluble nitrogen during hydrolysis
Brix	Refractive index correlating with soluble dry matter
TCA index	Amount of peptides soluble in trichloroacetic acid (above a certain molecular weight the peptide precipitate)
Peptide chain length	HPLC method based on gel permeation chromatography
Change in pH	Follow pH during hydrolysis
Viscosity	Follow change in viscosity during hydrolysis
Titration to basic pH	Titrate acid formed during hydrolysis (at pH >5.5) up to pH 8

Source: Nielsen (1997)

สมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเจลาตินไฮโดรไลเซต

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซตมีสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน ดังการศึกษาของ Kim และคณะ (2001) ที่สกัดเจลาตินไฮโดรไลเซตจากหนังปลาอะลาสกา พอลแลค (Alaska Pollack) โดยนำเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาดังกล่าวมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ 3 ขั้นตอนอย่างต่อเนื่องในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยขั้นตอนที่ 1 ใช้เอนไซม์อัลคาเลส แล้วนำเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ได้มาแยกโดยผ่านเมมเบรนที่มีขนาด Molecular weight cutoff (MWCO) 10,000 ดาลตัน นำส่วนที่ผ่านเมมเบรนมาย่อยในขั้นตอนที่ 2 ด้วยเอนไซม์ Pronase E นำเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ได้มาแยกโดยผ่านเมมเบรนที่มีขนาด MWCO 5,000 ดาลตัน และนำส่วนที่ผ่านเมมเบรนมาย่อยต่อขั้นตอนที่ 3 โดยใช้เอนไซม์คอลลาจีเนส แล้วนำเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ได้มาแยกด้วยเมมเบรนที่มีขนาด MWCO 1,000 ดาลตัน ตามลำดับ เมื่อนำไฮโดรไลเซตที่ได้จากแต่ละขั้นตอนไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันเปรียบเทียบกับ butylated hydroxyl toluene (BHT) และแอลฟาโทโคฟีรอลด้วยวิธี thiobarbituric acid (TBA) method พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ผ่านขั้นตอนที่สองคือการย่อยด้วยเอนไซม์ Pronase E ให้ผลการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกได้ดีที่สุด (ร้อยละ 58) สังเกตได้จากการเกิด malonaldehyde (MDA) ในปริมาณที่น้อย ส่วนเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ผ่านขั้นตอนที่ 1 และ 3 จะให้ผลการต้านการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิกประมาณ ร้อยละ 40 จากการผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าเจลาตินไฮโดรไลเซตที่สกัดจากหนังปลาอะลาสกา พอลแลค มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสารต้านออกซิเดชันที่มีอยู่ตามธรรมชาติอย่างแอลฟาโทโคฟีรอลพบว่ามีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน สาเหตุที่เจลาตินไฮโดรไลเซตที่ผ่านขั้นตอนที่สองมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันได้ดีที่สุดอาจมีสาเหตุมาจากการไฮโดรไลซิสในขั้นตอนนี้ทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีทั้งขนาดและลำดับของกรดอะมิโนที่เหมาะสมในการทำหน้าที่เป็นสารต้านออกซิเดชันได้มากที่สุด นอกจากนี้การทดลองของ Yang และคณะ (2008) ที่ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเจลาตินไฮโดรไลเซตจากหนังปลาโคเบีย (*Rachycentron canadum*) โดยเปรียบเทียบเจลาตินไฮโดรไลเซตที่ได้จากการสกัดในรีโทอร์ทที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (RSGH) กับเจลาตินไฮโดรไลเซตดังกล่าวที่นำมาย่อยซ้ำด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด (ET- RSGH) ได้แก่ โบรมิเลน ปาเปน แพนครีเอตินและทริปซิน แล้วทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการหาค่า DPPH radical scavenging activities และการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก พบว่าการย่อยเจลาติน

ไฮโดรไลเซสด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดที่เวลานานขึ้น ไม่ส่งผลให้เจลาตินไฮโดรไลเซสมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเปปไทด์จะมีคุณสมบัติเป็นสารต้านออกซิเดชันได้นั้นจะต้องมีลำดับของกรดอะมิโนภายในสายที่เหมาะสมด้วย การย่อยที่เวลานานเกินไปหรือค่าระดับการย่อยสลายมากเกินไปจะทำให้พันธะเปปไทด์ถูกทำลายไปมากเกิดการสูญเสียลำดับของกรดอะมิโนที่เหมาะสมในสายเปปไทด์ความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันจึงลดลง ซึ่งจากการทดลองพบว่าค่า DPPH radical scavenging activities สูงสุดของการใช้เอนไซม์แต่ละชนิดอยู่ที่เวลาในการย่อยต่าง ๆ จากผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าทั้ง RSGH และ ET-RSGH มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดคลิโนเลอิก นอกจากนี้ RSGH สามารถยับยั้ง DPPH radical ได้ดีขึ้นเมื่อใช้ในระดัความเข้มข้นมากขึ้นและ DPPH radical scavenging effects ของ RSGH 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร มีค่าเป็นร้อยละ 54.9 ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้ beta hydroxy acid (BHA) 10 ppm

งานวิจัยของ Mendis และคณะ (2005) เกี่ยวกับการนำเจลาตินไฮโดรไลเซสที่สกัดจากหนังหมึกยักษ์โคซิดิคัส ไซกัส (*Dosidicus gigus*) แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำเจลาตินที่สกัดได้มาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ต่างกัน 3 ชนิดได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน แอลฟาไลโมทริปซินและเปปซิน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด เป็นเวลา 4 ชั่วโมงได้ค่าระดับการย่อยร้อยละ 97 87 และ 56 ตามลำดับ และเมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของกรดคลิโนเลอิกของเจลาตินไฮโดรไลเซสทั้งสามชนิดพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสจากหนังทั้งสามชนิดดังกล่าวมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันที่ดีกว่าแอลฟาโทโคฟีรอล และให้ผลยับยั้งใกล้เคียงกับการใช้ BHT โดยเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันได้ดีที่สุด หรืออาจกล่าวได้ว่าคุณสมบัติของเอนไซม์ที่ใช้และระดับการไฮโดรไลเซสมีผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเปปไทด์ นอกจากนี้เจลาตินไฮโดรไลเซสจากหนังของหมึกจะมีกรดอะมิโนประเภทไฮโดรโฟบิกเป็นองค์ประกอบอยู่สูงถึงร้อยละ 51 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าส่วนที่สามารถละลายในไขมันจะทำหน้าที่ในการให้โปรตอนแก่อนุมูลไฮโดรโฟบิกเปอร์ออกซิลซึ่งเป็นอนุมูลที่ไม่เสถียร เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดคลิโนเลอิกในระบบก็จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชัน การเติมโปรตอนเข้าไปในโมเลกุลของอนุมูลไฮโดรโฟบิก เปอร์ออกซิลจะทำให้โมเลกุลมีความเสถียรมากขึ้นและเป็นการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันต่อไป

จากงานวิจัยของ Phanturat (2009) ได้ศึกษาการเตรียมเจลาตินไฮโดรไลเซสจากหนังปลาตาหวานโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส นิวเทรสและส่วนที่สกัดจากไส้ติ่งปลาตาหวานที่มี

กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในการไฮโดรไลซ์เจลาตินพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ได้มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ (DPPH และ ABTS) และการรีดิวซ์เฟอริก (FRAP) เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มมากขึ้น (ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5, 10 และ 15) และเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกสูงที่สุด ในขณะที่เจลาตินไฮโดรไลเซสที่ไฮโดรไลซ์ด้วยส่วนที่สกัดจากไส้ติ่งปลาที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด เมื่อใช้เอนไซม์ร่วมกันสองชนิดในการย่อยเจลาตินพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 จนมีระดับการย่อยสลายเป็นร้อยละ 25 และไฮโดรไลซ์ต่อด้วยนิวเทรส ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 นาน 1 ชั่วโมง จะมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH และความสามารถในการรีดิวซ์เฟอริกสูงที่สุด ขณะที่การใช้เอนไซม์อัลคาเลสจนมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 25 และย่อยต่อด้วยส่วนที่สกัดจากไส้ติ่งปลาที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 สามารถผลิตเจลาตินไฮโดรไลเซสที่มีกิจกรรมจับอนุมูลอิสระ ABTS สูงสุด โดยเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับนิวเทรสหรือส่วนที่สกัดจากไส้ติ่งปลาตาหวานที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1000 ppm จะแสดงสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันในระบบกรดลิโนเลอิกและระบบเลซิทิน-ไลโปโซม โดยเปปไทด์ที่มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันสูงสุดจากเจลาตินไฮโดรไลเซสทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 1.7 กิโลดาลตัน และมีความคงตัวต่ออุณหภูมิ (0-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60 และ 90 นาที) และพีเอช (2-12) สูง

Alemán และคณะ (2011a) ศึกษาเจลาตินไฮโดรไลเซสจากหนังและเยื่อหุ้มภายในลำตัว (outer and inner tunics) ของหมึกยักษ์ (*Dosidicus gigus*) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า 7 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์จากสัตว์ (Trypsin) และจุลินทรีย์ (Alcalase, Esperase, Protamex, Neutrase, NS37005, Savinase) พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ที่เปลี่ยนแอนจิโอเทนซิน (angiotensin converting enzyme) สูงสุด (IC₅₀ = 0.34 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่เจลาตินไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Esperase สามารถทำลายเซลล์มะเร็งและเนื้องอกในสมองได้มากที่สุด โดยเจลาตินไฮโดรไลเซสทั้งสองตัวอย่างมีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 500-1400 ดาลตัน เป็นองค์ประกอบหลัก เมื่อศึกษาในแง่ของการต้านอนุมูลอิสระจะพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความสามารถเพิ่มขึ้นจากเจลาตินซึ่งเป็นวัตถุดิบ โดยเจลาตินไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex, Neutrase และ NS37005 จะเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ในขณะที่ Trypsin, Savinase,

Esperase และ Alcalase จะเพิ่มขึ้นถึงประมาณ 7-10 เท่า เกลาตินไฮโดรไลสเสที่ข่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin, Savinase, Esperase และ Alcalase มีกิจกรรมในการจับโลหะสูงขึ้นถึงประมาณร้อยละ 80 ในขณะที่ Protamex, Neutrase และ NS37005 มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นน้อยกว่าร้อยละ 25 จะเห็นว่า เกลาตินไฮโดรไลสเสจากแหล่งวัตถุดิบเดียวกันมีความฤทธิ์ทางชีวภาพต่างกันเป็นผลมาจากชนิดของเอนไซม์ซึ่งมีกลไกการทำงานแตกต่างกัน ส่งผลให้ค่าระดับการข่อยสลายรวมถึงขนาดโมเลกุลและลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่ได้ก็ต่างกัน ทำให้มีฤทธิ์แตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้งานวิจัยของ Alemán และคณะ (2011b) ได้นำเกลาตินจากวัตถุดิบต่างชนิดกัน ได้แก่ หนังกปลาทูน่า, หนังกปลาฮาไลบัท (halibut) และหนังกหมึกบินยักษ์ (jumbo flying squid) มาข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเกลาตินไฮโดรไลสเสที่ได้มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ดังแสดงจากค่าการต้านอนุมูล ABTS และการรีดิวซ์ไอออน Fe^{3+} และเมื่อนำเกลาตินจากหนังกปลาทูน่าและเยื่อหุ้มลำตัวของหมึกบินยักษ์มาข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส, คอลลาจีเนส, ทริปซินและเปปซินในสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดเป็นเวลา 3 ชั่วโมงเท่ากันจะพบว่าเกลาตินไฮโดรไลสเสที่ข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด ในขณะที่เกลาตินไฮโดรไลสเสที่ข่อยด้วยเอนไซม์เปปซินจะให้ค่าต่ำสุด ซึ่งจากการทดลองได้แสดงให้เห็นว่าการเลือกชนิดของเอนไซม์จะมีผลต่อคุณสมบัติของเกลาตินไฮโดรไลสเสเช่นกัน

Gómez-Guillén และคณะ (2011) ได้สรุปว่าความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันของเปปไทด์ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างและความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของเปปไทด์ คอลลาเจนและเกลาตินไฮโดรไลสเสจะมีความคล้ายคลึงกับโปรตีนต้นแบบ กล่าวคือ มีไกลซีน (Gly), อะลานีน (Ala), โพรลีน (Pro), ไฮดรอกซีโพรลีน (Hyp), กลูตามิก แอซิด (Glx) และ แอสพาดิก แอซิด (Alx) ในปริมาณมาก แต่มีเมทไทโอนีน (Met), ฮิสทีดีน (His) และไทโรซีน (Tyr) ในปริมาณน้อย นอกจากนี้ในการศึกษาของ Dávalos และคณะ (2004) ยังรายงานว่ากรดอะมิโนบางชนิดมีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันได้ด้วยตัวเอง โดยทริปโตเฟน (Tyr), ไทโรซีน (Tyr) และเมทไทโอนีน (Met) มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันสูงที่สุด รองลงมาคือซิสทีน (Cys), ฮิสทีดีน (His) และเฟนิลอะลานีน (Phe) ส่วนกรดอะมิโนที่เหลือไม่พบว่ามีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน อย่างไรก็ตามมีเปปไทด์จำนวนมากที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันโดยที่ภายในสายไม่มีกรดอะมิโนที่สามารถให้โปรตอนได้ ดังเช่นการศึกษาของ Kim และคณะ (2001) ที่ได้แยกเปปไทด์ 2 ชนิดที่มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบอยู่ 13 และ 16 เรซิดิวส์จากหนังกปลาอะลาสกาพอลแลค (Alaska Pollack) พบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดมีไกลซีนอยู่ที่ปลายซี (C-terminus) และมี

ลำดับกรดอะมิโน Gly-Pro-Hyp ซ้ำ ๆ กัน Li และคณะ (2007) ยังได้แยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันสูงสุดจากคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากหนังหมู ซึ่งเปปไทด์ดังกล่าวมีลำดับกรดอะมิโน คือ Gln-Gly-Ala-Arg รวมถึงงานวิจัยของ Mendis และคณะ (2005) ที่พบว่า เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น Asn-Gly-Pro-Leu-Gln-Ala-Gly-Gln-Pro-Gly-Glu-Arg มีค่าการต้านอนุมูลอิสระสูงสุดในเจลาตินจากหนังหมู นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเปปไทด์จากเจลาตินและคอลลาเจนยังขึ้นอยู่กับปริมาณกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอีกด้วย โดยกรดอะมิโนดังกล่าวจะทำให้เปปไทด์สามารถละลายในน้ำมันได้ดีขึ้นทำให้สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้มากขึ้นด้วย Kim และคณะ (2005) ยังได้กล่าวว่าเปปไทด์ที่พบในเจลาตินจากหนังปลามีค่าการต้านออกซิเดชันสูงกว่าเปปไทด์จากโปรตีนเนื้อสัตว์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่มีปริมาณไกลซีนและโพรลีนสูงกว่า

นอกจากชนิดของกรดอะมิโนแล้วตำแหน่งของกรดอะมิโนก็มีความสำคัญต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันเช่นกัน ทั้งในแง่ของการเสริมและการหักล้างฤทธิ์ดังกล่าว (Hernández-Ledesma *et al.*, 2005) ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยจะเป็นตัวกำหนดขนาดและลำดับของกรดอะมิโนบนเปปไทด์ ซึ่งจะส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีฤทธิ์สูงกว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ เช่น คอลลาจีเนส เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน ปาเปนและนิวเทรส (Qian *et al.*, 2008; Alámen *et al.*, 2011a) นอกจากนี้ Gómez-Guillén และคณะ (2010) ยังได้กล่าวว่าน้ำหนักโมเลกุลของเปปไทด์ยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการต้านออกซิเดชันเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mendis และคณะ (2005) ที่พบว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจากไฮโดรไลเสทจากหนังหมูจะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมากกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง ซึ่งและการทดลองของ Yang และคณะ (2008) ในไฮโดรไลเสทจากหนังปลาโคเบียที่พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 700 ดาลตันมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด โดยมีฤทธิ์สูงกว่าไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการแยกขนาดถึงร้อยละ 20

สมบัติการมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ของเจลาตินไฮโดรไลเสท

นอกจากเจลาตินไฮโดรไลเสทจะมีสมบัติการต้านออกซิเดชันแล้ว ยังพบสมบัติการมีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ได้แก่ ความสามารถในการยับยั้ง angiotensin converting enzyme (ACE) ซึ่งมีผลต่อความดันโลหิต โดยจากการทดลองในหนูพบว่า การรับประทาน (oral administration) คอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากเท้าไก่และเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 8 โมเลกุล ได้แก่ Gly-Ala-Hyp-Gly-Lru-Hyp-Gly-Pro (Iwai *et al.*, 2008; Saiga *et al.*, 2008; Cheng *et al.*, 2009)

รวมถึงเจลาตินไฮโดรไลสจากวัวและหมู (Faria *et al.*, 2008) มีผลในการลดความดันโลหิต โดยจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนหรือเจลาตินไฮโดรไลสจะขึ้นอยู่กับจำนวนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ โดยพบว่าในสายเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE มักมีโพรลีนเป็นองค์ประกอบ โดยเฉพาะเปปไทด์ที่ได้จากคอลลาเจน (Kim *et al.*, 2001; Saiga *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2009; Shimizu *et al.*, 2010; Alemán *et al.*, 2011a; Byun and Kim, 2011) Saito และคณะ (2009) ได้รายงานว่าการคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลามีผลต่อการดูดซึมไขมัน (lipid absorption) และเมตาบอลิซึมของหนูอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเจลาตินหรือคอลลาเจนไฮโดรไลสมีส่วนช่วยในการพัฒนาข้อต่อในมนุษย์ โดย Eggerslüss (1999) และ Moskowitz (2000) พบว่าเจลาตินไฮโดรไลสมีความเกี่ยวข้องกับข้อต่อของร่างกาย การงอกของเล็บและสภาพผิว โดยการรับประทานเจลาตินไฮโดรไลส 10 กรัมต่อวันมีผลช่วยลดอาการเจ็บปวดที่เกี่ยวข้องกับโรคกระดูกอักเสบและข้อเสื่อมบริเวณเข่าและสะโพก อีกทั้งยังมีผลทำให้ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเลือดสูงขึ้น การวิจัยเกี่ยวกับการใช้คอลลาเจนหรือเจลาตินไฮโดรไลสของ Nomura และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่ามีการใช้คอลลาเจนหรือเจลาตินไฮโดรไลสในการปรับปรุงความหนาแน่นและความแข็งแรงของกระดูก โดยเฉพาะในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาทำให้สูญเสียสมดุลระหว่างการสร้างกระดูกและการดูดซึมสารอาหาร ส่งผลให้มวลกระดูกลดลงรวมถึงเกิดอาการโรคกระดูกพรุนอันเกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน และ Guillerminet และคณะ (2009) ได้ศึกษาพบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่จะมีความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density) เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับอาหารที่มีคอลลาเจนไฮโดรไลสไฮโดรไลส 25 มิลลิกรัม/กิโลกรัมในปริมาณวันละ 3.5 กรัมอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ รวมทั้งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาสด (Hou *et al.*, 2009) และคอลลาเจนไฮโดรไลสจากแมงกะพรุน (*Rhopilema esculentum*) (Zhuang *et al.*, 2009) มีความสามารถในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเลตส่งผลให้ลดการทำลายผิวหนังในหนูได้ นอกเหนือจากสมบัติดังกล่าวไปแล้วนั้น Gómez-Guillén และคณะ (2010) ยังได้รายงานว่าการเปปไทด์จากเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาทูน่าและหนังหมึกซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 1-10 กิโลดาลตันและน้อยกว่า 1 กิโลดาลตันมีสมบัติการต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial properties) โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Shewanella putrefaciens* และ *Photobacterium phosphoreum* ซึ่งอาจเกิดจากประจุของหมู่อะมิโนสามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและคุณสมบัติที่ไม่ชอบน้ำของกรดอะมิโนจะทำให้เปปไทด์สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ไปได้ (Wieprecht *et al.*, 1997)

การเกิดกลิ่นคาวในปลา

โดยทั่วไปสารประกอบเอมีนที่ระเหยได้ เช่น ไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine) จะเป็นสาเหตุหลักของการเกิดกลิ่นคาวในปลา (Koizumi *et al.*, 1979) สารประกอบคาร์บอนิล (carbonyl compounds) ที่เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวก็ทำให้เกิดกลิ่นคาวได้ด้วยเช่นกัน (Josephson *et al.*, 1984) โดยจากการศึกษาของ Mohri และคณะ (1992) พบว่าหนังของปลาซาร์ดีนที่มีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและเอนไซม์ไลพอกซิจีเนสอยู่สูงนั้น สารประกอบคาร์บอนิลจะเกิดง่ายกว่าไตรเมทิลเอมีนมาก Ganeko และคณะ (2008) ศึกษาสารประกอบที่ระเหยได้ในปลาซาร์ดีนพบว่านอกจากไตรเมทิลเอมีนแล้วยังมีสารประกอบอีก 33 ชนิดทั้งที่ระบุชนิดได้และยังไม่สามารถระบุชนิดได้แน่นอนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดกลิ่นคาว ได้แก่ สารประกอบไฮโดรคาร์บอน 8 ชนิด คือ pentane, 2-pentene, hexane, heptane, 2-octene, benzene และ pentadecane สารประกอบคีโตน 5 ชนิด คือ acetone, 1-penten-3-one, 2,3-pentanedione, 1-octane-3-one และ 2,3-octanedione ฟิวราน 1 ชนิด คือ 2-ethylfuran สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 1 ชนิด คือ carbon disulfide แอลดีไฮด์ 12 ชนิด ได้แก่ propanal, butanal, pentanal, hexanal, (E)-2-pentanal, heptanal, (E)-2-hexenal, (Z)-4-heptenal, octanal, (E)-2-octenal, (E,E)-2,4-heptadienal และ (E,Z)-2,6-nonadienal รวมถึงแอลกอฮอล์ 6 ชนิด ได้แก่ 1-penten-3-ol, (E)-2-penten-1-ol, (Z)-2-penten-1-ol, hexanol, 1-octen-3-ol และ heptanol นอกจากนี้ในการศึกษาของ Senger-Emonnot และคณะ (2006) เกี่ยวกับสารประกอบที่ให้กลิ่นในมะเดื่อทะเล (sea fig: *Microcosmus sulcatus*) ยังพบว่าสารไตรเมทิลเอมีน สารประกอบซัลเฟอร์และสารที่ไม่สามารถระบุกลุ่มของสารประกอบได้แน่ชัดอีกสองชนิดก็ให้กลิ่นคาวเช่นกัน ผลการทดสอบแก๊สโครมาโตกราฟี (GC) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนในการดมกลิ่นสารระเหยจากมะเดื่อทะเลมีรายชื่อสารประกอบและคำอธิบายกลิ่นของสารประกอบชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4 จะเห็นได้ว่ามีสารประกอบหลายชนิดที่ส่งผลต่อการเกิดกลิ่นของเจลาติน ดังนั้นนอกจากกลิ่นคาวแล้วยังอาจพบกลิ่นอื่น ๆ ที่ส่งผลต่อการยอมรับต่อตัวอย่างเจลาตินเช่นจากการศึกษาของ Ninan และคณะ (2009) พบว่าเจลาตินที่สกัดจากหนังปลา rohu (*Labeo rohita*) และ common carp (*Cyprinus carpio*) มีระดับของกลิ่นเมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสอยู่ที่ 2.3 และ 2.4 ตามลำดับ ซึ่งคะแนนดังกล่าวหมายถึงตัวอย่างมีกลิ่นจาง ๆ แต่สามารถรับรู้ได้ง่าย (0=ไม่มีกลิ่น, 6=มีกลิ่นรุนแรงและไม่เป็นที่ยอมรับ) โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนระบุว่าตัวอย่างมีกลิ่นคาวรวมถึงมีกลิ่นเน่าเหม็นจาง ๆ รวมอยู่ด้วย

Table 4. Compounds and odour descriptions analysed by GC of sea fig

Peak number	RI	Odour description	Compound
1	< 500/640	Sulfury, rotten	Methanethiol
2	502/845	Fishy, crustaceous	Trimethylamine
3	554/742	Fresh, marine	NI
4	594/990	Buttery	Butane-2,3-dione
5	650/-	Sulfury, gaseous	NI
6	733/1089	Sulfury, rubber	Dimethyldisulfide
7	759/1321	Green, metallic	Pent-2(E)-enol
8	804/1639	Cheese-like	Butyric acid
9	807/1122	Sulfury, cured meat	3-Methylbut-2-ene-1-thiole
10	816/-	Toasted	NI
11	843/1388	Green, grass	Hex-3(Z)-enol
12	852/1284	Meaty, nutty	2-Methyl-3-furanthiole
13	885/1262	Metallic, boiled potatoes	Hept-4(Z)-enale
14	890/1450	Toasted	Furfurylthiole
15	900/1361	Grilled, rice	2-Methylthiazolidine
16	959/1315	Mushroom	Oct-1-en-3-one
17	965/1390	Metallic	Octa-1,5-dien-3-ole
18	1020/1220	Mint	Eucalyptol
19	1028/-	Rubber, sulfury	Sulfur compoundf
20	1056/-	Grilled, phenolic	p-Cresol
21	1065/1780	Grilled	2-Acetyl-2-thiazolinee
22	1073/-	Roasted pork	NI
23	1095/2206	Fresh, marine	Sulfur compoundf
24	1127/1589	Green, fatty, melon	Nona-2,6(E,Z)-dienale
25	1153/1750	Green, fruity, water melon	Nona2,6(E,Z)-dienol
26	1161/-	Fresh	NI
27	1167/-	Herbaceous, mint	NI
28	1230/-	Green, fishy, fresh	NI
29	1247/2302	Meaty	5-(2-Hydroxyethyl)-4-methyl-thiazole

Note NI mean compound responsible for odour description not identified.

RI, retention indices

Source: Senger-Emonnot *et al.* (2006)

วิธีการลดกลิ่นคาว

เจลาตินที่สกัดได้จากปลา มักจะมีปัญหาในเรื่องของกลิ่นคาว ซึ่งทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเมื่อนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้น Kawahara และ Tanihata (2005) จึงได้ศึกษาการใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และถ่านกัมมันต์ในการจัดการกับหนังปลาก่อนนำไปสกัดเจลาติน โดยสารละลายที่ใช้ล้างหนังปลาในการทดลองได้แก่ น้ำ, สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 5.0, 10, 20 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ระดับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล ผลปรากฏว่าตัวอย่างที่ล้างด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เจือจางร้อยละ 0.5 และ 1.0 สามารถลดกลิ่นคาวได้ดีที่สุด เมื่อนำตัวอย่างมาศึกษาผลของการใช้ถ่านกัมมันต์ร่วมกับการล้างด้วยสารละลายเกลือโดยนำไฮโดรไลเซตที่ได้จากการสกัดหนังปลา 100 กรัมมาเติมถ่านกัมมันต์ 1 กรัม นำมาควนที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมากรองเพื่อกำจัดผงถ่านออก พบว่าการใช้ผงถ่านกัมมันต์เพียงอย่างเดียวให้ผลในการลดกลิ่นคาวเทียบเท่ากับการล้างด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เพียงอย่างเดียว แต่เมื่อใช้ถ่านกัมมันต์ร่วมกับการล้างด้วยสารละลายเกลือจะให้ผลในการลดกลิ่นคาวได้ดีที่สุด นอกจากนี้ในการศึกษาของ Muyonga และคณะ (2004) ยังพบว่าเมื่อนำสารสกัดเจลาตินจากหนังและกระดูกของปลาอะพวงแม่น้ำไนล์ (Nile perch: *Lates niloticus*) มากรองผ่านคอลัมน์ที่มีถ่านกัมมันต์บรรจุอยู่จะทำให้ตัวอย่างที่ได้มีคะแนนระดับกลิ่นคาวซึ่งทดสอบโดยใช้มาตราความชอบอยู่ในช่วง 2-2.5 (0=ไม่มีกลิ่น, 6=มีกลิ่นรุนแรงและไม่เป็นที่ยอมรับ) โดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 10 คนระบุว่าตัวอย่างไม่มีกลิ่นคาว (fishy) แต่จะมีกลิ่นเน่าเหม็นเล็กน้อย (putrid)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา
2. เพื่อศึกษาชนิดของหนังปลาที่เหมาะสมในการสกัดเจลาติน
3. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์และถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสทที่สกัดจากหนังปลา
4. เพื่อศึกษาเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท
5. เพื่อศึกษาสูตรอาหารเสริมสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาที่ตรงตามความต้องการของผู้บริโภค

บทที่ 2

วัสดุและวิธีการวิจัย

1. วัสดุดิบและสารเคมี

1.1 หน้ปลาตาหวานพันธุ์หน้หน้า (Bigeye snapper, *Priacanthus tayenus*) หน้ปลาปากคม (Lizard fish, *Saurida marginatus*) และหน้ปลาทรายแดง (Threadfin bream, *Nemipterus bleekeri*) จากท่าเทียบเรือประมงสงขลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา นำมาเก็บใน ห้องแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาไม่เกิน 3 เดือน

1.2 น้ำเซอร์ริเบอร์ริผสมน้ำอุ่นแท้ 100 % และน้ำส้มเขียวหวาน 100 % ตราทิปโก้ จากบริษัท ทิปโก้ฟู้ดส์ (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน)

1.3 เอนไซม์

อัลคาเลส (Alcalase) 2.4 L และนิวเทรส (Neutrase) 0.8 L (Novozyme, Bagsvaerd, Germany)

1.4 สารเคมี

1.4.1 สารเคมีสำหรับใช้ในการปฏิบัติต่อตัวอย่างหน้ปลาเบื้องต้น ได้แก่ โฆเดียมไฮดรอกไซด์และกรดอะซิติก กรดสำหรับใช้ในอาหาร

1.4.2 ส่วนสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ทางเคมีเป็นกรดวิเคราะห์ ได้แก่ 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), chlororamone T, L-bovine serum albumin(BSA), L-leusine และ *trans*-4-hydroxyproline จาก Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) perchloric acid, perchloric acid, copper sulfate, isopropanal, ethanol, methanol, hydrochloric, Sodium potassium ttrate copper sulfate จาก Labscan Ltd. (Dublin, Ireland) และ Sodium dodecyl sulfate (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250, G-250, phenolphthalein และ *N,N,N',N'*-tetramethyl ethylene diamine จาก Bio-Rad laboratories (Hercules, CA, USA) potassium persulfate และ *p*-dimethylamino-benzaldehyde จาก Fluka Chemical Co. (Buchs, Swizerland) type I collagen from calf skin จาก Elastin products Co., INC. (Owensville, MO, USA)

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือ	รุ่น	ผู้ผลิต/ประเทศ
Colour metre	ColorFlex	HunterLab , Reston, VA, USA
Texture Analyzer	TA-XT2i	Stable Micro System, Surrey, England
pH meter	CG842	SCHOTT, Mainz, Germany
Blender	Easypower	Moulinex, China
Magnetic stirrer	BIG SQUID	IKA LABORTECHNIK, Stanfen, Germany
Overhead stirrer	RW 20.n	IKA LABORTECHNIK, Stanfen, Germany
Oil bath	B-490	BUCHI, Flawil, Switzerland
Water bath	W350	Memmert, Schwabach, Germany
Vortex mixer	G-560E	Scientific Industries Inc., NY, USA
Microcentrifuge	MIKRO20	Hettich ZENTRIFUGEN, Leipzig, Germany
Refrigerated centrifuge	Avanti J-E	Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA
Brookfield Synchrolectic viscometer	DV II+	Brookfield Eng Labs Inc., Middleboro, MA, USA
Compact-PAGE apparatus	PAGEL [®] -Compact	Atto Co., Ltd., Tokyo, Japan
Electrophoresis apparatus	Mini-Protean II	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Homogenizer	T25 basic	IKA LABORTECHNIK, Selangor, Malaysia
Hand refractometer	Model ATC-1E, Brix 0-32%	ATAGO, Tokyo, Japan
Autoclave	SX-500	TOMY, Digital Biology, Tokyo, Japan

3. วิธีการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างหนังปลา

นำหนังของปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา ปลาปากคมและปลาทรายแดงมาทำละลายโดยให้น้ำไหลผ่านถุงที่บรรจุหนังปลา ก่อนขูดเศษเนื้อออก ตัดให้ได้ขนาดประมาณ 1 ตารางเซนติเมตร นำมาล้างทำความสะอาด วางให้สะเด็ดน้ำในตะกร้าพลาสติกที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที และเก็บในถุงโพลีเอทิลีนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสไม่เกิน 3 เดือน

3.2 การปฏิบัติเบื้องต้นตัวอย่างหนังปลา

นำหนังปลาจากข้อ 3.1 มาทำละลายโดยให้น้ำไหลผ่านถุงที่บรรจุหนังปลา ก่อนเข้าสู่กระบวนการปฏิบัติเบื้องต้นที่ดัดแปลงมาจาก Kittiphattanabawon (2004) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน (non-collageneous protein) กระบวนการทำให้พอง (swelling process) และการลดขนาด โดยแต่ละขั้นตอนมีวิธีการ ดังนี้

- การกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน

แช่หนังปลาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 0.025 นอร์มอล คนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้องจนครบ 2 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายในทุก 1 ชั่วโมง ล้างหนังปลาที่ได้ด้วยน้ำจนหมดค้างหรือมีพีเอชใกล้เคียงกับน้ำที่ใช้ล้าง

- กระบวนการทำให้พอง

แช่หนังปลาในสารละลายกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ คนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน (overhead stirrer) ที่อุณหภูมิห้องจนครบ 2 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายในทุก 40 นาที ล้างหนังปลาที่ได้ด้วยน้ำจนหมดกรดหรือมีพีเอชใกล้เคียงกับน้ำที่ใช้ล้าง

- การลดขนาด

นำหนังปลาที่ผ่านการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนและกระบวนการทำให้พองแล้วมาบดด้วยเครื่องบดอาหาร (blender) เพื่อลดขนาดเป็นเวลา 1 นาที

3.3 การศึกษาสภาวะและเวลาในการสกัดเจลาตินที่เหมาะสม

นำหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นจากข้อ 3.2 มาสกัดเจลาตินภายใต้สภาวะต่าง ๆ ซึ่งดัดแปลงมาจาก Kittiphattanabawon (2004) และ Yang และคณะ (2008) ดังแสดงในตารางที่ 5

Table 5. Extraction conditions of gelatin from bigeye snapper skin

Extraction	Fish skin: water (weight/ volumn)	Temperature (°C)	Time
Water bath	1 : 10	80, 90	1, 2, 3 hrs
Direct heat	1 : 10	100	1, 2, 3 hrs
Retort	1 : 2	110, 120, 130	30 min

ปรับพีเอชของตัวอย่างเป็น 7.0 แล้วกรองผ่านผ้าขาวบาง 2 ชั้น นำตัวอย่างที่ได้จากการสกัดในสภาวะต่าง ๆ มาวิเคราะห์ ดังนี้

- ปริมาณร้อยละผลผลิตของเจลาตินที่ได้

ปริมาณร้อยละผลผลิตของเจลาตินที่สกัดได้สามารถทำได้โดยการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนของเจลาตินที่สกัดได้และปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้วด้วยวิธีการของ Bergman และ Loxley (1963) (ดังภาคผนวก ข11.) และนำค่าที่ได้มาคำนวณ โดย

$$\text{ปริมาณร้อยละผลผลิต} = \frac{H_2}{H_1} \times 100$$

เมื่อ H_1 คือ ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้ว 100 กรัม

H_2 คือ ปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในสารสกัดเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้ว 100 กรัม

- รูปแบบโปรตีนโดย SDS-PAGE (Leamml, 1970) ดังภาคผนวก ข13.
- ระดับการไฮโดรไลซิส (Benjakul and Morrissey, 1997) (ภาคผนวก ข12.)

เลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดโดยพิจารณาจากปริมาณร้อยละผลผลิตของเจลาตินที่ได้ เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.4 การศึกษาผลของชนิดหนังปลาต่อผลผลิตและกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลา

นำหนังปลา 3 ชนิด ได้แก่ ปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา, ปลาทรายแดงและปลาปากคมจากข้อ 3.1 มาทำละลายโดยให้น้ำไหลผ่านถุงที่บรรจุหนังปลา ก่อนนำเข้าตู้ขึ้นตอนการปฏิบัติเบื้องต้นในข้อ 3.2 โดยหนังปลาแต่ละชนิดจะใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนดังแสดงในตารางที่ 6 แล้วนำหนังปลาที่ได้ไปสกัดด้วยขั้นตอนที่คัดเลือกจากข้อ 3.3 และเตรียมตัวอย่างเจลาตินผงโดยนำตัวอย่างที่สกัดได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องทำระเหยแบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสจนมีปริมาณของแข็ง ร้อยละ 10 แล้วจึงทำแห้งโดยอบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสโดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 1 ลิตรลงในถาดขนาด 60x30 ตารางเซนติเมตร ที่มีพลาสติกโพลีโพรพิลีนรองอยู่ อบเป็นเวลา 36 ชั่วโมง ก่อนพลิกกลับด้าน อบต่ออีก 6 ชั่วโมง (ตัวอย่างมีความชื้นร้อยละ 1-2) นำตัวอย่างมาบดด้วยเครื่องบดอาหาร (blender) บรรจุในถุงโพลีเอทิลีนและเก็บในโถสุญญากาศ

Table 6. Pretreatment process for fish skin

Fish	Removing non-collagenous protein	Swelling process
Bigeye snapper	2 hr	2 hr
Threadfin Bream	3 hr	40 min
Lizardfish	3 hr	40 min

นำเจลาตินผงที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้

3.4.1 ปริมาณร้อยละผลผลิตเช่นเดียวกับข้อ 3.3

3.4.2 ความชื้น (AOAC, 2000)

3.4.3 ทดสอบกลิ่นคาวในตัวอย่างเจลาตินจากหนังปลาทั้ง 3 ชนิด โดยนำเจลาตินมาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 (ละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและคนจนละลายหมด) ก่อนนำไปทดสอบกลิ่นคาวโดยใช้การทดสอบแบบ Multisample Difference test (0 = ไม่มีกลิ่น คาว, 15 = กลิ่นคาวเข้มที่สุด) เปรียบเทียบกับตัวอย่างอ้างอิง (Reference sample) ซึ่งเตรียมจากสารละลายเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่ไม่ผ่านกระบวนการล้าง 5 ระดับความเข้มข้น (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ง.1) ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10-12 คนที่ผ่านการฝึกฝนด้วยวิธีการและแบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก ง.2 และ ง.1 จนผู้ทดสอบทุกคนให้คะแนนไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) จากนั้นทดสอบตัวอย่างโดยให้ผู้ทดสอบดมกลิ่นตัวอย่างเจลาติน

เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ Multisample difference test ตัวอย่างแบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวก จ2. (วิธีการทดสอบดังภาคผนวก ง.2) รวมถึงการทำแบบทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) แบบ 9 คะแนน โดยผู้ทดสอบเพศหญิงจำนวน 30 คน เพื่อดูการยอมรับของผู้บริโภคต่อกลิ่นของเจลลาตินที่สกัดจากหนังปลาทั้ง 3 ชนิด

เลือกหนังปลาที่ให้ผลผลิตสูงสุดและกลิ่นคาวน้อยที่สุดไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไปและนำเจลลาตินผงที่ได้มาตรวจสอบ ดังนี้

- วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า โดยวิธี AOAC (2000) ดังวิธีการที่แสดงในภาคผนวก ข1., ข2., ข3. และ ข4.
- ความสามารถในการละลาย (Montero *et al.*, 1991) (ภาคผนวก ก2.)
- ความขุ่นของสารละลายเจลลาติน (Fernandez-Diaz *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ก1.)
- ค่าสีของเจลเจลลาตินด้วยเครื่องวัดค่าสี (model ColorFlex, HunterLab, Reston, VA, USA) (ภาคผนวก ก1.)
- ความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture Analyzer (TA-XT2i, Stable Micro System, Surrey, England) (Fernandez-Diaz *et al.*, 2001) (ภาคผนวก ก1.)
- ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม (Shahidi, 1995) (ภาคผนวก ก3.)
- ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชัน (Pearce and Kinsella, 1978) (ภาคผนวก ก4.)

3.5 การศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในการลดกลิ่นคาวของเจลลาตินจากหนังปลา

นำตัวอย่างหนังปลาที่คัดเลือกจากข้อ 3.4 น้ำหนัก 100 กรัมมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยมีลำดับการล้างดังนี้

ชุดควบคุม ไม่ล้างตัวอย่าง

ชุดทดลอง ล้างตัวอย่างหนังปลาด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ด้วยความเข้มข้นดังที่กล่าวมาปริมาตร 1 ลิตรในครั้งที่หนึ่งและ 0.5 ลิตรในครั้งที่สอง การล้างครั้งที่สามและสี่จะล้างด้วยน้ำปริมาตร 0.5 ลิตร โดยแต่ละครั้งจะใช้เวลาในการล้าง 5 นาที เมื่อล้างตัวอย่างแล้ววางในตะกร้าพลาสติกให้สะเด็ดน้ำที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ก่อนนำตัวอย่างหนังปลาไปผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นตามวิธีในข้อ 3.2 และสกัดเจลลาตินด้วยวิธีที่คัดเลือกจากข้อ 3.3 นำเจลลาตินที่

สกัดได้ไปทำแห้งแบบถาดจนกระทั่งมีความชื้นร้อยละ 1-2 บดเป็นผงด้วยเครื่องบดอาหาร (blender) นำเจลาตินที่ได้ไปทดสอบกลิ่นคาวตามวิธีในข้อ 3.5.1

3.5.1 การทดสอบกลิ่นคาว

นำเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาในข้อ 3.5 มาเตรียมเป็นสารละลายเจลาติน และทดสอบโดยใช้การทดสอบแบบ Multisample Difference test ใช้ผู้ทดสอบจำนวน 10-12 คนที่ผ่านการฝึกฝน รวมถึงการทำแบบทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) แบบ 9 คะแนน โดยผู้ทดสอบเพศหญิงจำนวน 30 คน เพื่อดูการยอมรับของผู้บริโภคต่อกลิ่นของเจลาตินเช่นเดียวกับข้อ 3.4.3

เลือกการเตรียมตัวอย่างที่ให้กลิ่นคาวน้อยที่สุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.6 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินเพื่อผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท

การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา เพื่อผลิตเป็นเจลาตินไฮโดรไลเสทจะใช้วิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Phanturat (2009) โดยเป็นการย่อยแบบ 2 ขั้นตอน (2-steps enzymatic hydrolysis) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ อัลคาเลส (Alcalase) ในขั้นตอนแรกและนิวเทรส (Neutrase) ในขั้นที่สอง โดยลำดับการวิจัยมีดังนี้

3.6.1 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

นำหนังปลาที่ผ่านการล้างด้วยกระบวนการที่คัดเลือกจากข้อ 3.5 ไปผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นด้วยวิธีในข้อ 3.2 และสกัดเจลาตินด้วยวิธีที่คัดเลือกมาในข้อ 3.3 ทำแห้งเช่นเดียวกับข้อ 3.4 และนำเจลาตินผงที่ได้มาเตรียมเป็นสารละลายเจลาตินเข้มข้นร้อยละ 2 ในน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 8.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 โมลาร์ นำสารละลายไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติมเอนไซม์อัลคาเลส (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ≥ 2.4 ยูนิต/กรัม) ร้อยละ 5 ของน้ำหนักเจลาติน (ปริมาตร/น้ำหนัก) กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชด้วย pH-state (เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ในตัวอย่างเพื่อรักษาพีเอชของตัวอย่างให้เป็น 8.0) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์ นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ ดังนี้

- ปริมาณโปรตีนด้วยวิธีไบยูเรต (Robison and Hodgen, 1940) ดังภาคผนวก ข10.
- ระดับการไฮโดรไลซิส (Benjakul and Morrissey, 1997) ดังภาคผนวก ข12.
- ABTS radical scavenging activity (Binsan, 2008) ดังภาคผนวก ข7.

เลือกตัวอย่างที่มีระดับการไฮโดรไลซ์และค่า ABTS radical scavenging activity สูงสุดไปย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสต่อไป

3.6.2 การศึกษาเวลาที่เหมาะสมในการย่อยเจลาตินด้วยเอนไซม์นิวเทรส

นำเจลาตินไฮโดรไลสที่คัดเลือกจากข้อที่ 3.6.1 มาปรับพีเอชเป็น 7.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 0.1, 1.0 และ 10 โมลาร์ นำตัวอย่างไปต้มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เติมเอนไซม์นิวเทรส (ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ≥ 0.8 ยูนิท/กรัม) ร้อยละ 5 ของน้ำหนัก เจลาตินเริ่มต้นก่อนย่อยด้วยอัลคาเลส (ปริมาตร/น้ำหนัก) กวนตลอดเวลาด้วยเครื่องกวน ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ควบคุมพีเอชด้วย pH-state (เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.02 โมลาร์ในตัวอย่างเพื่อปรับพีเอชให้คงที่ที่ 8.0) เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที นำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3.6 เลือกตัวอย่างที่มีระดับการไฮโดรไลซ์และค่า ABTS radical scavenging activity สูงสุดไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.7 การศึกษาผลของการใช้ถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลา

นำสารละลายเจลาตินไฮโดรไลสที่คัดเลือกจากข้อ 3.6.2 มาเติมถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.25, 0.5, 0.75 และ 1.0 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมงด้วยเครื่องกวนที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร ที่มีผงถ่าน 5 กรัมอยู่ด้านบน (วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก) นำสารละลายที่ได้มาทำแห้งเช่นเดียวกับข้อ 3.4 บรรจุตัวอย่างผงในถุงออลูมิเนียมฟอยล์และเก็บในโถสุญญากาศ นำตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลสไปทดสอบกลิ่นคาวและกลิ่นไม่พึงประสงค์โดยใช้ Multisample difference test (0 = ไม่มีกลิ่น, 15 = กลิ่นเข้มที่สุด) โดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 10 คน (วิธีการทดสอบดังภาคผนวก ง) รวมถึงการทดสอบการยอมรับต่อกลิ่นโดยใช้แบบทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) แบบ 9 คะแนน ด้วยผู้ทดสอบเพศหญิงจำนวน 30 คน เพื่อดูการยอมรับของผู้บริโภคในการนำเจลาตินไฮโดรไลสไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เลือกตัวอย่างที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดไปใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไปและนำไปตรวจสอบคุณภาพ ดังนี้

3.7.1 สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ ATBS ได้แก่

- ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ ATBS (Phanturat *et al.*, 2010 คัดแปลงจาก Binsan, 2008) ดังภาคผนวก ข7.
- ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ DPPH (Wu *et al.*, 2003) ดังภาคผนวก ข6.

- ความสามารถในการรีดิฟฟิวส์เฟอรัริก (Wu *et al.*, 2003) ดังภาคผนวก ข8.
- ความสามารถในการจับโลหะ (Boyer and McCleary, 1987) ดังภาคผนวก ข9.

3.7.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ความชื้น เถ้า โดยวิธี AOAC (2000) ดังวิธีการที่แสดงในภาคผนวก ข1., ข2., ข3. และ ข4.

3.7.3 ระดับการไฮโดรไลซิส (Benjakul and Morrissey, 1997) ดังภาคผนวก ข12.

3.7.4 ตรวจสอบสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน ได้แก่

- ความสามารถในการละลาย (Montero *et al.*, 1991) (ภาคผนวก ค2.)
- ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม (Shahidi, 1995) (ภาคผนวก ค3.)
- ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชัน (Pearce and Kinsella, 1978) (ภาคผนวก ค4.)

3.8 การวิเคราะห์ชนิดของสารที่ระเหยได้ของตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสท

นำตัวอย่างเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนึ่งหนานที่ไม่ผ่านการล้างด้วยน้ำในข้อ 3.5 และเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ไม่ผ่านการกวนด้วยผงถ่านจากข้อ 3.7 ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่ระเหยได้ โดยใช้สภาวะในการวิเคราะห์ดังแสดงในภาคผนวก ข14 ด้วยเครื่อง Gas chromatography-Mass spectrometry (GC/MS) เทคนิค Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME-GC-MS) ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล การเตรียมตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสททำได้โดยเตรียมตัวอย่างเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 20 ละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ก่อนบรรจุตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตรใส่ในขวดขนาด 20 มิลลิลิตรที่ปิดฝาสนิท และบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมงก่อนนำไปวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ คุณลักษณะกลิ่นรส (flavour attribute) ของสาร แต่ละชนิดระบุโดยใช้ข้อมูลจากการวิจัยของ Koizumi และคณะ (1979), Josephson และคณะ (1984), Mohri และคณะ (1992), Guen และ Demaimay (2000), Ranau และ Steinhart (2005), Senger-Emonnot และคณะ (2006), Ganeko และคณะ (2008), Pham และคณะ (2008), Acree และ Arn (2012) และ The Good Scents Company (2012)

3.9 การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลา

ขั้นตอนการสำรวจความต้องการของผู้บริโภคมีดังนี้

3.9.1 จัดทำแบบสอบถามเกี่ยวกับความต้องการของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ โดยมีผู้บริโภคร่วมเป้าหมาย คือ กลุ่มผู้หญิง อายุ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 200 คน โดยแบบสอบถาม (ภาคผนวก จ5.) จะประกอบด้วยคำถามที่เกี่ยวกับพฤติกรรมกรบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพ เช่น ความถี่ในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ สาเหตุที่เลือกรับประทานอาหารเสริมสุขภาพและประเภทของอาหารเสริมสุขภาพที่รับประทานอยู่ เป็นต้น ชนิดและลักษณะของอาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลสที่ผู้บริโภคร้องการ รวมถึงข้อมูลประชากรศาสตร์ของผู้บริโภค ทั้งนี้ชนิดของผลิตภัณฑ์ที่เป็นตัวเลือกในแบบสอบถามจะพิจารณาจากความเหมาะสมในการเติมเจลาตินไฮโดรไลสที่เตรียมได้จากข้อ 3.8 รวมถึงข้อมูลการตลาดของผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเสริมคอลลาเจนหรือโปรตีนไฮโดรไลส

3.9.2 รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ได้จากการสำรวจ เพื่อคัดเลือกประเภทของผลิตภัณฑ์ รสชาติและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่ผู้บริโภคร้องการมากที่สุด เพื่อใช้เป็นแนวความคิดผลิตภัณฑ์ในการวิจัยขั้นต่อไป

3.10 การพัฒนาสูตรและคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.9 มาใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลา โดยชนิดอาหารที่กลุ่มผู้บริโภคร้องการมากที่สุดได้แก่ น้ำผัก/ผลไม้ โดยน้ำผัก/ผลไม้ ที่ถูกเลือกมากที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ส้ม เบอร์รี่และองุ่น และผู้บริโภคร้องการน้ำผัก/ผลไม้ที่มีส่วนผสมของผัก/ผลไม้ 2 ชนิด ดังนั้นจึงใช้น้ำส้มผสมเบอร์รี่เป็นแนวความคิดผลิตภัณฑ์เพื่อใช้พัฒนาสูตรตามขั้นตอน ดังนี้

3.10.1 ศึกษาอัตราส่วนระหว่างน้ำส้มและน้ำเบอร์รี่ที่เหมาะสม

ศึกษาอัตราส่วนของน้ำส้มกับน้ำเบอร์รี่ที่เหมาะสมโดยวางแผนการทดลองแบบ augmented simplex-lattice ได้แผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7 นำไปทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยใช้ผู้ทดสอบที่เป็นเพศหญิง อายุ 18-44 ปี ให้คะแนนความชอบโดยใช้แบบทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) 9 คะแนน (Meilgaard *et al.*, 1999) รวมถึงนำตัวอย่างไปทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ ได้แก่

- ค่าสีของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวัดค่าสี (ColorFlex, HunterLab, Reston, VA, USA)
- ความหนืดด้วยเครื่อง Viscometer รุ่น RVDV II⁺ ยี่ห้อ Brookfield

- ค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดค่าพีเอช (CG842, SCHOTT, Deutschland, Germany)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (องศาบริกซ์) ด้วยเครื่อง Hand refractometer (model ATC-1E, Brix 0-32%, ATAGO, Tokyo, Japan)
- ค่ากรดในรูปของกรดซิตริก (AOAC, 1999) ตามภาคผนวก ข5.

เลือกสูตรที่ผู้ทดสอบให้คะแนนความชอบรวมและได้คะแนนความชอบไม่น้อยกว่า 7 คะแนนทุกคุณลักษณะไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

Table 7. The augmented simplex-lattice design for fruit juice

Sample No.	Ratio of fruit juice (%)	
	Orange	Berry
1	50	50
2	0	100
3*	50	50
4*	0	100
5	100	0
6	25	75
7	75	25
8*	100	0

Note: * replicated run

3.10.2 การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์ที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทและเจลาตินจากหนังปลา ตาหวานพันธุ์หนังหนา

เตรียมน้ำส้มผสมเบอร์รี่ตามสัดส่วนจากข้อ 3.10.1 จากนั้นเติมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากข้อ 3.7 โดยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง ได้แก่ ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 1.5, 2 และ 0, 0.25, 0.5, 0.75 รวมถึงเติมเจลาตินที่สกัดได้จากข้อ 3.5 ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2 และ 3 ลงไปในตัวอย่าง โดยแบ่งน้ำเบอร์รี่ร้อยละ 25 ของน้ำเบอร์รี่ทั้งหมดมาให้ความร้อนจนมีอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เติมเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลเสทลงไปจนละลายก่อนนำกลับไปผสมกับน้ำผลไม้ส่วนที่เหลือ นำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบคุณภาพเปรียบเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุม (ไม่เติมเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสท) โดยเปรียบเทียบคะแนนการทดสอบ

ทางประสาทสัมผัส (เช่นเดียวกับข้อ 3.10.1) รวมถึงนำตัวอย่างไปทดสอบคุณลักษณะต่าง ๆ เช่นเดียวกับข้อ 3.10.1

เปรียบเทียบคะแนนการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ที่เติมเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เลือกผลิตภัณฑ์ที่เติมเจลาตินไฮโดรไลสที่ระดับที่ได้รับการยอมรับมากที่สุดไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.11 การศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคกับผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่พัฒนาขึ้น

นำน้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่ได้จากข้อ 3.10.2 มาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคผู้หญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปจำนวน 200 คน โดยการทดสอบในสถานที่ทดสอบกลาง (Central Location Test) ในเขตจังหวัดสงขลา ได้แก่ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ ภายในมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เช่น โรงอาหาร อ่างเก็บน้ำและชมรมผู้สูงอายุ เป็นต้น โดยใช้แบบสอบถามดังแสดงในภาคผนวก จ7. ซึ่งสอบถามเกี่ยวกับพฤติกรรมการซื้อและบริโภคผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ คะแนนการยอมรับต่อผลิตภัณฑ์โดยใช้มาตราความชอบ 9 คะแนน ความตั้งใจซื้อของผลิตภัณฑ์และข้อมูลประชากรศาสตร์ของผู้บริโภค

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิจัยข้อ 3.3, 3.4, 3.6 และ 3.7 วางแผนการทดสอบแบบ Completely randomized design (CRD) ส่วนการทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้มาตราความชอบ (hedonic scale) ในขั้นตอนการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใช้แผนการทดลองแบบ randomized complete block design (RCB) วิเคราะห์ความแปรปรวนและทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range test ข้อมูลจากแบบสอบถาม (ข้อ 3.9 และ 3.10) วิเคราะห์ความถี่ไควสแควร์และความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร (crosstab) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for window version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) การวิจัยในข้อ 3.10.1 วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Design Expert version 7.0.3 (Stat-Ease, Inc., MN, USA)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาสภาวะของอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการสกัดเจลาติน

สารสกัดเจลาตินที่ได้จากการนำหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้วไปสกัดด้วยอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ พบว่ามีสมบัติ ดังนี้

1.1 ปริมาณร้อยละผลผลิต (Hyp yield) ของเจลาตินที่สกัดได้

จากการคำนวณโดยเปรียบเทียบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินที่สกัดได้กับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้ว 100 กรัมให้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการสกัดทำให้ปริมาณร้อยละผลผลิตเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 120 และ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงจะให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุด (ร้อยละ 76.36, 68.44 และ 68.24 ตามลำดับ) ผลผลิตของเจลาตินจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลา เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนในองค์ประกอบของหนังปลา รวมถึงเมตริกซ์ของหนังที่แตกต่างกัน (Karim and Bhat, 2009) นอกจากนี้ยังขึ้นกับสภาวะในการสกัดที่ต่างกันด้วย เมื่อเปรียบเทียบปริมาณร้อยละผลผลิตที่ได้จากการศึกษานี้กับการศึกษาของ Nalinanon และคณะ (2008) ซึ่งสกัดเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา (*Priacanthus tayenus*) ที่อุณหภูมิต่ำ (45 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 12 ชั่วโมงให้ผลผลิตร้อยละ 22.2 และการสกัดโดยใช้เปปซินร่วมกับสารยับยั้งโปรตีเอส (pepstatin A) ที่ให้ผลผลิตร้อยละ 40.3 โดยคำนวณจากปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินที่สกัดได้เทียบกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นโดยการแช่ในสารละลายต่างแล้ว จะพบว่าการสกัดด้วยอุณหภูมิสูงจะให้ปริมาณผลผลิตที่สูงกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการสกัดเจลาตินจากหนังของปลาฉลามกบ (brown banded bamboo shark) และฉลามหูดำ (blacktip shark) (45-75 องศาเซลเซียส, 6-12 ชั่วโมง) (Kittiphattanabawon *et al.*, 2010), หนังปลาคอด (cod) (45-100 องศาเซลเซียส, 15-120 นาที) (Kołodziejska *et al.*, 2008), หนังปลาเฉา (grass carp) (40-80 องศาเซลเซียส, 6-24 ชั่วโมง) (Kasankala *et al.*, 2007) และหนังปลา skate) (40-70 องศาเซลเซียส, 3-6 ชั่วโมง) (Cho *et al.*, 2006) ซึ่งพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิและเวลาในการสกัดจะส่งผลให้ปริมาณผลผลิตเจลาตินเพิ่มขึ้น ทั้งนี้กระบวนการทำให้พองด้วยสารละลายกรดในขั้นตอนการปฏิบัติเบื้องต้นจะทำให้เส้นใยในหนังปลาเกิดการพองตัว กรดจะ

ทำให้โปรตีนคลายตัวโดยทำลายพันธะนอนโควาเลนต์ ซึ่งเป็นการเตรียมคอลลาเจนให้พร้อมต่อการสกัด (Stainaby, 1987) เมื่อนำหนังปลาดังกล่าวมาสกัดอุณหภูมิที่สูงกว่าอุณหภูมิในการเปลี่ยนสภาพจากคอลลาเจนเป็นเจลาติน (สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส) (Karim and Bhat, 2009) จะทำลายพันธะไฮโดรเจน ทำให้สูญเสียโครงสร้างทริปเปิลเฮลิกซ์ (triple helix) ไป นอกจากนี้ความร้อนยังทำลายพันธะโควาเลนต์และนอนโควาเลนต์ทั้งภายในและระหว่างสายเปปไทด์ทำให้เกิดเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กลง (Foegeding *et al.*, 1996; Fonkwe and Singh, 1997; Cheow *et al.*, 2007; Karim and Bhat, 2009) การใช้อุณหภูมิสูงคอลลาเจนจะถูกย่อยสลายเป็นเจลาตินและละลายออกมาอยู่ในสารสกัดได้มากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำและเวลายาวนานกว่า นอกจากนี้ Yang และคณะ (2008) ยังได้กล่าวว่า การสกัดด้วยรีโทอร์ทสามารถทำให้เกิดการย่อยสลายของคอลลาเจน

Table 8. Hydroxyproline (Hyp) yield of gelatins extracted by different conditions.

Extraction condition		Hyp yield
Temperature (°C)	Time (h)	(%)
80	1	50.79 ± 1.78 ^{de}
	2	57.06 ± 5.06 ^{cde}
	3	53.36 ± 10.73 ^{cde}
90	1	61.22 ± 1.61 ^{bc}
	2	57.55 ± 1.44 ^{cde}
	3	55.01 ± 3.10 ^{cde}
100	1	52.40 ± 5.06 ^{cde}
	2	48.06 ± 7.30 ^e
	3	68.24 ± 6.15 ^{ab}
110	0.5	60.77 ± 4.90 ^{bcd}
120	0.5	76.36 ± 1.64 ^a
130	0.5	68.44 ± 1.15 ^{ab}

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

PFS: pretreated fish skin

การสกัดด้วยรีโทอร์ทนนอกจากผลของอุณหภูมิในการสกัดแล้ว ความดันภายในรีโทอร์ทยังส่งผลต่อเจลาตินที่สกัดได้ด้วย โดย Gómez-Guillén และ Montero (2005) พบว่าการใช้ความดันสูง (250 และ 400 MPa) เป็นเวลา 10 และ 20 นาที มีผลต่อการกระจายตัวของน้ำหนักโมเลกุลและสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาโคเวออร์ โซล (*Solea vulgaris*) การใช้ความดันยังสามารถลดระยะเวลาในการสกัดเจลาตินได้และให้เจลาตินที่มีคุณภาพของเจลาตินสูง นอกจากนี้ Yang และคณะ (2008) รายงานว่าการสกัดเจลาตินด้วยน้ำร้อนจะทำให้เกิดการย่อยสลายด้วยความร้อน (thermohydrolysis) และทำให้เกิดการละลายของเจลาตินที่เกิดการพองตัว การใช้รีโทอร์ทในการสกัดทำให้เกิดการเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ของคอลลาเจน โดยการสกัดในสภาวะที่รุนแรงเช่นนี้มีประสิทธิภาพมากพอที่จะใช้ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาได้

เมื่อพิจารณาการสกัดเจลาตินที่อุณหภูมิ 120 และ 130 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีและการสกัดที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงจะพบว่าให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงสุดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ในงานวิจัยนี้จะเลือกการสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากได้ปริมาณเจลาตินสูงสุดถึงร้อยละ 76.36 รวมถึงใช้อุณหภูมิต่ำกว่าการสกัดที่ 130 องศาเซลเซียสและเวลาในการสกัดสั้นกว่าการสกัดที่ 100 องศาเซลเซียส

1.2 รูปแบบโปรตีนโดย SDS-PAGE

ภาพที่ 5 แสดงรูปแบบของโปรตีนที่วิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE ภายใต้สภาวะ non-reducing ของตัวอย่างเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาทึบที่อุณหภูมิและเวลาในการสกัดต่างกันเปรียบเทียบกับคอลลาเจนชนิด type I โดยทั่วไปเจลาตินที่สกัดได้จากหนังของปลาตาหวานทั้งพันธุ์หนังหนาทึบ (*Priacanthus tayenus*) และหนังบาง (*Priacanthus macracanthus*) จะประกอบไปด้วยสายโซ่ $\alpha 1$ และ $\alpha 2$ เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งเป็นลักษณะของคอลลาเจนชนิด type I (Benjakul *et al.*, 2009) ซึ่งจากภาพจะเห็นว่าเมื่ออุณหภูมิและเวลาในการสกัดเพิ่มสูงขึ้นความเข้มของแถบโปรตีนของสายโซ่ $\alpha 1$, $\alpha 2$, β (ไคเมอร์ของสายโซ่ α), รวมถึงโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงจะจางลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านั้นมีปริมาณน้อยลงโดยที่อุณหภูมิการสกัด 120 และ 130 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาทีจะเกิดการย่อยสลายอย่างสมบูรณ์ของเจลาติน ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Muyonga และคณะ (2004) ที่รายงานว่าเจลาตินที่สกัดจากหนังปลากะพงแม่น้ำไนล์ (nile perch) ด้วยอุณหภูมิสูงจะมีเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าสายโซ่ α มากกว่าและพบองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่สูงกว่าสายโซ่ β น้อยกว่าเจลาตินที่สกัดด้วยอุณหภูมิต่ำ ทั้งนี้เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในขั้นตอนการสกัดและเปลี่ยนคอลลาเจนเป็นเจลาตินจะทำลายพันธะโควาเลนต์และนอนโควาเลนต์ทั้งในและระหว่างสายโซ่ α

และสายเปปไทด์ ซึ่งพันธะเปปไทด์บางส่วนก็จะถูกทำลายไปด้วย ดังนั้นในสารสกัดเจลาตินจึงประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลและความยาวสายที่หลากหลาย ขึ้นอยู่กับจำนวนและตำแหน่งของพันธะที่ถูกทำลาย (Zhao *et al.*, 2007) การย่อยสลายของเจลาตินจะเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินลดลง เช่น ค่าความแข็งแรงของเจล, สมบัติความยืดหยุ่น (viscoelastic properties), อุณหภูมิในการเกิดเจลต่ำลง (setting point) (Tavernier, 1989) ทั้งนี้นอกจากสายโซ่ β , $\alpha 1$, $\alpha 2$ และเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบของเจลาตินแล้วอาจมีโปรตีนชนิดอื่นปะปนมาด้วย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้นที่ไม่สมบูรณ์ (Zhao *et al.*, 2007)

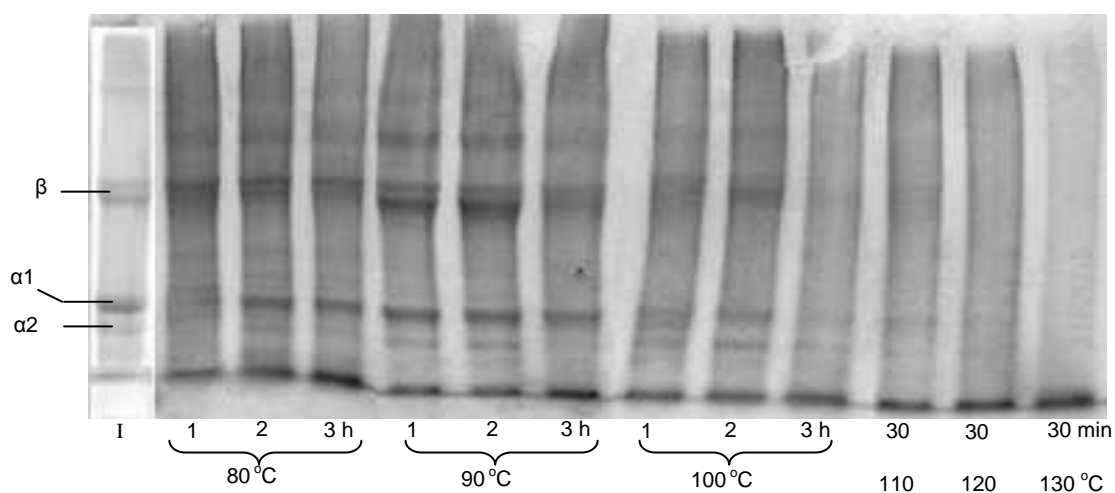


Figure 5. SDS-PAGE pattern of gelatin from bigeye snapper skin extracted at different temperature and time under non reducing condition. I: type I collagen

2. การศึกษาผลของชนิดหนังปลาต่อผลผลิตและกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลา

2.1 ปริมาณร้อยละผลผลิต (Hyp yield)

จากการคำนวณ โดยเปรียบเทียบปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเจลาตินผงกับปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในหนังปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบพบว่าหนังปลาทูหวานพันธุ์หนังหนาจะให้ปริมาณร้อยละผลผลิตสูงที่สุด (ร้อยละ 49.22) รองลงมาคือหนังปลาทรายแดงและหนังปลาปากคม (ร้อยละ 21.63 และ 24.61) ($p < 0.05$) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่หนังของปลาทูหวานพันธุ์หนังหนามีลักษณะหนาและเหนียวทำให้สามารถกำจัดเศษเนื้อออกได้ง่าย ในขณะที่หนังปลาทรายแดงและปากคมที่ใช้เป็นวัตถุดิบมีลักษณะนุ่มและบาง ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของหนังปลาดังกล่าว รวมถึง

ความสดของปลาทั้งสามชนิดอาจแตกต่างกัน ส่งผลให้ลักษณะของหนังปลาแตกต่างกันด้วย โดยหนังปลาที่สดน้อยกว่าอาจเกิดจากการย่อยสลายของหนังปลา นอกจากนี้ประสิทธิภาพของการชุดเศษเนื้อออกจากหนังปลาก็มีผลต่อการสกัดเจลาตินเช่นกัน ซึ่งโดยทั่วไปหนังปลาปากคมและหนังปลาทรายแดงจะไม่สามารถชุดเศษเนื้อออกได้หมด และทำได้เพียงลดขนาดก่อนเข้าสู่กระบวนการปฏิบัติหนังปลาเบื้องต้น ทำให้ต้องใช้เวลาในการแช่สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนออกไป (deproteinization) นานกว่าการเตรียมหนังปลาทาหวาน โดยจากการวิจัยของ Kittiphattanabawon (2004) พบว่าเมื่อเพิ่มเวลาในขั้นตอนการกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนจะทำให้สูญเสียคอลลาเจนจากวัตถุดิบไปมากขึ้น ซึ่งสามารถตรวจวัดโดยการหาปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนที่ถูกสกัดออกมาในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อนำหนังปลาที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นแล้วไปสกัดเจลาตินจะทำให้ได้ปริมาณผลผลิตที่ต่ำลง นอกจากนี้ผลผลิตของเจลาตินจะมีความแตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลา เนื่องจากปริมาณคอลลาเจนในองค์ประกอบของหนังปลา รวมถึงเมตริกซ์ของหนังที่แตกต่างกัน (Karim and Bhat, 2009)

2.2 การทดสอบกลิ่นคาว

ตารางที่ 9 แสดงผลการนำเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาทาหวานพันธุ์หนังหนา ทรายแดงและปากคมไปทดสอบทางประสาทสัมผัสกับผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 12 คน พบว่าเจลาตินทั้ง 3 ชนิดมีกลิ่นคาวไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่เมื่อประเมินการยอมรับต่อกลิ่นโดยรวมของเจลาตินกับผู้ทดสอบเพศหญิงจำนวน 30 คนด้วยแบบทดสอบมาตราความชอบ (hedonic scale) แบบ 9 คะแนน พบว่าเจลาตินจากหนังปลาทาหวานพันธุ์หนังหนามีคะแนนการยอมรับมากที่สุด (5.40 ± 1.51) ($p < 0.05$) ส่วนเจลาตินจากหนังปลาทรายแดงและหนังปลาปากคมมีระดับคะแนนไม่แตกต่างกัน (3.40 ± 1.35 และ 3.90 ± 1.79 ตามลำดับ) ($p > 0.05$) โดยผู้ทดสอบระบุว่าตัวอย่างเจลาตินจากหนังปลาทรายแดงและปลาปากคมมีกลิ่นอื่น ๆ นอกเหนือจากกลิ่นคาว ได้แก่ กลิ่นไหม้ กลิ่นอับและกลิ่นกรด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากหนังปลาที่เป็นวัตถุดิบมีสภาพที่แตกต่างกัน โดยหนังปลาทรายแดงและหนังปลาปากคมที่นำมาใช้ยังคงมีเศษเนื้อติดอยู่ในปริมาณมากทำให้ไม่สามารถกำจัดได้หมดในขั้นตอนการแช่โซเดียมไฮดรอกไซด์ เมื่อนำหนังปลาดังกล่าวมาสกัดเจลาตินอาจทำให้สารให้กลิ่นจากเศษเนื้อถูกสกัดออกมาด้วย

Table 9. Fishy odour and acceptance score of gelatins extracted from different fish skins

Fish skin	Score	
	Fishy odour	Acceptance
Bigeye snapper	7.03 ± 3.57 ^a	5.40 ± 1.51 ^a
Threadfin Bream	10.25 ± 3.96 ^a	3.40 ± 1.35 ^b
Lizardfish	9.53 ± 4.10 ^a	3.90 ± 1.79 ^b

Means ± SD from 12 trained panelists for multisample difference test and from 30 panelist for hedonic scale.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences ($p < 0.05$).

เมื่อพิจารณาจากปริมาณผลผลิตและคะแนนการยอมรับของกลิ่นจึงเลือกเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. องค์ประกอบทางเคมีและสมบัติของเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

3.1 องค์ประกอบทางเคมี

เมื่อนำสารสกัดเจลาตินจากปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีไปทำแห้งด้วยการอบในถาดและนำมาบดลดขนาดจะได้เป็นเจลาตินที่มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลค่อนข้างใส เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่ามีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 10 โดยประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 90.92 ± 0.39 ความชื้นร้อยละ 4.65 ± 0.42 เถ้าร้อยละ 1.47 ± 0.04 และไขมันร้อยละ 0.05 ± 0.03 เนื่องจากเจลาตินเป็นสารจำพวกโปรตีนจึงเห็นได้ว่าตัวอย่างมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก และถึงแม้ในหนังปลาตาหวานที่เป็นวัตถุดิบจะมีองค์ประกอบอื่น ๆ เช่น โปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน ไขมัน เถ้า และเม็ดสีที่ผิวหนังของปลา แต่องค์ประกอบดังกล่าวจะถูกกำจัดไปในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างด้วยการแช่ในสารละลายต่าง (Johnston-Banks, 1990) เจลาตินที่สกัดได้มีปริมาณโปรตีนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง ของ Kittiphattanabawon (2004) ซึ่งมีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 84.23 โดยอาจเป็นผลมาจากการที่ตัวอย่างมีปริมาณความชื้น (ร้อยละ 8.94) และเถ้า (ร้อยละ 5.98) ที่สูง ปริมาณเถ้าในตัวอย่างเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพบว่าไม่สูงกว่าปริมาณที่กำหนด (ร้อยละ 2.6) (Jones, 1977) และพบว่ามีปริมาณใกล้เคียงกับเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาชนิดอื่น ๆ เช่น ปลา

กะพงแม่น้ำไนล์ (ร้อยละ 0.5-1.4) (Mugonga *et al.*, 2003) และเจลาตินทางการค้าของบริษัท Norland Inc., สหรัฐอเมริกา (ร้อยละ 0.82) (Haug, 2004) แต่จากการศึกษาของ Kittiphattanabawon (2004) พบว่าเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา (*Priacanthus tayenus*) ที่มีความชื้นร้อยละ 8.94 และมีปริมาณเถ้าสูงถึงร้อยละ 5.89 ซึ่งเป็นผลมาจากการกำจัดเอาเกลือออกจากหนังปลาที่เป็นวัตถุดิบได้ไม่ดีพอ เมื่อสกัดจึงทำให้แร่ธาตุที่อยู่ในเกลือถูกสกัดออกมาอยู่ในตัวอย่างเจลาตินด้วย

3.2 สมบัติบางประการของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

3.2.1 ความสามารถในการละลาย

เจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมีความสามารถในการละลายที่ดีในช่วงพีเอชกว้าง (1-10) โดยเจลาตินดังกล่าวมีความสามารถในการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 87.37-94.28 ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Benjakul และคณะ (2009) ที่สกัดเจลาตินจากหนังปลาตาหวานสองสายพันธุ์ ได้แก่ ปลาตาหวานหนังบาง (*Priacanthus macracanthus*) และปลาตาหวานหนังหนา (*Priacanthus tayenus*) โดยเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาทั้งสองชนิดมีค่าการละลายมากกว่าร้อยละ 90 ในทุกช่วงพีเอชที่ทำการทดลอง (1-10) นอกจากนี้ Kittiphattanabawon (2004) ยังพบว่าเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา (*Priacanthus tayenus*) สามารถละลายได้ดีถึงร้อยละ 90-100 ที่พีเอชต่ำ (1-4) แต่ความสามารถในการละลายจะค่อย ๆ ลดลงเมื่อพีเอชของระบบเข้าใกล้ 8 ซึ่งเป็นจุดที่มีการละลายต่ำที่สุดทั้งนี้ เป็นผลมาจากค่า pI เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Ahmad and Benjakul (2011) ที่พบว่าเจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาหัวที่ผ่านการปฏิบัติเบื้องต้นด้วยกรดอะซิติกและกรดฟอสฟอริกมีความสามารถในการละลายสูงกว่าร้อยละ 90 ในทุกช่วงพีเอชที่ทำการทดลอง (1-10) และความสามารถในการละลายจะลดลงที่พีเอช 8 เช่นกัน

3.2.2 ความขุ่นของสารละลายเจลาตินและค่าสีของเจลาติน

เมื่อนำเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่สกัดด้วยอุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีมาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.67 แล้วนำไปวัดค่าการส่องผ่านของแสงจะพบว่ามีค่าการส่องผ่านของแสงเพียงร้อยละ 0.842 ± 0.017 (ดังแสดงในตารางที่ 10) เจลที่เกิดจากสารละลายเจลาตินดังกล่าวมีค่าสีในระบบ L*, a*, b* เป็น 32.58 ± 1.99 , -1.67 ± 0.28 และ 6.14 ± 1.76 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าสีของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา (*Priacanthus tayenus*) และหนังบาง (*Priacanthus macracanthus*) ในงานวิจัยของ Benjakul และคณะ (2009) ซึ่งมีค่าสีในระบบ L*, a*, b* เป็น 29.71, -1.61, 3.22 และ 28.55, -1.33, -3.90 ตามลำดับ พบว่าตัวอย่างเจลที่ได้จากการทดลองจะมีค่า b* สูงกว่า ทั้งนี้อาจ

เป็นผลมาจากอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน โดยจากการทดลองของ Benjakul และคณะ (2009) จะสกัดตัวอย่างที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองนี้ สกัดที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที การให้ความร้อนกับระบบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบอาจส่งผลให้เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลแบบเมลลาร์ด (maillard browning reaction) ขึ้นได้ เนื่องจากกรดอะมิโนโดยเฉพาะไลซีนที่เป็นองค์ประกอบของตัวอย่างมีบทบาทอย่างยิ่งในการทำให้เกิดปฏิกิริยาดังกล่าว ทั้งในสถานะที่มีความร้อนและไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง (Plakas *et al.*, 1985)

Table 10. Proximate analysis and properties of gelatin extracted from bigeye snapper skin

Chemical composition and properties	
Ash	1.47±0.04 % wet basis
Moisture	4.65±0.42 % wet basis
Protein*	90.92±0.39 % wet basis
Fat	0.05± 0.03 % wet basis
Solubility	> 85 % at pH 1-10
Turbidity of 6.67% gelatin solution	0.842±0.017 %
Colour of 6.67% gelatin gel	L*
	a*
	b*
Bloom strength	62.6±2.1 g

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

*Conversion factor = 5.4.

3.2.3 ความแข็งแรงของเจล

เจลของเจลาตินที่สกัดได้มีค่าความแข็งแรง (bloom strength) เป็น 62.6±2.1 กรัม ซึ่งต่ำกว่าเจลของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมงอย่างมาก (*Priacanthus tayenus*: 227.7±6.20 กรัม และ *Priacanthus macracanthus*: 254.10±11.13 กรัม) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาการสกัดเจลาตินปลากระพงแม่น้ำไนล์ (nile perch) (Muyonga *et al.*, 2004) และปลาทูน่าครีบลีโง (yellowfin tuna) (Cho *et al.*, 2005) ที่พบว่าเจลาตินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยเฉพาะเจลาตินที่สกัดด้วยอุณหภูมิสูงจะมี

ค่าความแข็งแรงของเจลต่ำ เนื่องจากความร้อนจากการสกัดจะไปทำลายโครงสร้างของเจลาคิน ได้แก่ สายโซ่แอลฟา เบต้าและแกมมา ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดและความแข็งแรงของโครงสร้างเจล (Karim and Bhat, 2009) เมื่อพิจารณาองค์ประกอบของตัวอย่างเจลาคินที่ได้จากการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วย SDS-PAGE ดังแสดงในภาพที่ 5 จะพบว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีจะทำให้เกิดการย่อยสลายของสายโซ่แอลฟา เบต้าและแกมมา องค์ประกอบส่วนใหญ่ที่เหลืออยู่จึงเป็นเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีความสามารถในการเกิดเจลต่ำและเจลที่ได้มีความแข็งแรงต่ำ นอกจากนี้ Kittiphattanabawon และคณะ (2010) ยังแสดงให้เห็นว่าค่าความแข็งแรงของเจลาคินที่สกัดจากหนังของปลาฉลามกบ (brown banded bamboo shark) และฉลามหูดำ (blacktip shark) ซึ่งมีค่า 206-214 กรัม จะลดลงเมื่ออุณหภูมิ (45-75 องศาเซลเซียส) และเวลา (6-12 ชั่วโมง) ในการสกัดเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการใช้อุณหภูมิสูงในการสกัดจะทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนหรือสายเปปไทด์ การย่อยสลายที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างอาจส่งผลให้เจลาคินไม่สามารถสร้างจังก์ชันโซน (junction zone) ซึ่งทำให้เกิดความแข็งแรงในโครงข่ายของเจลได้ (Karim and Bhat, 2009)

3.2.4 ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม

จากภาพที่ 6 แสดงความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมของเจลาคินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการเกิดโฟมจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาคินสูงขึ้นในทุกช่วงเวลา ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบผลจากการทดลองกับเจลาคินที่สกัดจากหนังปลาชนิดเดียวกันแต่ใช้อุณหภูมิในการสกัด 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบว่ามีความสามารถในการเกิดโฟม ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 สูงถึงร้อยละ 128.13 (Kittiphattanabawon, 2004) ทั้งนี้เป็นผลมาจากโครงสร้างของเจลาคินที่แตกต่างกัน โดยเจลาคินที่สกัดโดยใช้อุณหภูมิต่ำจะมีโครงสร้างที่มีขนาดใหญ่ทำให้สามารถเกิดฟิล์มและกักฟองอากาศไว้ภายในสารละลายได้ดีกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก (Karim and Bhat, 2009) ความสามารถในการเกิดโฟม (foam expansion) ซึ่งวัดจากปริมาตรของสารละลายเจลาคินที่เพิ่มขึ้นทันทีหลังจากการโฮโมจิไนซ์จะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเกิดโฟมของเจลาคิน นอกจากนี้ภาพที่ 6 ยังแสดงให้เห็นว่าความคงตัวของโฟมไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองตั้งแต่ 0 – 60 นาที ($p > 0.05$) Sánchez และ Patino (2005) กล่าวว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้อัตราการแพร่ของโมเลกุลสูงขึ้น นอกจากนี้ Lawal (2004) ยังแสดงให้เห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นจะทำให้โฟมมีความคงตัวสูงขึ้น เนื่องจากทำให้เกิดโฟมที่มีลักษณะแข็งแรงมากกว่า ทั้งนี้ความสามารถในการเกิดโฟมเป็นสมบัติทางฟิสิกส์เคมีของโปรตีน โดยความคงตัวของโฟมจะ

ขึ้นอยู่กับความเร็วของโมเลกุลโปรตีนที่บริเวณรอยต่อ ซึ่งในส่วนที่มีไขมันจะอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำ และส่วนของสายโซ่ที่ไม่ชอบน้ำจะหันไปในส่วนที่ไม่มีไขมัน (Sanchez-Vioque *et al.*, 2001) จากการทดลองแม้ว่าปริมาณของโฟมจะไม่เปลี่ยนแปลงแต่ความละเอียดและขนาดของฟองอากาศจะเปลี่ยนไป โดยในสารละลายที่ผ่านการโฮโมจีไนซ์ในตอนแรกจะมีขนาดของโฟมที่เล็กละเอียด จนเมื่อเวลาผ่านไปฟองอากาศจะมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากเกิดการรวมตัวของฟองอากาศดังกล่าว ในระหว่างที่เวลาผ่านไปแรงโน้มถ่วงจะทำให้ น้ำซึ่งล้อมรอบฟองอากาศอยู่ไหลลงสู่ที่ต่ำ จึงเป็นสาเหตุให้ชั้นฟิล์มบางลงและเกิดการรวมตัวของฟองอากาศในที่สุด (Zayes, 1997)

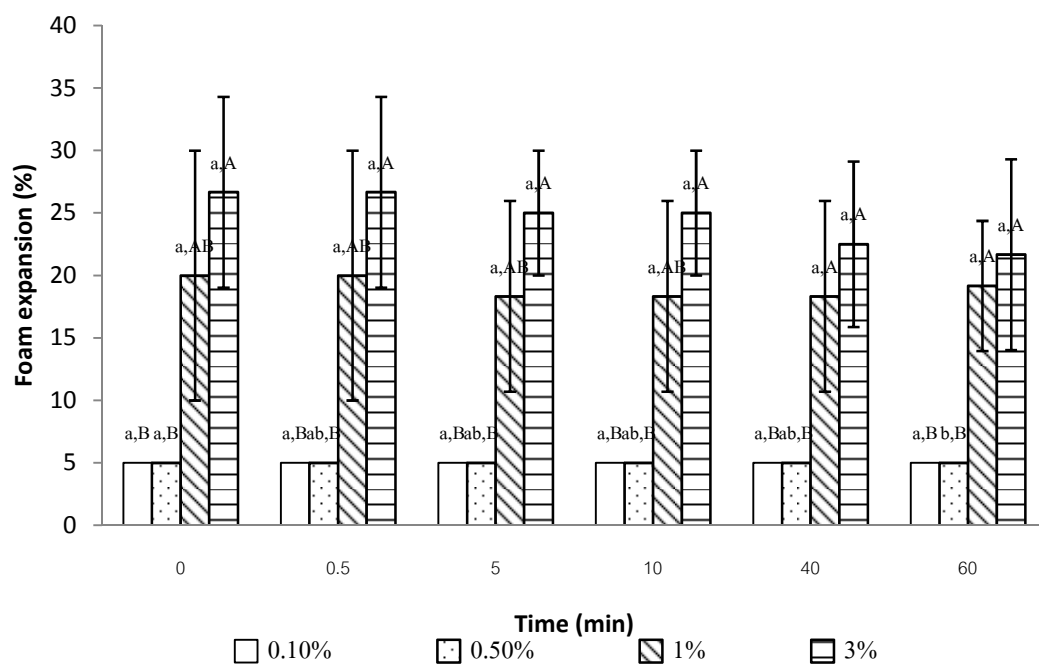


Figure 6 Foaming properties of gelatin from bigeye snapper skin extracted at 120°C for 30 min at different concentration (0.1 – 3.0 %). Bars represent the standard deviation from triplications. Different lowercase letters under the same concentration indicate significant differences ($p < 0.05$) and different uppercase letters under the same time indicate significant differences ($p < 0.05$).

3.2.5 ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชัน

จากค่าความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifying activity index, EAI) และความคงตัวของอิมัลชัน (emulsion stability index, ESI) ของตัวอย่างเจลาคตินในตารางที่ 11 แสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของตัวอย่างเพิ่มขึ้นค่า EAI จะลดลง ในขณะที่ค่า ESI เพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) ผลการทดลองดังกล่าวให้ผลตรงข้ามกับเจลาคตินจากปลาชนิดเดียวกันในการทดลองของ Kittiphattanabawon (2004) ซึ่งสกัดโดยใช้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมงพบว่าเจลาคตินจะมีค่า EAI สูงขึ้นและค่า ESI ลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) (ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1-3 มีค่า EAI = 10.43 – 41.46, ESI = 4.71 – 27.25) ทั้งนี้อาจเป็นผลของการสกัดเจลาคตินที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีทำให้เกิดเจลาคตินที่มีองค์ประกอบเป็นเปปไทด์สายสั้นจำนวนมากกว่าการสกัดที่อุณหภูมิต่ำ โดยการใส่เปปไทด์สายสั้นเป็นอิมัลซิไฟเออร์จะทำให้เกิดหยดไขมันที่มีขนาดใหญ่ถึงแม้จะใช้ที่ระดับความเข้มข้นสูงก็ตาม (Karim and Bhat, 2009) แต่การทดลองนี้ให้ผลสอดคล้องกับโปรตีนไฮโดรไลสจากกล้ามเนื้อปลาทูแอก (*Decapterus maruadsi*) (Thainsilakul *et al.*, 2007) โดยพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส (ร้อยละ 0.1, 0.5, 1.0 และ 3.0) ที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่า EAI ลดลง (5.31 - 37.28) ค่า EAI ใช้บอกความสามารถของโปรตีนในการเป็นสารทำให้เกิดและคงสภาพความเป็นอิมัลชัน โดยแสดงค่าในหน่วยพื้นที่ของรอยต่อ (interface) ต่อน้ำหนักของโปรตีน ซึ่งสามารถวัดได้ด้วยการนำอิมัลชันไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (Pearce and Kinsella, 1978) ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการถูกดูดซับของโปรตีนบนผิวหน้าของหยดน้ำมันระหว่างการโฮโมจีไนซ์ โดยโปรตีนจะสร้างเยื่อบาง ๆ หุ้มหยดน้ำมันไว้เพื่อป้องกันการรวมตัวกันของหยดไขมัน ความสามารถดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับหมู่ที่ชอบและไม่ชอบน้ำ รวมถึงความมีขี้ของโมเลกุลโปรตีน (Dickinson and Lorient, 1994; Rahali *et al.*, 2000; Gbogouri *et al.*, 2004) เมื่อพิจารณาร่วมกับความสามารถในการละลายของเจลาคตินจะพบว่าเจลาคตินสามารถละลายน้ำได้ดี ดังนั้นที่ระดับความเข้มข้นต่ำเจลาคตินจะเคลื่อนที่ไปยังรอยต่อระหว่างน้ำมันและน้ำโดยอาศัยการแพร่ (diffusion) แต่ที่ระดับความเข้มข้นสูงโปรตีนไม่สามารถเคลื่อนที่ในลักษณะที่ขึ้นกับการแพร่ได้ ส่งผลให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันในเฟสของน้ำ ทำให้ค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ลดลง (Thainsilakul *et al.*, 2007) อย่างไรก็ตามที่ระดับความเข้มข้นของเจลาคตินร้อยละ 3 มีค่า ESI เป็นศูนย์ เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวการเกิดอิมัลชันของตัวอย่างน้อยมาก โดยสังเกตจากค่า EAI ที่ต่ำ และภายหลังจากเก็บอิมัลชันเป็นเวลา 10 นาทีไม่สามารถสังเกตการเกิดอิมัลชันได้เช่นกัน

Table 11 Emulsifying properties of gelatin from bigeye snapper skin extracted at 120°C for 30 min at various concentrations

Gelatin concentrations (%)	Emulsifying activity index (m ² /g)	Emulsion stability index (min)
0.1	84.91 ± 9.93 ^a	15.97 ± 1.54 ^b
0.5	21.58 ± 1.01 ^b	20.49 ± 1.78 ^a
1.0	13.73 ± 1.08 ^c	24.14 ± 5.00 ^a
3.0	6.18 ± 0.96 ^d	0

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

4. การศึกษาผลของการใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

จากการทดลองนำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาล้างหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา เพื่อลดกลิ่นคาวในวัตถุดิบก่อนนำไปเข้าสู่กระบวนการเตรียมตัวอย่างเบื้องต้นและนำหนังปลาที่ได้ไปสกัดเจลาติน พบว่าเจลาตินที่สกัดได้มีคะแนนระดับกลิ่นคาวที่ทดสอบโดยใช้ผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนเป็นผู้ประเมินดังแสดงในตารางที่ 12 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการล้างหนังปลาด้วยน้ำหลาย ๆ ครั้งมีส่วนช่วยในการลดกลิ่นคาวลงได้มากที่สุด โดยเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาที่ผ่านการล้างด้วยน้ำปลาจำนวน 4 ครั้งมีระดับคะแนนกลิ่นคาวอยู่ที่ 3.20±1.69 ในขณะที่เจลาตินที่สกัดได้จากหนังปลาชุดควบคุมจะมีระดับคะแนนกลิ่นคาวอยู่ที่ 8.47±2.36 นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าการล้างหนังปลาด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ มีความสามารถในการลดกลิ่นคาวได้ดีกว่าการล้างหนังปลาด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Kawahara และ Tanihata (2005) ที่ใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.1-2.0 ในการล้างหนังปลาลาสกาน พอลแลค (Alaskan Pollack) ก่อนนำไปสกัดเป็นเจลาติน ซึ่งพบว่าการล้างหนังปลาด้วยน้ำสามารถลดกลิ่นคาวในเจลาตินที่สกัดได้มากที่สุด (p<0.05) ในขณะที่การล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 2.0 ไม่มีผลทำให้กลิ่นคาวลดลงจากชุดควบคุม (p>0.05) การเติมโซเดียมคลอไรด์เป็นการเพิ่มความแรงไอออน (Ionic

strenght) ให้กับสารละลาย จึงอาจเป็นไปได้ว่าสารประกอบที่ให้กลิ่นคาวส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทมีความเป็นขี้ด้าซึ่งสามารถละลายในน้ำได้ดีกว่าในสารละลายเกลือ

Table 12. Fishy odour score of gelatin extracted from bigeye snapper skin washed by NaCl solution at various concentrations

% NaCl	Fishy odour score
Control (unwashed)	8.47±2.36 ^a
0 %	3.20±1.69 ^c
0.5 %	6.76±2.85 ^{ab}
1.0 %	4.77±1.81 ^{bc}
1.5 %	5.09±1.97 ^{bc}
2.0 %	7.46±3.38 ^a

Means ± SD from twelve panelists.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences ($p < 0.05$).

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท

5.1 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

5.1.1 ระดับการย่อยสลายของเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

ระดับการย่อยสลายเป็นค่าที่แสดงให้เห็นจำนวนของพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลาย (Adler-Nissen, 1986) มีความสำคัญเป็นอย่างมากเนื่องจากส่งผลต่อสมบัติหลายประการของโปรตีนไฮโดรไลเสท (Nielsen, 1997) จากภาพที่ 7 ซึ่งแสดงระดับการย่อยสลายของเจลาตินที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะพบว่าในช่วง 30 นาทีแรก ระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และระดับการย่อยสลายจะค่อนข้างคงที่ในช่วงหลังจากนาทีที่ 90 ของการย่อยเป็นต้นไป การเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกนั้นแสดงให้เห็นว่ามีพันธะเปปไทด์จำนวนมากที่ถูกย่อยสลายไป (Shahidi *et al.*, 1995) โดยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ประเภทที่สุ่มย่อยจากภายในสายเปปไทด์ (endopeptidase) มีความจำเพาะต่ำและสามารถย่อยเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่ไม่มีขี้ด้าได้ดี (Adler-Nissen, 1986) ดังนั้นในช่วงต้นของปฏิกิริยาในระบบจะมีสารตั้งต้นที่มีสภาพเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์อยู่เป็นจำนวนมาก ทำให้มีโอกาสเกิดการย่อยสารตั้งต้นได้ง่าย แต่เมื่อระดับการย่อยสูงขึ้นตำแหน่งที่เหมาะสมต่อการทำงานของ

เอนไซม์ลดลง เกิดการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์ (enzyme autodigestion) และ/หรือการเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Kristinsson and Rasco, 2000) จึงทำให้อัตราในการย่อยสลายลดลงไปด้วย รูปแบบกราฟของระดับการย่อยสลายนี้มักพบในการใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ การใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังบาง (*Priacanthus macracanthus*) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 40 นาทีแรกของการย่อย (Phanturat, 2009) รวมถึงการย่อยเจลาตินจากหนังปลาโซล (*Solea vulgaris*) และหนังหมึกด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสนาน 3 ชั่วโมง (Giménez *et al.*, 2009) และการย่อยเจลาตินจากหนังปลากะพงข้างเหลือง (*Lutjanus vitta*) ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้ติ่งของปลากะพงข้างเหลือง ปลาตาหวานหนังหนา (*Priacanthus tayenus*) และปลาทรายแดง (*Nemipterus marginatus*) ก็พบรูปแบบการย่อยนี้เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองนี้จึงคัดเลือกการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่เวลา 90 นาทีไปศึกษาในขั้นตอนต่อไปเนื่องจากมีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด

5.1.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) ของเจลาตินไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส

ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสด้วยเวลาต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 8 วิธีนี้เป็นการตรวจสอบความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับอนุมูล ABTS (Binsan *et al.*, 2008) โดยจากผลการทดลองพบว่าค่าความสามารถดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นโดยสัมพันธ์กับค่าระดับการย่อยสลายตัวอย่างที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 30 นาทีจะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS สูงที่สุดและคงที่จนถึงนาทีที่ 180 จึงเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยโมเลกุลของเจลาตินด้วยเอนไซม์ทำให้ได้เปปไทด์ซึ่งมีขนาดโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันมากขึ้น (Gómez-Guillén *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Khantaphant และ Benjakul (2008) ยังกล่าวว่าความแตกต่างของความสามารถในการต้านออกซิเดชันของเจลาตินไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันและมีระดับการย่อยสลายต่างกัน เกิดจากการที่ไฮโดรไลสที่มีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ลำดับของกรดอะมิโนและความยาวสายโซ่ที่ต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปไฮโดรไลสจะประกอบด้วยเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถให้ไฮโดรเจน (hydrogen donor) และทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้เกิดเป็นสารที่มีความคงตัว ซึ่งทำให้หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลนั้นได้

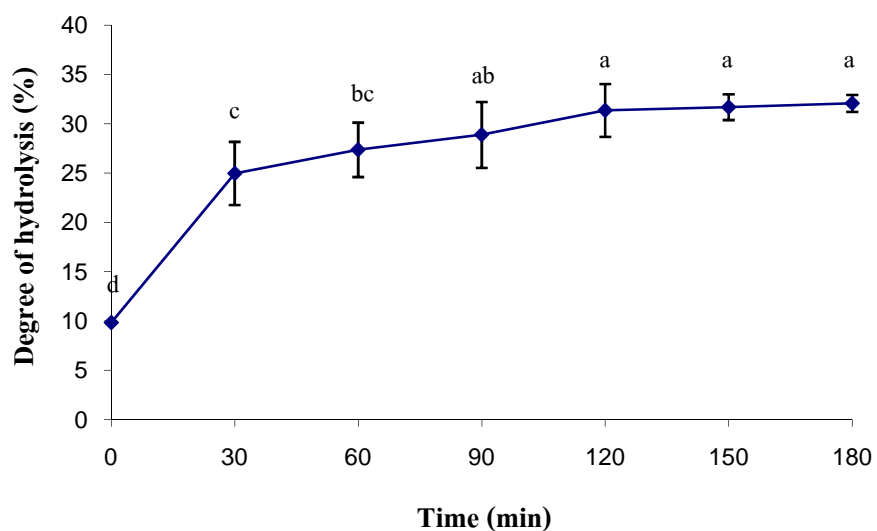


Figure 7. Degree of hydrolysis of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Alcalase at various times.

Different letters indicate the significant differences ($p < 0.05$). Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

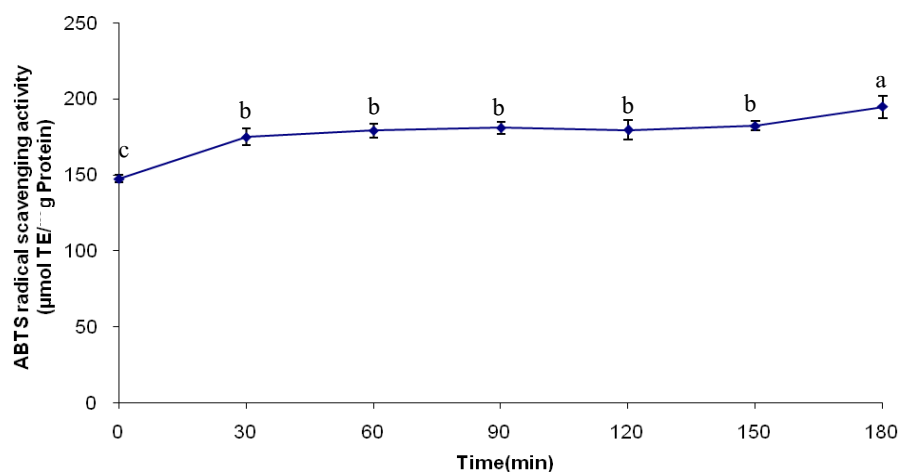


Figure 8. ABTS radical scavenging activity of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Alcalase at various times. Different letters indicate the significant differences ($p < 0.05$). Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

5.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์นิวเทรส

5.2.1 ระดับการย่อยสลายของเจลาตินไฮโดรไลสที่ข่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส

เมื่อนำเจลาตินไฮโดรไลสที่ผ่านการข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 90 นาที มาข่อยต่อด้วยเอนไซม์นิวเทรสเป็นเวลา 180 นาทีและเก็บตัวอย่างทุก ๆ 30 นาทีของการข่อยเพื่อนำมาตรวจสอบระดับการย่อยสลายดังแสดงในภาพที่ 9 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ผ่านการข่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสไม่มีการเปลี่ยนแปลงของค่าระดับการย่อยสลาย ($p > 0.05$) ผลการทดลองนี้แตกต่างจากการทดลองของ Phanturat *et al.* (2010) ที่ข่อยเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนึ่งบางที่ผ่านการสกัดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมงโดยการข่อยแบบสองขั้นตอน ซึ่งขั้นตอนแรกจะข่อยด้วยอัลคาเลสจนตัวอย่างมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 แล้วจึงนำมาข่อยต่อด้วยเอนไซม์นิวเทรสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ซึ่งส่งผลให้ค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอีกร้อยละ 5 ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการที่เจลาตินซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของการทดลองนี้ผ่านการสกัดด้วยอุณหภูมิที่สูงถึง 120 องศาเซลเซียส ทำให้พันธะเปปไทด์ถูกทำลายไป ดังจะเห็นได้จากข้อ 1.2 ที่แสดงให้เห็นเจลาตินประกอบไปด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำ เมื่อนำเจลาตินดังกล่าวมาข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสก่อนนำมาข่อยต่อด้วยเอนไซม์นิวเทรสทำให้เปปไทด์ดังกล่าวมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสจะเป็นการข่อยจากภายในสายเปปไทด์ (endopeptidase) โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นลิวซีนและฟีนิลอะลานีน (Adler-Nissen, 1986) จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าระดับการย่อยสลาย

5.2.2 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลสที่ข่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส

ความสามารถในการจับอนุมูล ABTS ให้ผลดังแสดงในภาพที่ 10 จากภาพจะเห็นได้ว่าตัวอย่างที่ผ่านการข่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสเป็นเวลา 30 นาทีจะมีค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS สูงที่สุด และจะลดลงเมื่อการข่อยดำเนินไปถึงนาทีที่ 120 ($p < 0.05$) เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของเปปไทด์จะขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโมเลกุลและขนาดของโมเลกุล ซึ่งเป็นผลมาจากสภาวะในการผลิต ดังนั้นการข่อยด้วยเอนไซม์จึงถูกนำมาใช้ในการคัดแปลงโปรตีนให้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น (Korhonen *et al.*, 1998) การข่อยสลายที่เวลานานเกินไปจะไปทำลายโครงสร้างและขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ทำให้ความสามารถในการจับอนุมูล ABTS ลดลงดังภาพที่ 10 ดังนั้นจึงเลือกการข่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสที่เวลา 30 นาทีไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

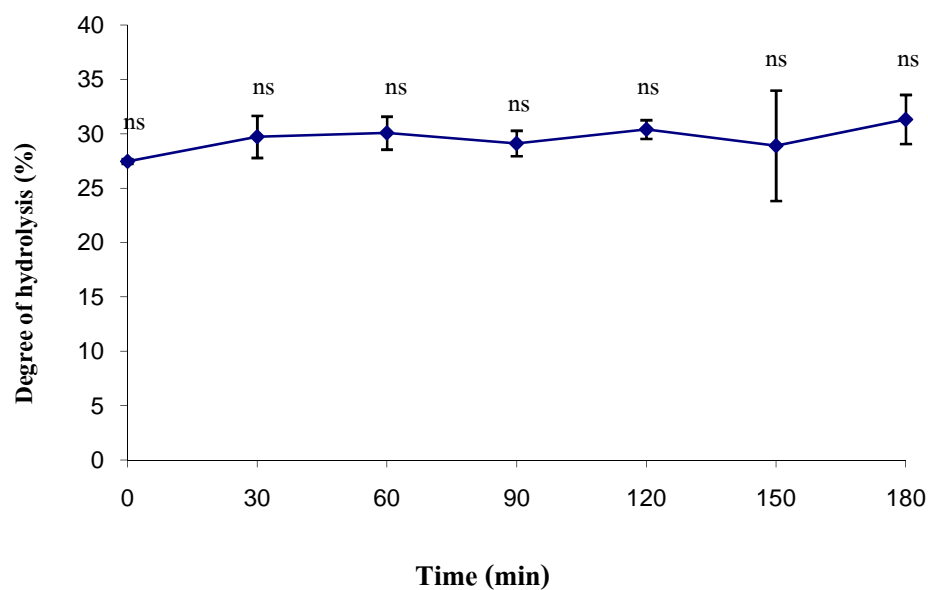


Figure 9. Degree of hydrolysis of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Neutrase at various times. ns indicate not significant differences ($p > 0.05$). Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

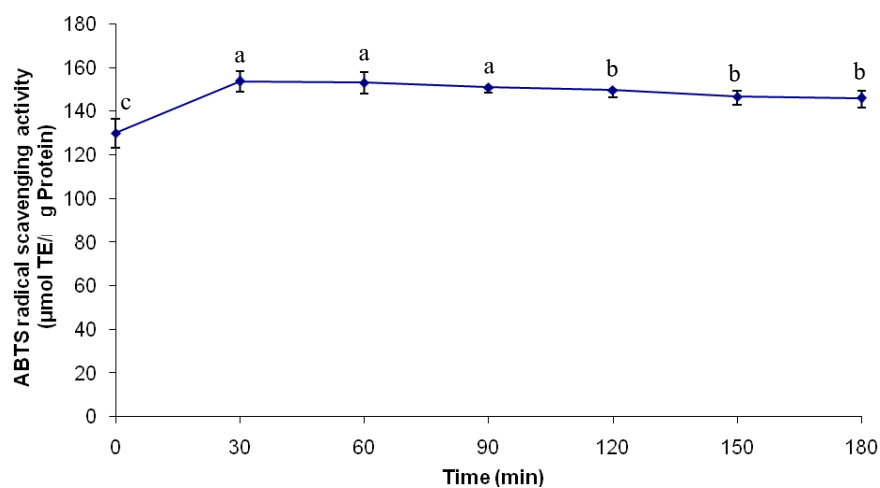


Figure 10. ABTS radical scavenging activity of gelatin hydrolysates hydrolyzed by Neutrase at various times. Different letters indicate the significant differences ($p < 0.05$). Bars represent the standard deviation from triplicate determinations.

6. การศึกษาผลของการใช้ผงถ่านกัมมันต์ในการลดกลิ่นคาวของเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลา ตาหวานพันธุ์หนังหนา

ในการศึกษาการลดกลิ่นคาวของเจลาตินไฮโดรไลสที่ผลิตจากหนังปลา ตาหวานพันธุ์หนังหนาพบว่าเมื่อเจลาตินผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรสแล้ว กลิ่นของผลิตภัณฑ์ที่ได้จะต่างไปจากเจลาตินเริ่มต้น โดยพบว่าการใช้เอนไซม์นิวเทรสซึ่งมีกลิ่นส่งผลทำให้ตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลสที่มีกลิ่นเช่นเดียวกับเอนไซม์ดังกล่าว ในการทดสอบกลิ่นโดยผู้ทดสอบที่ผ่านการฝึกฝนแล้วจำนวน 10 คนจึงมีการตกลงคำศัพท์ใหม่ขึ้นมาเพื่อใช้ทดแทนคำว่า ‘กลิ่นคาว’ ซึ่งใช้ในการทดสอบกลิ่นของเจลาติน โดยมีมติของผู้ทดสอบให้ใช้คำว่า ‘กลิ่นไม่พึงประสงค์’ ในการประเมินโดยใช้แบบทดสอบ multisample difference test พร้อมทั้งยังมีการประเมินการยอมรับกลิ่นของผู้บริโภคในแง่ของการนำเจลาตินไฮโดรไลสไปใช้ต่อในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพกับผู้บริโภคจำนวน 30 คน ด้วยแบบทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) แบบ 9 คะแนน นอกจากนี้ได้นำตัวอย่างเจลาตินก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์มาทดสอบเพื่อเปรียบเทียบผลของกลิ่นเอนไซม์นิวเทรสต่อเจลาตินไฮโดรไลสที่ได้ ซึ่งผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าการใช้ถ่านกัมมันต์ไม่มีผลต่อการลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ของเจลาตินไฮโดรไลส ($p > 0.05$) อีกทั้งยังมีแนวโน้มว่าเจลาตินไฮโดรไลสที่ผ่านการกวนด้วยผงถ่านจะมีกลิ่นไม่พึงประสงค์สูงขึ้น จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายเจลาตินไฮโดรไลสที่ผ่านการกวนและกรองด้วยผงถ่านที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าปริมาณโปรตีนในสารละลาย (ร้อยละ 16.07 ± 0.12) ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการใช้ผงถ่าน (ร้อยละ 17.99 ± 0.37) ($p < 0.05$) ดังนั้นเมื่อนำสารละลายดังกล่าวไปทำแห้งจึงทำให้ได้เจลาตินไฮโดรไลสที่มีความเข้มข้นของสารให้กลิ่นคาวมากขึ้น ทั้งนี้กลไกการดูดซับของผงถ่านคือการกักโมเลกุลไว้ภายในรูพรุนบนผิวหน้าของผงถ่าน ซึ่งระหว่างผิวหน้าของผงถ่านกับโมเลกุลดังกล่าวจะมีแรงกระทำอย่างอ่อนซึ่งเรียกว่าแรงแวนเดอร์วาล โดยโมเลกุลที่ไม่มีขั้วและมีขนาดใหญ่จะถูกดูดซับได้ง่ายกว่าโมเลกุลขนาดเล็ก (Cameron Carbon Incorporated, 2006) และเนื่องจากผิวหน้าของผงถ่านกัมมันต์เป็นพื้นผิวที่ไม่มีขั้วจึงสามารถดูดซับสารที่ไม่มีขั้วได้ โดยในการดูดซับสารดังกล่าวออกจากสารละลายจะต้องมีแรงกระทำระหว่างผิวหน้าของผงถ่านกับแรงกระทำของโมเลกุลที่มากกว่าแรงที่สารดังกล่าวจะไปละลายในน้ำ (DeSilva, 2000) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ที่ไม่มีขั้วซึ่งมีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่จะถูกดูดซับไว้โดยผงถ่าน ในขณะที่สารซึ่งทำให้เกิดกลิ่นไม่พึงประสงค์มีขนาดเล็กและสามารถละลายน้ำได้ดีจึงถูกกักไว้บนผงถ่านได้น้อยกว่า ทั้งนี้จากงานวิจัยของ Kawahara และ Tanihata (2005) พบว่าการนำสารละลายเจลาตินที่สกัดจากหนังปลามากวนกับผงถ่านกัมมันต์ร้อยละ 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องสามารถลดกลิ่นคาว

ได้ จึงเป็นไปได้ว่าในขั้นตอนการย่อยเจลาตินด้วยเอนไซม์อาจเกิดสารประกอบที่ส่งผลต่อกลิ่นของตัวอย่างนอกเหนือจากที่พบในเจลาตินทำให้ผงถ่านกัมมันต์ไม่สามารถกำจัดสารดังกล่าวออกไปได้

Table 13. Odour score of gelatin and gelatin hydrolysates treated by activated carbon (AC) at various concentrations

Sample	Odour score*	
	Fishy odour	Acceptance
Gelatin**	3.11±2.11 ^d	5.28±1.76 ^a
GH***	4.93±3.00 ^{cd}	4.91±1.65 ^a
GH + 0 % AC****	6.58±2.80 ^{bc}	3.78±1.88 ^b
GH + 0.25 % AC	11.26±3.27 ^a	3.47±2.06 ^b
GH + 0.50 % AC	10.44±2.96 ^a	3.31±1.86 ^b
GH + 0.75 % AC	8.81±2.76 ^{ab}	3.44±1.78 ^b
GH + 1.0 % AC	8.74±3.68 ^{ab}	3.94±1.98 ^b

* Means ± SD from 12 trained panelists for fishy odour score and 30 panelists for acceptance score.

** Gelatin extracted from skin washed with water for 4 times.

*** Gelatin hydrolysate without activated carbon treated.

**** Gelatin hydrolysate filtered through activated carbon.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences ($p < 0.05$).

7. องค์ประกอบและสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลสที่ผลิตจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

7.1 องค์ประกอบทางเคมี

เมื่อนำเจลาตินไฮโดรไลสที่ผ่านขั้นตอนการลดกลิ่นคาวด้วยการล้างหนังปลาซึ่งเป็นวัตถุดิบด้วยน้ำ 4 ครั้งก่อนการสกัดมาทำแห้งโดยการอบแบบถาดและนำเจลาตินไฮโดรไลสดังกล่าวไปวิเคราะห์องค์ประกอบพบว่าปริมาณโปรตีนในตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลส (ร้อยละ 83.14 ± 0.54) ต่ำกว่าเจลาตินที่ใช้เป็นวัตถุดิบเริ่มต้น (ร้อยละ 90.92 ± 0.39) ดังแสดงในตารางที่ 14 ทั้งนี้เป็นผลมาจากตัวอย่างมีปริมาณเถ้าและความชื้นที่สูงขึ้น ปริมาณเถ้าที่เพิ่มขึ้นเกิดจากการใช้ pH-stat เพื่อควบคุมค่าพีเอชของระบบให้คงที่ในขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดเกลือขึ้นจากปฏิกิริยาการสะเทินระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลจากโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่เติมลงไปกับหมู่อะมิโนซึ่งถูกปลดปล่อย

ออกมาจากการตัดพันธะเปปไทด์ (Nielsen, 1997) นอกจากนี้ในขั้นตอนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ยังมีการเติมโมเลกุลของน้ำเข้าไปเพื่อให้พันธะเปปไทด์แตกออกอีกด้วย ดังนั้นสัดส่วนของ โปรตีนในเจลาตินไฮโดรไลเสทจึงน้อยกว่าในเจลาตินที่เป็นวัตถุดิบ (Nielsen, 1997) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนและเถ้าจากการทดลองอื่น ๆ เช่น โปรตีนไฮโดรไลเสทจากหนังปลาแซลมอนที่ย่อยด้วยเอนไซม์แอลคาเลส (See *et al.*, 2011) มีปริมาณโปรตีน ร้อยละ 89.53 ± 0.51 และเถ้า ร้อยละ 3.58 ± 0.06 เนื่องจากการใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในขั้นตอนการย่อย หรือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกล้ามเนื้อปลาทูแขก (*Decapterus maruadsi*) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและทำแห้งด้วยการระเหิดมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 68.97 และมีปริมาณเถ้าสูงถึง ร้อยละ 24.56 ซึ่งเป็นผลมาจากการใช้บัฟเฟอร์และการปรับพีเอชในขั้นตอนการย่อยด้วยเอนไซม์ เช่นกัน (Thiansilakul, 2007)

7.2 สมบัติการต้านออกซิเดชัน

เมื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยพิจารณาจากความสามารถในการต้านอนุมูลของ 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) และ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) พบว่ามีค่า 482.69 ± 3.01 และ $4.920.08$ ไมโครโมล TE/กรัมโปรตีน DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่มีความคงตัว เมื่อละลายในเอทานอลจะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยสารที่ให้ไฮโดรเจนจะจับกับอนุมูล DPPH แล้วทำให้สีของสารเปลี่ยนจากสีม่วงไปเป็นสีเหลืองและทำให้ค่าการดูดกลืนแสงลดลง (Shimada *et al.*, 1992) ความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารใด ๆ ในการจับอนุมูลของ DPPH จะขึ้นกับความสามารถในการให้ไฮโดรเจนของสารนั้น (Binsan *et al.*, 2008) ส่วนการศึกษาการต้านอนุมูลของ ABTS เป็นในการวัดค่ากิจกรรมในการต้านออกซิเดชันเมื่อสารตัวอย่างสามารถเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับอนุมูล ABTS ได้ โดยทั่วไปไฮโดรไลเสทประกอบด้วยเปปไทด์หรือโปรตีนซึ่งให้ไฮโดรเจน (hydrogen donor) และสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระแล้วเปลี่ยนรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความคงตัวขึ้น ส่งผลให้หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้ โดยจากการศึกษาของ Phanturat (2009) รายงานว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังบางด้วยเอนไซม์อัลคาเลส นิวเทรสและโปรตีเอสจากไส้ติ่งปลาตาหวานที่มีค่าระดับการย่อยสลายร้อยละ 5-25 มีความสามารถในการต้านอนุมูลของ ABTS และ DPPH อยู่ในช่วงประมาณ 1,700-2,200 และ 10-14 ไมโครโมล TE/มิลลิกรัมโปรตีน โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Khantaphant และ Benjakul (2008) ที่พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทจากการย่อยหนังปลากระพงข้างเหลืองด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจากไส้ติ่งของปลากระพงข้างเหลือง (*Lutjanus vitta*) ปลาตาหวานหนังหนา

(*Priacanthus tayenus*) และปลาทรายแดง (*Nemipterus bleekeri*) ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 มีค่าความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH 7.1, 5.9, 6.1 ไมโครโมล TE/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ค่าความสามารถในการต้านอนุมูล ABTS เป็น 1606, 1522, 1595 ไมโครโมล TE/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับและค่าความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริก (ferric reducing antioxidant power: FRAP) เป็น 2.32, 2.10, 2.22 ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ได้จากการทดลองจะมีค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างจากเจลาตินไฮโดรไลเสทจากการศึกษาอื่น ๆ อาจเป็นผลมาจากการใช้สภาวะในการสกัดเจลาตินที่แตกต่างกันก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ โดยการใช้อุณหภูมิที่สูงมากในการสกัดทำให้โมเลกุลของเจลาตินถูกย่อยสลาย (Karim and Bhat, 2009) รวมถึงการย่อยด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันทำให้เจลาตินไฮโดรไลเสทที่ได้มีลำดับของกรดอะมิโนและความยาวของสายโซ่เปปไทด์ที่แตกต่างกันส่งผลให้มีกิจกรรมดังกล่าวแตกต่างกัน โดยกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทจะขึ้นอยู่กับลำดับและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ (Chen *et al.*, 1998; Thainsilakul *et al.*, 2007) เปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันมักประกอบด้วยหมู่อะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเช่นวาเลอีนและลิวซีนที่ปลาย N (N-terminal end) และมีโพรลีน ฮิสทีดีนหรือไทโรซีนภายในสาย (Chen *et al.*, 1996) กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำภายในสายของเปปไทด์จากเจลาตินจะมีผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันเป็นอย่างมากเมื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ชนิดอื่น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนดังกล่าวจะทำให้เปปไทด์สามารถละลายในไขมันได้ดีขึ้น (Mendis *et al.*, 2005) รวมทั้งสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ด้วยทำให้โปรตอกรับอนุมูลเพอรอกซิลที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic peroxy radical) และการจับกับไอออนของโลหะ (Megias *et al.*, 2007)

นอกจากนี้ในการทดลองพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากหนังปลาตาหวาน พันธุ์หนังหนา มีค่าความสามารถในการจับโลหะ (metal chelating) เท่ากับ 0.44 ± 0.04 มิลลิกรัม EDTA eq/มิลลิกรัมโปรตีนและ FRAP ไม่สามารถวัดค่าได้ ทั้งนี้ค่าความสามารถในการจับโลหะ แสดงถึงความสามารถในการจับโปรออกซิเดนต์ทำให้ลดออกซิเดชันของไขมัน โลหะทรานซิชัน ได้แก่ เหล็ก ทองแดง โคบอลต์ในอาหารมีผลต่ออัตราการเกิดออกไซด์ออกซิเดชันและทำให้เกิดการแตกตัวของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารประกอบที่ระเหยได้ โดยไอออนของโลหะทรานซิชันจะไปเร่งการเปลี่ยนแปลงสถานะของออกซิเจน รวมทั้งทำปฏิกิริยากับเปอร์ออกไซด์อย่างรวดเร็ว (Klompong *et al.*, 2007; Giménez *et al.*, 2009) หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และหมู่อะมิโน (amino group) ที่โซ่ข้าง (side chain) ของกรดอะมิโนที่เป็นกรด (acidic: Glx, Asx) และด่าง (basic: Lys, His, Arg) มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการจับโลหะ (Saiga *et al.*, 2003)

โดยเฉพาะฮิสทีดีน (His) (Chen *et al.*, 1998) เมื่อพิจารณาชนิดและจำนวนของกรดอะมิโนในเจลาตินจากหนังปลาตาหวานหนังหนา (ตารางที่ 2) จะเห็นว่ามี Glx, Asx, Lys, Arg และ His ต่ำ (ประมาณ 230 เรซิดิวซ์/1000 เรซิดิวซ์) เช่นเดียวกับเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาไหลและหนังหมึกในการวิจัยของ Giménez และคณะ (2009) (225 และ 196 เรซิดิวซ์/1000 เรซิดิวซ์ตามลำดับ) ส่งผลให้ค่าความสามารถในการจับโลหะต่ำ ค่า FRAP เป็นค่าที่แสดงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดเป็นสารที่มีความคงตัวมากขึ้น (Wang *et al.*, 2008) โดยจากการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลสที่มีค่า FRAP ต่ำมากจนไม่สามารถวัดค่าได้ ทั้งนี้ Alemán และคณะ (2011b) พบว่าค่า FRAP เจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาทูน่า, หนังปลาฮาไลบัท (halibut) และหนังของหมึกบินยักษ์ (jumbo flying squid) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส คอลลาจีเนส ทริปซินและเปปซินมีความสัมพันธ์อย่างมากกับจำนวนกรดอะมิโนไฮดรอกซีไลซีน (Hly) และระดับการเกิดไฮดรอกซีเลชันของ Lys Arg Tyr Asp Thr Leu และ Ile แต่จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าเจลาตินจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนามีปริมาณ Hyl เพียง 10 เรซิดิวซ์/1000 เรซิดิวซ์ ซึ่งอาจส่งผลให้มีค่า FRAP ต่ำ นอกจากนี้ Alemán และคณะ (2011b) ยังพบว่าเจลาตินไฮโดรไลสจะมีค่าการต้านอนุมูล ABTS และการรีดิวซ์ไอออน Fe^{3+} เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นและชนิดของเอนไซม์จะมีผลต่อคุณสมบัติของเจลาตินไฮโดรไลส

Table 14. Proximate analysis and antioxidant properties of gelatin hydrolysate

Chemical composition and properties	
Ash	8.54±0.13 % wet basis
Moisture	6.65±0.08 % wet basis
Protein*	83.14±0.54 % wet basis
Fat	0.04±0.03 % wet basis
Solubility	> 95 % at pH 1-10
ATBS radical scavenging activity	482.69±3.01 μ mol TE/g protein
DPPH radical scavenging activity	4.92±0.08 μ mol TE/g protein
FRAP	-
Metal chelating	0.44±0.04 mg EDTA eq/mg protein
Degree of hydrolysis	31.33±2.25 %

Means \pm SD from triplicate determinations (n=3).

*Conversion factor = 5.4.

7.3 ความสามารถในการละลาย

เจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังกาที่ข่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 90 นาทีและนำมาข่อยต่อด้วยเอนไซม์นิวเทรสเป็นเวลา 30 นาที มีความสามารถในการละลายที่ดีในช่วงพีเอชกว้าง (1-10) โดยเจลาตินไฮโดรไลสดังกล่าวมีความสามารถในการละลายอยู่ในช่วงร้อยละ 95.52 – 99.64 เมื่อเปรียบเทียบกับเจลาตินซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีค่าการละลายเป็น ร้อยละ 87.37-94.28 ในช่วงพีเอชเดียวกันจะพบว่าค่าความสามารถในการละลายเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากการที่โปรตีนมีโมเลกุลขนาดเล็กโดยรวมทั้งมีหน่วยโพลิเปปไทด์ที่ละลายได้ (solvated polypeptide unit) และมีหมู่ที่ชอบน้ำ (hydrophilic) มากขึ้น ทำให้สามารถละลายได้มากขึ้น (Adler-Nissen, 1986; Shahidi, 1994) เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Thainsilakul (2006) ที่พบว่าเจลาตินจากกล้ามเนื้อปลาทุแวกมีความสามารถในการละลายสูงถึง ร้อยละ 99 ในทุกพีเอชที่ทำการทดลอง (1-10)

7.4 ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม

ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมของเจลาตินไฮโดรไลสในภาพที่ 11 โดยในการทดลองพบว่าตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลส ร้อยละ 0.1 ไม่เกิดโฟมหลังการโฮโมจีไนซ์ สำหรับความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 3 พบว่าความสามารถในการเกิดโฟมจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสสูงขึ้น ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับเจลาติน (ภาพที่ 6) นอกจากนี้เจลาตินไฮโดรไลสยังมีค่าความสามารถในการเกิดโฟมสูงกว่าเจลาตินประมาณ 4 เท่า ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เจลาตินไฮโดรไลสมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าและมีโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนน้อยกว่า (Jeon *et al.*, 1999) โดยในการทดลองค่าระดับการย่อยสลายของเจลาตินไฮโดรไลสมีค่าเป็นร้อยละ 21.49 ± 2.25 ของเจลาตินที่เป็นวัตถุดิบ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลสจะขึ้นอยู่กับขนาดโมเลกุล (Adler-Nissen, 1986) และความชอบน้ำเป็นหลัก (Turgeon *et al.*, 1992) โปรตีนปลาไฮโดรไลส มักจะมีความสามารถในการละลายที่ดีกว่าโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ส่งผลให้ความสามารถในการเกิดโฟม การอุ้มน้ำ การดูดซับไขมันและความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนเริ่มต้น (Sathivel *et al.*, 2003; Gbogouri *et al.*, 2004) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองในโปรตีนไฮโดรไลสจากกล้ามเนื้อปลาทุแวก (*Decapterus maruadsi*) ของ Thainsilakul และคณะ (2007) ที่ระบุว่าความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าความสามารถในการเกิดโฟมเพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามการที่ระดับการย่อยสลายสูงขึ้นอาจมีผลลดความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากเปปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมากไม่มีความแข็งแรงเพียงพอต่อการคงตัวของโฟม (Shahidi *et al.*, 1995) ซึ่งสังเกตได้ว่าโฟมที่

ได้จากการวิจัยนี้ไม่มีความคงตัว เนื่องจากลักษณะโฟมจะเปลี่ยนจากฟองอากาศขนาดเล็กเป็นฟองอากาศที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทั้งนี้ Halling (1989) ได้กล่าวว่าสำหรับการเกิดโฟมที่ตินั้นโปรตีนจะต้องสามารถแพร่ไปยังรอยต่อระหว่างน้ำและอากาศได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งเกิดการคลายตัวและจัดเรียงตัวของโปรตีนที่บริเวณรอยต่อนั้น ซึ่งความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนสามารถปรับปรุงได้โดยการเพิ่มความยืดหยุ่น ปลดปล่อยส่วนที่ไม่ชอบน้ำออกมาและเพิ่มความสามารถในการลดแรงตึงผิวให้มากขึ้น ส่วนความคงตัวของโฟมนั้นจะขึ้นอยู่กับฟิล์มและแรงกระทำระหว่างโมเลกุลของโปรตีนที่อยู่ในเมทริกซ์ (Mutilangi *et al.*, 1996)

7.5 ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชัน

จากค่า Emulsifying activity index (EAI) ของตัวอย่างเจลาตินในตารางที่ 15 แสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มสูงขึ้นความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์จะลดลงเช่นเดียวกับตัวอย่างเจลาตินซึ่งเป็นวัตถุคิบั และเมื่อเปรียบเทียบค่ากันแล้วจะพบว่าเจลาตินไฮโดรไลสจะมีค่า EAI ที่ต่ำกว่าเจลาตินที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันและให้อิมัลชันที่ไม่มีความคงตัว (ตารางที่ 11) ทั้งนี้เป็นผลมาจากเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงหรือมีความไม่ชอบน้ำมากจะทำให้ให้อิมัลชันมีความคงตัวสูง โดยการย่อยจะทำให้เปปไทด์สูญเสียสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ไป (Quaglia and Orban, 1990; Mahmoud *et al.*, 1992; Mutilangi *et al.*, 1996; Kristinsson and Rasco, 2000; Gbogouri *et al.*, 2004) ถึงแม้ว่าไฮโดรไลสที่มีระดับการย่อยสลายสูงจะสามารถแพร่ไปยังรอยต่อ (interface) ระหว่างไขมันและน้ำได้เร็วแต่จะมีค่า EAI และ ESI ต่ำ เนื่องจากเปปไทด์ขนาดเล็กที่ถูกดูดซับบริเวณรอยต่อจะไม่มีประสิทธิภาพมากพอในการลดแรงตึงผิว รวมถึงไม่สามารถคลายตัวและจัดเรียงตัวที่บริเวณรอยต่อเพื่อรักษาความคงตัวของอิมัลชันได้เหมือนเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Rahali *et al.*, 2000; Gbogouri *et al.*, 2004) ทั้งนี้จากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อไฮโดรไลสมีความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีค่า EAI ลดลง ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับค่า EAI ของเจลาติน (ตารางที่ 10) และสอดคล้องกับการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลสจากกล้ามเนื้อปลาทูแอก (*Decapterus maruadsi*) (Thainsilakul *et al.*, 2007) และจากกล้ามเนื้อปลาข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) (Klompong *et al.*, 2007) โดยอาจเกิดจากที่ระดับความเข้มข้นสูงโปรตีนในเจลาตินไฮโดรไลสจะรวมตัวกันเอง และกระจายตัวไปยังผิวหน้าของเม็ดไขมันได้น้อยกว่า ทำให้ค่าความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ลดลง (Thainsilakul *et al.*, 2007) ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น

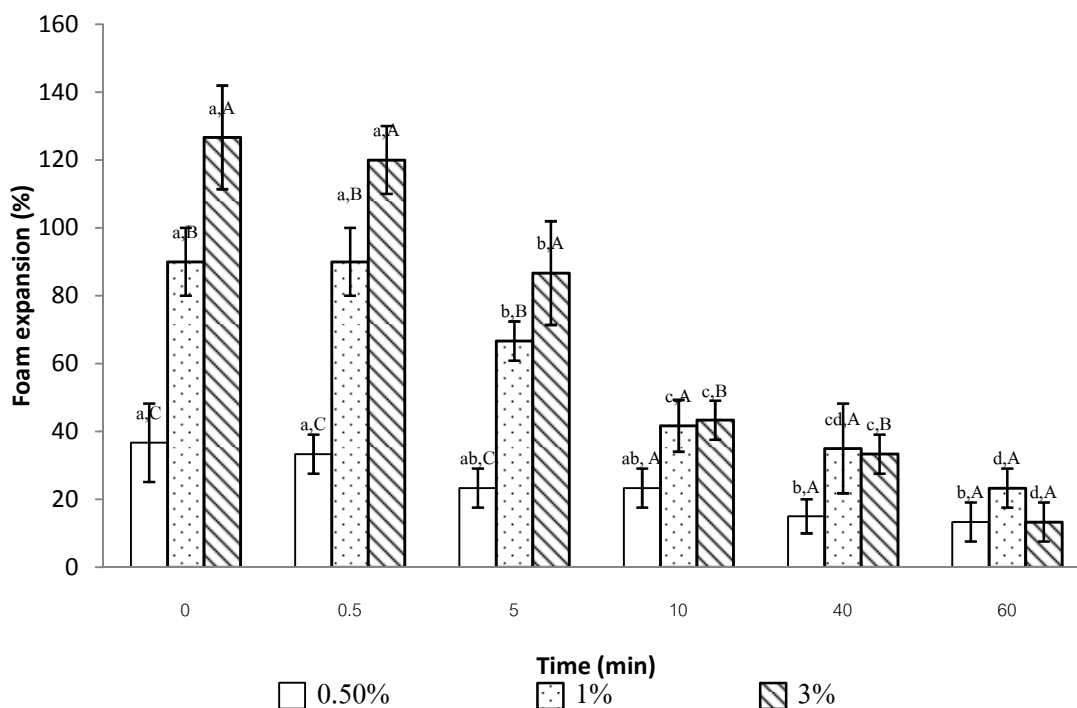


Figure 11 Foaming properties of gelatin hydrolysate from bigeye snapper skin. Bars represent the standard deviation from triplications. Different lowercase letters under the same concentration indicate significant differences ($p < 0.05$) and different uppercase letters under the same time indicate significant differences ($p < 0.05$).

Table 15. Emulsifying properties of gelatin hydrolysate from bigeye snapper skin extracted at 120°C for 30 min at various concentrations

Gelatin hydrolysate concentrations (%)	Emulsifying activity index (m^2/g)	Emulsion stability index (min)
0.1	72.73 ± 6.61^a	0
0.5	6.30 ± 0.46^b	0
1.0	2.63 ± 0.83^b	0
3.0	2.54 ± 0.37^b	0

Means \pm SD from triplicate determinations ($n=3$).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences ($p < 0.05$).

8. การวิเคราะห์ชนิดของสารที่ระเหยได้ของตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสท

จากการวิเคราะห์สารประกอบที่ระเหยได้ด้วย gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) ในตัวอย่างก๊าซที่เก็บจากช่องว่างเหนือของเหลว (headspace) ของเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการล้างพบว่าประกอบด้วยสารประกอบที่ระเหยได้ 7 กลุ่ม ได้แก่ สารประกอบเอมีน 1 ชนิด, แอลกอฮอล์ 5 ชนิด, สารประกอบซัลเฟอร์ 2 ชนิด, คีโตน 7 ชนิด, กรด 3 ชนิด, อัลดีไฮด์ 3 ชนิดและสารประกอบอื่น ๆ (Miscellaneous compounds) อีก 8 ชนิด (ดังแสดงในตารางที่ 16) โดยเมื่อพิจารณาจากร้อยละของพื้นที่ใต้กราฟ (% peak area) ซึ่งแสดงถึงปริมาณของสารประกอบในก๊าซตัวอย่างพบว่า สารประกอบที่มีปริมาณมากที่สุด ได้แก่ สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ, คีโตนและแอลกอฮอล์ตามลำดับ โดยสารประกอบซัลเฟอร์ ได้แก่ Dimethyl disulfide และ Dimethyl trisulfide ซึ่งมีปริมาณมากในตัวอย่างและมีค่า Threshold ต่ำ (0.16-12 และ 0.005-0.01 ppb ตามลำดับ; Leffingwell and Leffingwell, 1991) จะให้กลิ่นซัลเฟอร์ กลิ่นคาวปลาหรือกลิ่นคล้ายกะหล่ำปลี (Guen *et al.*, 2000; Senger-Emonnot *et al.*, 2006) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานของ Guen และคณะ (2000) ที่รายงานว่าสารประกอบระเหยได้ในหอยแมลงภู่ส่วนใหญ่เป็นสารประกอบซัลเฟอร์และ Dimethyl disulfide และ Dimethyl trisulfide มีบทบาทสำคัญต่อกลิ่นโดยรวมของอาหารเนื่องจากมีระดับความเข้มข้นในการรับรู้ต่ำ โดยสารประกอบสองชนิดนี้เกิดจากการให้ความร้อนแก่กรดอะมิโน (Guen *et al.*, 2000) ส่วนสารประกอบกลุ่มคีโตน ได้แก่ 2-Butanone, 3-Methyl-2-pentanone, 2-Heptanone, 2-Nonanone (ค่า threshold เท่ากับ 50000, 70000, 140-3000, 5-200 ppb ตามลำดับ; Leffingwell and Leffingwell, 1991) และกลุ่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ Cyclobutanol, 3-methyl butanol, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol, 2 (ค่า threshold เท่ากับ 500, 250-300, 90 ppb ตามลำดับ) สารเหล่านี้มีค่า threshold สูงทำให้มีผลต่อกลิ่นโดยรวมของตัวอย่างน้อย ยกเว้น 2-Undecanone และ 1-Heptanol มีค่า threshold เท่ากับ 7 และ 9 ppb (Leffingwell and Leffingwell, 1991) และมีปริมาณค่อนข้างสูงจะให้กลิ่น fresh/green และกลิ่นคล้ายยา (Guen *et al.*, 2000)

ส่วนตัวอย่างก๊าซที่เก็บจากช่องว่างเหนือของเหลวของเจลาตินไฮโดรไลเสทพบว่าประกอบด้วยสารประกอบที่ระเหยได้ 9 กลุ่ม ได้แก่ สารประกอบเอมีนและอนุพันธ์ 9 ชนิด, แอลกอฮอล์ 1 ชนิด, สารประกอบที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 1 ชนิด, คีโตน 14 ชนิด, กรด 3 ชนิด, อัลดีไฮด์ 1 ชนิด, ไพราซีน 7 ชนิด, ฟูราน 1 ชนิดและสารประกอบอื่น ๆ (Miscellaneous compounds) อีก 6 ชนิด ดังตารางที่ 13 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาชุดควบคุมจะพบว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทมีสารประกอบที่มีซัลเฟอร์ลดลง

มาก โดยพื้นที่ใต้กราฟของ Dimethyl disulfide ลดลงจากร้อยละ 19.46 เหลือร้อยละ 0.67 และไม่พบ Dimethyl trisulfide แต่มีสารประกอบไพราซีนและฟูรานซึ่งไม่ปรากฏในเจลาตินดังกล่าว รวมทั้งสารประกอบเอมีนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น โดยสารประกอบเอมีนจะให้กลิ่นคล้ายเนื้อและไพราซีนซึ่งให้กลิ่นไหม้ กลิ่นถั่วหรือกลิ่นดิน (Guen *et al.*, 2000; Senger-Emonnot *et al.*, 2006; Shimoda *et al.*, 1996) ผลการวิเคราะห์ดังกล่าวสอดคล้องกับการทดสอบทางประสาทสัมผัสในข้อ 6 ที่ผู้ทดสอบซึ่งได้รับการฝึกฝนจำนวน 10 คนมีมติว่ากลิ่นของตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลเสทแตกต่างจาก ‘กลิ่นคาว’ ในเจลาติน โดยให้นิยามกลิ่นนี้ว่าเป็น ‘กลิ่นไม่พึงประสงค์’ ซึ่งกลุ่มผู้ทดสอบมีความเห็นว่ากลิ่นดังกล่าวเป็นกลิ่นของเอนไซม์นิวเทรสที่ใช้ในขั้นตอนการย่อยเจลาติน นอกจากเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างแล้วสารประกอบเอมีนและไพราซีนยังอาจเกิดจากสภาวะที่ใช้ในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสท โดยสารประกอบเอมีนในปลาเกิดจากการย่อยสลายของโปรตีนโดยเอนไซม์หรือการย่อยสลายด้วยตัวเองซึ่งส่งผลต่อการเกิดกลิ่นคาว ซึ่งการวัดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้สามารถใช้วัดความสดรวมถึงติดตามการเน่าเสียของปลาได้ (Ranau and Steinhart, 2005) ส่วนสารประกอบไพราซีนเกิดจากปฏิกิริยามอลดาร์ดในขั้นตอนของการให้ความร้อนแก่กรดอะมิโน (Shimoda *et al.*, 1996) จะเห็นได้ว่าการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสทมีการย่อยตัวอย่างเจลาตินด้วยเอนไซม์รวมถึงการให้ความร้อนในขณะย่อย การหยุดการทำงานของเอนไซม์และการทำแห้งซึ่งอาจเป็นสาเหตุของการเกิดสารประกอบดังกล่าว

Table 16. Volatile compounds in gelatin (G) and gelatin hydrolysate (GH)

Compound	Flavour attribute	Area Normalized (%)	
		G	GH
Amines and derivatives			
N-(2-aminoethyl)-1,2-ethanediamine		2.95	-
2,5-Dimethoxy-4-bromoamphetamine		-	4.15
4-Benzyloxyamphetamine		-	4.30
2-Pentanamine		-	3.41
5-Methyl-2-phenylindole		-	1.16
p-Hydroxynorephedrine		-	2.42
N-(Methylthio)carbonyl-oxamide		-	2.92
N-Acetyl-3,4,5-trimethoxy-phenylpropylamine		-	0.57

Table 16. (continued)

Compound	Flavour attribute	Area Normalized (%)	
		G	GH
Alcohols			
Cyclobutanol	ammonia-like	5.39	3.68
3-methyl butanol	whiskey, malt, burnt	2.65	-
1-Heptanol	herb, mushroom, chemical, green	1.30	-
2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-phenol	medicinal	2.27	-
2,4-Di-tert-butylphenol		1.19	-
S-containing compounds			
Dimethyl disulfide	sulfury, rubber, onion, cabbage, putrid	19.46	0.67
Dimethyl trisulfide	sulfur, fish, cabbage, green, marine	2.94	-
Ketones			
5-Nitro-3-nitrylpyridone		5.88	-
2-Butanone	cheese, butter	3.41	-
3-methyl-2-pentanone	sulfury, black currant	2.28	3.48
1-(2-Furanyl)-ethanone	sweet, almondy and nutty	0.57	-
2-Heptanone	sweet	0.88	3.34
2-Nonanone	fresh, sweet	1.05	3.70
2-Undecanone	orange, fresh, green	6.44	1.62
3,5-Bis-trimethylsilyl-2,4,6-cycloheptatrien-1-one		-	7.64
4-Methyl-2-pentanone	sulfury, black currant	-	1.35
4-Methyl-3-hexanone	fresh	-	2.85
6-Methyl-2-heptanone	sweet	-	0.45
5-Methyl-2-heptanone	sweet	-	2.29
2-Octanone	herb, butter, resin	-	0.86
1-[2'-Ethenyl-1'-cyclohexenyl]propanone		-	1.22

Table 16. (continued)

Compound	Flavour attribute	Area Normalized (%)	
		G	GH
2-Decanone		-	2.21
2-Dodecanone	fruity, citrus, floral	-	0.55
2-Tridecanone	fatty, earthy	-	0.80
Acids			
Ethanethioic acid	pungent	2.36	-
Benzeneacetic acid		2.01	-
Propanoic acid	pungent, rancid, soy	1.03	-
Benzoic acid		-	1.45
Acetic acid	sour	-	0.59
Butanoic acid	cheesy	-	1.99
Aldehydes			
3-methyl-butanal	cocoa, almond, malt	1.45	-
2,4-Hexadienal	green, vegetable	0.96	-
Benzaldehyde	almond, burnt sugar	1.21	0.79
Miscellaneous compounds			
Hexane	alkane	11.44	-
2-methoxyethyl-N-N-dimethyl- formamidine	musty	3.00	-
Chloroform	chloroform-like	2.74	1.89
4-(4-Chlorophenyl)-2,6- diphenylpyridine		1.31	-
7-Chloro-4-hydroxy-3-methylquinoline	odorous compounds in bottom ash	1.29	-
1-Nonene	green, fatty	3.57	-
Heptane	alkane	7.51	-
Methoxy-phenyl-oxime	fishy	2.63	6.88
4-Ethyl-2,5,6-Trimethylpyrimidine		-	0.59
Pentadecane	alkane	-	1.75

Table 16. (continued)

Compound	Flavour attribute	Area Normalized (%)	
		G	GH
4-(4'-Methoxyphenyl)-2,2,4-trimethyl-tetrahydrobenzopyran		-	0.65
2-Methoxy-3,8-dioxocephalotax-1-ene		-	0.24
Pyrazines			
2,5-Dimethylpyrazine	popcorn, roasted, roasted nut	-	5.52
2,6-Dimethylpyrazine	popcorn, roasted, burnt, earthy	-	2.02
2,3,5-Trimethyl pyrazine	baked, roasted, burnt, earthy	-	2.66
2,5-Dimethyl-3-ethylpyrazine	roasted, earthy	-	11.67
2-Ethyl-3,5-dimethyl-pyrazine	roasted	-	3.28
2,5-Dimethyl-3-butylpyrazine		-	0.95
2-Butyl-3,5-dimethylpyrazine		-	0.50
Furans			
2,5-Diethylfuran		-	0.26

9. การสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท จากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

จากการสำรวจความต้องการของผู้บริโภคต่อการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท ด้วยการสัมภาษณ์ความต้องการของผู้บริโภคเพศหญิง อายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 200 คน โดยใช้แบบสอบถามให้ผลการสำรวจดังนี้

9.1 ข้อมูลทางประชากรศาสตร์

ลักษณะทางประชากรศาสตร์ของผู้ตอบแบบสำรวจเป็นเพศหญิงซึ่งอยู่ในช่วงอายุ 18-25 ปี ร้อยละ 27.2, 21-34 ปี ร้อยละ 16.6, 35-44 ปี ร้อยละ 14.7, 45-59 ปี ร้อยละ 20.3 และ 60 ปีขึ้นไป ร้อยละ 21.2 โดยส่วนใหญ่นับถือศาสนาพุทธ ร้อยละ 83.4 รองลงมาเป็นศาสนาอิสลาม ร้อยละ 11.5 ประชากรส่วนใหญ่มีการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรี (ร้อยละ 56.7) โดยเป็นนักเรียน/นักศึกษา ร้อยละ 30.4 และข้าราชการ/รัฐวิสาหกิจ ร้อยละ 30.0 มีรายได้ของครอบครัวต่อเดือนอยู่ในช่วง 10,000-30,000 บาท ร้อยละ 45.6 โดยมีค่าอยู่กันเป็นครอบครัวขนาดใหญ่มีสมาชิกมากกว่า 4 คน ถึง ร้อยละ 65.4 ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 17

Table 17. Demographic and socioeconomic characteristic of respondents (n=200)

Demographic	% Respondent frequency
Religion	
Buddhism	83.4
Christianity	3.7
Islam	11.5
Age	
18-25 years old	27.2
21-34 years old	16.6
35-44 years old	14.7
45-59 years old	20.3
Over 60 years old	21.2
Education	
Lower than primary school	2.3
Primary school	12.0
Vocational / high school	11.5
Diploma	1.8
Bachelor degree	56.7
Higher than Bachelor degree	15.2
Career	
Student	30.4
Government service	30.0
Company employee	3.7
Housewife	14.3
Business owner	9.7
Labor	4.6
Pensioners	6.9

Table 17. (continued)

Demographic	% Respondent frequency
Income	
<10,000 bahts	13.8
10,000-30,000 bahts	45.6
30,001-50,000 bahts	23.0
> 50,000 bahts	16.6
Family members	
1 person	6.0
2 persons	10.1
3 persons	18.0
4 persons and over	65.4

9.2 ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภค

จากการสำรวจพฤติกรรมการบริโภคอาหารสุขภาพได้ผลดังแสดงในตารางที่ 18 พบว่าผู้ตอบแบบสำรวจส่วนใหญ่จะรู้จักผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (ร้อยละ 92.2) และมีความถี่ในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากกว่า 3-7 ครั้งต่อสัปดาห์ร้อยละ 28.1 1-2 ครั้ง/สัปดาห์ ร้อยละ 27.6 และน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือนร้อยละ 20.3 จะเห็นได้ว่าถึงแม้ผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่จะตอบว่ารู้จักอาหารเพื่อสุขภาพ แต่เมื่อพิจารณาความถี่ในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพกลับพบว่าจำนวนผู้ตอบแบบสอบถามที่บริโภคอาหารเพื่อสุขภาพอย่างสม่ำเสมอมีจำนวนไม่ถึงร้อยละ 30 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของธนาคารกสิกรไทย (2555) ที่รายงานว่าตลาดอาหารสุขภาพเป็นเรื่องใหม่ของผู้บริโภคส่วนใหญ่และผู้บริโภคส่วนมากมีพฤติกรรมการบริโภคที่เน้นรสชาติมากกว่าประเด็นสุขภาพ แต่อย่างไรก็ตามตลาดอาหารเพื่อสุขภาพในประเทศมีแนวโน้มการขยายตัวขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยกลุ่มผู้บริโภคหลักส่วนมากเป็นผู้หญิงวัยทำงาน อายุระหว่าง 25-40 ปี

Table 18. Functional food consuming behavior of respondents

Questions	% Respondent frequency
Have you known about functional food?	
Yes	92.2
No	3.2
Not sure	4.6
How often do you consume functional food?	
More than 3 – 7 times/ week	28.1
1 – 2 times/ week	27.6
1 – 3 times/ month	17.1
Less than 1 time/ month	26.3
What type of functional food do you normally consume?	
Drinking fruit extract	46.5
Yoghurt	68.2
Chicken essence	23.0
Milk products	41.9
Instant drinking powder	28.1
Cereals drinks	52.5
Bird nest	20.3
Breakfast cereal	18.9
Vitamin/fiber fortified fruit juice	25.3
Drinking collagen	3.7
Whole wheat bread	34.1
Others	3.2

Table 18. (continued)

Questions	% Respondent frequency
What is the reason of consuming functional food ?	
Preventing disease / For health	85.7
Treating the disease	22.6
Beauty	19.8
Anti-aging	19.8
Good taste	37.3
Others	3.2
What is an important factor of functional food purchasing?	
Advertising media	60.4
Friend suggestion	39.6
Family influence	23.0
Book/ academic information	34.1
Good taste/ interesting products	39.2
Good for health	52.5
Promotion	12.0
Internet	8.8
Other	2.3
What is the reason of stop consuming the functional food that you have been eating ?	
Trying new product	9.2
Getting bored	6.0
Not feel better after consuming	8.8
Not good taste	2.8
Not worth compared with product value	8.8
Others	1.4

เมื่อสอบถามถึงอาหารเพื่อสุขภาพที่นิยมรับประทานคำตอบสามอันดับแรกได้แก่ โยเกิร์ต (ร้อยละ 68.2), น้ำธัญพืช (ร้อยละ 52.5) และน้ำผลไม้สกัด (ร้อยละ 46.5) และสาเหตุที่ผู้ตอบแบบสำรวจเลือกรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพเพื่อป้องกันรักษาโรคหรือเพื่อสุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ (ร้อยละ 85.7) ขณะที่การสำรวจของธนาคารกสิกรไทย (2555) พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่คนไทยเลือกซื้อส่วนใหญ่เป็นประเภทเครื่องดื่มเพื่อความสวยงาม เพิ่มประสิทธิภาพระบบย่อยอาหาร บำรุงสมอง และลดความเสี่ยงจากโรคหัวใจ ทั้งนี้เนื่องจากผลการสำรวจของงานวิจัยนี้เป็นกลุ่มผู้บริโภคที่อาศัยในเขตจังหวัดสงขลาเท่านั้นจึงอาจให้ผลแตกต่างจากผลการสำรวจในเขตอื่น ๆ ปัจจัยที่มีผลต่อการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ของผู้ตอบแบบสอบถามมากที่สุดได้แก่โฆษณาตามสื่อต่าง ๆ เช่น วิทยุ, โทรทัศน์หรือสื่ออินเทอร์เน็ต (ร้อยละ 60.4) รองลงมาคือตัวผู้ตอบแบบสอบถามเองรู้สึกว่าคุณภาพที่เหล่านั้นจะส่งผลดีต่อสุขภาพ (ร้อยละ 52.5) นอกจากนี้ในกลุ่มผู้ตอบแบบสำรวจที่เลือกรับประทานอาหารเพื่อสุขภาพบางผลิตภัณฑ์แล้วได้ให้สาเหตุการเลือกรับประทานว่ามีสินค้าใหม่มาทดแทน (ร้อยละ 9.2) รู้สึกว่าคุณภาพที่ไม่ได้ช่วยให้รู้สึกดีขึ้น (ร้อยละ 8.8) หรือรู้สึกว่าไม่คุ้มค่ากับราคาของผลิตภัณฑ์ (ร้อยละ 8.8) อาจเป็นผลมาจากการที่ปัจจุบันตลาดอาหารเพื่อสุขภาพในประเทศไทยมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทำให้มีผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ ๆ ที่น่าสนใจเกิดขึ้นอยู่เสมอผู้บริโภคจึงมีทางเลือกมากขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจยังมีแนวโน้มที่จะทำให้ผู้บริโภคหันมาสนใจอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้นด้วย (สำนักนโยบายอุตสาหกรรมสาขา 2, 2552)

จากการศึกษายังพบว่าช่วงอายุของผู้ตอบแบบสอบถามมีความสัมพันธ์กับความถี่ในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ($p < 0.05$) โดยผู้บริโภคที่มีอายุมากจะมีความถี่ในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพสูงกว่า ซึ่งผู้บริโภคร้อยละ 48.89 ในวัย 60 ขึ้นไป มีความถี่ในการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพมากกว่า 3-7 ครั้ง/สัปดาห์ ในขณะที่ผู้บริโภคในช่วงอายุ 18-25 ปี ร้อยละ 44 มีความถี่ในการบริโภคน้อยกว่า 1 ครั้ง/เดือน แต่ช่วงอายุจะไม่มีผลต่อการเลือกชนิดของอาหารเพื่อสุขภาพที่บริโภค ($p > 0.05$)

9.3 ข้อมูลในการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท

จากการสอบถามข้อมูลความต้องการของผู้บริโภคต่อกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการให้เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา โดยมีกลุ่มผลิตภัณฑ์ให้เลือก 5 กลุ่ม ให้ผลการสำรวจดังแสดงในตารางที่ 19 จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าผู้ทำแบบสำรวจให้ความสนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์กลุ่มน้ำผักและผลไม้มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มผลิตภัณฑ์นมและไอศกรีม ตามลำดับ เนื่องจากผู้บริโภคมีความคุ้นเคยในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยจากการสำรวจผลิตภัณฑ์ที่กล่าวอ้างว่าเติมคอลลาเจนหรือคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่จำหน่ายในเขต

จังหวัดสงขลาพบว่าเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มผลไม้ 9 ชนิด นมและนมถั่วเหลือง 3 ชนิด เครื่องดื่มคอลลลาเจน 3 ชนิด เครื่องดื่มชงร้อน เช่น กาแฟและโกโก้ 5 ชนิด ทั้งนี้จากการศึกษาความสัมพันธ์พบว่าช่วงอายุของผู้บริโภคไม่มีผลต่อการเลือกกลุ่มผลิตภัณฑ์อาหารดังกล่าว ($p>0.05$)

Table 19. Type of food product used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product

Product	% Respondent frequency
Fruit/ vegetable juice	63.1
Herb/ spice beverage	22.1
Instant drinking powder	28.1
Milk powder	46.1
Ice cream	40.1

ข้อมูลสำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์ในกลุ่มต่าง ๆ โดยเลือกเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีผู้สนใจมากที่สุด 5 ลำดับแรก ดังนี้

9.3.1 กลุ่มผลิตภัณฑ์น้ำผัก/ผลไม้

ผลจากแบบสำรวจแสดงให้เห็นว่าจากผู้บริโภคที่ต้องการให้เสริมเจลาตินไฮโดรไลสเสทลงในน้ำผลไม้จำนวน 137 คน ชนิดน้ำผลไม้ที่ต้องการมากที่สุดสามอันดับแรกได้แก่ น้ำส้ม, เบอร์รี่และองุ่น โดยน้ำผักหรือผลไม้ควรมีผัก/ผลไม้ผสมอยู่ 1-2 ชนิดและมีเนื้อผลไม้หรือกากผลไม้ขนาดเล็กผสมอยู่ (ข้อมูลดังตารางที่ 20, 21 และ 22)

Table 20. Fruit/ vegetable juice used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product

Fruit/vegetable	% Respondent frequency *
Orange	39.4
Berry	28.5
Grape	21.9
Pomegranate	13.1
Pineapple	8.8

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing fruit/ vegetable juice (137 respondents).

Table 21. The number of fruit/ vegetable used for developing of gelatin hydrolysate supplemented blend fruit/ vegetable juice

Number of fruit/ vegetable	% Respondent frequency *
1	29.2
2	29.2
3	27.0
4	13.1
Other	1.5

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents who choosing fruit/ vegetable juice (137 respondents).

Table 22. Characteristic of fruit/ vegetable juice supplemented with gelatin hydrolysate

Characteristic	% Respondent frequency *
Clear fruit/ vegetable juice	38
Fruit/ vegetable juice with pulp	62

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing fruit/ vegetable juice (137 respondents).

9.3.2 กลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มสมุนไพร/เครื่องดื่ม

ผู้ตอบแบบสำรวจส่วนใหญ่ (ร้อยละ 47.7 จากผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 49 คน) จะเห็นว่าเครื่องดื่มที่ทำมาจากสมุนไพรและเครื่องดื่มควรทำมาจากสมุนไพร/เครื่องดื่มเพียงชนิดเดียว (ตารางที่ 24) และเครื่องดื่มในกลุ่มดังกล่าวที่ได้รับความสนใจในการนำไปพัฒนามากที่สุดได้แก่ กระจับ, ขิง, ตะไคร้, เก๊กฮวยและบัวบก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 23

Table 23. Herb/ spice beverage used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product

Herb/ spice	% Respondent frequency *
Roselle	36.7
Ginger	24.5
Lemon grass	22.4
Chrysanthemum	22.4
Asiatic pennywort	20.4

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing herb/ spice beverage (49 respondents).

Table 24. The number of herb/ spice used for developing of gelatin hydrolysate supplemented herb/spice or mixed herb/spice beverage

Number of herb/ spice	% Respondent frequency *
1	47.7
2	29.5
3	11.4
4	11.4

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing herb/ spice beverage (49 respondents).

9.3.3 กลุ่มผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มขงร้อน

ผู้ตอบแบบสำรวจที่สนใจผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มขงร้อนมีจำนวน 60 คน โดยผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ที่มีผู้ให้ความสนใจมากที่สุด 4 ลำดับแรก ได้แก่ นมถั่วเหลือง (ร้อยละ 35), กาแฟ (ร้อยละ 30.0), นม (ร้อยละ 21.7) และ เครื่องดื่มมอลต์สกัด (ร้อยละ 21.7) ดังแสดงในตารางที่ 25

Table 25. Instant drinking powder used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product

Drinking powder	% Respondent frequency *
Soy milk	35.0
Coffee	30.0
Milk	21.7
Malt extract	21.7
Green tea	20.0

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing instant drinking powder (60 respondents).

9.3.4 กลุ่มผลิตภัณฑ์นม

ตารางที่ 26 แสดงความถี่ในการเลือกผลิตภัณฑ์นมที่ผู้ตอบแบบสำรวจสนใจให้นำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท (n=98) โดยโยเกิร์ตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมสนใจเป็นอันดับที่ 1 (ร้อยละ 57.1) รองลงมา คือ นมเปรี้ยว (ร้อยละ 53.1) นมพาสเจอร์ไรซ์ (ร้อยละ 32.7) และนมยูเอชที (ร้อยละ 32.7) ตามลำดับ และเมื่อถามถึงรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้ผลิตพบว่าผู้บริโภคให้ความสนใจผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการเติมแต่งกลิ่นรสมากที่สุด (ร้อยละ 52.0) ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 27

Table 26. Milk product used for developing of gelatin hydrolysate supplemented product

Milk product	% Respondent frequency *
Yoghurt	57.1
Drinking yoghurt	53.1
Pasturized milk	32.7
UHT milk	32.7
Coffee creamer	10.2

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing milk product (98 respondents).

Table 27. Flavour of gelatin hydrolysate supplemented milk product

Flavour	% Respondent frequency *
Original	52.0
Chocolate	34.7
Berry	32.7
Vanilla	22.4
Nut/ cereal	16.3

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing milk product (98 respondents).

9.3.5 กลุ่มผลิตภัณฑ์ไอศกรีม

จากจำนวนผู้ทำแบบสอบถามทั้งหมด 200 คน มีผู้ที่สนใจในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ไอศกรีม 89 คน โดยไอศกรีมกะทิเป็นไอศกรีมที่มีคนเลือกมากที่สุด คิดเป็นร้อยละ 34.8 ของผู้ที่เลือกกลุ่มไอศกรีมทั้งหมด ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 28

Table 28. Flavour of gelatin hydrolysate supplemented ice cream

Flavour	% Respondent frequency *
Coconut milk	34.8
Vanilla	33.7
Chocolate	30.3
Cereal	28.1
Tropical fruit	19.1

Note * % respondent frequency was calculated by comparison with the number of respondents choosing icecream (89 respondents).

จากการคัดเลือกผลิตภัณฑ์ที่มีความถี่ในการเลือกของผู้บริโภคสูงสุดทำให้ได้แนวความคิดผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปเสริมเจลาตินไฮโดรไลสเป็นผลิตภัณฑ์ในกลุ่มน้ำผัก/ผลไม้ ซึ่งจำนวนชนิดของผักและผลไม้ที่เป็นส่วนประกอบควรมีเพียง 1-2 ชนิด และผลไม้ที่ได้รับความนิยมมากที่สุดคือส้มและเบอร์รี่ซึ่งมีกากผลไม้ผสมอยู่ จึงนำแนวความคิดนี้ไปใช้ในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมเจลาตินไฮโดรไลสต่อไป

10. การพัฒนาสูตรผลิตภัณฑ์เสริมเจลาคินไฮโดรไลเสท

10.1 การหาสูตรเบื้องต้น

เมื่อนำแนวความคิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากข้อ 9 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ 2 ชนิด คือน้ำส้มและน้ำเบอร์รี่ ดังนั้นจึงหาสัดส่วนของน้ำผลไม้ทั้งสองชนิดที่เหมาะสมโดยวางแผนการทดลองแบบผสม (Mixture design) โดยใช้โปรแกรม Design Expert version 7.0.3 (ผลการวิเคราะห์แสดงในภาคผนวก จ) พบว่าสัดส่วนของน้ำผลไม้ที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อคะแนนความชอบทุกคุณลักษณะ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 29) ดังนั้นจึงไม่สามารถนำโมเดลทางคณิตศาสตร์มาใช้เพื่อทำนายสัดส่วนที่ดีที่สุดได้ โดยจากการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและกายภาพของน้ำผลไม้ทั้ง 5 สูตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 29 จะเห็นว่าตัวอย่างน้ำส้มร้อยละ 100 มีความแตกต่างจากน้ำเบอร์รี่ร้อยละ 100 อย่างชัดเจน ทั้งในด้านสีซึ่งน้ำส้มจะมีค่า b^* และ L^* ที่สูงโดยมีสีส้มอ่อน ในขณะที่น้ำเบอร์รี่มีค่า L^* และ a^* ที่ต่ำกว่า ($p < 0.05$) ซึ่งมีสีม่วงปนแดงที่ค่อนข้างเข้ม และน้ำส้มยังมีค่าความหนืดและค่าความเป็นกรดแสดงรูปของกรดซิตริกที่สูงกว่าน้ำเบอร์รี่อีกด้วย ($p < 0.05$) แต่ความแตกต่างด้านคุณภาพทางกายภาพและทางเคมีดังกล่าวไม่มีผลต่อความชอบของน้ำผลไม้ทุกชุดการทดลองในด้านสี กลิ่นรส รสชาติ ความหนืดและความชอบรวม ($p > 0.05$)

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบโดยรวมจะเห็นว่าตัวอย่างน้ำผลไม้ที่มีสัดส่วนน้ำส้มต่อน้ำเบอร์รี่เป็นร้อยละ 50 ต่อ 50 มีแนวโน้มได้รับคะแนนสูงสุด จึงคัดเลือกสัดส่วนดังกล่าวเพื่อนำไปใช้ศึกษาต่อไป

10.2 การหาพัฒนาสูตรน้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาคินไฮโดรไลเสท

เมื่อนำน้ำส้มผสมเบอร์รี่ในอัตราส่วนร้อยละ 50:50 ที่ได้จากข้อ 10.1 มาเสริมเจลาคินไฮโดรไลเสทที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 1.5 และ 2 พบว่าคะแนนความชอบของผู้บริโภคต่อลักษณะปรากฏ สีและความหนืดของตัวอย่างไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 31 แต่เมื่อพิจารณาคะแนนความชอบในด้านกลิ่นรส รสชาติและความชอบโดยรวมจะพบว่า เมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาคินไฮโดรไลเสทเพิ่มขึ้นคะแนนดังกล่าวจะลดลง ($p < 0.05$) โดยอยู่ในระดับ ‘บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ’ ถึง ‘ไม่ชอบเล็กน้อย’ ทั้งนี้เป็นผลมาจากเจลาคินไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรสมิกกลิ่นไม่พึงประสงค์ (คะแนนจากการทดสอบ multisample difference test 6.58 ± 2.80 , ดังตารางที่ 12) ซึ่งเป็นกลิ่นที่เกิดจากเอนไซม์ นอกจากนี้ปริมาณเกลือในเจลาคินไฮโดรไลเสทที่เกิดจากการใช้ pH-stat เพื่อควบคุมพีเอชของระบบให้คงที่ในขั้นตอนการย่อยเจลาคินดังที่ได้อธิบายไว้ในข้อ 5 ยังส่งผลให้คะแนนความชอบด้านรสชาติของน้ำผลไม้ลดลงอีกด้วย อีกทั้งการเติมเจลาคินไฮโดรไลเสทยังส่งผลต่อสมบัติทาง

เคมีและกายภาพของน้ำผลไม้ได้แก่ ทำให้ค่าพีเอช ความหนืดและค่าสี L^* , a^* , b^* เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างชุดควบคุม ($p < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 32 โดยระดับความแตกต่างจะมากขึ้นตามความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Phanturat (2009) ที่ทดลองใช้เจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังบางที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์จากไส้ติ่งปลาตาหวานพันธุ์หนังบางและเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์นิวเทรส พบว่าการเติมไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปทำให้ค่าพีเอชรวมถึงค่า a^* และ b^* สูงขึ้นด้วย ($p < 0.05$) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของตัวอย่างอาจเกิดจากการเติมเจลาตินไฮโดรไลสซึ่งมีพีเอช 7.45 (ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2) ส่งผลทำให้ค่าพีเอชของน้ำผลไม้สูงขึ้น นอกจากนี้การเติมเจลาตินไฮโดรไลสยังส่งผลให้ความหนืดและปริมาณของแข็งของน้ำผลไม้เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของค่า a^* และ b^* เป็นผลมาจากสีของเจลาตินไฮโดรไลสซึ่งมีสีน้ำตาล (L^* , a^* และ b^* = 67.85 ± 0.06 , 10.28 ± 0.04 และ 30.22 ± 0.07 ตามลำดับ) รวมทั้งอาจเกิดจากการให้ความร้อนน้ำเบอร์รี่เพื่อนำมาละลายเจลาตินไฮโดรไลส ซึ่งการให้ความร้อนทำให้น้ำตาลในน้ำเบอร์รี่เกิดการแตกสลายและเกิดเป็นสารโพลีเมอร์ของอัลดีไฮด์หรือคีโตนซึ่งให้สีที่เข้มขึ้น (Kamuf *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากปฏิกิริยามลลาร์ด ซึ่งจะเกิดขึ้นกับระบบที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ โดยน้ำตาลรีดิวซิง (reducing sugar) เช่น กลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนเกิดเป็นสารประกอบกลูโคส-เอมีน (glucose amine compound) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีสีน้ำตาล ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีความร้อนและไม่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้อง (Plakas *et al.*, 1985)

จากการศึกษานี้จะเห็นว่า การเติมเจลาตินไฮโดรไลสในน้ำส้มผสมเบอร์รี่ที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดคือร้อยละ 1 ยังส่งผลให้ตัวอย่างมีคะแนนในหลายคุณลักษณะอยู่ในระดับไม่เป็นที่ยอมรับ โดยเฉพาะด้านกลิ่นรสซึ่งมีคะแนนอยู่ในระดับไม่ชอบเล็กน้อยถึงบอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ จึงทดลองลดระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสลงเป็นร้อยละ 0.25, 0.5 และ 0.75 ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสในตารางที่ 33 แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างที่มีการเติมเจลาตินไฮโดรไลสร้อยละ 0.25 ได้รับคะแนนความชอบไม่แตกต่างจากตัวอย่างชุดควบคุมในทุกคุณลักษณะ ($p > 0.05$) แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 0.5 และ 0.75 คะแนนความชอบในด้านกลิ่นรส ความหนืด รสชาติและความชอบโดยรวมจะลดลง ($p < 0.05$) (ตารางที่ 33) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Phanturat (2006) ที่รายงานว่า การเติมเจลาตินไฮโดรไลสที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังบางและย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์จากไส้ติ่งปลาตาหวานและเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับเอนไซม์นิวเทรสในระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ไม่ส่งผลต่อคะแนนความชอบด้านสี ความขุ่น กลิ่น กลิ่นรส เนื้อสัมผัสและ

ความชอบโดยรวม โดยเมื่อพิจารณาจากสมบัติทางเคมีและกายภาพของตัวอย่างน้ำส้มผสมเบอร์รี่ ดังแสดงในตารางที่ 34 จะพบว่าการเติมเจลาตินไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0 – 0.75 ไม่มีผลต่อค่า L^* b^* และค่าความหนืด ($p > 0.05$) แต่มีผลต่อค่าพีเอชและค่า a^* แต่จากการทดลองจะเห็นว่าแม้ว่าตัวอย่างที่เติมเจลาตินไฮโดรไลสที่ร้อยละ 0.25 จะมีค่าพีเอชและค่า a^* ที่แตกต่างจากตัวอย่างชุดควบคุม ($p < 0.05$) แต่ความแตกต่างดังกล่าวไม่ส่งผลต่อคะแนนความชอบ ขณะที่เมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นเป็น 0.5 และ 0.75 ผู้บริโภคจึงสามารถรับรู้ถึงความเปลี่ยนแปลงได้และทำให้คะแนนความชอบลดลง ดังนั้นจึงคัดเลือกน้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

เนื่องจากกลิ่นของเอนไซม์และเกลือในเจลาตินไฮโดรไลสส่งผลต่อคะแนนความชอบของผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่ ดังนั้นจึงได้ทดลองนำเจลาตินที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ซึ่งมีกลิ่นไม่พึงประสงค์น้อยกว่า (คะแนนจากการทดสอบ multisample difference test = 3.11 ± 2.11 , ตามตารางที่ 12) มาเติมลงในน้ำผลไม้ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1, 2 และ 3 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าการเติมเจลาตินในปริมาณดังกล่าวไม่มีผลต่อคะแนนความชอบในด้านลักษณะปรากฏ (7.03 ± 0.89 ถึง 7.30 ± 0.65) สี (6.87 ± 0.97 ถึง 7.47 ± 0.78) กลิ่นรส (6.63 ± 1.07 ถึง 6.97 ± 1.07) ความหนืด (7.07 ± 0.87 ถึง 7.27 ± 0.78) รสชาติ (6.73 ± 1.05 ถึง 6.87 ± 1.05) และความชอบโดยรวม (6.67 ± 1.03 ถึง 7.10 ± 0.84) ($p > 0.05$)

Table 29. Acceptance score of fruit juice with various ratios of orange and berry juice

Orange: Berry (%)	Acceptance score					
	Appearance	Colour	Odour	Viscosity	Flavour	Overall
100:0	7.43±1.09 ^a	7.55±0.98 ^a	6.98±1.07 ^a	7.17±0.92 ^a	6.72±1.28 ^a	7.17±0.91 ^a
75:25	7.20±0.92 ^a	7.17±0.91 ^a	7.10±1.09 ^a	7.27±0.74 ^a	6.87±1.17 ^a	7.17±0.95 ^a
50:50	7.32±0.93 ^a	7.13±1.10 ^a	7.20±0.97 ^a	7.32±0.81 ^a	7.23±1.18 ^a	7.28±1.09 ^a
25:75	7.00±1.08 ^a	6.67±1.30 ^a	6.67±1.24 ^a	6.97±0.89 ^a	7.00±1.31 ^a	6.97±1.13 ^a
0:100	7.03±1.16 ^a	7.22±1.22 ^a	7.10±1.39 ^a	7.18±1.19 ^a	7.25±1.27 ^a	7.23±1.24 ^a

Mean ± SD from 30 panelists.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

Table 30. Chemical and physical properties of fruit juice with various ratios of orange and berry juice

Orange: Berry (%)	pH	Solid content (°Brix)	Colour			Viscosity		Acidity (% as citric acid)
			L*	a*	b*	cP	% τ	
100:0	3.47±0.01 ^c	12.0	41.87±0.02 ^a	8.60±0.05 ^c	46.90±0.44 ^a	26.1±1.5 ^a	24.9±0.4 ^a	0.53±0.00 ^a
75:25	3.52±0.01 ^d	12.0	21.46±0.13 ^b	22.34±0.32 ^a	20.94±0.66 ^b	24.2±0.7 ^a	23.8±0.6 ^a	0.47±0.00 ^b
50:50	3.57±0.02 ^c	11.9	12.47±0.04 ^c	20.24±0.28 ^b	11.80±0.69 ^c	16.3±2.5 ^b	16.4±2.6 ^b	0.45±0.01 ^c
25:75	3.67±0.01 ^b	12.0	7.85±0.06 ^d	17.14±0.56 ^c	5.89±0.91 ^d	14.8±1.1 ^b	14.6±0.9 ^b	0.38±0.00 ^d
0:100	3.72±0.01 ^a	11.8	5.35±0.08 ^e	11.72±0.32 ^d	3.34±0.38 ^e	15.4±1.0 ^b	15.6±0.8 ^b	0.32±0.00 ^e

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

Table31. Acceptance score of fruit juice added with 0-2 % gelatin hydrolysate

Gelatin hydrolysate (%)	Acceptance score					
	Appearance	Colour	Odour	Viscosity	Flavour	Overall
0	7.03±0.85 ^a	7.00±0.87 ^a	6.73±0.87 ^a	6.93±0.69 ^a	6.73±0.69 ^a	6.77±0.73 ^a
1	7.17±0.65 ^a	7.00±0.87 ^a	5.27±1.72 ^b	6.77±1.07 ^a	5.33±1.83 ^b	5.43±1.55 ^b
1.5	7.27±0.74 ^a	7.27±0.74 ^a	4.47±1.59 ^c	6.60±1.07 ^a	4.70±1.70 ^c	4.93±1.51 ^b
2	7.07±0.83 ^a	6.97±0.81 ^a	3.97±1.67 ^c	6.53±1.14 ^a	3.73±1.78 ^d	4.20±1.73 ^c

Mean ± SD from 30 panelists.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences ($p < 0.05$).

Table 32. Chemical and physical properties of fruit juice added with 0-2 % gelatin hydrolysate

Gelatin hydrolysate (%)	pH	Solid content (°Brix)	Colour			Viscosity	
			L*	a*	b*	cP	% τ
0	3.72±0.02 ^d	12.5	13.16±0.34 ^b	20.50±0.21 ^c	10.87±0.68 ^c	19.1±1.0 ^b	19.2±1.0 ^b
1	4.08±0.04 ^c	13.5	14.26±0.54 ^b	21.57±0.42 ^{ab}	13.37±0.54 ^b	20.7±0.4 ^a	20.9±0.2 ^a
1.5	4.24±0.01 ^b	14.0	15.34±0.27 ^{ab}	21.31±0.15 ^b	14.60±1.48 ^{ab}	20.5±0.5 ^a	20.6±0.3 ^a
2	4.34±0.01 ^a	14.5	17.06±0.33 ^a	22.09±0.33 ^a	15.68±1.24 ^a	21.2±0.2 ^a	21.3±0.2 ^a

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

Table 33. Acceptance score of fruit juice added with 0-0.75 % gelatin hydrolysate

Gelatin hydrolysate (%)	Acceptance score					
	Appearance	Colour	Odour	Viscosity	Flavour	Overall
0	7.47±0.78 ^a	7.27±1.01 ^a	7.33±0.80 ^a	7.47±0.97 ^{ab}	7.43±0.90 ^a	7.33±0.76 ^a
0.25	7.60±0.77 ^a	7.60±0.77 ^a	6.93±1.39 ^a	7.67±0.84 ^a	7.00±1.39 ^{ab}	7.27±1.08 ^a
0.50	7.47±0.78 ^a	7.47±0.78 ^a	6.33±1.37 ^b	7.37±1.07 ^{ab}	6.60±1.30 ^b	6.60±1.33 ^b
0.75	7.43±0.73 ^a	7.40±0.93 ^a	5.63±7.59 ^c	7.13±0.97 ^c	5.90±1.47 ^c	5.90±1.32 ^c

Mean ± SD from 30 panelists.

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

Table 34. Chemical and physical properties of fruit juice added with 0-0.75 % gelatin hydrolysate

Gelatin hydrolysate (%)	pH	Solid content (°Brix)	Colour			Viscosity	
			L*	a*	b*	cP	% τ
0	3.64±0.01 ^d	12.5	13.48±1.00 ^a	20.71±0.73 ^b	12.57±0.70 ^a	19.4±0.9 ^a	19.5±0.9 ^a
0.25	3.74±0.01 ^c	13.0	13.11±0.88 ^a	21.67±0.13 ^a	10.95±0.82 ^a	19.4±0.9 ^a	19.5±0.9 ^a
0.50	3.85±0.00 ^b	13.2	12.92±0.15 ^a	19.69±0.19 ^c	12.65±0.86 ^a	18.8±2.4 ^a	18.9±2.3 ^a
0.75	3.93±0.00 ^a	13.4	14.58±0.53 ^a	20.90±0.48 ^{ab}	12.38±0.41 ^a	19.6±1.6 ^a	19.7±1.5 ^a

Means ± SD from triplicate determinations (n=3).

Different superscripts in the same column indicate the significant differences (p<0.05).

11. การยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา

เมื่อนำผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่ที่มีการเสริมเจลาตินไฮโดรไลสร้อยละ 0.25 ที่ได้จากการพัฒนาสูตรในข้อที่ 10 มาทดสอบการยอมรับของผู้บริโภคเพศหญิง อายุ 18 ปีขึ้นไป จำนวน 200 คน โดยสอบถามเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภคอาหารเพื่อสุขภาพและน้ำผลไม้ ความชอบที่ผู้บริโภคมีต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสในด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น ความหนืด รสชาติและความชอบรวม นอกจากนี้ยังถามถึงความคาดหวังว่าจะซื้อผลิตภัณฑ์และข้อมูลทั่วไปของผู้บริโภค ข้อมูลที่ได้จากการสำรวจมีผลดังนี้

11.1 ข้อมูลทางประชากรศาสตร์

ลักษณะทางประชากรศาสตร์ของผู้ตอบแบบสำรวจเป็นเพศหญิง ซึ่งอยู่ในช่วงอายุ 18-25 ปี ร้อยละ 32.2, 21-34 ปี ร้อยละ 17.1, 35-44 ปี ร้อยละ 15.6, 45-59 ปี ร้อยละ 18.0 และ 60 ปีขึ้นไป ร้อยละ 17.1 โดยส่วนใหญ่นับถือศาสนาพุทธ ร้อยละ 84.9 รองลงมาเป็นศาสนาอิสลาม ร้อยละ 14.6 ประชากรส่วนใหญ่มีการศึกษาอยู่ในระดับปริญญาตรี (ร้อยละ 58.5) โดยเป็นนักเรียน/นักศึกษา ร้อยละ 34.1 และค้าขาย/ธุรกิจส่วนตัว ร้อยละ 18.0 มีรายได้ของครอบครัวต่อเดือนอยู่ในช่วง 10,000-30,000 บาท ร้อยละ 41.5 โดยมีอยู่กันเป็นครอบครัวขนาดใหญ่ มีสมาชิกมากกว่า 4 คน ถึง ร้อยละ 71.2 ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 34 เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลดังกล่าวกับข้อมูลจากการสำรวจความต้องการของผู้บริโภค (ตารางที่ 17) พบว่าผู้ตอบแบบทดสอบทั้งสองกลุ่มมีลักษณะประชากรศาสตร์ใกล้เคียงกัน ซึ่งในการสำรวจทั้ง 2 ครั้งได้ทำการสำรวจกับผู้บริโภคในเขตจังหวัดสงขลาเช่นเดียวกัน

11.2 ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมการบริโภค

ผลจากการสำรวจดังแสดงในตารางที่ 36 พบว่าผู้ตอบแบบสอบถามมากถึง ร้อยละ 92.2 ให้ความสนใจในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมสูงสุดสามอันดับแรก ได้แก่ น้ำผลไม้สด (ร้อยละ 63.3), ผลิตภัณฑ์นม (ร้อยละ 46.3) และโยเกิร์ต (ร้อยละ 39.5) ซึ่งผลการสำรวจที่ได้สอดคล้องกับผลจากการสำรวจความต้องการของผู้บริโภค (ตารางที่ 17) ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมบริโภคโยเกิร์ต น้ำผลไม้และผลิตภัณฑ์นม (ร้อยละ 68.2, 46.5 และ 41.9 ตามลำดับ) โดยสาเหตุที่ผู้บริโภคเลือกอาหารเสริมสุขภาพส่วนใหญ่เพื่อป้องกันรักษาโรคหรือเพื่อสุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์ (ร้อยละ 75.1) และเลือกตัดสินใจซื้อโดย

ดูจากโฆษณาตามสื่อต่าง ๆ (ร้อยละ 73.4) ยังคงเป็นสาเหตุหลักที่ผู้บริโภคเลือกตอบมากที่สุด เช่นเดียวกัน

กลุ่มผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่มีความถี่ในการบริโภคน้ำผลไม้อยู่ที่ 1-3 ครั้งต่อสัปดาห์ (ร้อยละ 46.4) โดยชนิดของน้ำผลไม้ที่ได้รับความนิยม 3 อันดับแรก ได้แก่ ส้ม, องุ่น และเบอร์รี่ ตามลำดับ และเมื่อถามถึงการบริโภคเครื่องดื่มที่เสริมเจลาตินไฮโดรไลสพบว่า ผู้บริโภค ร้อยละ 55.1 ตอบว่าเคยบริโภคผลิตภัณฑ์ดังกล่าวแล้ว

Table 35. Demographic and socioeconomic characteristic of consumer test for gelatin hydrolysate supplemented blend fruit juice

Demographic	% Consumer frequency
Religion	
Buddhism	84.9
Christianity	0.5
Islam	14.6
Age	
18-25 years old	32.2
21-34 years old	17.1
35-44 years old	15.6
45-59 years old	18.0
Over 60 years old	17.1
Education	
Lower than primary school	4.4
Primary school	14.6
Vocational / high school	9.8
Diploma	2.4
Bachelor degree	58.5
Higher than Bachelor degree	10.2

Table 35. (continued)

Demographic	% Consumer frequency
Career	
Student	34.1
Government service	17.6
Company employee	13.2
Housewife	8.8
Business owner	18.0
Labor	5.4
Pensioners	2.9
Income	
<10,000 bahts	26.4
10,000-30,000 bahts	41.5
30,001-50,000 bahts	17.6
> 50,000 bahts	14.6
Family members	
1 person	2.0
2 persons	9.3
3 persons	17.6
4 persons and over	71.2

Table 36. Functional food consuming behavior of consumers

Question	% Consumer frequency
Do you intend to buy any functional food ?	
Yes	92.2
No	3.2
How often do you consume functional food?*	
More than 3 – 7 times/ week	32.2
1 – 2 times/ week	40.1
1 – 3 times/ month	18.6
Less than 1 time/ month	9.0
What type of functional food do you normally consume? *	
Drinking fruit extracted	63.3
Yoghurt	39.5
Chicken essence	24.9
Milk products	46.3
Instant drinking powder	27.1
Breakfast cereal	19.8
Cereals drinks	38.4
Bird nest	15.3
Brown rice / germinated brown rice	22.6
Vitamin/fiber fortified fruit juice	29.4
Drinking collagen	2.8
Whole wheat bread	27.7
Others	0

Table 36. (continued)

Question	% Consumer frequency
What is the reason of consuming functional food ?*	
Preventing disease / For health	75.1
Treating the disease	37.9
Beauty	39.0
Anti-aging	16.9
Good taste	28.2
Others	0.6
What is an important factor of functional food purchasing?	
Advertising media	73.4
Friend suggestion	36.2
Family influence	27.7
Book/ academic information	33.3
Good taste/ interesting products	39.5
Feel good for health	57.1
Promotion	11.9
Internet	10.2
Other	0.6
How often do you drink fruit/ vegetable juice ?	
Every day	15.0
4-6 times/week	18.4
1-3 times/week	46.4
1-3 times/month	15.0
Less than once a month	5.3

Table 36. (continous)

Question	% Consumer frequency
What is your favorite fruit/ vegetable juice ?	
Orange	65.2
Grape	37.7
Berry	35.7
Apple	32.9
Lime	25.6
Carrot	25.6
Have you ever drunk any drinks added with collagen/ gelatin hydrolysate ?	
Yes	55.1
No	44.9

Note * The consumer frequency was calculated by comparison of the number of consumers choosing each choice and the number of consumers who interested to buy functional food. (177 respondents).

11.3 คะแนนการยอมรับและความคาดหวังในการซื้อผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท

คะแนนการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่เสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทร้อยละ 0.25 แสดงดังตารางที่ 37 โดยคะแนนความชอบด้านกลิ่น, ความหนืด, รสชาติและความชอบโดยรวมที่ประเมินโดยใช้การทดสอบมาตราความชอบ (Hedonic scale) แบบ 9 คะแนน ได้คะแนนเกิน 7 ทุกคุณลักษณะ เว้นแต่คะแนนลักษณะปรากฏ โดยจากการสอบถามผู้ทดสอบพบว่าผู้บริโภคไม่ชอบลักษณะของเกล็ดคัสที่ลอยอยู่ในตัวอย่าง

หลังจากทดสอบผลิตภัณฑ์แล้ว เมื่อสอบถามถึงความตั้งใจในการซื้อผลิตภัณฑ์พบว่าเมื่อไม่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับการเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทผู้บริโภคให้คะแนนความตั้งใจซื้อเฉลี่ยเท่ากับ 4.16 ± 0.81 โดยตอบว่า ‘อาจจะซื้อ’ ผลิตภัณฑ์ร้อยละ 48.3 และหลังจากให้ข้อมูลเกี่ยวกับการเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทและประโยชน์ที่จะได้รับจากการบริโภคแล้วกลุ่มผู้บริโภคจะให้คะแนนความตั้งใจซื้อสูงขึ้นเป็น 4.37 ± 0.86 ($p < 0.05$) และเลือกตอบว่าจะ ‘ซื้อแน่นอน’ มากขึ้น (ร้อยละ 54.1) ดังแสดงข้อมูลในตารางที่ 38 ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากข้อมูลพฤติกรรมผู้บริโภคของผู้ตอบแบบสอบถามจะพบว่าผู้ตอบแบบสอบถามส่วนใหญ่นิยมบริโภคน้ำผลไม้อยู่แล้ว ทำให้

โอกาสในการตอบว่า ‘ซื้อแน่นอน’ มีค่อนข้างมาก โดยเฉพาะเมื่อมีข้อมูลเกี่ยวกับการเสริมเจลาตินไฮโดรไลสและประโยชน์ที่ได้รับทำให้ผู้บริโภคมีความต้องการซื้อสูงขึ้น นอกจากนี้ในการศึกษาพบว่าอายุ ระดับการศึกษา อาชีพ รายได้และจำนวนสมาชิกในครอบครัวไม่มีผลต่อการตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภคทั้งก่อนและหลังได้รับข้อมูล ($p>0.05$)

Table 37. Acceptance score of gelatin hydrolysate supplement blend fruit juice

Characteristic	Score*
Apperance	6.91±1.17
Odour	7.15±1.30
Viscosity	7.04±1.23
Taste	7.44±1.27
Overall	7.45±1.17

Note * Mean ± SD from 200 respondents.

Table 38. Frequency of consumer purchase intent of gelatin hydrolysate supplement blend fruit juice

Purchase intention	Consumer frequency (%)	
	Before*	After*
Definitely would buy (5)	35.7	54.1
Maybe buy (4)	48.3	33.3
Maybe/ Maybe not buy (3)	12.6	8.2
Maybe not buy (2)	1.4	2.9
Definitely would not buy (1)	1.9	1.4

* Before and after consumers had been informed about product health benefit.

ดังนั้นจะเห็นว่าเจลาตินไฮโดรไลสเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนามีศักยภาพในการเสริมในผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ผสมซึ่งเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โดยอาจมีผลในการเพิ่มสมบัติทางชีวภาพ (bioactive properties) อื่น ๆ นอกเหนือจากการต้านออกซิเดชัน ได้แก่ การต้านความดันโลหิตสูง (Zhao *et al.*, 2007; Alamán *et al.*, 2011a) ช่วยปรับปรุงความหนาแน่นและความแข็งแรงของกระดูก (Nomura *et al.*, 2005) การงอกของเล็บ สภาพผิวและเพิ่มปริมาณไฮดรอกซีโพรลีนในเลือด (Eggerslüss, 1999; Moskowitz, 2000) รวมทั้งลดอาการที่เกี่ยวข้องกับโรคข้อกระดูกอักเสบและข้อเสื่อม (osteoarthritis) (Moskowitz, 2000; Lupien, 2002)

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้อุณหภูมิและเวลาในการสกัดเจลาตินสูงขึ้นทำให้ได้ปริมาณผลผลิตไฮดรอกซีโพรลีนสูงขึ้น โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสนาน 30 นาทีให้ปริมาณผลผลิตสูงสุด แต่เจลาตินที่ได้จะสูญเสียสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความแข็งแรงของเจลลดลง
2. จากการเปรียบเทียบเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนา ทราเยแดงและปากคมพบว่าเจลาตินจากหนังปลาตาหวานให้ปริมาณผลผลิตสูงสุดและเจลาตินที่ได้ยังมีคะแนนการยอมรับด้านกลิ่นสูงสุด
3. การล้างหนังปลาด้วยน้ำ 4 ครั้งก่อนนำไปสกัดเจลาตินสามารถลดกลิ่นคาวในเจลาตินได้ แต่การล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1.0, 1.5 และ 2.0 ไม่สามารถลดกลิ่นคาวในเจลาตินได้ เช่นเดียวกับการใช้ผงถ่านกัมมันต์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.50, 0.75 และ 1.0 ไม่สามารถลดกลิ่นไม่พึงประสงค์ในเจลาตินไฮโดรไลเซตได้
4. การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเซตจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนังหนาโดยการย่อยด้วยเอนไซม์แบบสองขั้นตอนพบว่าการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 เป็นเวลา 90 นาทีในขั้นตอนแรกและย่อยต่อด้วยเอนไซม์นิวเทรสที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0 เป็นเวลา 30 นาทีจะให้เจลาตินไฮโดรไลเซตที่มีระดับการย่อยสลายและค่าความสามารถในการต้านอนุมูลสูงที่สุด
5. แนวความคิดผลิตภัณฑ์สำหรับการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพเสริมเจลาตินไฮโดรไลเซตโดยการสัมภาษณ์กลุ่มผู้บริโภคเป็นผู้หญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปพบว่าน้ำส้มผสมน้ำเบอร์รี่ที่มีเนื้อผลไม้ชิ้นเล็ก ๆ ผสมอยู่เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมที่สุด

6. การเติมเจลาตินไฮโดรไลสที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ในน้ำส้มผสมเบอร์รี่อัตราส่วน 1: 1 ไม่ส่งผลต่อคะแนนความชอบของน้ำส้มผสมเบอร์รี่ในทุกคุณลักษณะ แต่เมื่อระดับความเข้มข้นของเจลาตินไฮโดรไลสเพิ่มขึ้นจะทำให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นรส รสชาติและความชอบรวมลดลง นอกจากนี้การเติมเจลาตินไฮโดรไลสยังส่งผลให้พีเอช ค่าสีและความหนืดของน้ำผลไม้เพิ่มขึ้นด้วย
7. การยอมรับผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เสริมเจลาตินไฮโดรไลสที่ได้รับการพัฒนาของผู้ทดสอบเพศหญิงอายุตั้งแต่ 18 ปีขึ้นไปพบว่าผู้บริโภคมีความชอบผลิตภัณฑ์ด้านลักษณะปรากฏ กลิ่น ความหนืด รสชาติและความชอบรวมในระดับ ‘ชอบปานกลาง’ โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 6.91, 7.15, 7.04, 7.44 และ 7.45 ตามลำดับ มีคะแนนความตั้งใจซื้อเท่ากับ 4.16 โดยผู้บริโภคร้อยละ 35.7 คิดว่า ‘จะซื้อแน่นอน’ และหากมีข้อมูลบ่งชี้เพิ่มเติมให้ผู้บริโภคราบถึงคุณประโยชน์ของเจลาตินไฮโดรไลสที่เสริมในผลิตภัณฑ์พบว่าผู้บริโภคที่ตอบว่า ‘จะซื้อแน่นอน’ จะเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 54.1 โดยมีคะแนนความตั้งใจซื้อเพิ่มขึ้นเป็น 4.37

ข้อเสนอแนะ

1. เจลาตินไฮโดรไลเสทที่ได้จากการทดลองยังมีกลิ่นไม่พึงประสงค์สูง ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการนำไปเสริมในผลิตภัณฑ์ซึ่งเกิดจากเอนไซม์นิวเทรสที่มีกลิ่นเฉพาะตัว ดังนั้นจึงควรศึกษาขั้นตอนกำจัดเอนไซม์นิวเทรสออกจากเจลาตินไฮโดรไลเสทก่อนการนำไปใช้ หรือศึกษาการใช้เอนไซม์ชนิดอื่นที่ไม่มีผลต่อกลิ่นทดแทน จะทำให้สามารถเพิ่มปริมาณการใช้เจลาตินไฮโดรไลเสทในอาหารได้มากยิ่งขึ้น
2. ควรมีการศึกษาขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และลำดับกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อคัดเลือกระดับการย่อยสลายและชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม เพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีสมบัติดังกล่าวสูงสุด
3. ควรมีการศึกษาการนำเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาไปใช้ในกลุ่มของผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพที่มีกลิ่นใกล้เคียงกัน เช่น ชูปไก่สกัด เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- กีฬารีน. 2553. คอลลาเจนสดตากเป่าสี่สุดยอดนวัตกรรมใหม่ของวงการคอลลาเจน(ออนไลน์).
สืบค้นจาก: <http://www.anattara.com/คอลลาเจนสด.html> (30 มีนาคม 2555)
- มัทนา แสงจินดาวงษ์, วันชัย วรวัฒนเมธิกุล, พงษ์เทพ วิไลพันธ์, จุฑา มุกดาสนิท และ วรณวิมล
คล้ายประดิษฐ์. 2552. การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือของปลาซึ่งใช้ในการผลิตซูริมิ
(ออนไลน์). สืบค้นจาก: [http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/06-technology/
manthana/techno_00.html](http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/06-technology/manthana/techno_00.html)
- หนังสือพิมพ์ประชาชาติธุรกิจ สรุปข่าวการตลาด. 2551. สก๊อต รุกหนักเครื่องดื่มสุขภาพปีกง
คอลลาเจนเพิ่มสินค้าใหม่ (ออนไลน์). สืบค้นจาก :
<http://www.ryt9.com/s/psum/462284/> (30 มีนาคม 2555)
- สำนักนโยบายอุตสาหกรรมรายสาขา 2, สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. 2552. รายงานการสำรวจ
และจัดเก็บข้อมูลตลาดอาหารเพื่อสุขภาพกลุ่ม Functional Food ณ ประเทศเกาหลีใต้.
มิถุนายน 2552
- ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานปลัดกระทรวงพาณิชย์. 2554. โครงสร้าง
สินค้าออกของไทย ปี 2535 - 2554(ม.ค. - ธ.ค.) (ออนไลน์). สืบค้นจาก:
http://www.ops3.moc.go.th/infor/Export/stru1/struct_export/report.asp (30 มีนาคม
2555)
- ศูนย์เศรษฐกิจการลงทุนภาคที่ 5, สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมการลงทุน. 2554. สรุปภาวะ
ลงทุนใน 14 จังหวัดภาคใต้ ไตรมาสที่ 1ของปี 2554 และแนวโน้มการลงทุน ไตรมาส
2. ข่าวเผยแพร่ ฉบับที่ 4/2554 (7 เมษายน 2554)
- Acree, T. and Arn, H. 2004. Flavornet and Human Odor Space (Online). Available
<http://www.flavornet.org/flavornet.html> (12 March 2012)
- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. Elsevier, Applied Science
Publishers, New York.

- Alais, C. and Linden, G. 1991. Food Biochemistry. Ellis Horwood. West Sussex.
- Ahmad, M., and Benjakul, S. 2010a. Extraction and characterisation of pepsinsolubilised collagen from the skin of unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*). Food Chem. 120: 817–824.
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P. and Gómez-Guillén, M. C. 2011a. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. LWT - Food Sci. Tech. 44: 407-413.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, P. 2001b. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Res. Int. 44: 1044–1051.
- AOAC. 1999. Official Methods of Analysis, 14th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Chemists. Gaithersberg.
- Archer, M. 2001. Fish Waste Production in the United Kingdom: The Quantities Produced and Opportunities for Better Utilisation. Seafish Report Number SR537.
- Arnesen, J. A. and Gildberg, A. 2007. Extraction and characterisation of gelatin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. J. Bioresour. Technol. 98 : 53-57.
- Avena-Bustillos, R. J., Olsen, C. W., Chiou, B., Yee, E., Bechtel, P. J., and McHugh, T. H. 2006. Water vapor permeability of mammalian and fish gelatin films. J. Food Sci. 71: E202–E207.
- Badii, F., and Howell, N. K. 2006. Fish gelatin: Structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. Food Hydrocolloid. 20: 630–640.
- Benjakul, S. and Morrissey, M. 1997. Protein hydrolysate from Pacific whiting solid wastes. J. Agric. Food Chem. 45: 3423-3430.

- Benjakul, S., Oungbho, K., Visessanguan, W., Thiansilakul, Y. and Roytrakul, S. 2009. Characteristics of gelatin from the skin of bigeye snapper, *Priacanthus tayenus* and *Priacanthus macracanthus*. *Food Chem. in Press*.
- Bergman, I. and Loxley, R. 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* 35: 1961-1965.
- Bigi, A., Bracci, B., Cojazzi, G., Panzamolta, S. and Roveri, N. 1998. Drawn gelatin films with improved mechanical properties. *Biomaterials.* 19: 2335-2340.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M. and Kishimura, H. 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chem.* 106: 185–193.
- Boyer, R. F. and McCleary, C. J. 1987. Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. *Free Rad. Biol. Med.* 3: 65-77.
- Burghagen. 1999. Collagen. *In Food Chemistry 2nd Ed.* (Belitz.H.D. and Grosch, W., eds.). p. 540-547. Springer-Verlag, Berlin.
- Cameron Carbon Incorporated. 2006. Activated carbon manufacture, structure & properties: Activated Carbon & Related Technology. Cameron Carbon Incorporated. USA.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* 44: 2619-2623.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamaguchi, F., Fujimoto and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragment found in digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 49–53.
- Cheng, F. Y., Wan, T. C., Liu, Y. T., Lai, K. M., Lin, L. C., and Sakata, R. 2008. A study of in vivo antihypertensive properties of enzymatic hydrolysate from chicken leg bone protein. *Anim. Sci. J.* 79: 614-619.

- Cheow, C. S., Norizah, M. S., Kyaw, Z. Y., and Howell, N. K. 2007. Preparation and characterisation of gelatins from the skins of sin croaker (*Johnius dussumieri*) and shortfin scad (*Decapterus macrosoma*). *Food Chem.* 101: 386–391.
- Cho, S. M., Kwak, K. S., Park, D. C., Gu, Y. S., Ji, C. I. and Jang, D. H. 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. 2005. Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) skin gelatin compared to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloid.* 19: 221–229.
- Cho, S-H., Jahncke, M.L., Chin, K-B. and Eun, J-B. 2006. The effect of processing conditions on the 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. *J. Food Sci.* 65: 194–199.
- Cohen, S.A. and Michaud, D.P. 1993. Synthesis of a fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acid via high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 211. 279-287.
- Cole, C. G. B. 2000. Gelatin. *In* Encyclopedia of food science and technology 2nd Ed. (Francis, F. J. ed). p. 1183–1188. Wiley. New York.
- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B., and López-Fandiño, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Protect.* 67: 1939-1944.
- DeSilva, F. 2000. Activated carbon filtration. *Water Quality Products Magazine.* January.

- Dickinson, E. and Loreint, D. 1994. Emulsoin. *In* Food Macromolecules and Colliods. (Dickinson, E. and Loreint, D., eds.). p. 201-274. The Royal Society of Chemistry. Cambridge, UK.
- Eggerslüss, B. 1999. Gelatin hydrolysate and its health aspects. The European Food and Drink Review. Autumn.
- Fahmi A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K. and Uemura, Y. 2004. Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem.* 39: 1195–1200.
- Faria, M., da Costa, E. L., Gontijo, J. A. R., and Netto, F. M. 2008. Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *J. Med. Food.* 11: 560-567.
- Fernandez-Diaz, M. D., Montero, P. and Gomez-Guillen, M. C. 2001. Gel properties of collagens from skins of cod (*Gadus morhua*) and hake (*Merluccius merluccius*) and their modification by the coenhancers magnesium sulphate, glycerol and transglutaminase. *Food Chem.* 74: 161-167.
- Foegeding, E.A., Lanier, T.C. and Hultin, H.O. 1996. Collagen. *In* Food Chemistry 3rd Ed. (Fennema, O.R., ed). p. 902-906. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Fonkwe, L. G. and Singh, R. K. 1997. Production and characterization of gelatinous protein extracts from turkey deboner residue. *Process Biochem.* 32: 309-318.
- Ganeko, N., Shoda, M., Hirohara, I., Bhadra, A., Ishida, T., Matsuda, H., Takamura, H. and Matoba, T. 2008. Analysis of volatile flavor compounds of Sardine (*Sardinops melanostica*) by solid phase microextraction. *J. Food Sci.* 73, 1: s83-s88.
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. and Parmen, A.M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *J. Food Sci.* 69: 615–622.

- Gilsenan, P. M., and Ross-Murphy, S. B. 2000. Rheological characterisation of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloid*. 14: 191–195.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., and Montero, M. P. 2008. Physico-chemical and film forming properties of jumbo flying squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloid*. 23: 585-592.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chem*. 114: 976-983.
- Gómez-Guillén, 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.
- Gómez-Guillén, M. C., Ihl, M., Bifani, V., Silva, A., and Montero, P. 2007. Edible films made from tuna-fish gelatin with antioxidant extracts of two different murta ecotypes leaves (*Ugni molinae Turcz*). *Food Hydrocolloid*. 21: 1133–1143.
- Gómez-Guillén, M. C., López-Caballero, M. E., Alemán, A., López de Lacey, A., Giménez, B. and Montero, P. 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. *In Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*. (Bihan, E. ed.), p. 89-115. Transworld Research Network Signpost, Kerala.
- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. E. and Montero, M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloid*. 25: 1813-1827.
- Guo, Y. T., Li, Y. M., Zhu, Z. T., and Zhao, Y. F. 2005. Effect of the phosphate group with different negative charges on the conformation of phosphorylated Ser/Thr-Pro motif. *Int. J. Peptide Res. Therapeutics*. 11: 159–165.
- Gudmundsson, M., and Hafsteinsson, H. 1997. Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. *J. Food Sci*. 62: 37–47.

- Guen, S., Prost, C. and Demaimay, M. 2000. Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography–olfactometry and gas chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 896: 361–371.
- Guillerminet, F., Beaupied, H., Fabien-Soulé, V., Tomé, D., Benhamou, C. L., Roux, C. and Blais, V. 2009. Hydrolyzed collagen improves bone metabolism and biomechanical parameters in ovariectomized mice: An in vitro and in vivo study. *Bone.* 46: 827-834.
- Hallett, I. C. and Bremner, H. A. (1988) Fine structure of the myocommata-muscle fibre junction in hoki (*Macruronus novaezelandiae*). *J. Sci. Food Agric* 44: 245-261.
- Hansen, E. F. and Lee, S. N. 1991. The effects of relative humidity on some physical properties of modern vellum : implication for the optimum relative humidity for the display and storage of parchment. The Book and Paper Group. ANNUAL. 10. New Mexico.
- Haug, I. J., Draget, K. I., and Smidsrød, O. 2004. Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloid.* 18: 203-213.
- Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B. and Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 588-593.
- Holzer, D. 1996. Gelatin production. Patent, US 5,484,888.
- Hou, H., Li, B., Zhao, X., Zhuang, Y., Ren, G., Yan, M., et al. (2009). The effect of pacific cod (*Gadus macrocephalus*) skin gelatin polypeptides on UV radiation induced skin photoaging in ICR mice. *Food Chem.* 115: 945-950.
- Hudson, C. B. 1994. Gelatin-relating structure and chemistry of functionality. *In* Food Hydrocolloid: Structure, Properties, and Functions.(Nishihari, K. and Doi, E., eds.). Plenum, New York.

- Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E., and Maruyama, S. 2009. Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biot. Biochem.*, 73: 2317-2319.
- Igoe, R. S. 1983. *Dictionary of Food Ingredients*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Iwai, K., Saiga-Egusa, A., Hayakawa, T., Shimizu, M., Takahata, Y., and Morimatsu, F. 2008. An angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory peptide derived from chicken collagen hydrolysate lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*. 55: 602-605.
- Jamilah, B. and Harvinder, K.G. 2002. Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chem.* 77: 81-84.
- Je, J., Qian, Z., Byun, H., and Kim, S. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem.* 42: 840-846.
- Jeon, Y.J., Byun, H.G. and Kim, S.K. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Proc. Biochem.* 35: 471-478.
- Johnston-Bank, F. A. 1990. Gelatin. *In Food Gels*. (Harris, P., ed.). p. 233-289. Elsevier Applied Science. London.
- Jones, N. R. 1977. Uses of gelatin in edible products. *In The Science and Technology of Gelatin*. (Ward, A. G. and Courts, A., eds.). p. 366-394. Academic Press. London.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tanaka, M. 2006. Skin gelatin from bigeye snapper and brownstripe red snapper: chemical compositions and effect of microbial transglutaminase on gel properties. *Food Hydrocolloid*. 20: 1216-1222.

- Josephson, D.B., Lindsay, R.C. and Stuibler, D.A. 1984. Biogenesis of lipid-derived volatile aroma compounds in the emerald shiner (*Notropis atherinoides*). *J Agric. Food Chem.* 32: 1347–52.
- Kamuf, W., Nixon, A., Parker, O. and Barnum, G. C. 2003. Overview of Caramel Colors. *Cereal Foods World*. March-April .48: 64-69.
- Karim, A.A. and Bhat, R. 2009. Fish gelatin: properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloid*. 23: 563-576.
- Kasankala, L.M., Xue, Y., Weilong, Y., Hong, S.D. and He, Q. 2007. Optimization of gelatine extraction from grass carp (*Catenopharyngodon idella*) fish skin by response surface methodology. *Bioresour. Technol.* 98: 3338–3343.
- Kawahara, H. and Tanihata, T. 2005. Method for Producing Fish Gelatin Peptide. Patent, US 2005/0124034 A1.
- Kennan, T. R. 1994. Gelatin. *In* Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. (Kroschwitz, J., ed). p. 406-416. Wiley, New York.
- Khantaphant, S. and Benjakul, S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comp. Biochem. Physiol., Part B*. 151: 410–419.
- Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S. and Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatinhydrolysate of Alaska Pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1984-1989.
- Kim, S.K. and Jung, W.K. 2006. Calcium from fish bone and other marine resources. *In* Marine Nutraceuticals and Functional Foods (Barrow, C. and Shahidi, F. eds.). p. 419-430.
- Kittiphattanabawon, P. 2004. Extraction and Characterization of Collagen and Gelatin from Bigeye Snapper (*Priacanthus tayenus*) Skin and Bone. Master of Science Thesis in Food Technology, Prince of Songkla University. Songkhla, Thailand.

- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 102: 1317–1327.
- Koizumi, C., Keiu, T.C. and Nonaka, J. 1979. Undesirable odor of cooked sardine meat. *Nippon Suisan Gakkaishi* 45:1307–12.
- Kolodziejska, I., Sikorski, E.Z. and Niecikowska, C. 1999. Parameters affecting the isolation of collagen from squid (*Illex argentinus*) skins. *Food Chem.* 66: 153-157.
- Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A. and Tupasela, T. 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 9: 307-319.
- Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev. Food Sci. Nutr.* 40: 43–81.
- Kuijpers, A. J., Engbers, G. H. M., Feijen, J., De Smedt, S. C., Meyvis, T. K. L., Demeester, J., Krijgeveld, J., Zaat, S. A. and Dankert, J. 1999. Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels. *Macromolecule.* 32: 3325-3333.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685.
- Lawal, O. S. 2004. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. *Food Chem.* 86: 345-355.
- Lawless, H.T. and Heymann, H. 1998. *Sensory Evaluation of Food.* Chapman & Hall. New York.
- Lee, Y. C. and Lee, S.W. 1999. Quality changes during storage in Korean clear pear juices concentrated by three methods. *J. Food Qual.* 22: 565-57.
- Leffingwell, J. C. and Leffingwell, D. 1991. GRAS flavor chemicals detection thresholds. *Perfumer and Flavorist.* 16: 1-19.

- Lesniasuskas, R.O. and Carr, B.T. 2004. Workshop summary: Data analysis workshop: getting the most out of just-about-right data. *J. Food Qual.* 15: 891-899.
- Leuenberger, B. H. 1991. Investigation of viscosity and gelation properties of different mammalian and fish gelatins. *Food Hydrocolloid.* 5: 353-361.
- Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. P., and Wu, Y. N. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* 102: 1135-1143.
- Lupien, J. R. 2002. The precautionary principle and other non-tariff barriers to free and fair international food trade. *Cr. Rev. Food Sci.* 42: 403-415.
- Mahmoud, M. I., Malone, W. T., and Cordle, C. T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. *J. Food Sci.* 57: 1223-1229.
- Mackie, A. R., Gunning, A. P., Ridout, M. J., and Morris, V. J. 1998. Gelation of gelatin, observation in the bulk and at the air-water interface. *Biopolymers.* 46: 245-252.
- McCormick, R. 1987. Exploiting the novel properties of pectin and gelatin gels. *Prepared Foods.* 5: 204-205.
- McWilliams, M. 2001. *Foods-Experimental Perspectives.* 4th Ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs.
- Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., and Vioque, J. 2007. Affinity purification of cooper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. *J. Agr. Food Chem.* 55: 6509-6514.
- Meilgaard, M., Civille, G.V. and Carr, B.T. 1999. *Sensory Evaluation Techniques.* 3rd Ed. CRC Press. Boca Raton.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G. and Kim, S.K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci.* 77: 2166-2178.
- Mohri, S., Cho, S.Y., Endo, Y. and Fujimoto, K. 1992. Linoleate 13(S)-lipoxygenase in sardine skin. *J. Agric. Food Chem.* 40:573–6.
- Montero, P., Jimenez-Colmenero, F., and Borderias, J. 1991. Effect of pH and the presence of NaCl on some hydration properties of collagenous material from trout (*Salmo irideus* Gibb) muscle and skin. *J. Sci. Food Agric.* 54: 137-146.
- Moskowitz, R.W. 2000. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin. Arthritis. Rheu.* 30: 87-99.
- Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., and Kilara, A. 1996. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *J. Food Sci.* 61: 270–274, 303.
- Muyonga, J. H., Cole, C. G. B. and Duodu, K. G. 2004. Extraction and physico-chemical characterisation of Nile perch (*Lates niloticus*) skin and bone gelatin. *Food Hydrocolloid.* 18: 581–592.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. 2007. Use of pepsin for collagen extraction from the skin of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chem.* 104: 593-601.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Kishimura, H. 2008. Improvement of gelatin extraction from bigeye snapper skin using pepsin-aided process in combination with protease inhibitor. *Food Hydrocolloid.* 22: 615–622.
- Nielsen, P.M. 1997. Functionality of protein hydrolysates. *In Food Proteins and their Applications.* (Damodaran, S. and Paraf, A., eds.). Marcel Dekker. New York.

- Ninan, G., Jose, J. and Abubacker, Z. 2011. Preparation and characterization of gelatin extracted from the skins of rohu (*Labeo rohita*) and common carp (*Cyprinus carpio*). *J. Food Process. Preserv.* 35: 143–162.
- Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M. and Kasugai, S. 2005. Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats. *Nutrition.* 21: 1120-1126.
- Norland, R. E. 1990. Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability. *In Fish gelatin.* (Voight, M. N. and Botta, J. K., eds.). p. 325–333. Technomic Publishing. Lancaster PA.
- Olijve, J., Mori, F., and Toda, Y. 2001. Influence of molecular-weight distribution of gelatin on emulsion stability. *J. Colloid Interf. Sci.* 243: 476–482.
- Papon, P., Leblon, J., and Meijer, P. H. E. 2007. Gelation and transitions in biopolymers. *In The Physics of Phase Transitions.* p. 189–213. Springer. Berlin.
- Plakas, S. M., Lee, T. C., Wolke, R. E. and Meade, T. L. 1985. Effect of Maillard Browning Reaction on Protein Utilization and Plasma Amino Acid Response by Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *J. Food Nutr.* 115: 1589-1599.
- Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem.* 26: 716-723.
- Peterson, E. M. and Johnson, A. 1978. *Encyclopedia of Food Science.* AVI. Westport.
- Pham, A. J., Schilling, M. W., Yoon, Y., Kamadia, V. V. and Marshall, D. L. 2008. Characterization of fish sauce aroma-impact compounds using GC-MS, SPME-Osmo-GCO, and Steven' power law exponents. *J. Food Sci.* 73: Nr. 4. C268-C274.
- Phanturat, P. 2009. Characterization and Use of Proteinase from Pylotic Caeca of Bigeye Snapper (*Priacanthus macracanthus*) for Production of Gelatin Hydrolysate

- with Antioxidative activity. Master of Science Thesis in Food Science and Technology. Prince of Songkla University. Songkhla, Thailand.
- Poppe, J. 1997. Gelatin. *In* Thickening and Gelling Agent for Food. 2nd Ed. (Imeson, A., ed.). p. 144-168. Blackie Academic and Professional. London.
- Potter, N. N. and Hotchkiss, J. H. 1998. Food Science. 2nd ed. Aspen. Gaithersburg.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., and Kim, S. K. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana shaw*. *Biores. Technol.* 99: 1690-1698.
- Quaglia, G. B., and Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysate. *J. Food Sci.* 55: 1571–1573, 1619.
- Rahali, V., Chobert, J. M., Haertle, T., and Gueguen, J. 2000. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of b-lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung.* 44: 89–95.
- Ranau, R. and Steinhart, H. 2005. Identification and evaluation of volatile odor-active pollutants from different odor emission sources in the food industry. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 226-231.
- Robinson, H. W., and Hodgen, C. G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum protein I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *J. Biol. Chem.* 135: 707–725.
- Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.* 51: 3661-3667.

- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., et al. 2008. Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9586-9591.
- Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., and Suzuki, H. 2009. Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10477-10482.
- Sánchez, C. C. and Patino, J. M. R. 2005. Interfacial, foaming and emulsifying characteristics of sodium caseinate as influenced by protein concentration in solution. *Food Hydrocolloid.* 19: 407-416.
- Sánchez-Vioque, R., Bagger, C. L., Rabiller, C. and Guéguen, J. 2001. Foaming properties of acylated rapeseed (*Brassica napus* L.) hydrolysates. *J. Colloid Interface Sci.* 244: 386- 393.
- Sathivel, S., Bechtel, P., Babbitt, J., Smiley, S., Crapro, C., Reppond, K. and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by-product hydrolysates. *J. Food Sci.* 68: 2196-2200.
- Schrieber, R., and Gareis, H. 2007. *Gelatine handbook*. Weinheim: Wiley-VCH GmbH & Co.
- See, S. F., Hoo, L. L. and Babji, A. S. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. *Int. Food Res. J.* 18: 1359-1365.
- Senger-Emonnot, P., Rochard, S., Pellegrin, F., George, G., Fernandez, X. and Lizzani-Cuvelier, L. 2006. Odour active aroma compounds of sea fig (*Microcosmus sulcatus*). *Food Chem.* 97: 465–471.
- Shahidi, F. 1994. Seafood processing by-products. *In* *Seafoods chemistry, processing, technology and quality*. (Shahidi, F. and Botta, J. R., eds.). p. 320–334. Blackie. Glasgow.
- Shahidi, F., Xiao-Qing, H. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 53: 285-293.

- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soy bean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agr. Food Chem.* 40: 945–948.
- Shimizu, K., Sato, M., Zhang, Y., Kouguchi, T., Takahata, Y., Morimatsu, F., et al. 2010. The bioavailable octapeptide Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 6960-6965.
- Shimoda, M., Peralta, R. R., and Osajima, Y. 1996. Headspace gas analysis of fish sauce. *J. Agric. Food. Chem.* 44: 3601–3605.
- Stainsby, G. 1987. Gelatin gels. *In* Collagen as Food. *Advances in Meat Research*. Vol. 4. (Pearson, A. M., Dutson, T. R. and Bailey. A. J. eds.). p. 209–222. Nostrand Reinhold Company, Inc. New York.
- Surh, J., Gu, Y. S., Decker, E. A., and McClements, D. J. 2005. Influence of environmental stresses on stability of o/w emulsions containing cationic droplets stabilized by SDS-fish gelatin membranes. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4236–4244.
- Surh, J., Decker, E. A., and McClements, D. J. 2006. Properties and stability of oil-in-water emulsions stabilized by fish gelatin. *Food Hydrocolloid.* 20: 596–606.
- Tavernier, B. H. 1989. Molecular mass distribution of gelatin and physical properties. *Photographic Gelatin Proceedings.* 1: 217–228.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.* 103: 1385-1394.
- Thainsilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Composition, functional properties and antioxidative of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.* 103: 1385-1394.

- The Good Scents Company. 1980-2012. The Good Scents Company is introducing Perflavory (Online). Available <http://www.thegoodscentscompany.com/index.html> (12 March 2012)
- Tressler, D. K. and Joslyn, M. A. 1954. The Chemistry and Technology of Fruit and Vegetable Juice Production. AVI. New York.
- Turgeon, S. L., Gauthier, S. F. and Paquin, P. 1992. Emulsifying property of whey peptide fractions as a function of pH and ionic strength. *J. Food Sci.* 57: 601-604.
- US FDA. 1997. FDA Center of Biologics Evaluation and Research, Transmissible Spongiform Encephalopathies Advisory Committees. Transcript of Meeting 23 April 1997. Rockville.
- Veis, A. 1964. The Macromolecular Chemistry of Gelatin. Academic Press. New York.
- Voet, D., Voet, G. and Pratt, C. 2008. Principles of biochemistry. Wiley. New York.
- Wang, L., An, X. X., Yang, F. M., Xin, Z. H., Zhao, L. Y., and Hu, Q. H. 2008. Isolation and characterisation of collagens from the skin, scale and bone of deep-sea redfish (*Sebastes mentella*). *Food Chem.* 108: 616-623.
- Wasswa, J., Tnag, J. and Gu, X. 2007. Utilization of fish processing by-products in the gelatin industry. *Food Rev. Int.* 23: 159 – 174.
- Wieprecht, T., Dathe, M., Epanand, R. M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., et al. 1997. Influence of the angle subtended by the positively charged helix face on the membrane activity of amphipathic, antibacterial peptides. *Biochem.* 36: 12869-12880.
- Wong, D. W. S. 1989. Mechanism and Theory in Food Chemistry. Van Nostrand Reinhold. New York.
- Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. 2003. Free amino acid and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 36: 949-957.

- Xiong, Y.L. 1997. Structure-function relationships of muscle protein. *In* Food Protein and their Applications. (Damodaran, S. and Paraf, A., eds.). p. 341-392. Marcel Dekker, Inc. New York.
- Yang, J. I., Ho, H.Y., Chu, Y.J. and Chow, C.J. 2008. Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chem.* 110: 128 – 136.
- Zayas, JF. 1997. Foaming properties of proteins. *In*: Functionality of Proteins in Food. (Zayas, J. F. ed.). p. 260–309. Springer-Verlag, Berlin.
- Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X. and Zeng, M. 2007. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *J. Process Biochem.* 42: 1586 – 1591
- Zhou, P., Mulvaney, S. J., and Regenstein, J. M. 2006. Properties of Alaska Pollock skin gelatin: A comparison with Tilapia and pork skin gelatins. *J. Food Sci.* 71: 313–321.
- Zhuang, Y., Sun, L., Zhao, X., Wang, J., Hou, H., and Li, B. 2009. Antioxidant and melanogenesis-inhibitory activities of collagen peptide from jellyfish (*Rhopilema esculentum*). *J. Sci. Food Agric.* 89: 1722-1727.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก การเตรียมกรวยกรอง

อุปกรณ์และวัสดุ

1. กรวยกรองบุชเนอร์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
2. กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 เซนติเมตร
3. ผงถ่านกัมมันต์ 5 กรัม

วิธีการ

1. วางกระดาษกรองลงในกรวยบุชเนอร์
2. ผสมผงถ่านกัมมันต์กับน้ำกลั่นปริมาตร 25 มิลลิลิตร คนให้ผงถ่านกระจายตัว
3. เทส่วนผสมทั้งหมดลงบนกระดาษกรองในขณะที่ผงถ่านยังคงกระจายตัวอยู่
4. ใช้น้ำกลั่นอีก 10 มิลลิลิตรกลั้วภาชนะเพื่อชะผงถ่านที่เหลือลงไปบนกระดาษกรอง
5. รอจนกระทั่งไม่มีน้ำหยดออกมาจากกรวยบุชเนอร์ จะได้ชั้นกรองดังแสดงในภาพที่ 12 แล้วจึงนำตัวอย่างมากรองผ่านกรวยดังกล่าว

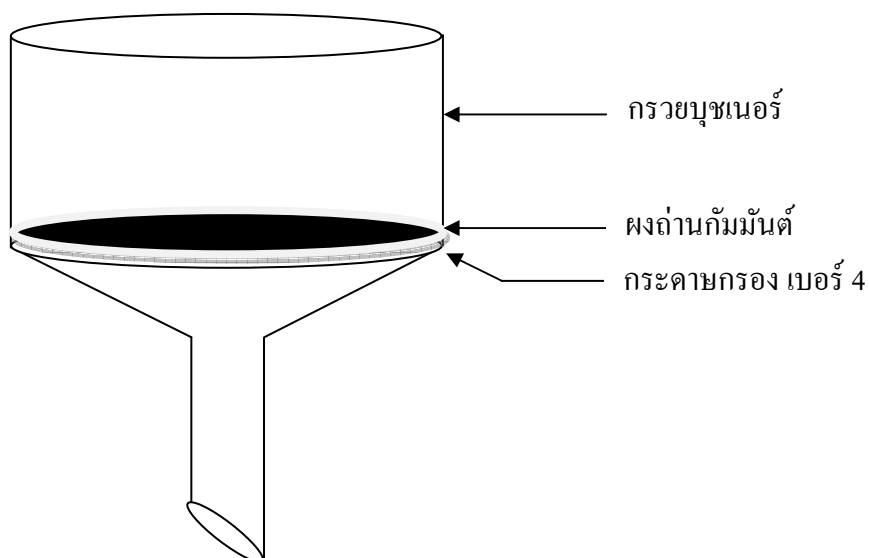


Figure 12 Buchner's funnel with activated carbon layer

ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี

ข1. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC, 2002)

อุปกรณ์

1. ภาชนะสำหรับหาความชื้นพร้อมฝา (moisture can)
2. โถดูดความชื้น (dessicator)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

วิธีการ

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นพร้อมฝาในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำภาชนะดังกล่าวมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2 กรัมใส่ลงในภาชนะสำหรับหาความชื้น
3. อบภาชนะพร้อมตัวอย่างในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก
4. นำตัวอย่างไปอบและชั่งน้ำหนักซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 3 จนได้ผลต่างของน้ำหนักสองครั้ง ติดต่อกันไม่เกิน 3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{(w_1 - w_2)}{w_1} \times 100$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

ข2. การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

4. ครุฑชิลิต (crucible)
5. โถดูดความชื้น (dessicator)
6. เตาเผา

วิธีการ

1. เเผาครุฑชิลิตในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. ทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้นก่อนนำมาชั่งเพื่อหาน้ำหนักที่แน่นอน (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)
3. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัมใส่ลงในครุฑชิลิตแล้วนำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน
4. เเผาครุฑชิลิตพร้อมตัวอย่างที่เผาไปแล้วในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมงทิ้งไว้ให้เย็นและชั่งน้ำหนักตามข้อ 2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{w_2}{w_1} \times 100$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

w_2 คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)

ข3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. หลอดย่อยโปรตีน
2. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร
3. บิวเรต (buret)
4. ชุดย่อยโปรตีน
5. ชุดกลั่นโปรตีน

สารเคมี

1. Kjeldahl catalyst: ผสมโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 9 ส่วนกับคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 1 ส่วน
2. กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
4. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 40% (น้ำหนัก/ปริมาตร)
5. สารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.02 นอร์มัล
6. สารละลายกรดบอริก (H_3BO_3) ความเข้มข้น 10% (ปริมาตร/ปริมาตร)
7. สารละลายอินดิเคเตอร์: ผสมเมทิลเรด (methyl red) ร้อยละ 0.1 (ในเอทานอลร้อยละ 95) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรกับโบรมโครโซล กรีน (bromocresol green) ร้อยละ 0.2 (ในเอทานอลร้อยละ 95) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักประมาณ 1-2 กรัม ห่อตัวอย่างด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ก่อนใส่ในหลอดย่อยโปรตีน เตรียมเบลงค์โดยกระดาษกรองเบอร์ 4 ที่ไม่ใส่ตัวอย่าง
2. เติม Kjeldahl catalyst 5 กรัม และกรดซัลฟิวริก 20 มิลลิลิตรลงในหลอดย่อยโปรตีน
3. ต่อหลอดย่อยโปรตีนเข้ากับเครื่องย่อยโปรตีน ให้ความร้อนเพื่อย่อยจนตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีฟ้าและใส
4. ทิ้งไว้ให้เย็นและเติมน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร
5. นำตัวอย่างไปกลั่นโดยเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้นร้อยละ 20 จนสารละลายตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีดํา นำตัวอย่างเข้าเครื่องกลั่นโดยรับไอระเหยด้วยสารละลายสารละลายกรดบอริกที่หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ไว้แล้ว 2-3 หยด

6. นำสารที่กลั่นได้ไปไตเตรตด้วยสารละลายไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล จนเป็นสีชมพูอ่อน อ่านปริมาตรกรดที่ใช้แล้วนำไปคำนวณเป็นปริมาณโปรตีน

การคำนวณ

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

- เมื่อ A คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มัลที่ใช้ไตเตรต ตัวอย่าง
- B คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.02 นอร์มัลที่ใช้ไตเตรต แบลงก์
- N คือ ความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มัล)
- W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)
- F คือ แฟกเตอร์สำหรับการแปลงปริมาณไนโตรเจนเป็นโปรตีน (protein-nitrogen conversion factor) (สำหรับปลาและวัสดุเศษเหลือจากปลา = 6.25, สำหรับเจลาตินจากปลา = 5.4)

ข4. การวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (soxhlet apparatus) ประกอบด้วยขวดกั่นกลมสำหรับใส่ตัวทำละลาย, ซอกเลต(soxhlet), เครื่องควบแน่น (condenser) และเตาให้ความร้อน (heating mantle)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
4. โถดูดความชื้น (desiccator)
5. เครื่องชั่งไฟฟ้า (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง)

สารเคมี

1. ปีโตรเลียมอีเทอร์

วิธีการ

1. อบขวดกั่นกลมสำหรับหาปริมาณไขมันซึ่งมีขนาดความจุ 250 มิลลิลิตรในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก
2. ทำซ้ำข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกันสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 1-2 กรัมห่อด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่างปิดทับด้วยสำลี
4. นำตัวอย่างใส่ในซอกเลต เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ปริมาตร 150 มิลลิลิตรลงในขวดกั่นกลม แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ใช้เวลาในการสกัด 14 ชั่วโมง โดยควบคุมให้ปีโตรเลียมอีเทอร์ระเหยและควบแน่นหยดลงมาสกัดตัวอย่างด้วยอัตรา 150 หยดต่ออนาที
6. เมื่อครบเวลา นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอกเลต ระเหยปีโตรเลียมอีเทอร์ในขวดกั่นกลมด้วยเครื่องทำระเหยแบบสุญญากาศ
7. อบขวดกั่นกลมจากข้อ 6 ในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 ± 2 องศาเซลเซียสจนตัวทำละลายแห้ง ก่อนนำมาใส่ในโถดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นและนำมาชั่งน้ำหนัก
8. ทำซ้ำข้อ 7 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งติดต่อกันสองครั้งไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ โดยน้ำหนัก)} = \frac{w_2}{w_1} \times 100$$

เมื่อ w_1 คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

w_2 คือ น้ำหนักไขมันหลังอบ (กรัม)

ข5. วิเคราะห์ปริมาณกรด (AOAC, 1999)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล
2. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน

วิธีการ

1. ปิเปิดน้ำผลไม้ 5 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน
2. นำสารตัวอย่างไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอนประมาณ 0.1 นอร์มัลจนได้สารละลายสีชมพูอ่อน
3. นำปริมาณต่างที่ใช้ไปคำนวณค่าปริมาณกรดทั้งหมด

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกรด (ร้อยละของกรดซิตริก)} = \frac{N \times V \times 0.07}{S} \times 100$$

เมื่อ

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

V คือ ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท

S คือ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้

ข6. การตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH (Wu *et al.*, 2003)

สารเคมี

1. สารละลาย 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอล ร้อยละ 95
2. สารละลาย 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) ในเมทานอลความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์

วิธีการ

1. ผสมตัวอย่างปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรกับสารละลาย DPPH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
2. ผสมให้เข้ากันดีแล้ววางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. เตรียมแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 10 – 60 ไมโครโมลาร์ (เตรียมจากสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ โดยนำมาเจือจางด้วยเมทานอล)
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

Table 39. Preparation of standard Trolox solution for DPPH radical scavenging activity determination

Trolox Concentration (μM)	1000 μM Trolox (μl)	Distilled water (μl)
0	0	5000
10	50	4950
20	100	4900
40	200	4800
60	300	4700

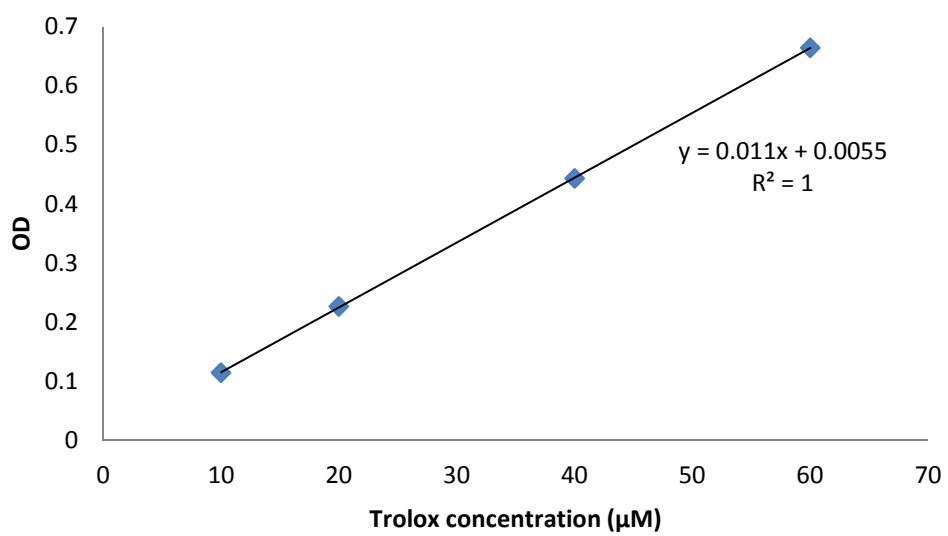


Figure 13 Standard curve for DPPH radical scavenging activity determination

ข7. การตรวจสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS (Binsan *et al.*, 2008)

สารเคมี

1. สารละลาย 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) เข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ ในเอทานอลร้อยละ 95
2. สารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต เข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์
3. สารละลาย 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) ในเมทานอลความเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์

การเตรียม working solution

1. ผสมสารละลาย ABTS กับสารละลายโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตในปริมาณเท่ากัน
2. บ่มไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
3. ผสมสารละลายในข้อ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรกับเมทานอล 25 มิลลิลิตร
4. นำสารที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปรับจนได้สารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสง 1.1 ± 0.02

วิธีการ

1. ผสมตัวอย่างปริมาตร 150 ไมโครลิตรกับ working solution ปริมาตร 2850 ไมโครลิตร
2. ผสมให้เข้ากันดีแล้ววางไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
3. เตรียมแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง
4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Trolox เข้มข้น 50-600 ไมโครโมลาร์ (เตรียมจากสารละลายเข้มข้น 1000 ไมโครโมลาร์ โดยนำมาเจือจางด้วยเมทานอล)
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตรและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

Table 40. Preparation of standard Trolox solution for ABTS radical scavenging activity determination

Trolox Concentration (μM)	1000 μM Trolox (μl)	Distilled water (μl)
0	0	5000
50	250	4750
100	500	4500
200	1000	4000
300	1500	3500
400	2000	3000
500	2500	2500
600	3000	2000

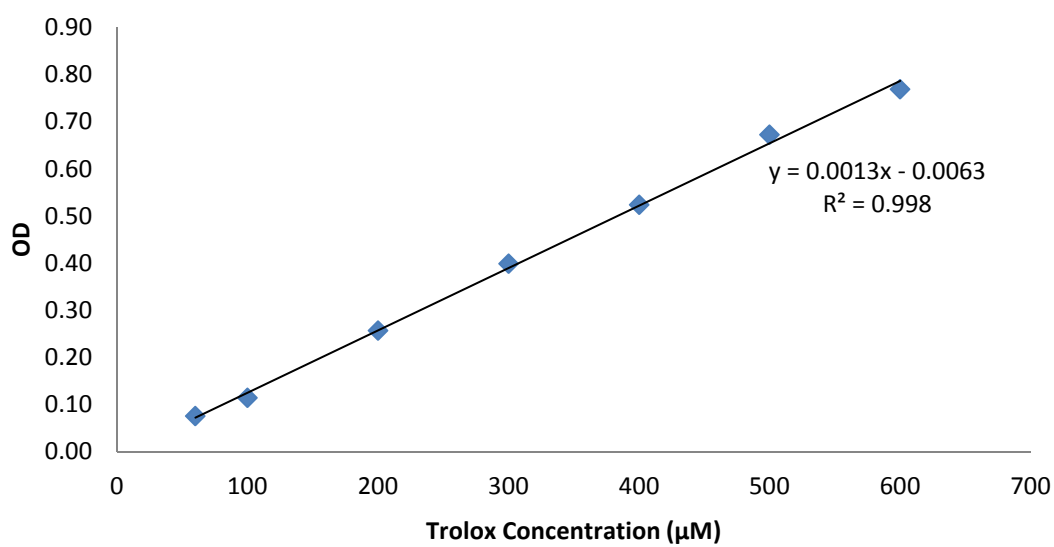


Figure 14 Standard curve for ABTS radical scavenging activity determination

ข8. การตรวจสอบ ferric reducing antioxidant power (FRAP) (Wu *et al.*, 2003)

สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.6
2. สารละลาย potassium ferricyanide เข้มข้นร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
3. สารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
4. สารละลาย FeCl_3 เข้มข้นร้อยละ 0.1 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
5. สารละลาย 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox) ในเมทานอลความเข้มข้น 10-80 ไมโครโมลาร์

วิธีการ

1. ผสมตัวอย่างสารละลายเจลาตินไฮโดรไลสจากข้อ 3.7 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและสารละลาย potassium ferricyanide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
3. เติมสารละลาย trichloroacetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. แบ่งส่วนผสมออกมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตรและสารละลาย FeCl_3 200 ไมโครลิตร
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตรและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

Table 41. Preparation of standard Trolox solution for ferric reducing antioxidant power determination

Trolox Concentration (μM)	1000 μM Trolox (μl)	Distilled water (μl)
0	0	5000
10	50	4950
20	100	4900
40	200	4800
60	300	4700
80	400	4600

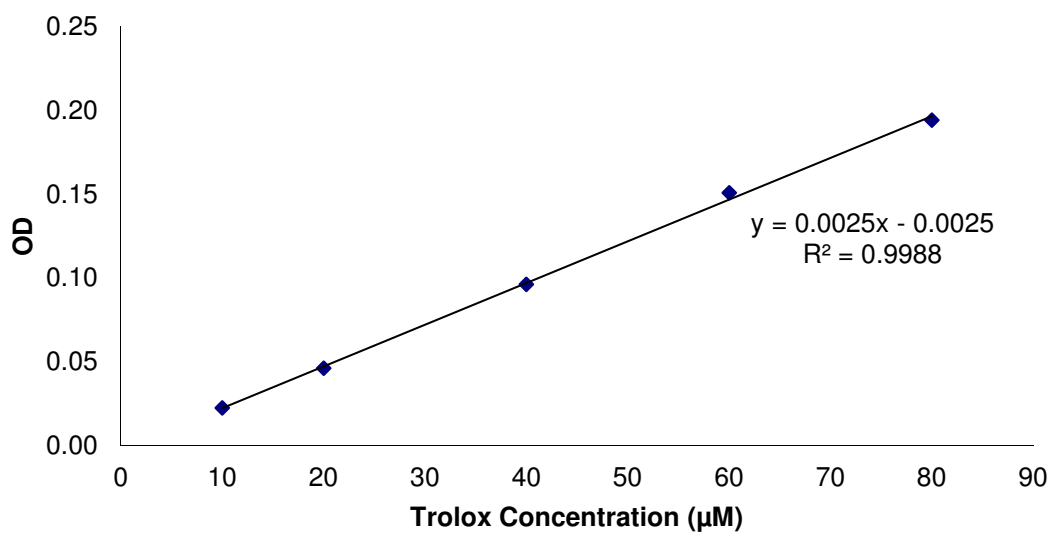


Figure 15 Standard curve for ferric reducing antioxidant power determination

ข9. การตรวจสอบความสามารถในการจับโลหะ (Metal chelating activity) (Boyer and McCleary, 1987)

สารเคมี

1. สารละลาย FeCl_2 เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
2. สารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์
3. สารละลาย EDTA เข้มข้น 10-80 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

วิธีการ

1. ผสมตัวอย่างสารละลายเจลาตินไฮโดรไลสจากข้อ 3.7 ปริมาตร 4.7 มิลลิลิตร กับ สารละลาย FeCl_2 0.1 มิลลิลิตร และสารละลาย ferrozine 0.2 มิลลิลิตร
2. วางทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

Table 42. Preparation of standard EDTA solution for Metal chelating activity determination

EDTA Concentration (mg/ml)	1000 mg/ml EDTA (μl)	Distilled water (μl)
0	0	5000
10	50	4950
30	150	4850
50	250	4750
80	400	4600

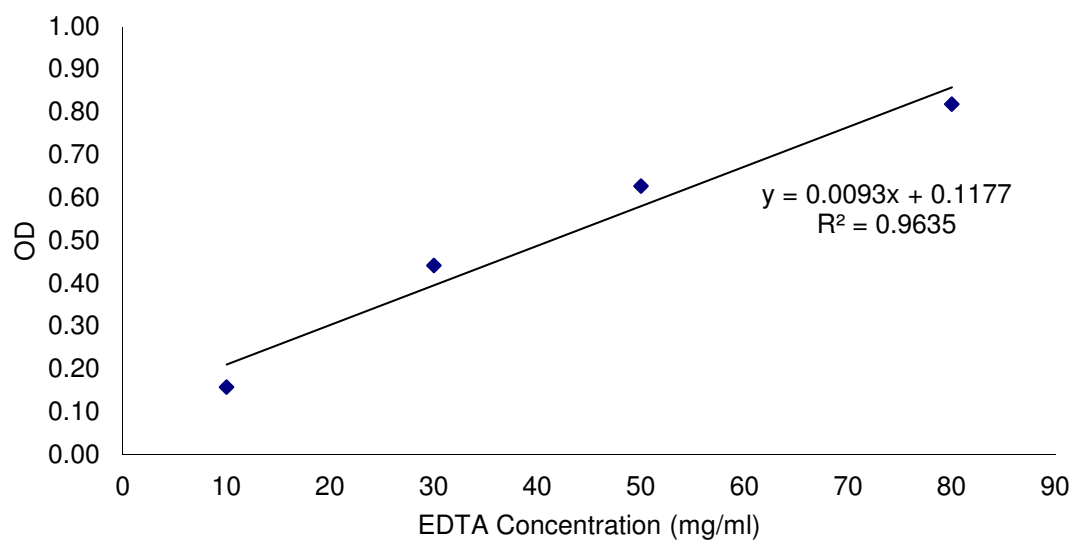


Figure 16 Standard curve for Metal chelating activity determination

ข10. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีไบยูเรท (Robison and Hodgen, 1940)

สารเคมี

1. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine Serum Albumin (BSA) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
2. สารละลายไบยูเรท: ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 1.5 กรัม โซเดียมโพแทสเซียมทาทาเทรต 6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 300 มิลลิลิตรในขณะกวน ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

วิธีการ

1. ดูดตัวอย่างสารละลาย (สารละลายเจลาตินที่สกัดได้จากข้อ 3.3, สารละลายเจลาตินไฮโดรไลสจากข้อ 3.6.1 และ 3.6.2, สารละลายเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลสเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) จากตัวอย่างผง) ปริมาตร 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายไบยูเรท 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
3. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน BSA

Table 43. Preparation of standard BSA solution for Biuret's method

Effective BSA Concentration (mg/ml)	10 mg/ml BSA (μ l)	Distilled water (μ l)
0	0	500
2	100	400
4	200	300
6	300	200
8	400	100
10	500	0

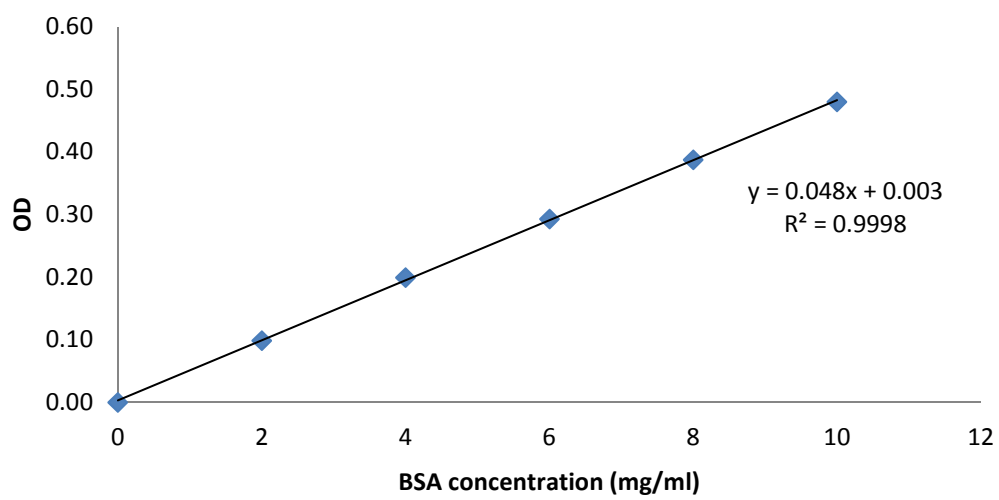


Figure 17 Standard curve for Biuret method

ข11. วิเคราะห์ปริมาณไฮดรอกซีโพรตีน (Bergman and Loxley, 1963)

สารเคมี

1. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล
2. Oxidant solution : ผสมสารละลาย chlororamone T เข้มข้นร้อยละ 7 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กับ acetate/citrate buffer, pH 6 ในอัตราส่วน 1:4 (ปริมาตร/ปริมาตร)
3. Ehrlich's reagent solution : ผสม สารละลาย A (ซึ่ง α -dimethylamino-benzaldehyde 2 กรัม ละลายใน perchloric acid เข้มข้นร้อยละ 60 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร) กับ isopropanal ในอัตราส่วน 3:13
4. ไอโซโพรพานาล
5. สารละลายไฮดรอกซีโพรตีนมาตรฐาน 400 ppm

วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว
2. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัลในอัตราส่วน 1:10 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
3. นำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียสใน oil bath เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
4. กำจัดสีด้วยถ่านกัมมันต์และกรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4
5. ปรับพีเอชให้เป็น 6.0-6.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกและสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 และ 1 โมลาร์
6. ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

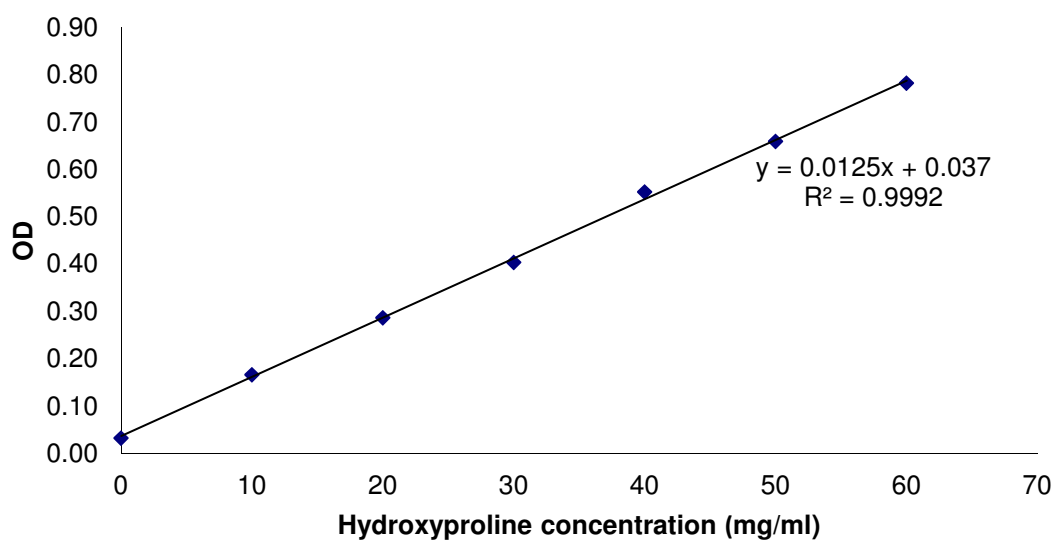
การวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลองและเติมไอโซโพรพานาลปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
2. เติม oxidant solution ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติม Ehrlich's reagent solution ปริมาตร 1.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. นำตัวอย่างไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาทีในอ่างควบคุมอุณหภูมิ
5. นำตัวอย่างมาหล่อเย็นโดยให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 2-3 นาที
6. เจือจางส่วนผสมให้เป็น 5 มิลลิลิตรด้วยไอโซโพรพานาล
7. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 558 นาโนเมตร

8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

Table 44. Preparation of standard Hydroxyproline solution

Effective Hydroxyproline Concentration (mg/ml)	400 ppm Hydroxyproline (μ l)	Distilled water (μ l)
0	0	100
10	2.5	97.5
20	5.0	95.0
30	7.5	92.5
40	10.0	90.0
50	12.5	87.5
60	15.0	85.0

**Figure 18** Standard curve for hydroxyproline content determination

ข12. วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis) (Benjakul and Morrissey, 1997)

สารเคมี

1. สารละลายมาตรฐาน L-leucine เข้มข้น 30 มิลลิโมล
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร
3. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2125 โมลาร์, pH 8.2
4. สารละลาย 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS) เข้มข้นร้อยละ 0.01
5. สารละลายโซเดียมซัลไฟต์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์

วิธีการ

1. เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2125 โมลาร์, พีเอช 8.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรและสารละลาย TNBS เข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่มีตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตรอยู่
2. นำตัวอย่างไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที
3. หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายโซเดียมซัลไฟต์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร
4. วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร
6. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณเป็นค่าระดับการย่อยสลาย

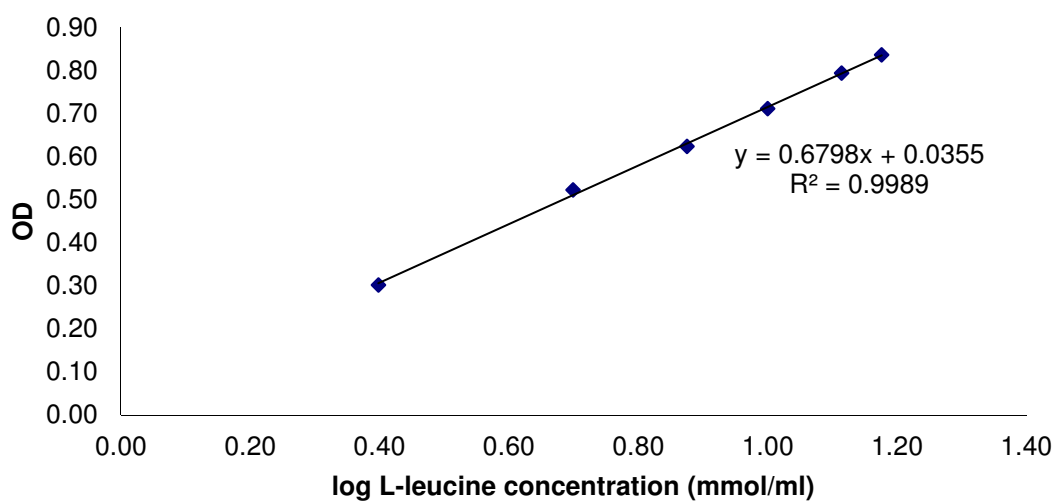
การคำนวณ

$$DH = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

เมื่อ	L_t	คือ	จำนวนหมู่ α -amino ทั้งหมดในตัวอย่างที่ย่อยเป็นเวลา t
	L_0	คือ	จำนวนหมู่ α -amino ทั้งหมดในตัวอย่างเจลาตินเริ่มต้น
	L_{max}	คือ	จำนวนหมู่ α -amino ทั้งหมดในตัวอย่างเจลาตินเริ่มต้นที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์แล้ว (ย่อยในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

Table 45. Preparation of standard L-leucine solution

Effective L-leucine Concentration (mmol/ml)	30 mmol L-leucine (ml)	40 mmol HCl (ml)
0	0	1
2.5	0.083	0.917
5.0	0.167	0.833
7.5	0.250	0.750
10.0	0.333	0.667
13.0	0.433	0.567
15.0	0.500	0.500

**Figure 19** Standard curve for Degree of Hydrolysis determination

ข13. การตรวจสอบรูปแบบโปรตีน โดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970)

อุปกรณ์

ชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสแบบมินิเจล

สารเคมี

1. Acrylamide/bis-acrylamide: ละลาย Acrylamide 29.2 กรัมและ bis-acrylamide 0.8 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้ประมาณ 1 เดือนหลังการเตรียม
2. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8
3. สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์เข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8
4. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
5. สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 (เก็บที่อุณหภูมิห้อง)
6. Sample buffer (non-reducing buffer) ประกอบด้วย :

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	0.1514	กรัม
กลีเซอรอล	2.5	มิลลิลิตร
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	0.25	กรัม
โบรโมฟินอลบลู	0.25	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 25 มิลลิลิตร

7. Electrode buffer ประกอบด้วย :

ทริส-ไฮโดรคลอไรด์	3.0	กรัม
ไกลซีน	14.4	กรัม
โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	1.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

8. Catalyst ประกอบด้วย :

สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 10 (เตรียมก่อนใช้)

TEMED (N,N,N,N-tetramethyl ethylenediamine)

9. โปรตีนมาตรฐาน ได้แก่ คอลลาเจน type I จากหนังวัว

10. ลีซ้อมโปรตีน Coomassie Brilliant Blue R-250
11. Staining solution: ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 น้ำหนัก 0.04 กรัมในเมทานอล 100 มิลลิลิตร คนจนละลายหมดแล้วเติม Glacial acetic acid 15 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 85 มิลลิลิตร
12. Destaining solution 1: ผสมเมทานอล 200 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 30 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร
13. Destaining solution 2: ผสมเมทานอล 50 มิลลิลิตร กรดอะซิติก 75 มิลลิลิตรและน้ำกลั่น 875 มิลลิลิตร

วิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลสตามละลายในสารละลายโซเดียม-โดเดซิลซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 5 จนได้สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 12 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เหยียงแยกที่ความเร็ว 5,500g นาน 15 นาที นำส่วนใสที่ได้มาผสมกับ sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 (ได้สารละลายที่มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) ต้มสารละลายในน้ำเดือดนาน 3 นาที ทำให้เย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม running gel (5% gel) (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-arylamide	1.665	มิลลิลิตร
1.5 M Tris-HCl buffer pH 8.8	2.500	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5.6785	มิลลิลิตร
10% SDS	100	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	50	ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน		
TEMED	5	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันแล้วคูลใส่ในกระจกสำหรับเตรียมแผ่นเจล แผ่นละ 3.5 มิลลิลิตร

3. การเตรียม stacking gel (4% gel) (สำหรับเจล 2 แผ่น)

30% Acrylamide/0.8% bis-acrylamide	0.665	มิลลิลิตร
0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8	1.250	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	3.000	มิลลิลิตร
10% SDS	50	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulfate	25	ไมโครลิตร
เขย่าให้เข้ากัน		
TEMED	3	ไมโครลิตร

เขย่าให้เข้ากันแล้วดูใส่ในกระจกสำหรับเตรียมแผ่นเจลจนเต็ม

4. การแยกโปรตีนโดยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

ประกอบชุดเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber ด้านใน แล้วโหลดตัวอย่างที่เตรียมจากข้อ 1 ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ก่อนเติม electrode buffer ให้เต็ม chamber ด้านนอก ต่อชุดอิเล็กโตรโฟรีซิสเข้ากับ power supplier เปิดกระแสไฟฟ้า 30 mA (สำหรับเจล 2 แผ่น) รอนสีของโบรมอีนอลบลูเคลื่อนที่ลงมาจนเกือบสุดปลายกระจกจึงหยุดให้กระแสไฟฟ้า

5. การย้อมสีโปรตีนในเจล

นำเจลมาย้อมสีโดยแช่ใน staining solution นาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาแช่ใน destaining solution I นาน 15 นาที แล้วนำมาแช่ทิ้งไว้ข้ามคืนใน destaining solution II

ข14. สภาพะในการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารประกอบที่ระเหยได้โดยใช้เครื่อง GC/MS

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณของสารที่ระเหยได้ในเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลเสทในข้อ 3.8 ด้วยเทคนิค headspace-solid phase microextraction for gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) โดยเก็บตัวอย่างจากช่องว่างเหนือสารละลายเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลเสท (headspace) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้วย SPME holder โดยใช้ไฟเบอร์ชนิด Divinylbenzene/Carboxen/Polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50/30 μm (SPME inlet liner 0.75 mm i.d., Supelco, Bellefonte, PA, USA) โดยเก็บตัวอย่างบริเวณช่องว่างเหนือสารละลายนาน 5 นาที หลังจากนั้นนำ SPME holder ไปต่อกับ injection port ของ GC-MS โดยกำหนดอุณหภูมิของส่วน injection port เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการปลดปล่อยสารตัวอย่างนาน 5 นาทีก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่องรุ่น Agilent 6890 Plus GC/HP 5973 MSD และกำหนดสภาวะการวิเคราะห์ดังแสดงในตารางที่ 45

Table 46. GC/MS condition for flavor analysis

Condition	Column type: HP-Innowax
Length of column (m)	30
Diameter of column (mm)	0.25
Film thickness (μm)	0.25
Type carrier gas	Helium
Rate of carrier gas (ml/min)	1.0
Injection volume (μl)	1.0
Mode of operation	splitless
Injection temperature ($^{\circ}\text{C}$)	250
Oven temperature ($^{\circ}\text{C}$)	40 $^{\circ}\text{C}$ \rightarrow 230 $^{\circ}\text{C}$, 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ Hold at 230 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min
Interface temperature ($^{\circ}\text{C}$)	270
Mass range (amu)	20 - 450
Ionization energy (eV)	70
Scan Rate (scans/sec)	1.43

ภาคผนวก ค การทดสอบทางกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่

ค1. การทดสอบคุณสมบัติของเจลลาตินเจล (Fernandez-Diaz *et al.*, 2001)

การเตรียมเจล

เตรียมสารละลายเจลาตินที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.67 ปรับพีเอชของสารละลายให้เป็น 3, 5, 7 และ 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 นอร์มอลและสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์ดังนี้

ค1.1 ความขุ่นของสารละลายเจลาติน

นำสารละลายเจลาตินค่าพีเอชต่าง ๆ ที่ได้เตรียมไว้ข้างต้นไปวัดค่าความขุ่น (Turbidity) ที่ความยาวคลื่น 360 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง double-beam spectrophotometer (UV-16001, SHIMADZU, N.S.W., Australia) ทำการทดลอง 5 ซ้ำสำหรับตัวอย่างแต่ละค่าพีเอช

ค1.2 ค่าสีของเจลาตินเจล

นำเจลของเจลาตินที่เตรียมไว้ข้างต้นไปวัดค่าสีด้วยเครื่อง Hunter lab colour metre (ColorFlex, HunterLab, Reston, USA)

ค1.3 ความแข็งแรงของเจลาตินเจล (Bloom strength)

นำเจลของเจลาตินที่เตรียมและบ่มไว้มาวางไว้จนตัวอย่างมีอุณหภูมิ 8-9 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง TA-XT2i Texture analyzer (Stable Micro System, Surrey, UK) โดยตั้งค่าสภาวะในการวัด ดังนี้

- Load cell ขนาด 5 kN
- Cross head speed 1 mm/s
- ใช้หัววัด flat-faced cylindrical Teflon[®] plunger ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.27 เซนติเมตร
- วัดค่า Maximum force (ในหน่วยกรัม) เมื่อหัววัดกดลงไปในเจล 4 มิลลิเมตร
- ทำการทดลอง 5 ซ้ำสำหรับตัวอย่างแต่ละพีเอช
- ขนาดของเจลตัวอย่างทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.8 เซนติเมตร ความสูง 2.7 เซนติเมตร

ค2. ความสามารถในการละลาย (Montero *et al.*, 1991)

สารเคมี

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 6 นอร์มัล
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก เข้มข้น 6 นอร์มัล

วิธีการ

1. ละลายเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลสด้วยน้ำกลั่นที่มีอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ได้สารละลายที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) กวนด้วยเครื่องกวน (magnetic stirrer) ที่อุณหภูมิห้องจนตัวอย่างละลาย
2. นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 8 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเป็น 1-10 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์และสารละลายกรดไฮโดรคลอริก
3. ปรับปริมาตรของแต่ละตัวอย่างเป็น 10 มิลลิลิตร
4. นำตัวอย่างไปหมุนเหวี่ยงด้วยแรงเหวี่ยง $8500 \times g$ ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
5. ตรวจสอบปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใสด้วย Biuret method

ค3. ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม (Shahidi, 1995)

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1, 0.5, 1 และ 3 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
2. นำตัวอย่างปริมาตร 20 มิลลิลิตรในกระบอกตวงขนาด 50 มิลลิลิตร ไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (model T25 basic, ULTRA TURRAX[®], IKA LABORTECHNIK, Selangor, Malaysia) ที่ความเร็ว 11,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที
3. วางตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้องและอ่านปริมาตรที่เวลา 0, 30 และ 60 นาทีหลังการโฮโมจีไนซ์

การคำนวณ

$$\text{ความสามารถในการเกิดโฟม (ร้อยละ)} = (V_T / V_0) \times 100$$

$$\text{ความคงตัวของโฟม (ร้อยละ)} = (V_t / V_0) \times 100$$

- เมื่อ V_T คือ ปริมาตรหลังโฮโมจีไนซ์ 0 นาที
 V_t คือ ปริมาตรหลังโฮโมจีไนซ์ 30 หรือ 60 นาที
 V_0 คือ ปริมาตรของตัวอย่างเริ่มต้น

ค4. ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์และความคงตัวของอิมัลชัน (Pearce and Kinsella, 1978)

สารเคมี

1. น้ำมันถั่วเหลือง
2. สารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) เข้มข้นร้อยละ 0.1

วิธีการ

1. เตรียมสารละลายเจลาตินหรือเจลาตินไฮโดรไลเสทที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.1, 0.5, 1 และ 3 (น้ำหนัก/ปริมาตร)
2. ผสมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 30 มิลลิลิตรกับน้ำมันถั่วเหลืองปริมาตร 10 มิลลิลิตร
3. นำส่วนผสมไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (model T25 basic, ULTRA TURRAX[®], IKA LABORTECHNIK, Selangor, Malaysia) ที่ความเร็ว 20,000 rpm เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
4. เก็บตัวอย่าง 50 ไมโครลิตรจากกันภาชนะที่เวลา 0 และ 10 นาทีหลังการโฮโมจีไนซ์
5. เจือจางตัวอย่าง 100 เท่าด้วยสารละลาย SDS
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณ

การคำนวณ

$$\text{ความสามารถในการเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (m}^2\text{/g)} = \frac{2 \times 2.203 \times A_{500}}{0.25 \times P}$$

$$\text{ความคงตัวของอิมัลชัน (ร้อยละ)} = (A_0 \times \Delta t) / \Delta A$$

เมื่อ	A_{500}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
	A_0	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรของตัวอย่างที่เก็บในนาทีที่ 0
	A_{10}	คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตรของตัวอย่างที่เก็บในนาทีที่ 10
	Δt	คือ 10 นาที
	ΔA	คือ $A_0 - A_{10}$
	P	คือ ความเข้มข้นของสารละลายเจลาติน

ภาคผนวก ง การทดสอบทางประสาทสัมผัส

ง1. การเตรียมตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการฝึกฝนผู้ทดสอบการดมกลิ่น

1. เตรียมตัวอย่างมาตรฐานในการฝึกฝนการดมกลิ่นคาวโดยนำเจลาติน (เจลาตินที่สกัดจากหนังปลาดาทาหวานพันธุ์หนังกาที่ไม่ผ่านการล้างวัตถุคิบั และสกัดที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที) มาเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 5, 10, 20, 30, 40 และ 50 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยละลายด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนตัวอย่างละลายหมด
2. บรรจุตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นลงในขวดสีชาขวดละ 3 มิลลิลิตร

ง2. วิธีการและตัวอย่างมาตรฐานที่ใช้ในการฝึกฝนผู้ทดสอบการดมกลิ่น

1. อธิบายวัตถุประสงค์ บทบาทของผู้ทดสอบ วิธีการที่นำมาใช้ในการทดสอบ คำนิยาม และขั้นตอนการประเมินกลิ่นต่าง ๆ ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเซตที่จะประเมินให้ผู้ทดสอบทราบและทำความเข้าใจให้ตรงกัน
2. ฝึกฝนให้ผู้ทดสอบมีความชำนาญ โดยใช้ตัวอย่างมาตรฐานที่เตรียมในภาคผนวก ง1
3. ให้ผู้ทดสอบมีมติร่วมกันในการกำหนดสเกลของตัวอย่างมาตรฐาน 5 ระดับลงในแบบทดสอบดังแสดงในภาคผนวกที่ ง1. และทดสอบการดมกลิ่นตัวอย่างมาตรฐานซ้ำหลาย ๆ ครั้งเพื่อให้ผู้ทดสอบมีความแม่นยำในการประเมินมากขึ้น คะแนนและตัวอย่างมาตรฐานที่ได้จากมติกุ่มดังแสดงในตารางที่ 46
4. ประเมินความแม่นยำของผู้ทดสอบในการฝึกฝนแต่ละครั้งโดยการทดสอบดมตัวอย่างสารละลายเจลาติน 2 ระดับความเข้มข้น (blind test)
5. ฝึกฝนและทดสอบความแม่นยำจากผู้ทดสอบแต่ละคนมีคะแนนเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) หรือมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานต่ำ และมีแนวโน้มในการให้คะแนนเป็นไปในทิศทางเดียวกัน หรือไม่มี interaction ระหว่างผู้ทดสอบกับตัวอย่าง ($p > 0.05$) จากการวิเคราะห์ความแปรปรวน
6. ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเซตแต่ละครั้งจะฝึกฝนผู้ทดสอบจนมีผลน่าเชื่อถือติดต่อกันอย่างน้อย 2 ครั้งก่อนให้ทดสอบตัวอย่างจริง

Table 47. Fishy odour score of standard gelatin

Gelatin concentration (%)	Score (cm)
0	0
5	4.25
20	7.5
40	12.2
50	15

ภาคผนวก จ ผลการวิเคราะห์ ANOVA จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Design Expert เพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำส้มและน้ำเบอรี่

Table 48 ANOVA for Mixture Linear Model (Appearance)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Appearance	Model	1.606E-003	1	1.606E-003	0.040	0.8476	not significant
	Linear Mixture	1.606E-003	1	1.606E-003	0.040	0.8476	
	Residual	0.24	6	0.040			
	Lack of Fit	0.072	3	0.024	0.43	0.7487	not significant
	Pure Error	0.17	3	0.056			
	Cor Total	0.17	3				

$R^2 = 0.0067$

Table 49 ANOVA for Mixture Quadratic Model (Colour)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Colour	Model	0.27	2	0.13	2.38	0.1874	not significant
	Linear Mixture	0.022	1	0.022	0.39	0.5582	
	AB	0.25	1	0.25	4.38	0.0907	
	Residual	0.28	5	0.056			
	Lack of Fit	0.061	2	0.030	0.41	0.6939	not significant
	Pure Error	0.22	3	0.073			
	Cor Total	0.55	7				

A : Orange, B : Berry ; $R^2 = 0.4882$

Table 50 ANOVA for Mixture Linear Model (Flavour)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Flavour	Model	0.066	1	0.066	2.55	0.1612	not significant
	Linear Mixture	0.066	1	0.066	2.55	0.1612	
	Residual	0.16	6	0.026			
	Lack of Fit	9.694E-003	3	3.231E-003	0.067	0.9740	not significant
	Pure Error	0.15	3	0.048			
	Cor Total	0.22	7				

$R^2 = 0.2985$

Table 51 ANOVA for Mixture Linear Model (Viscosity)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Viscosity	Model	0.064	1	0.064	4.46	0.0792	not significant
	Linear Mixture	0.064	1	0.064	4.46	0.0792	
	Residual	0.086	6	0.014			
	Lack of Fit	0.038	3	0.013	0.81	0.5661	not significant
	Pure Error	0.047	3	0.016			
	Cor Total	0.15	7				

$R^2 = 0.4263$

Table 52 ANOVA for Mixture Cubic Model (Taste)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Taste	Model	0.21	3	0.071	1.30	0.3908	not significant
	Linear Mixture	3.556E-004	1	3.556E-004	6.531E-003	0.9395	
	AB	0.015	1	0.015	0.27	0.6306	
	AB(A-B)	0.20	1	0.20	3.61	0.1302	
	Residual	0.22	4	0.054			
	Lack of Fit	0.017	1	0.017	0.26	0.6457	not significant
	Pure Error	0.20	3	0.067			
	Cor Total	0.43	7				

A : Orange, B : Berry ; $R^2 = 0.4928$

Table 53 ANOVA for Mixture Linear Model (Overall)

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F Value	p-value Prob>F	
Overall	Model	0.017	1	0.017	1.83	0.2251	not significant
	Linear Mixture	0.017	1	0.017	1.83	0.2251	
	Residual	0.057	6	9.530E-003			
	Lack of Fit	3.278E-003	3	1.093E-003	0.061	0.9771	not significant
	Pure Error	0.054	3	0.018			
	Cor Total	0.075	7				

$R^2 = 0.2335$

ภาคผนวก ฉ ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัสและแบบสำรวจ

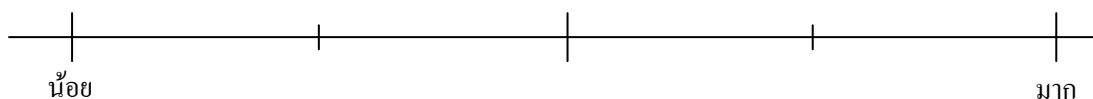
ฉ1. ตัวอย่างแบบทดสอบในการฝึกฝนผู้ทดสอบดมกลิ่นคาว

หมายเลขแบบทดสอบ

แบบทดสอบ

การฝึกฝนผู้ทดสอบสำหรับกลิ่นคาวในเจลาติน/เจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนึ่งหน้า
ครั้งที่..... วันที่.....

ชื่อ - สกุล



กลิ่น

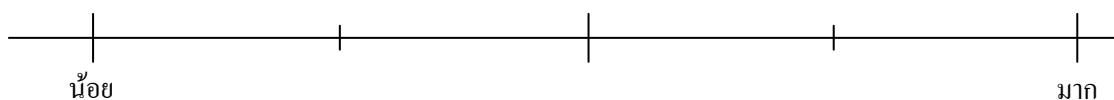
ฉ2. ตัวอย่างแบบทดสอบกลิ่นคาวของเจลาติน

หมายเลขแบบทดสอบ

แบบทดสอบ

กลิ่นคาวในเจลาติน/เจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนึ่งหน้า
ครั้งที่..... วันที่.....

ชื่อ - สกุล



กลิ่นคาว

ฉ3. ตัวอย่างแบบทดสอบกลิ่นของเจลาตินไฮโดรไลเสท

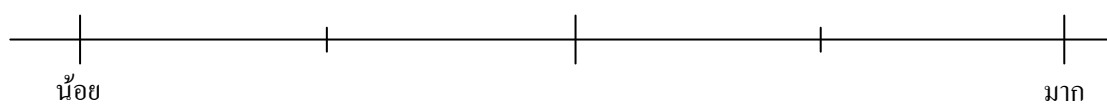
หมายเลขแบบทดสอบ

แบบทดสอบ

กลิ่นไม่พึงประสงค์ของเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาตาหวานพันธุ์หนึ่งหน้า

ครั้งที่..... วันที่.....

ชื่อ - สกุล



กลิ่น ไม่พึงประสงค์

น4. ตัวอย่างแบบทดสอบทางประสาทสัมผัสโดยใช้มาตราความชอบของน้ำผลไม้

หมายเลขแบบสอบถาม

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส

ชื่อ – สกุล วันที่

อายุ () 18-25 ปี () 26-34 ปี () 35-44 ปี
 () 45-59 ปี () 60 ปีขึ้นไป

คำชี้แจง กรุณาใส่หมายเลขคะแนนตามความพึงพอใจในตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกรของท่านมากที่สุด

9 คือ ชอบมากที่สุด 8 คือ ชอบมาก 7 คือ ชอบปานกลาง
 6 คือ ชอบเล็กน้อย 5 คือ ไม่สามารถบอกได้ว่าชอบหรือไม่ 4 คือ ไม่ชอบเล็กน้อย
 3 คือ ไม่ชอบปานกลาง 2 คือ ไม่ชอบมาก 1 คือ ไม่ชอบเลย

คุณลักษณะ	รหัส	รหัส	รหัส	รหัส
ลักษณะปรากฏ				
สี				
กลิ่น				
ความหนืด				
กลิ่นรส				
ความชอบโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

ขอขอบคุณทุกท่านเป็นอย่างสูงที่เสียสละเวลาในการตอบแบบทดสอบ

ฉ.5. ตัวอย่างแบบสำรวจความต้องการของผู้บริโภค

ลำดับที่	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
----------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท

คำชี้แจง แบบสอบถามนี้เป็นส่วนหนึ่งของการวิจัยเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสท ทุกคำตอบจะเป็นประโยชน์ในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารเสริมเจลาตินไฮโดรไลเสทต่อไป ขอขอบพระคุณที่ให้ความร่วมมือ

คำอธิบาย อาหารเสริมสุขภาพ คือ อาหารที่ให้ประโยชน์ต่อร่างกายนอกเหนือไปจากโภชนาการพื้นฐาน (อาหารหลัก 5 หมู่) โดยการเพิ่มคุณค่าของสารในอาหารให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

เจลาตินไฮโดรไลเสท คือ เปปไทด์ขนาดเล็กที่ได้จากการย่อยสลายคอลลาเจน ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง โรคแก่ก่อนวัย โรคเสื่อมสมรรถภาพของอวัยวะต่างๆ และยังมีส่วนช่วยเรื่องความแข็งแรงของข้อต่อกระดูก

ข้อมูลเกี่ยวกับพฤติกรรมผู้บริโภค

ใส่เครื่องหมาย ✓ ลงใน () หน้าข้อที่ท่านเลือก

- ท่านรู้จักผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพหรือไม่
 รู้จัก ไม่รู้จัก ไม่แน่ใจ
- ความถี่ในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ
 มากกว่า 3-7 / สัปดาห์
 1-2 ครั้ง / สัปดาห์
 1-3 ครั้ง / เดือน
 น้อยกว่า 1 ครั้ง / เดือน
- ท่านนิยมรับประทานผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพชนิดใดบ้าง
(เลือกตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)
 น้ำผลไม้สกัด เช่น พ룬สกัก เบอร์รี่สกัด รังนก
 โยเกิร์ต เช่น แอคทีเวีย ดัชชี บีทาเก้นท์ ธัญพืชอาหารเช้า (breakfast cereal)
 ชูปไก่สกัด เช่น แบรินค์ สก็อต น้ำผลไม้เสริมวิตามิน/ใยอาหาร
 ผลิตภัณฑ์นม เช่น แกลซีเมก ชูปเสริมคอลลาเจน
 ผลิตภัณฑ์ขงคิม เช่น ซาเจียว มอลด์สกัก ขนมปังเสริมใยอาหาร / ธัญพืช
 น้ำธัญพืช เช่น น้านมถั่วเหลือง น้ำข้าวงอก น้านมข้าว
 อื่น ๆ โปรดระบุ

สำหรับผู้เก็บข้อมูล

4. สาเหตุที่ท่านเลือกรับประทานผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (กรุณาเลือกตอบ 2 ข้อ)

- () เพื่อป้องกันโรค / เพื่อสุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์
 () เพื่อรักษาโรค () เพื่อชะลอความแก่
 () เพื่อความงาม () รสชาติดี
 () อื่น ๆ โปรดระบุ

5. ปัจจัยใดที่สำคัญต่อการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ

(เลือกตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)

- () จากการโฆษณาตามสื่อต่าง ๆ เช่น โทรทัศน์, วิทยุ, แมกกาซีน
 () เพื่อนแนะนำ
 () อิทธิพลของคนในครอบครัว
 () หนังสือ / ข้อมูลทางวิชาการ
 () รสชาติดี / ผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจ
 () มีความรู้ดีกว่าดีต่อสุขภาพ
 () การส่งเสริมการขาย เช่น ลดราคา, ของแถม
 () อินเทอร์เน็ต
 () อื่น ๆ โปรดระบุ

6. สาเหตุที่ท่านเลือกรับประทานอาหารเสริมสุขภาพที่เคยรับประทานมาแล้ว

(หากไม่เลือกรับประทานให้ข้ามไปตอบข้อต่อไป)

- () มีสินค้าใหม่ทดแทน
 () เบื่อ
 () รับประทานแล้วไม่รู้สึกรู้ชาติขึ้น
 () รสชาติไม่ดี
 () ไม่คุ้มเท่ากับราคาของผลิตภัณฑ์
 () อื่น ๆ โปรดระบุ

15. ผลิตภัณฑ์นมควรมีรสชาติใด (กรุณาเลือกตอบ 2 ข้อ)

- () ไม่แต่งกลิ่นรส () ช็อกโกแลต () วานิลลา
 () กาแฟ () ประเภทถั่ว/ธัญพืช
 () ผลไม้จำพวกเบอร์รี่ เช่น สตรอเบอร์รี่, เชอร์รี่, บลูเบอร์รี่, แครนเบอร์รี่
 () ผลไม้ตระกูลส้ม เช่น มะนาว, ส้มเขียวหวาน, ส้มโชกุน, ส้มวาเลนเซีย
 () ผลไม้เมืองร้อน เช่น มะละกอ, แดงโม, สับปะรด, กัญชง, มะม่วง
 () ผลไม้เมืองหนาว เช่น พีช, แอปเปิ้ล, กีวี

16. ไอศกรีมรสชาติใดที่ท่านคิดว่าควรเสริมเจลาตินไฮโดรไลส (กรุณาเลือกตอบ 2 ข้อ)

- () ไอศกรีมช็อกโกแลต () ไอศกรีมสตรอเบอร์รี่
 () ไอศกรีมกะทิ () ไอศกรีมวานิลลา
 () ไอศกรีมผสมธัญพืช เช่น ลูกเดือย, ถั่วแดง
 () ไอศกรีมเชอร์เบทผลไม้เมืองร้อน เช่น สับปะรด, ส้ม, มะม่วง, มะนาว
 () ไอศกรีมเชอร์เบทผลไม้เมืองหนาว เช่น พีช, แอปเปิ้ล, กีวี
 () ไอศกรีมเชอร์เบทเบอร์รี่ เช่น สตรอเบอร์รี่, เชอร์รี่, บลูเบอร์รี่, แครนเบอร์รี่

ฉ.6. ตัวอย่างใบชี้แจงข้อมูลและการแสดงความยินยอมเข้าร่วมการทดสอบทางประสาทสัมผัส

ใบชี้แจงข้อมูลและการแสดงความยินยอมเข้าร่วมการทดสอบทางประสาทสัมผัส ของผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อสุขภาพ

ใบยินยอมการเป็นอาสาสมัคร

(Consent form)

ในระหว่างวันที่ 13-26 สิงหาคม 2554 นี้ ท่านจะได้รับตัวอย่างน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพเพื่อทดสอบชิมจำนวน 1 ตัวอย่าง โดยจะใช้เวลาในการทดสอบชิมคิดเป็นเวลาไม่เกิน 20 นาที โดยประมาณ ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้เพื่อสุขภาพที่ท่านได้ทดสอบชิมนั้นเป็นผลิตภัณฑ์ที่ทางผู้จัดการทดสอบได้ผลิตขึ้นเองอย่างถูกสุขลักษณะ ท่านสามารถสอบถามรายละเอียดของการวิจัยครั้งนี้ได้จาก นางสาวสินีนาด สุขไกว ผู้วิจัย และถ้าท่านมีเหตุผลใด ๆ ที่ทำให้ท่านไม่อาจทดสอบชิมต่อได้ ท่านสามารถยกเลิกการทดสอบได้ทุกขณะที่ท่านต้องการ

ข้าพเจ้าได้รับข้อมูลตามที่ต้องการและยินดีเข้าร่วมการทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำผลไม้เพื่อสุขภาพ

ลงชื่อ

()

วันที่

4. สาเหตุที่ท่านเลือกรับประทานผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (กรุณาเลือกตอบ 2 ข้อ)
- () เพื่อป้องกันโรค / เพื่อสุขภาพที่แข็งแรงสมบูรณ์
- () เพื่อรักษาโรค () เพื่อชะลอความแก่
- () เพื่อความงาม () รสชาติดี
- () อื่น ๆ โปรดระบุ
5. ปัจจัยใดที่สำคัญต่อการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (เลือกตอบได้มากกว่า 1 ข้อ)
- () จากการโฆษณาตามสื่อต่าง ๆ เช่น โทรทัศน์, วิทยุ, แมกกาซีน
- () เพื่อนแนะนำ
- () อิทธิพลของคนในครอบครัว
- () หนังสือ / ข้อมูลทางวิชาการ
- () รสชาติดี / ผลิตภัณฑ์ที่น่าสนใจ
- () มีความรู้สึกที่ดีต่อสุขภาพ
- () การส่งเสริมการขาย เช่น ลดราคา, ของแถม
- () อินเทอร์เน็ต
- () อื่น ๆ โปรดระบุ
6. ความถี่ในการบริโภคน้ำผัก/ผลไม้
- () ทุกวัน
- () 4-6 ครั้งต่อสัปดาห์
- () 1-3 ครั้ง / สัปดาห์
- () 1-3 ครั้ง / เดือน
- () น้อยกว่า 1 ครั้ง / เดือน
7. ชนิดของน้ำผัก/ผลไม้ที่ท่านนิยมบริโภค
- () มังคุด () บัว () สับปะรด
- () กะล่ำ () มะขาม () ทับทิม
- () แก้วมังกร () มะม่วง () เสาวรส
- () ส้ม () มะนาว () ฝรั่ง
- () แอปเปิ้ล () กีวี () พีช
- () องุ่น () แคนตาลูป () แพลชั่นฟรุต
- () จำพวกเบอร์รี่ เช่น สตอร์เบอร์รี่, เชอร์รี่, บลูเบอร์รี่, แคนเบอร์รี่
- () แครอท () ฟักทอง () มะเขือเทศ
- () มันแกว () แตงกวา () บัทรูท
- () บล๊อคเคอรี่ () อื่น ๆ โปรดระบุ

8. ท่านรู้จักหรือเคยบริโภคผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่เสริมคอลลาเจน, เจลาติน, เจลาติน-ไฮโดรไลเสทหรือไม่ (เช่น กิฟฟารีนอะบาโลนคอลลาเจนผสมน้ำทับทิม)
() เคย (ทำต่อข้อ 9) () ไม่เคย

การยอมรับผลิตภัณฑ์น้ำส้มผสมเบอร์รี่เพื่อสุขภาพ

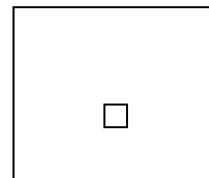
กรุณาพิจารณาและชิมตัวอย่างน้ำส้มผสมเบอร์รี่เพื่อสุขภาพและใส่เครื่องหมาย ✓ ตามระดับความชอบต่อตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่ใกล้เคียงกับความรู้สึของท่านมากที่สุด

ระดับความชอบ ปัจจัย	ไม่ชอบมากที่สุด	ไม่ชอบมาก	ไม่ชอบปานกลาง	ไม่ชอบเล็กน้อย	บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่	ชอบเล็กน้อย	ชอบปานกลาง	ชอบมาก	ชอบมากที่สุด
1. ลักษณะปรากฏ									
2. กลิ่น									
3. ความหนืด									
4. รสชาติ									
5. ความชอบรวม									

1. หากมีน้ำส้มผสมเบอร์รี่ที่ท่านชิมนี้จำหน่ายในท้องตลาดท่านจะซื้อหรือไม่
() ซื้อแน่นอน () อาจจะซื้อ () อาจจะซื้อหรือไม่ซื้อ
() อาจจะไม่ซื้อ () ไม่ซื้อแน่นอน

2. หากทราบว่าน้ำส้มผสมเบอร์รี่ดังกล่าวมีการเสริมเจลาตินไฮโดรไลเซตซึ่งเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กที่ได้จากการย่อยสลายคอลลาเจน ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของโรคมะเร็ง โรคแก่ก่อนวัย โรคเสื่อมสมรรถภาพของอวัยวะต่างๆ และยังมีส่วนช่วยเรื่องความแข็งแรงของข้อต่อกระดูกท่านจะซื้อหรือไม่

- () ซื้อแน่นอน () อาจจะซื้อ () อาจจะซื้อหรือไม่ซื้อ
 () อาจจะไม่ซื้อ () ไม่ซื้อแน่นอน



ข้อมูลเชิงประชากรศาสตร์

1. เพศ
 - () ชาย
 - () หญิง
2. ศาสนา
 - () พุทธ
 - () คริสต์
 - () อื่น ๆ โปรดระบุ.....
3. อายุ
 - () 18-25 ปี
 - () 26-34 ปี
 - () 35-44 ปี
 - () 45-59 ปี
 - () 60 ปีขึ้นไป
4. การศึกษา
 - () ต่ำกว่าประถมศึกษา
 - () ประถมศึกษา
 - () ปวช. / ปวส. / มัธยมศึกษา
 - () อนุปริญญา หรือ เทียบเท่า
 - () ปริญญาตรี
 - () สูงกว่าปริญญาตรี
5. อาชีพ
 - () นักเรียน / นิสิต / นักศึกษา
 - () พ่อบ้าน / แม่บ้าน
 - () ข้าราชการ / รัฐวิสาหกิจ
 - () ค้าขาย / ธุรกิจส่วนตัว
 - () พนักงานบริษัทเอกชน
 - () รับจ้าง
 - () อื่น ๆ โปรดระบุ.....
6. รายได้ของครอบครัวต่อเดือน
 - () น้อยกว่า 10,000 บาท
 - () 10,000 – 30,000 บาท
 - () 30,001 – 50,000 บาท
 - () มากกว่า 50,000 บาท
7. จำนวนสมาชิกในครอบครัว (นับรวมตัวท่านด้วย)
 - () 1 คน
 - () 2 คน
 - () 3 คน
 - () 4 คนขึ้นไป

