เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลาทับทิม

ปลาทับทิม หรือปลานิลแดง (Nile tilapia) เป็นปลาที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างปลานิล (*Oreochromis niloticus*) และปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) นักวิชาการประจำสถานีประมง จังหวัดอุบลราชธานี ได้เริ่มศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับปลานิลสีแดงในปี พ.ศ. 2511 โดยคัดเลือกลูกปลานิลที่มีสีแดงมาศึกษาและปรับปรุงพันธุ์ จนได้เป็นปลานิลสีแดงสายพันธุ์ไทยชื่อ "ปลานิลแดง" ซึ่งสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี เป็นผู้ทรงประทานชื่อให้ในปี พ.ศ. 2527 (พรรณศรี จิริโมภาส, 2531, หน้า 41-43)

การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ปลาทับทิมโดยนักวิชาการได้มีการศึกษากันมาอย่างต่อเนื่องทั้งในประเทศและต่างประเทศ จนกระทั่งบริษัทกรุงเทพฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จำกัด บริษัทในเครือเจริญโภคภัณฑ์ ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ปลาทับทิมขึ้นใหม่โดยใช้ปลานิลแดงสายพันธุ์ฟลอริดา (Red-florida) จากประเทศสหรัฐอเมริกา อิสราเอล และไต้หวัน มาผสมกับปลานิลแดงสายพันธุ์จิตรลดา ปลาลูกผสมที่ได้เจริญเติบโตเร็ว เลี้ยงได้ทั้งในน้ำกร่อยและน้ำจืด เนื้อปลาดิบมีสีชมพูเรื่อ เมื่อสุกเนื้อจะมีสีขาว ปุย เนื้อนุ่ม โดยชื่อ "ปลาทับทิม" เป็นชื่อได้รับพระราชทานจากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 22 มกราคม พ.ศ. 2541 (อำนวย พรานเบ็ด, 2543)

คุณค่าทางโภชนาการของปลาทับทิม

จากคุณค่าทางโภชนาการรวมถึงสีสันของปลาทับทิมที่น่ารับประทาน ทำให้การบริโภคปลาทับทิมภายในประเทศได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น เนื่องจากปลาทับทิมมีรสชาติดี และมีเนื้อที่ดีกว่าปลานิลแดงและปลานิลธรรมดา มีเนื้อสีขาวเหมือนปลากะพง ผู้จัดอาหารโต๊ะจีนและภัตตาคารต่าง ๆ จึงนิยมใช้ปลาทับทิมแทนปลากะพง (ทอม, 2540 อ้างอิงใน พาขวัญ ทองรักษ์, 2546)

บริษัทกรุงเทพฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จำกัด (2542) ได้แบ่งการตลาดของปลาทับทิมออกเป็น 2 กลุ่ม คือตลาดภายในประเทศ โดยวางจำหน่ายปลาทับทิมตามซุปเปอร์มาร์เก็ต (supermarket) ร้านอาหาร โรงแรม ภัตตาคาร และโต๊ะจีน โดยจะเน้นที่ตลาดระดับกลางถึงระดับบน ตลาดต่างประเทศ ทางบริษัทฯ จะเป็นผู้จัดส่งเอง ซึ่งจะส่งไปในรูปของการแล่เนื้อและปลาทั้งตัว ตลาดปลาทับทิมไทยมีคู่แข่งสำคัญคือ มาเลเซีย สำหรับตลาดในต่างประเทศที่สำคัญได้แก่ ประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งเป็นตลาดอันดับหนึ่ง ประเทศอื่นๆ ได้แก่ ออสเตรเลีย ฮ่องกง

ไต้หวัน และสิงคโปร์ ซึ่งนิยมบริโภคปลาเนื้อขาว นอกจากนี้ยังมีการส่งออกไปยังประเทศแคนาดา อิตาลี และตะวันออกกลางในรูปปลาทั้งตัว ทั้งยังนำไปแปรรูปเป็นปลาดิบซาชิมิ ปลาชุบแป้งทอด ปลาแล่แช่แข็งส่งไปประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และยุโรป

ปลาเกิดการเน่าเสียได้เร็วมาก การเน่าเสียเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (autolysis) การรวมตัวกับออกซิเจนของไขมัน ทำให้เกิดกลิ่นหืน และการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527; Dalgaard, Gram and Huss, 1993 อ้างอิงใน เนตรนรินทร์ ขุนสูงเนิน, 2546, หน้า 4) ภายหลังจากปลาตายใหม่ๆ จะเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ระยะนี้มีความสำคัญมาก เนื่องจากเป็นระยะที่ยังไม่เกิดการสลายตัวของโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนโดยเอนไซม์ของปลาเอง และจุลินทรีย์ยังไม่สามารถใช้เนื้อปลาเป็นอาหารได้ ดังนั้นถ้าเรายืดช่วงระยะนี้ให้ยาวออกไป ก็จะทำให้ปลามีอายุการเก็บนานขึ้น และอายุการเก็บรักษาจะเพิ่มมากขึ้นถ้าปลาไม่มีการสูญเสียกำลังมากในขณะถูกจับ และการขนส่งปลาทำด้วยความระมัดระวัง (สุมาลี เหลืองสกุล, 2527; Farber, 1991; Fraser and Sumar, 1998) และหลังจากผ่านระยะการเกร็งตัวแล้วเอนไซม์ที่มีอยู่ภายในตัวปลาและเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ย่อยสลายองค์ประกอบของเนื้อปลาและผลิตสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ซึ่งก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่า นอกจากนี้การย่อยสลายโปรตีนในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (putrefaciens) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารประกอบที่ระเหยและก่อให้เกิดกลิ่นเหม็นเน่าได้เช่นกัน เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulphide) เมทิลเมอแคปแทน (methylmercaptan) อินโดล (indole) เอมีน (amine) และแอมโมเนีย (ammonia) ซึ่งการเน่าเสียแบบนี้มักมีสาเหตุจาก *Clostridium* sp. หลายชนิด และแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญเล็กน้อย (facultative bacteria) เช่น *Pseudomonas* sp., *Alcaligenas* และ *Proteus* บางชนิด (Fraser and Sumar, 1998; Gray, Hoover, and Mur, 1983; Manzano-mazorra, et al., 2000) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหลังการจับและหลังจากปลาตาย ขึ้นกับความเข้มข้นของสารประกอบ ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึม และปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzymes)

พิชญา ชินอุปราวัฒน์ (2539) ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนหัวและก้างปลาดุกบิ๊กอุยกับน้ำกลั่นและปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยตัวเอง พบว่าอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยตัวเอง คือ อัตราส่วนหัวและก้างต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:1 ย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อยนาน 2 ชั่วโมง ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 7 ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้ 3.09 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของปลา

จุลินทรีย์ทั่วไป (microflora)

ปลาสดสามารถที่จะปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ทั่วไป (microflora) ในส่วนต่างๆ ได้ เช่น ลำไส้ เนื้อ ผิวหนัง พบว่าจุลินทรีย์ที่แยกออกมาได้จากลำไส้เล็กและผิวหนังปลาส่วนใหญ่ คือ *Pseudomonas* และ *Acinetobacter* (60% isolates) และ *Corynebacterium*, *Flavobacterium* และ M*icrococcus* (20% isolates) และเมือกของปลาจะมีแบคทีเรียพวก *Pseudomonas*, *Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium, Corynebacterium, Saricina, Serratia, Vibrio* และ *Bacillus* และมักพบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวปลามักจะเป็นชนิดเดียวกับที่มีอยู่ในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ ซึ่งจำนวนและชนิดของ microflora จะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมที่ปลาอาศัยอยู่ คุณภาพของน้ำ และพันธุ์ปลา (Ray, 1996) เช่น แบคทีเรียที่อยู่บนตัวปลาที่อาศัยอยู่ในเขตหนาวก็จะเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) ปลาที่อยู่ในเขตน้ำอุ่นจะเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophile) และถ้าเป็นปลาน้ำเค็มก็จะพบแบคทีเรียพวก *Aeromonas, Lactobacillus, Brevibacterium, Alcaligenes* และ *Streptococcus* ซึ่งแบคทีเรียที่พบในเหงือกและผิวหนังของปลาจะมีจำนวนตั้งแต่ 10^3 ถึง 10^5 cfu/g (Ashie, Smith and Simpson, 1996; Fraber, et al., 1990; Molin, Stenstrom and Ternstrom, 1983)

จุลินทรีย์ก่อโรคทั่วไป (pathogen flora)

แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) ที่ปนเปื้อนในปลา เช่น *Vibrio parahaemolyticus, V. vulnificus, Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophilla, Yersinia enterocoltica, Clostridium perfringens* และ *C. botulinum* (Fraser and Sumar, 1998) ซึ่งการเจริญและกิจกรรม (activity) ของแบคทีเรียก่อโรคในปลาจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและสุขลักษณะในการเก็บรักษา พบว่าการเก็บรักษาปลาไว้ที่อุณหภูมิน้อยกว่า 1 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา การเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์ก่อโรคเหล่านี้จะถูกยับยั้ง ส่วนใหญ่ปลาและอาหารทะเลมักจำเป็นต้องพิจารณาถึงความปลอดภัยจากการเจริญและการสร้างสารพิษจากแบคทีเรียที่ไม่สามารถย่อยสลายโปรตีน (non-proteolytic) ของ *C. botulinum* โดยเฉพาะสายพันธุ์ E (Church and Parsons, 1995) เพราะสารพิษที่ผลิตขึ้นก่อให้เกิดอันตรายต่อระบบประสาท (neuroparalytic disease) และ *V. parahaemolyticus* ยังเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในลำไส้และระบบทางเดินอาหาร (gastroenteritis) นอกจากนี้ในระหว่างการเก็บรักษาและขนส่ง ปลาอาจมีการปนเปื้อนกับแบคทีเรียก่อโรคอื่นๆ เช่น *Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* (Parry, 1993; Richter and Banwart, 1983)

ลักษณะการเน่าเสียของปลา

โดยปกติการเน่าเสียของปลาจะเริ่มต้นที่ การสูญเสียกลิ่นรสที่บ่งบอกถึงความสดของปลา (fresh fish flavor) หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเกิดเป็นกลิ่นรสที่ผิดปกติขึ้น (off-flavor) เช่น กลิ่นเหม็นเน่า กลิ่นคาวปลา รวมทั้งสารประกอบที่ระเหยได้ต่างๆ พบว่าส่วนของลำไส้ ระบบทางเดินอาหารของปลา และเหงือกเป็นส่วนที่ไวต่อการเน่าเสียมากที่สุด ส่วนใหญ่แล้วจะเกิดจากการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรียร่วมกับเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzyme) ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่อการเน่าเสียของปลา แสดงในตาราง 1

ตาราง 1 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของปลา

จุลินทรีย์ทั่วไป	จุลินทรีย์ก่อโรค	จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย
Pseudomonas	*Vibrio paraheamolyticus*	*Pseudomonas*
Acinetobacter	*Listeria monocytogenes*	*Acinetobacter*
Corynebacterium	*Aeromonas hydrophilla*	*Moraxella*
Micrococcus	*Clostridium perfringens*	*Alcaligenes*
Flavobacterium	*C. botulinum*	

ที่มา: Fraser and Sumar, 1998

การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือจากปลา

จากอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำที่มีการขยายตัวมากขึ้นนี้ ทำให้ปริมาณการบริโภคสัตว์น้ำทั้งภายในประเทศและการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศมีปริมาณสูงขึ้นตามไปด้วย และเนื่องจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมเหล่านี้ ปัญหาที่ตามมาก็คือ ปัญหาของการจัดการเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูป แต่เดิมนั้นจะนำเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาแนวทางในการนำเศษเหลือใช้มาทำให้เกิดประโยชน์ และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่เศษเหลือเหล่านี้ โดยการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้แก่

1. เจลาติน (gelatin) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหนังและกระดูกปลา สามารถนำเจลาตินมาใช้กับอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมอาหาร หรืออุตสาหกรรมยา เป็นต้น (ฤทัยรัตน์ หวานฉ่ำ, 2547, หน้า 6)

2. ปลาป่น (fish meal) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการกำจัดน้ำและไขมันออกจากปลาหรือเศษเหลือจากปลา โดยวิธีการบีบอัดหรือปั่นเหวี่ยงเอาส่วนของน้ำและไขมันออกไป ทำให้ปลาป่นที่ได้มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) วิตามิน (vitamin) และเกลือแร่ (mineral) ในปริมาณสูง แต่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนัก ส่วนใหญ่จะนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ (Hall and Ahmad, 1992)

3. ปลาหมัก (fish silage) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเนื้อหรือเศษเหลือจากปลาโดยการเติมกรดอินทรีย์ (organic acid) หรือกรดอนินทรีย์ (inorganic acid) เพื่อเป็นการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และเป็นการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่อยู่ตามธรรมชาติในตัวปลาเอง เช่น เปปซิน ทริปซิน หรือคาเทปซิน เป็นต้น มีผลทำให้เนื้อปลาเกิดการย่อยสลาย ซึ่งเป็นการย่อยสลายที่ไม่สามารถควบคุมการเกิดปฏิกิริยาได้ ทำให้ได้เปปไทด์ขนาดเล็กหลายชนิด และกรดอะมิโนอิสระ (Hall and Ahmad, 1992; Gildberg, 1993) นิยมนำผลิตภัณฑ์ปลาหมักนี้มาผลิตเป็นอาหารสัตว์

4. โปรตีนปลาสกัด (fish protein isolate) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแยกโปรตีนออกจากปลาหรือเศษเหลือจากปลาโดยอาศัยสมบัติการละลายของโปรตีน โดยคุณภาพของโปรตีนปลาสกัดนี้จะขึ้นอยู่กับคุณภาพวัตถุดิบ แต่เดิมนั้นมีการนำโปรตีนปลาสกัดนี้มาใช้เป็นอาหารสัตว์ ต่อมาจึงได้มีการวิจัยพัฒนานำโปรตีนปลาสกัดมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ลูกชิ้นปลา แฮมเบอร์เกอร์ บะหมี่ เป็นต้น (ฤทัยรัตน์ หวานฉ่ำ, 2547, หน้า 7)

5. โปรตีนปลาเข้มข้น (fish protein concentrate) เป็นโปรตีนที่ได้จากการนำเนื้อหรือเศษเหลือจากปลามาล้างด้วยน้ำเพื่อแยกส่วนของเลือด ไขมัน สารให้กลิ่นรสออกไป จากนั้นนำมาสกัดเอาไขมันออกและสารให้กลิ่นรสที่เหลือออกโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เช่น เอทานอล (ethanol) เฮกเซน (hexane) เอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) หรือไอโซโพรพานอล (isopropanol)_ เป็นต้น หลังจากกำจัดตัวทำละลายออกไปแล้ว นำไปทำแห้งโดยวิธีการบดเป็นผงละเอียด โปรตีนปลาเข้มข้นมีอยู่หลายชนิด เช่น ชนิดเอ มีลักษณะคือไม่มีกลิ่นรส มีไขมัน ไม่เกินกว่าร้อยละ 0.75 ชนิดบี มีลักษณะเป็นผงไม่กำจัดกลิ่น มีไขมันเกินกว่าร้อยละ 3 และชนิดซี มีลักษณะ เป็นปลาป่นทั่วไปในสภาพที่ถูกหลักอนามัย มีการนำโปรตีนปลาเข้มข้นชนิดเอและบีไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารหลายชนิด เช่น พาสต้า ขนมปัง ซุป เป็นต้น แต่พบว่าจะไม่เติมในระดับที่สูงมากนักเพราะมีคุณสมบัติบางประการที่ไม่ดีมาก เช่น คุณสมบัติการละลาย (solubility properties) คุณสมบัติการพองตัว (Hall and Ahmad, 1992) ได้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนโดย Tannenbaum, et al. (1970)

ศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอสหลายชนิดมาทำการย่อยเนื้อปลา red hake เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติการละลาย พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์โปรเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ได้จาก *Streptomyces griseus* มาย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักเนื้อปลา) ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.5 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะให้โปรตีนปลาเข้มข้นที่มีการละลายสูงถึงร้อยละ 94

6. โปรตีนปลาไฮโดรไลเซท / เปปโตน (fish protein hydrolysate / peptone) เป็นผลิตภัณฑ์ของผสมของเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนบริเวณพันธะเปปไทด์ (peptide bond) ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์โปรติเอส ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่บางประการของโปรตีน เช่น คุณสมบัติการละลาย คุณสมบัติการเกิดอิมัลชัน (emulsion properties) และคุณสมบัติการเกิดโฟม / ฟอง (foaming properties) เป็นต้น (Vojdari and Whitaker, 1994)

โปรตีนไฮโดรไลเซท เริ่มผลิตในเชิงการค้าในปี 1990 ที่ประเทศจีนและญี่ปุ่น วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตได้แก่ กลูเตนข้าวสาลี เคซีน (casein) แป้งปลา (fish flour) เจลาติน ยีสต์ และกลูเตนข้าวโพด เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร กลิ่นรสที่ได้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้น (สุปราณี แย้มพราย, 2539, หน้า 7)

จุดประสงค์หลักของการย่อยสลายโปรตีนปลาด้วยเอนไซม์คือ เพื่อให้ได้โปรตีนปลาเข้มข้นที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีเหมาะสมต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ความคงตัว กลิ่นรส ดังนั้นจึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายที่เหมาะสม ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ เวลา ความเข้มข้นของสับสเตรท และเอนไซม์ เป็นต้น มีรายงานการใช้แอซิดโปรติเอส (acid protease) และอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อทิศทางในการย่อยสลาย โดยเอนไซม์ที่เป็นเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะเริ่มทำการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากด้านใน ส่วนเอกโซเปปดิเดส (exopeptidase) จะเริ่มย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายสายมาก่อน (Adler-Nissen, 1986)

พิชญา ชินอุปราวัฒน์ (2539) กล่าวว่าการนำเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปปลามาใช้ให้เกิดประโยชน์ ควรส่งเสริมและพัฒนา เพราะนอกจากจะเป็นการคิดค้นผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ แล้วยังเป็นการช่วยลดมลพิษให้กับสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่ง ในวงการอุตสาหกรรมอาหารปัจจุบันมีการนำสิ่งเหลือใช้จากกระบวนการผลิตปลามาใช้ให้เกิดประโยชน์หลายวิธี เช่น การนำน้ำที่ได้จากการนึ่งปลาแซลมอลเพื่อบรรจุกระป๋องมาผลิตเป็นเปปโตน (Afolabi, Oka and Umoh,

1980) นอกจากนี้ หัว กระดูก และครีบปลาถูกนำมาผลิตเปปโตนเพื่อใช้เป็นแหล่งให้ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (Jissim, Salt and Stretton, 1988)

Wang, Wang and Chio (2006) รายงานว่าส่วนหัว เปลือก และหางของกุ้งถูกกำจัดระหว่างกระบวนการผลิต และมีประมาณร้อยละ 50 ของกุ้งที่จับได้ ดังนั้นการผลิตที่เพิ่มขึ้นทำให้ส่วนของกุ้งเป็นปัญหากับสิ่งแวดล้อม ไม่สามารถควบคุมการทิ้งได้ He, et al. (2006) จึงใช้ประโยชน์จากไคติน และองค์ประกอบของโปรตีนในเปลือกกุ้งเหลือทิ้ง ซึ่งวิธีดั้งเดิมนั้นจะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการย่อยสิ่งเหล่านี้ ปัจจุบันใช้วิธีทางชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ที่ผลิตโปรติเอสหรือเอนไซม์ย่อยโปรตีน เพื่อสามารถนำโปรตีนกลับมาใช้ใหม่ (Gagne and Simpson, 1993; Oh, et al., 2000 อ้างอิงใน สิรินภา ช่วงโอภาส, 2550, หน้า 14-15)

การย่อยสลายโปรตีน

การย่อยสลายโปรตีนมี 3 วิธีหลักๆ ดังนี้

1. **การย่อยด้วยกรด** (Acid hydrolysis)

กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เป็นกรดตัวแรกที่ใช้ในการย่อยโปรตีน ต่อมาจึงมีการนำกรดไฮโดรคลอริก (HCl) มาใช้จนถึงปัจจุบันยังคงใช้กรดไฮโดรคลอริกอยู่เพราะมีความสามารถในการทำให้พันธะเปปไทด์แตกออกได้มากกว่ากรดซัลฟูริกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน กรดที่มักใช้เป็นกรดที่มีความเข้มข้นสูงและใช้ความร้อนช่วยขณะที่ย่อย (reflux) นอกจากนี้ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกที่มากเกินนั้นสามารถกำจัดออกได้ง่ายโดยการระเหย (evaporation) ปัญหาที่สำคัญในการย่อยโปรตีนด้วยกรดคือ การเกิดตะกอนสีดำ (black humin) ในระหว่างกระบวนการย่อยซึ่งเป็นผลมาจากการรวมตัวระหว่างกรดอะมิโนบางชนิดได้แก่ ทริปโตเฟน และซิสเตอีน การทำลายจะเกิดมากน้อยเท่าใดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโปรตีน อุณหภูมิ ระยะเวลาในการย่อย และความเข้มข้นของโปรตีนที่ใช้ในการย่อย (วรพงษ์ อัศวเกศมณี, 2538 อ้างอิงใน วิชชุลดา ช่วยฉิม, 2544, หน้า 7)

2. **การย่อยด้วยด่าง** (Alkaline hydrolysis)

การใช้ด่างย่อยโปรตีนโดยปกติจะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) หรือใช้แบเรียมไฮดรอกไซด์ ($Ba(OH)_2$) เข้มข้นและใช้ความร้อนช่วยในการย่อยสลาย ถึงแม้ว่าการใช้ด่างในการย่อยโปรตีนจะมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1983 แล้วก็ตาม แต่การใช้งานยังอยู่ในวงจำกัดและมีกฎเกณฑ์เฉพาะ เนื่องจากด่างจะทำลายกรดอะมิโนบางชนิดคือ อาร์จีนีน ซีรีน ทรีโอนีน ซีสตีน และซีสเตอีน เป็นต้น (Bailey, 1967 อ้างอิงใน วิชชุลดา ช่วยฉิม, 2544, หน้า 7)

3. **การย่อยด้วยเอนไซม์** (Enzyme hydrolysis)

ปัจจุบันการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์มีมากขึ้น และข้อจำกัดของการใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ คือ มีต้นทุนการผลิตที่สูง (วุฒิพจน์ ศุภวิริยากร, 2548) จึงมีการนำเอนไซม์โปรติโอไลติก มาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ได้แก่ เปปซิน ทริปซิน ปาเปน โบรมิเลน เป็นต้น เอนไซม์จากแบคทีเรีย เช่น เอนไซม์จาก *Bacillus subtilis* และเอนไซม์จากรา เช่น เอนไซม์จาก *Aspergillus oryzae* เป็นต้น โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่าการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนจะดีกว่าการใช้กรดหรือด่าง เนื่องจากเอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแต่ละชนิดจับกันโดยไม่ทำลายกรดอะมิโน

การย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ควรคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ หลายประการประกอบกัน ได้แก่ ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นสับสเตรท รวมทั้งพันธะที่ถูกย่อย เช่น ถ้าพันธะที่ถูกย่อยอยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดใหญ่ ผลของกระบวนการย่อยอาจทำให้ได้โพลีเปปไทด์ (polypeptide) หรือโปรตีนยังคงมีขนาดใหญ่ แต่จะได้กรดอะมิโนที่ต้องการในปริมาณน้อย สำหรับขนาดของโมเลกุลนั้นถ้ามีขนาดใหญ่มากและเอนไซม์ที่ใช้ไม่ใช่เอนไซม์ที่ตัดพันธะของกรดอะมิโน ดังนั้นโอกาสที่จะได้กรดอะมิโนก็จะน้อยกว่าการย่อยโปรตีนที่มีโมเลกุลเล็กหรือเปปไทด์สายสั้นๆ (Mohr, 1978)

Quagia and Orban (1987) ใช้เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) ย่อยเนื้อปลาซาร์ดีนที่สกัดไขมันออกแล้ว โดยใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรทที่ต่างกัน ทำการควบคุมระดับการย่อยสลายให้เท่ากับร้อยละ 5, 10, 15 และ 20 นำมาทดสอบการละลายที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2 และ 5 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทปลามีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000 ถึง 3,000 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ขึ้น พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้จะมีสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1,000 ในปริมาณที่สูงขึ้น ต่อมาในปี 1992 Yu and Tan ได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อยสลายที่มีต่อคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาโดยใช้ปลา *Orechromis mossambicus* เป็นวัตถุดิบ และใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ที่ 0.6 Anson unit ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ในช่วงร้อยละ 0.5 ถึง 2.0 พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 ของน้ำหนักเนื้อปลา และใช้เวลาย่อยสลายตั้งแต่ 25 ถึง 350 นาที จะทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่มีร้อยละของไนโตรเจนสูงที่สุด พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ทำแห้งแล้วประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 90.1 เถ้าร้อยละ 6.2 และไขมันร้อยละ 0.5 เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นใน

โปรตีนไฮโดรไลเซทปลา ไข่ และเนื้อปลาพบว่ามีค่าร้อยละ 51.1, 51.6 และ 50.4 ของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดตามลำดับ

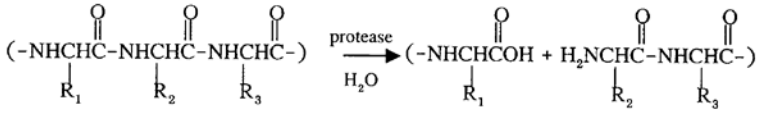
Quaglia and Orban (1990) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยสลายปลาซาร์ดีนที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 5 จะให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (emulsion) ดีที่สุด และดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมเคซีเนทที่ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ทางการค้า เมื่อตรวจสอบค่า surface hydrophobicity (S_0) ด้วยเครื่อง fluorescence spectrometer พบว่ามีค่า S_0 สูง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีกรดอะมิโนปลายสายประเภทที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) อยู่มาก

สีวิกา กิจสวัสดิ์ (2548) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 3 ชนิด พบว่าเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์ออไซม์เอฟพีดี (allzyme FPD) และเอนไซม์โบรมิเลน (bromelain) มีสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานที่ความเป็นกรด-ด่าง 6 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การคัดเลือกเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดในการย่อยสลายโปรตีนจากเลือดสุกร พบว่าเอนไซม์อัลคาเลส 2.4L มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุด โดยให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 43.49 และให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 4.19 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนจากเลือดสุกร คือใช้ปริมาณโปรตีนร้อยละ 2 เอนไซม์อัลคาเลส 2.4L 30 ยูนิต ย่อยสลายเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง โดยให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 48.15 การทดสอบคุณสมบัติการเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทมีลักษณะในการยับยั้งแบคทีเรียในช่วงแคบ โดยยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก คือ *B. cereus* TISTR 008, *B. pumilus* TISTR 908 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และนอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซทยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยมีกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 94.65 ซึ่งเทียบเท่ากับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ 2 ชนิด คือ บิวทีเลทไฮดรอกซีอานีโซล (Butylated hydroxyl anisol : BHA) ซึ่งมีกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 84.33 และบิวทีเลท ไฮดรอกซีโทลีน (Butylated hydroxyl toluene : BHT) มีกิจกรรมการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 89.52 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.02

เอนไซม์โปรติโอไลติก

เอนไซม์โปรติโอไลติกเป็นเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase group, E.C 3.4) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยย่อยสลาย (hydrolyse) พันธะเปปไทด์ของโปรตีน มีลักษณะการตัดสายโพลิเปปไทด์ คือ ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนได้เปปไทด์สายสั้นๆ และการย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีนได้กรดอะมิโน เอนไซม์โปรติโอไลติกมีจำนวนทั้งหมด 39 ชนิด เช่น เอนไซม์เปปซิน เอนไซม์ทริปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในร่างกาย เป็นต้น นอกจากนี้แหล่งของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่ได้จากพืช เช่น เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์ฟิกซิน (ficin) เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์ เช่น เอนไซม์ไคโมทริปซิน เอ (chymotrypsin A) จากตับอ่อนของหมู เป็นต้น เอนไซม์สเตร็ปโตคอคคัสโปรติเอส (*Streptococcus protease*) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดส่วนใหญ่มีความคงตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

เอนไซม์โปรติโอไลติกมีชื่อสามัญหลายชื่อได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรติเอส (protease) โปรติเนส (protenase) และเปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolase) มีลักษณะปฏิกิริยาคือ การสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ ดังปฏิกิริยาในภาพ 1



R1, R2, R3 = side chains of amino acids

ภาพ 1 การสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก

ที่มา: McMurry, 1994

เอนไซม์โปรติโอไลติกเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารดังแสดงในตาราง 2 ในการจัดจำแนกชนิดของเอนไซม์ สามารถแบ่งได้ตามแหล่งที่สร้าง เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ถ้ามาจากจุลินทรีย์ต้องเป็นจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดโรค และได้รับการยอมรับจาก FAO/WHO (Novo Industri, 1984 อ้างอิงใน สีวิกา กิจสวัสดิ์, 2548, หน้า 8) และเมื่อแบ่งตามตำแหน่งที่เอนไซม์ที่เข้าทำปฏิกิริยา จะแบ่งได้ 2 ประเภท คือ เอกโซโปรติเอส (exoprotease) จะย่อยพันธะเปปไทด์ตรงปลาย N-terminal และ C-terminal ของสายเปปไทด์เข้ามาให้เป็นกรดอะมิโน เอนไซม์ในกลุ่มนี้มีทั้งอินตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (intracellular enzymes) และเอกตราเซลลูลาร์เอนไซม์ (extracellular

enzymes) และอีกประเภทคือเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จะย่อยพันธะเปปไทด์ภายในสายโพลีเปปไทด์แบบสุ่มหรือแบบจำเพาะจนกระทั่งได้เปปไทด์เป็นสายสั้นๆ

ตาราง 2 ตัวอย่างเอนไซม์โปรติโอไลติกจากพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ที่ใช้ในอาหาร

Type of protease	Name	Source	pH-range	Preferential specificity[a]
Serine protease				
Animal	Trypsin	Porcine, bovine	7 - 9	P1:lysine, arginine
	Chymotrypsin,		8 - 9	P1:phenylalanine,
	Elastase			tyrosine, tryptophan
Bacterial	Subtilisin Carlsberg,	*Bacillus licheniformis*	6 - 8	P1:alanine
	Alcalase[b]	*B. amyloliquefaciens*	6 - 10	Broad specificity, P1
	Substilisin BPN,			mainly
	Substilisin Novo			hydrophobic amino acid
Cysteine protease				
Plant	Papain	Papaya latex	5 - 8	Broad specificity, mainly
	Bromelain	Pineapple stem	5 - 8	P2:hydrophobic amino
	Ficin	Ficus late	5 - 8	acid
Aspartic protease				
Animal	Pepsin	Porcine, bovine	1 - 4	P1 and P'1:Mainly
				hydrophobic amino acid
	Chymosin	Calf	4 - 6	P1 and P'1:Mainly
				hydrophobic amino acid
Fungal	Chymosin-like	*Mucor pusillus*,	4 - 6	P1 and P'1:Mainly
		M. miehei,		hydrophobic amino acid
	Aspergillopeptidase A	*Endothia parasitica*	2 - 5	Preferably glutamic acid,
		Aspergillus saitoi		aspartic acid, leucine
	Neulase	*Rhizopus* sp.	3 - 6	Like pepsin

ตาราง 2 (ต่อ)

Type of protease	Name	Source	pH-range	Preferential specificity[a]
Metallo protease				
Animal	Carboxy peptidase A	Pancrease	7 - 8	Terminal amino acid at C-terminus of peptide, except proline, arginine, lysine
Bacterial	Neutral protease, Neutraseb	*B. amyloliquefaciens*	5 - 7	P'1:phenylalanine, leucine, valine
	Neutral protease, Thermolysin	*B. thermoproteolyticus*	7 - 9	P'1:isoleucine, leucine, valine, phenylalanine
Mixture of lysozyme, papain, chymopapain	Crude papain	Papaya fruit	5 - 9	Broad specificity
Mixture of elastase, trypsin, chymotrypsin carboxypeptidase	Pancreatin	Pancreas (bovine, porcine)	7 - 9	Very broad specificity
metallo protease	Veron P, Biozyme A, Sumyzyme LP	*Aspergillus oryzae*	4 - 8	Very broad specificity
	Pronase	*Streptomyces griseus*	7 - 9	Very broad specificity

หมายเหตุ: [a]Pn and P'n represent preference for amino acid at carboxylic and amino site of cleaved bond, respectively. [b] Commercial preparations.

ที่มา: Adler-Nissen, 1993

ประเภทของเอนไซม์โปรติโอไลติก

International Union of Biochemistry and Molecular Biology ได้แบ่งกลุ่มของเอนไซม์โปรติโอไลติก ซึ่งแบ่งตามกลไกสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำได้เป็น 2 กลุ่ม (Barrett, 1994 อ้างอิงใน จุฑาพร แสวงแก้ว, 2543, หน้า 5-7) คือ

1. **Exopeptidases (EC 3.4.11 ถึง 19)**

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายของโปรตีน สามารถแบ่งเอนไซม์ตามการสลายพันธะของสายโปรตีน ได้เป็น 6 ประเภท ดังต่อไปนี้

1.1 Aminopeptidase (EC 3.4.11) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนโดยตัดทางปลายอะมิโน (N-terminal) ทีละหนึ่งหน่วย

1.2 Dipeptidase (EC 3.4.13) เป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อไดเปปไทด์สับสเตรท (dipeptide substrates) บริเวณปลายสายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน

1.3 Dipeptidyl-peptidases, Tripeptidyl-peptidases (EC 3.4.14) คือ โปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนจากทางด้านปลายอะมิโนเข้ามาทีละสองหรือสามหน่วย

1.4 Dipeptidyl-dipeptidases (EC 3.4.15) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิล (C-terminal) ของโปรตีนเข้ามาทีละสองหน่วย

1.5 Carboxypeptidases (EC 3.4.16 ถึง 18) คือโปรติเอสที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากทางด้านปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนเข้ามาทีละหน่วย แบ่งได้ 3 กลุ่มคือ Serine carboxy peptidases (EC 3.4.16), Metallo carboxypeptidases (EC 3.4.17) และ Cysteine carboxypeptidases (EC 3.4.18)

1.6 Omega peptidases (EC 3.4.19) คือโปรติเอสที่สามารถย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้ทั้งจากทางด้านปลายอะมิโนและปลายคาร์บอกซิล

2. **Endopeptidase (EC 3.4.21 ถึง 24 และ 99)**

เป็นโปรติเอสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในสายโปรตีนซึ่งมักมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนระหว่างตำแหน่งพันธะเปปไทด์ที่ย่อย สามารถแบ่งโปรติเอสตามกลไกการทำงานที่บริเวณเร่ง และความจำเพาะของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979; Barrett, Rawlings and Woessner, 2003 อ้างอิงใน สิรินภา ช่วงโอภาส, 2550, หน้า 7) ได้ 5 กลุ่มดังนี้

2.1 Serine peptidase (EC 3.4.21) มีบริเวณเร่งคือซีรีน และฮีสทีดีนเรซิดิว (histidine residue) กลไกการเร่งปฏิกิริยาขึ้นกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl) ของซีรีนเรซิดิว (serine residue) องค์ประกอบอื่นที่สำคัญในการเร่งการตัดพันธะเปปไทด์โดยซีรีนเปปติเดส (serine peptidase) คือ การมีหมู่ -NH- ที่สองสายแกนหลักเพื่อนำมาใช้สำหรับพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับการพัฒนาประจุลบของออกซิเจนจากหมู่คาร์บอนิลของพันธะเปปไทด์ที่จับได้ ซึ่งยากที่จะวัดหาค่าปริมาณที่มาตรฐานได้เนื่องจากหมู่ -NH- จะมีความจำเป็นสำหรับโครงสร้างที่เป็นอันหนึ่งอันเดียวกันของโปรตีน มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 7 ถึง 11 เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไคโมทริพซิน และทริพซิน เป็นต้น

2.2 Cysteine peptidase (EC 3.4.22) มีบริเวณที่เร่งปฏิกิริยาคือซีสเตอีน (-SH) และ ฮีสทีดีนเรซิดิว กลไกการเร่งปฏิกิริยาจะคล้ายกับกลุ่มของซีรีนเปปติเดสเป็นอย่างมาก เนื่องจากจะมีการสร้างโควาเลนท์ของสารตัวกลาง (covalent intermediate) โดยจะมีการจับนิวคลีโอไฟล์ (nucleophile) ซึ่งเป็นอะตอมซัลเฟอร์ (sulphur) ของสายข้างซีสเตอีน ส่วนสายข้างของฮีสทีดีนจะส่งเสริมในการเป็นตัวรับไฮโดรเจนหรือบทบาทที่วิ่งกลับไปกลับมา เอนไซม์เหล่านี้จะไวต่อออกซิเจน มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 6 ถึง 7.5 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ ปาเปน (papain) และบรอมิเลน (bromelain)

2.3 Aspartic peptidase (EC 3.4.23) มีแอสปาติกเรซิดิว (aspartic residue) เป็น ลิแกนด์ (ligand) เอนไซม์กลุ่มนี้เชื่อว่าจะเร่งการตัดพันธะเปปไทด์ โดยจะไม่มีการใช้หมู่ฟังก์ชั่น (functional group) ของเอนไซม์ในการจับนิวคลีโอไฟท์ ยิ่งไปกว่านั้นจะไม่มีการสร้างโควาเลนท์ของตัวกลาง ระหว่างเอนไซม์และส่วนของสับสเตรท โดยปรากฏว่าการเร่งของแอสปาร์ติกเรซิดิวจะประกอบด้วยสายข้างของกรดแอสปาร์ติกทั้งสองด้าน ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำจะเหมาะสมกับเอนไซม์กลุ่มนี้ซึ่งเชื่อว่าเป็นธรรมชาติของหมู่คาร์บอกซิลซึ่งจะส่งเสริมการเร่ง โดยข้อมูลโครงสร้างจากการศึกษาผลึกด้วยรังสีเอกซ์ (X-ray crystallo-graphic) ยืนยันว่าบริเวณสายข้างทั้งสองเป็นตำแหน่งที่เหมาะที่จะทำการตัดพันธะเปปไทด์ของสับสเตรท แสดงให้เห็นว่าหมู่คาร์บอกซิลทั้งสองจะอยู่ใกล้ชิดกันเพียงพอที่จะใช้พันธะไฮโดรเจนร่วมกันระหว่างออกซิเจนของกรดแอสปาร์ติกทั้งสอง มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 2 ถึง 4 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เรนนิน (rennin) และเปปซิน (pepsin) เป็นต้น

2.4 Metallopeptidase (EC 3.4.24) ลิแกนโลหะในเมทัลโลเปปติเดส (metallopeptidase) อยู่ที่ฮิสทิดีนเรซิดิว กลูตามิกเรซิดิว แอสปาร์ติกเรซิดิว และ ไลซีนเรซิดิว เอนไซม์กลุ่มนี้จะคล้ายกับแอสปาร์ติกเปปติเดส ซึ่งจะไม่มีการสร้างโควาเลนท์ของตัวกลาง เป็นโปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อย กล่าวคืออยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์ (cofactor) โดยปกติเป็นสังกะสี (Zn^{2+}) แต่อาจเป็นโคบอล (Co^{2+}) แมงกานีส (Mn^{2+}) นิเกิล (Ni^{2+}) และทองแดง (Cu^{2+}) เป็นต้น สามารถแบ่งแยกได้อีกขึ้นอยู่กับจำนวนอิออนโลหะที่ต้องการ ในการเร่งปฏิกิริยาเมทัลโลเปปติเดสต้องการสังกะสี (Zn^{2+}) เพียงตัวเดียว แต่บางแฟมิลี่ (family) ต้องการ 2 อิออนโลหะเพื่อเป็นโคคะตะไลติก (co-catalytic) เช่น อาจต้องการโคบอลหรือแมงกานีส 2 อิออน มีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาที่ช่วง 7 ถึง 9 ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ ซีเปียโปรติเนส (sepia proteinase) และคอลาจีเนส (collagenase) เป็นต้น

2.5 โปรติเอสชนิดที่ยังไม่รู้ถึงกลไกการเร่งปฏิกิริยา (EC 3.4.99)

ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก

การย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก มีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง เช่น สับสเตรท เอนไซม์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ระยะเวลาในการย่อย เป็นต้น

1. สับสเตรท ชนิดของสับสเตรท การเตรียมสับสเตรทและความเข้มข้นของสับสเตรท มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก และส่งผลต่อความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้ (Nakajima, Shoji and Nabetani, 1992) ชนิดและลักษณะของสับสเตรทมีผลต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ ถ้าโปรตีนมีการยึดเกาะหนาแน่นทำให้ไม่เหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ การเตรียม สับสเตรทก่อนนำไปย่อยสลายต้องทำให้รูปร่างของโปรตีนมีความเหมาะสมต่อการย่อยสลายของเอนไซม์ โดยทั่วไปจึงมีการเติมน้ำในอัตราส่วนเท่ากับสับสเตรทเพื่อให้เกิดการกระจายตัวของเอนไซม์ (Mohr, 1980)

2. เอนไซม์ ธรรมชาติของเอนไซม์และปริมาณของเอนไซม์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติโอไลติก เนื่องจากกระบวนการย่อยสลายต้องอาศัยความจำเพาะเจาะจงระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทที่ใช้ พบว่าเอนไซม์เอนโดเปปติเดสที่ผลิตจาก *Cellulomonas flavigena* NTOU 1 มีประสิทธิภาพในการย่อยวัสดุเศษเหลือจากกุ้ง (Chen, et al., 1992) อ้างอิงใน วันชัย เกียรติพิมล, 2545, หน้า 14-15

Benjakul and Morrissey (1997) พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาแปซิฟิกไวทิง (Pacific whiting) *Merluccius productus* มีประสิทธิภาพสูงกว่าเอนไซม์นิวเทรส (neutrase) นอกจากนี้เอนไซม์อัลคาเลสยังสามารถย่อยปลาเฮอริงได้ดีกว่าเอนไซม์ปาเปน และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสขมน้อยกว่าเอนไซม์ปาเปน (Hoyle and Merritt, 1994)

3. ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกตัวของอิออนของหมู่ prototropic ที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติซึ่งนำไปสู่การเบี่ยงเบนในด้านการจับกับสับสเตรทหรือการเร่งปฏิกิริยา ในบางกรณีค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลทำให้ผลผลิตต่ำลงเนื่องจากการแตกตัวของอิออนของผลผลิตเอง ดังนั้นในการทำงานของเอนไซม์ต้องควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสม เพื่อไม่ให้กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งไป (Whitaker, 1994) การย่อยสลายโปรตีนมีความสัมพันธ์กับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมกับเอนไซม์ที่เลือกใช้ อัญชลี สาระโบก และอรัญ หันพงศ์กิตติกูล (2542) พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสสามารถย่อยสลายน้ำ

นึ่งปลาทูน่าได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 ส่วนเอนไซม์นิวเทรสมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเท่ากับ 7

4. อุณหภูมิที่เลือกใช้ในการย่อยสลายโปรตีนมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่เลือกใช้ Benjakul and Morrissey (1997) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาแปซิฟิกไวทิง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลสคือ 60 องศาเซลเซียส และเอนไซม์นิวเทรสสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส

5. ระยะเวลาในการย่อยสลาย Yu and Tan (1992) พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีระยะเวลาการย่อยสลายโปรตีนที่เหมาะสมที่ 5 ชั่วโมง ซึ่งถ้าหากใช้เวลามากกว่านี้จะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีรสขม และได้กรดอะมิโนจำเป็นเพียงครึ่งหนึ่งของปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

การย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรติโอไลติกเป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์โปรติเอสทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์คือ เปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ โดยปกติแล้วโปรตีนปลาสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในปลา เช่น เปปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และ คาเทปซิน (cathepsins) เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในปลามีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการเกิดการย่อยสลายของโปรตีนปลาและใช้เวลาในการย่อยสลายยาวนาน ผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จึงประกอบไปด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระ จึงมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนักนิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา เป็นต้น

การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติโอไลติกในอุตสาหกรรม

เอนไซม์โปรติโอไลติกที่ผลิตจากจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมนั้น มักใช้ในการย่อยโปรตีนบางส่วน หรือการย่อยแบบไม่สมบูรณ์เพื่อเพิ่มการละลาย ได้แก่ อุตสาหกรรมผงซักฟอกจะใช้เอนไซม์โปรติโอไลติก อะไมเลส และไลเปส เป็นตัวขจัดคราบสกปรกต่างๆ เช่น โปรตีน แป้ง และไขมันให้หลุดออกไปจากเสื้อผ้า ซึ่งเอนไซม์โปรติโอไลติกเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในผงซักฟอกที่มีการผลิตมากกว่าเอนไซม์อื่นๆ คือ มีการผลิตสูงถึงร้อยละ 35 บริษัทที่ผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกมี 2 บริษัทด้วยกันคือ 1) บริษัท Novo Industri A/S จะผลิตเอนไซม์โปรติโอไลติก 3 ชนิด คืออัลคาเลส (alcalase) จาก *B. liguiformis* เอสเพอเรส (esperase) จาก *B. liguiformis* ที่ชอบด่าง และซาวิเนส (savinase) จาก *B. amyloliquefaciens* ที่ชอบ

ด่าง และ 2) บริษัท Gist-Brocades ผลิตเอนไซม์โปรติโอไลติกชื่อ แม็กซาเทส (Mazatase) จาก *B. liguiformis* (ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2537)

การนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ในการทำเนยแข็งจะใช้เอนไซม์โปรติโอไลติกที่ผลิตได้จากเชื้อรา และแบคทีเรีย โดยใช้แทนเรนเนตในการผลิตเนยแข็ง และยังใช้ประโยชน์ในการแยกโปรตีนออกจากส่วนต่างๆ เช่น กระดูกที่นำมาป่นและย่อยด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติกที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้ส่วนที่เป็นของเหลวซึ่งสามารถนำมาใช้ทำเนื้อกระป๋อง และซุปกระป๋องได้ โดยเอนไซม์ชนิดนี้ยังสามารถใช้ปรับปรุงกลิ่น รส ลักษณะเนื้อสัมผัส ของปลาทูน่าบรรจุกระป๋องได้ (Callahan and Herz, 1989) นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในการทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และน้ำผลไม้ให้ใส ประโยชน์ที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งได้แก่ การใช้ในการผลิตน้ำปลาโดยกล้าเชื้อโคจิซีอิ๊ว (soy sauce koji) ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์คุณภาพดีกว่าใช้เอนไซม์ โปรติเอสสำเร็จรูป (Chae, Itoh and Nikkunis, 1989) อ้างอิงใน วิชชุลดา ช่วยฉิม, 2544, หน้า 14-15

Godfrey and West (1996) รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสทำให้เกิดความนุ่มของโด (dough) ซึ่งใช้ทำคุกกี้ (cookies) ขนมปังกรอบ (wafers) และขนมปังอบ (waffles) เป็นต้น ทำให้ได้ความกรอบ มีสีเปลือกขนมปังที่ดี และปรับปรุงรสชาติ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี และใช้ในกระบวนการทำให้เครื่องดื่มมีความใส (clarification) และทำให้นมเกิดการตกตะกอน (coagulating) เพื่อนำไปทำเนย (cheese)

นอกจากนี้ยังมีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทในอาหาร และผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ซึ่งเปปไทด์สกัดได้จาก เคซีน เนย ถั่วเหลือง เนื้อ และแหล่งอื่นๆ อีกมากมาย โดยเอนไซม์ตัวอย่างเช่น นิวทรัลโปรติเอสหรืออัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตจาก *B. subtilis* โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทผสมทำเป็นเครื่องดื่มสำหรับนักกีฬา เครื่องดื่มที่มีสารอาหารสำหรับผู้สูงอายุ ใช้ในจุดประสงค์ของการลดความอ้วน และเพิ่มความแข็งแรงของร่างกาย

อุตสาหกรรมหนังสัตว์และขนสัตว์ มีการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติโอไลติกโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่เป็นด่างในการกำจัดขนออกจากหนังสัตว์ก่อนที่จะนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ โดยจะใช้ปริมาณค่อนข้างมาก คือร้อยละ 0.1 ถึง 1.0 (โดยน้ำหนัก) นอกจากนี้ยังใช้เพื่อป้องกันการหดตัวของขนสัตว์ได้อีกด้วย (ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2537)

การคัดเลือกแบคทีเรียโปรติโอไลติก

การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตเอนไซม์นั้นจะต้องคำนึงถึงความปลอดภัย เพราะจุลินทรีย์อาจทำให้เกิดโรค หรือผลิตสารพิษออกมาปะปนกันเอนไซม์

ในทางปฏิบัติจึงเลือกจุลินทรีย์ที่ผ่านการรับรองจาก GRAS-Clearance (Generally Recognized As Safe) ของ FDA (Food and Drugs Administration) ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยจุลินทรีย์ที่ผ่านการรับรองแล้วมีเพียง 5 ชนิดเท่านั้นคือ *Bacillus subtilis, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Kluyveromyces fragillis* หรือจากการรับรองของ European commission (health and consumer proptection directorate-general) ที่อนุญาตให้ใช้เอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *Bacillus* sp. เช่น *B. subtilis*, *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ หากเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ก่อนที่จะนำมาใช้ผลิตเอนไซม์จะต้องทดสอบว่าเป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นหรือไม่ นอกจากนี้การเลือกจุลินทรีย์ชนิดใดมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ควรเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเอนไซม์ได้มากซึ่งทำได้ 2 ประการคือ เลือกสายพันธุ์จากธรรมชาติ และการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์ (โชคชัย มนต์ประสาธน์, 2526, หน้า 6)

วิชชุลดา ช่วยฉิม (2544) กล่าวว่าแบคทีเรียโปรติโอไลติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสแล้วส่งออกนอกเซลล์ มักเป็นแบคทีเรียในสกุล *Clostridium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* และ *Proteus* เช่น

Clostridium bifermentans	*Bacillus brevis*	*Pseudomonas alcaligenes*
C. botulinum	*B. cereus*	*P. aurefaciens*
C. historyticum	*B. finnus*	*P. chlororaphis*
C. putrefaciens	*B. larvae*	*P. fluorescens*
C. putreficum	*B. megaterium*	*Proteus mirabilis*
C. sordellii	*B. polymyxa*	*P. morganii*
C. sporogenes	*B. sphaericus*	*P. vulgaris*
	B. subtilis	

แบคทีเรียกลุ่มนี้อาจแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ และสามารถสร้างสปอร์ (aerobic spore formers) เช่น *B. cereus*

2. กลุ่มที่เจริญได้ทั้งในสภาพมีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobic microoganism) เช่น *P. fluorescens*

3. กลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญและสามารถสร้างสปอร์ (anaerobic spore formers) เช่น *C. sporogenes*

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนนั้น จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารประเภทโปรตีนชนิดต่างๆ โดยเกิดจากเอนไซม์โปรติเอสที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่ง

พบว่าประสิทธิภาพในการย่อยจะแตกต่างกันตามความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์จากแบคทีเรียที่สามารถย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น บางชนิดสามารถย่อยโปรตีนหางนม บางชนิดสามารถย่อยโปรตีนจากไข่ขาวผงและบางชนิดสามารถย่อยโปรตีนได้ทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับแหล่งของโปรตีนที่นำมาทดสอบ (Maxcy and Sikes, 1979)

ความสามารถบางอย่างของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียนั้น คือ การผลิตเอนไซม์โปรติโอไลติกซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงสารอาหารประเภทโปรตีนให้มีคุณค่าทางโภชนาการและคุณภาพลดลง นอกจากนี้มีการศึกษาจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสกับการเน่าเสียของเนื้อวัว เนื้อหมู และปลา จากการศึกษาของ Tarrant, et al., 1973 อ้างอิงใน วิชชุลดา ช่วยฉิม, 2544, หน้า 18 พบว่าไมโอไฟบริลลาโปรตีน (myofibrillar protein) ในเนื้อหมูนั้นจะถูกย่อยอย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเตรียมได้จาก *P. fragi*

นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวบางชนิดสามารถย่อยโปรตีนในสภาพไม่มีออกซิเจน (anaerobic microorganism) ทำให้ได้สารประกอบที่มีกลิ่นเหม็น (putrefactive odor) เช่น ไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) เมอร์แคปแทน (CH_3SH) เอมีน (amines) อินโดล (indole) และกรดไขมัน (fatty acid) จึงเรียกแบคทีเรียพวกนี้ว่าแบคทีเรียพิวทริแฟกทีฟ (putrefactive bacteria) เช่น *C. putrefaciens*, *C. sporogenes, C. putida*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis* และ *P. morganii* แบคทีเรียในกลุ่มนี้บางชนิดเป็นพวกที่สร้างกรดในขณะเดียวกันกับการย่อยโปรตีน (acid-proteolytic) เช่น *Streptococcus faecalis* var. liquefaciens และ *M. caseolyticus* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

Chaychotcharoen (1987) ได้ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียโปรติโอไลติกจากผลิตภัณฑ์จากปลาหมึกพบว่ามีแบคทีเรียที่สำคัญ ได้แก่ *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp. และ Coryneform group

Byrum and Selmons (1995) รายงานว่าแบคทีเรียโปรติโอไลติก ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Flavobacterium* และ *Vibrio alginolyticus* โดย *Staphylococcus* sp. จะพบได้ในสัตว์ ส่วน *Flavobacterium* sp. และ *V. alginolyticus* จะพบในดินและผิวน้ำ

ปัจจุบันเอนไซม์โปรติโอไลติกจากจุลินทรีย์ได้รับการยอมรับมากเพราะมีต้นทุนในการผลิตต่ำ แหล่งของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้มากในระดับอุตสาหกรรมแสดงดังตาราง 3

ตาราง 3 แหล่งของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่ใช้มากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

การนำไปใช้ประโยชน์	แหล่งของเอนไซม์
Oriental fermentation	*A. oryzea*
	A. flavus
Bread making	*A. oryzea*
Cheese coagulation	*M. miehei*
	M. pusillus
	E. parasitica
Cheese ripening	*P. roqueforti*
	P. caserilum
	4^{th}stomach of ruminant
Meat tenderization	*B. subtilis*
	A. oryzea
	Papaya, pineapple, figs
Solubilization of fish protein	*B. subtilis*
	Papaya
Chill-proofing	A. oryzea
	B. subtilis
	Papaya, pineapple, figs
	Bovine and porcine stomach
Plastein	Bovine and porcine stomach
	Papaya
Detergent and cleaning	*B. liguiformis*
	B. subtilis
	S. griseus
Clinical (digestive aid, diagnosis,	*A. flavus*
streptokinase, etc.)	*A. oryzea*
	A. japonica
	C. albicans

ตาราง 3 (ต่อ)

การนำไปใช้ประโยชน์	แหล่งของเอนไซม์
Biochemical (purification of cellular material, peptide analysis, peptide synthesis, etc.)	*A. hystolyticum* *S. griseus* Papaya *A. hystolyticum* Bovine and porcine stomach

ที่มา: Loffler, 1986

Mohr (1980) รายงานการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าทำได้ค่อนข้างยาก ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน แต่โดยทั่วไปแล้วเอนไซม์อัลคาเลส ที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์จะมีประสิทธิภาพการย่อยสลายสูงกว่าเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากสัตว์ เช่น เอนไซม์ทริปซิน เป็นต้น และในขณะเดียวกันต้นทุนการผลิตเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์ค่อนข้างต่ำ ทำให้เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์เข้ามามีบทบาทมากขึ้น ซึ่งแต่เดิมนั้นนิยมเลือกใช้เอนไซม์แอซิดโปรติเอส (acid protease) จากเชื้อจุลินทรีย์ในการย่อยสลายโปรตีนปลา เนื่องจากจะมีส่วนช่วยในการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ด้วยแต่โปรตีนที่ผลิตได้มีค่าต่ำ ดังนั้นนักวิจัยจึงเริ่มให้ความสนใจในการใช้เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสและอัลคาไลน์โปรติเอสย่อยสลายโปรตีนปลา

Choorit and Prawertsan (1992) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่ผลิตได้จากแบคทีเรียสกุล *Bacillus sp.* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักทางภาคใต้ของประเทศไทย (บูดู) หลังจากหมักเป็นเวลา 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากการวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติโอไลติก พบว่าสภาวะที่เหมาะสมอยู่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 7 ถึง 8 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และจากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียพบว่าเป็น *B. subtilis* 3 สายพันธุ์ และอีก 1 สายพันธุ์เป็น *B. liguiformis*

Kungsuwan, et al. (1996) ศึกษาการใช้ *L. plantarum* สายพันธุ์ 541 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลกติกในกระบวนการหมักหัวกุ้งแบบกะ เพื่อแยกโปรตีนออกจากหัวกุ้ง พบว่ามีสภาวะที่เหมาะสมคือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 อัตราส่วนหัวกุ้งต่อหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 5 ต่อ 1 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

Wang and Chio (1997) ได้เปรียบเทียบการแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งและปูโดยใช้ *Pseudomonas sp.* สายพันธุ์ต่างๆ โดยทำการหมักในระบบ liquid phase fermentation และระบบ solid phase fermentation นาน 15 วัน พบว่า *P. aeruginosa* K-187 ทำการหมักแบบ liquid phase fermentation จะมีประสิทธิภาพในการขจัดโปรตีนดีที่สุด

Fagbenro and Bello-Olusoji (1997) รายงานว่าการใช้ *L. plantarum* หมักกับหัวกุ้งโดยใส่เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ใช้น้ำตาลอ้อย (cane molasses) ร้อยละ 15 เป็นแหล่งคาร์บอน อุณหภูมิระหว่างการหมัก 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเหลือน้อยกว่า 4.5 และเมื่อหมักนาน 30 วัน พบว่าปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เติมลงไปไม่มีผลต่อสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non protein nitrogen) หรือกรดอะมิโนอิสระ

Zakaria, Hall and Shama (1998) ได้ทดลองใช้ *L. paracasei* ในการหมักเศษเหลือของกุ้ง Scamp โดยใช้กลูโคสเป็นแหล่งของคาร์บอนในถังหมักแบบหมุนได้ในแนวนอน (rotating horizontal bioreactor) เพื่อแยกโปรตีนและแร่ธาตุออกในระหว่างขั้นตอนของการผลิตไคทินที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน พบว่าสามารถแยกโปรตีนและแคลเซียมได้ร้อยละ 77.5 และ 61 ตามลำดับ การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกในการย่อยสลายโปรตีนนี้สามารถแยกแร่ธาตุออกมาพร้อมกับโปรตีนในขั้นตอนเดียว เนื่องจากกรดแลกติกที่สร้างขึ้นมาจากแบคทีเรียอีกทั้งการใส่เชื้อในปริมาณเริ่มต้นและให้แหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นสูงจะมีส่วนช่วยให้แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างกรดแลกติกเพิ่มมากขึ้น มีผลช่วยให้สามารถลดจำนวนของแบคทีเรียอื่นที่ปนเปื้อนและลดระยะเวลาของการหมักลงด้วย (Shirai, et al., 2001; Fagbenro and Bello-Olusoji, 1997 อ้างอิงใน วุฒิพจน์ ศุภวิริยากร, 2548, หน้า 10-11)

Yang, et al. (2000) ทำการทดลองเปรียบเทียบการแยกโปรตีนออกจากเศษเหลือจากการแปรรูปสัตว์น้ำโดยใช้ *B. subtilis* Y-108, *B. subtilis* CCRC 10029 และ *P. maltophilia* CCRC 10737 เพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับย่อย โดยทำการหมักเป็นเวลา 7 วัน พบว่า *B. subtilis* Y-108 สามารถแยกโปรตีนได้ดีที่สุด

Oh, et al. (2000) ได้เปรียบเทียบการแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งและปู โดยใช้ *B. subtilis* และ *P. aeruginosa* เพื่อหาจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีน โดยทำการหมักนาน 7 วัน พบว่า *P. aeruginosa* มีประสิทธิภาพในการแยกโปรตีนสูงสุด คือ ร้อยละ 78 ของปริมาณเริ่มต้น การใช้จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus sp.* หรือ *Pseudomonas sp.* โดยเฉพาะ *P. aeruginosa* ในการแยกโปรตีนออกจากเศษเหลือของกุ้งโดยตรงนั้นไม่สามารถนำโปรตีนมาใช้

เป็นอาหารสำหรับมนุษย์ได้ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่อาจก่อให้เกิดโรค หรือผลิตสารพิษและสารต่างๆ ออกมาในระหว่างกระบวนการหมัก ดังนั้นการหาจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษมาใช้ในการแยกโปรตีนออกจากเศษเหลือของกุ้งก็จะช่วยให้สามารถแก้ไขปัญหาเกี่ยวกับสารต่างๆ ที่จุลินทรีย์จะผลิตออกมาได้

วิชชุลดา ช่วยฉิม (2544) ได้ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอส พบว่า *P. aeruginosa* สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุด โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์ 25.6 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปศึกษาสภาวะการย่อยโปรตีนจากหัวกุ้ง พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ผลิตได้ร้อยละ 9 ย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงสุด 8.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีปริมาณโปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า คิดเป็นร้อยละ 52.6, 0.56, 14.9 และ 15.6 ตามลำดับ

ตรีสินธุ์ โพธารส (2546) ศึกษาชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ พบว่าเมื่อใช้เครื่องในปลาทูน่า 200 กรัม ละลายในสารละลายซัคซิเนตบัฟฟเฟอร์ (succinate buffer) ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติมเชื้อ *L. bulgaricus* ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และน้ำตาลกลูโคส 2 กรัม สามารถให้ปริมาณโปรตีนสูงสุด 16.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำโปรตีนดังกล่าวไปเตรียมเป็นผลผลิตแห้ง จะได้ผลผลิตคิดเป็นร้อยละ 6.63 ของปริมาณเครื่องในที่ใช้เริ่มต้น โดยมีปริมาณโปรตีน ความชื้น เถ้า เกลือโซเดียมคลอไรด์ และไขมัน คิดเป็นร้อยละ 66.13, 22.45, 7.00, 3.94 และ 0.48 ตามลำดับ นอกจากนี้เปปโตนที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และสามารถนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *B. subtilis*, *E. coli* และ *S. aureus* โดยมีคุณภาพเทียบเท่ากับเปปโตนทางการค้า

Bacillaceae

Bacillaceae เป็นแบคทีเรียที่มีมีรูปร่างเซลล์เป็นแท่ง ยกเว้น 1 สกุลที่มีรูปร่างทรงกลม สร้างเอนโดสปอร์ (endospore) โดยเอนโดสปอร์สะท้อนแสงมากกว่าและติดสีย้อมยากกว่า รวมทั้งทนความร้อนและสารเคมีอื่นๆ และในเอนโดสปอร์มีกรดไดพิโคลินิค (dipicolinic acid) อยู่ร้อยละ 5 ถึง 15 ของน้ำหนักแห้งสปอร์ (spore) อาจอยู่ตรงกลางเซลล์ (central spore) หรืออยู่ค่อนทางปลาย (subterminal spore) หรือปลายเซลล์ก็ได้ (terminal spore) ส่วนใหญ่ติดสีแกรมบวก เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา (flagella) หรืออาจจะไม่เคลื่อนที่ มีทั้งกลุ่มที่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีออกซิเจน (aerobic microorganism) ในสภาพที่มีหรือไม่มี

ออกซิเจน (facultative anaerobic microorganism) หรือในสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic microorganism) อ้างอิงใน กรรณิการ์ เสนทอง, 2551, หน้า 3-4

คุณสมบัติทั่วไปของ *Bacillus* sp.

Bacillus sp. มีรูปร่างเซลล์เป็นแท่งตรงหรือเกือบตรง เป็นซาโพรไซต์ (saprophyte) อยู่ในดิน น้ำจืด น้ำเค็ม มีหลายชนิดที่สร้างเอกโซเอนไซม์ (exoenzyme) ย่อยโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนซึ่งมีผลทำให้อาหารเน่าเสีย มีเอนโดสปอร์ที่ทนความร้อน จึงอาจทนกระบวนการพาสเจอร์ไรเซชัน (pasteurization) ในน้ำนม หรืออาหารกระป๋องที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอได้ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2544) ส่วนใหญ่มีการเคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา สร้างเอนโดสปอร์ 1 สปอร์ต่อ 1 เซลล์ ติดสีแกรมบวก หรืออาจจะติดสีแกรมบวกเมื่ออายุยังน้อย ดำรงชีวิตแบบใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงาน (chemoorganotroph) เมตาบอลิซึมเป็นแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) หรือไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic respiration) หรืออาจเกิดทั้งสองแบบ ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

ถ้าเปรียบเทียบสกุล *Bacillus* กับสกุลอื่นๆ พบว่าเชื้อในสกุล *Bacillus* มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกันมาก *B. coagulans* จะสร้างกรดแลคติก (lactic acid) เพียงอย่างเดียว ในขณะที่ *B. subtilis*, *B. licheniformis* และ *B. cerues* สร้าง 2, 3 บิวเทนไดออล (2, 3 butanediol) และกลีเซอรอล (glycerol) เป็นส่วนใหญ่ ส่วน *B. polymyxa* สร้าง 2, 3 บิวเทนไดออล เอธานอล (ethanol) และไฮโดรเจน (hydrogen) เป็นส่วนใหญ่ สำหรับ *B. macerans* สร้างเอธานอล อะซิโตน (acetone) กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก (formic acid) บางชนิดสามารถดำรงชีวิตแบบใช้ออกซิเจนปริมาณน้อยในการเจริญ (microaerophilic microorganism) ได้ ใช้ไฮโดรเจนเป็นแหล่งพลังงาน มีความต้องการอาหารแตกต่างกัน อุณหภูมิสูงที่สุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 25 ถึง 75 องศาเซลซียส อุณหภูมิต่ำที่สุดที่เจริญได้อยู่ระหว่าง 5 ถึง 45 องศาเซลเซียส ทนเกลือได้อยู่ในช่วงน้อยกว่าร้อยละ 2 ถึง 25

อนุกรมวิธานของเชื้อ *Bacillus* ที่ใช้ในงานวิจัย

B. subtilis

รูปร่างเป็นแท่ง มีแฟลกเจลลาออกทางด้านข้าง (lateral flagella) ของเซลล์ การแตกออกของสปอร์อยู่ที่ศูนย์กลางของเซลล์ โคโลนีที่เจริญบนอาหารวุ้นผิวอาจเรียบหรือขรุขระ ทึบ สีครีมหรือน้ำตาล สร้างเอกโซเอนไซม์ที่ย่อยแป้ง (starch) และเคซีน (ดวงพร คันธโชติ, 2537

อ้างอิงใน กรรณิการ์ เสนทอง, 2551, หน้า 4) เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ทั้งอัลคาไลน์โปรติเอสและนิวทรัลโปรติเอส

B. cereus

มีลักษณะเป็นรูปท่อนตรง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์และสารพิษ (toxin) ซึ่งสามารถขับออกมาปนเปื้อนอยู่ในอาหารได้ ช่วงอุณหภูมิในการเจริญอยู่ระหว่าง 30 ถึง 37 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 4 ถึง 5 องศาเซลเซียส สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ระหว่าง 6 ถึง 7 และเจริญได้ดีในสภาพที่มีออกซิเจน สามารถผลิตเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสได้ นอกจากนี้ *B. cereus* สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ฝุ่นละออง ธัญพืช แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ สารปรุงแต่งรส ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และอุจจาระของผู้ที่มีสุขภาพดีได้ประมาณร้อยละ 15 (National Food Institute Thailand, 2547 อ้างอิงใน กรรณิการ์ เสนทอง, 2551, หน้า 4)

เอนไซม์นิวทรัลโปรติเอส

นิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะ (ionic bond) กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในแบคทีเรียและราโดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่มบาซิลลัส *Bacillus* sp. หลายชนิด เช่น *Bacillus megateri*, *B. cereus* และ *B. thermoproteolyticus* ซึ่งจะผลิตเฉพาะนิวทรัลโปรติเอสเท่านั้น (Priest, 1977 อ้างอิงใน อภิรดี อุดมสิน, 2546, หน้า 9-10) แต่ใน *B. subtilis* พบว่ามีการผลิตทั้งเอนไซม์นิวทรัลโปรติเอสและเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่มีการผลิตทั้งนิวทรัลโปรติเอสและอัลคาไลน์ เช่น *B. thuringenesis*, *B. pumilus* และ *B. polymyxa* (Griffin and Forgarty, 1973) เป็นต้น

นิวทรัลโปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของสังกะสีอยู่ที่บริเวณเร่ง กิจกรรมของเอนไซม์สูงเมื่อใช้สับสเตรทสังเคราะห์ FAGLA (furylacrolylglycyl leucinamide) ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง พบว่าแคลเซียม (Ca^{2+}) จะทำให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์ชนิดนี้สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีนและถูกยับยั้งด้วยสารประเภทคีเลทิงเอเจนต์ (chelating agents) เช่น กรดเอทิลีนไดแอมีนเททระแอซีทิก (ethylenediaminetetraacetic acid : EDTA) (1,10 ฟีแนนโทรลีน) 1,10-Phenanthroline (Pero and Sloma, 1993) ซึ่งยับยั้งเอนไซม์โดยการดึงอะตอมของสังกะสีออก แต่ไม่ถูกยับยั้งโดยไดไอโซโพรพิลฟลูออโรฟอสเฟต (di-isopropryl fluorophosphate : DFP) ซัลไฮดริล รีเอเจนต์ (sulfhydryl reagent) ซอยบีน (soybean) ทริปซินอินฮิบิเตอร์ (trypsin inhibitor) และ โปเตโต โปรติเอส อินฮิบิเตอร์ (potato protease

inhibitor) ความสามารถสูงสุดในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่สภาวะความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7 ถึง 8 โดยใช้เคซีนเป็นสับสเตรท มีความเสถียรในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 5 ถึง 10 (Endo, 1962 อ้างอิงใน อภิรดี อุดมสิน, 2546, หน้า 9) เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ เทอร์โมไลซิน (thermolysin) จาก *B. stearothermophilus* ซึ่งมีสมบัติเด่น คือ มีความเสถียรสูง เช่น เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลือถึงร้อยละ 50 เนื่องจากในโครงสร้างของเอนไซม์มีแคลเซียมอิออน 4 อะตอม (Endo, 1962 อ้างอิงใน อภิรดี อุดมสิน, 2546, หน้า 9) เมื่อเทียบกับนิวทรัลโปรติเอสจาก *B. amyloliquefaciens* ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์จะเหลือร้อยละ 50 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 59 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เนื่องจากมีแคลเซียมอิออน 2 อะตอมในโครงสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้การผลิตเทอโมไลซินจาก *B. stearothermophilus* KP 1236 พบว่าอุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์คือที่ 80 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 และเอนไซม์ยังมีความเสถียรเป็นเวลาถึง 10 นาที เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียส (Yukio, et al., 1987) นอกจากนี้ยังพบนิวทรัลโปรติเอสในราพวก *Aspergillus oryzae* อีกด้วย

นิวทรัลโปรติเอสนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย เช่น อุตสาหกรรมฟอกหนัง เบียร์ ซีอิ้ว น้ำปลา การผลิตสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) อุตสาหกรรมผลิตเนยแข็งและขนมปังต่างๆ นอกจากนี้มีผู้ศึกษาถึงสมบัติของนิวทรัลโปรติเอสจาก *B. subtilis* พบว่าช่วยปรับปรุงคุณภาพของขนมปังประเภท cracker และ biscuit ทำให้แป้งเป็นแผ่นบางโดยไม่ฉีกขาด และช่วยลดฟองอากาศที่เกิดระหว่างการอบ และเมื่อใช้เอนไซม์นี้ร่วมกับเอนไซม์ไลเปส (lipase) ในการทำเนย พบว่าช่วยเพิ่มรสชาติของเนยแข็งและไม่ทำให้เกิดรสขม (Godfrey, 1983)

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

อัลคาไลน์โปรติเอสพบว่ามีทั้งในพืช สัตว์ และโดยเฉพาะในจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งแบคทีเรีย (bacteria) เชื้อรา (fungi) แอคติโนมัยซีท (actinomyces) และยีสต์ (yeast) (ศิรินภา ช่วงโอภาส, 2550, หน้า 10-11)

Miyaji, et al. (2005) ได้แยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากดินของ Abashiri ประเทศญี่ปุ่น พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Stenotrophomonas maltophilia* และให้ชื่อว่า S-1 แบคทีเรียนี้สามารถเจริญบนเคซีนซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ได้โปรติเอสที่บริสุทธิ์ กำหนดชื่อให้เป็น *S. maltophilia* Protease-1 (SmP-1) พบว่ามีอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับทำปฏิกิริยาคือ 50 องศาเซลเซียส มีลำดับกรดอะมิโนที่ปลายของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่บริสุทธิ์คือ NH_2-SASAPMVSGVAALVLE พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมนั้นมี

ความเป็นด่างที่ค่อนข้างสูงมาก และเอนไซม์คงตัวต่อความร้อน ทำให้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในอุตสาหกรรมอาหารและอื่นๆ

Aftab, et al. (2006) ทำการแยกแบคทีเรียที่ชอบด่างได้ 53 ไอโซเลท จากทุ่งนาหลายที่ของเมือง Karashi พบว่า 25 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดยมี *Bacillus brevis* SSA1 ที่ผลิตเอนไซม์ได้ดีที่สุดเท่ากับ 800 หน่วยต่อมิลลิลิตร (AU/ml) จึงถูกเลือกเพื่อทำการศึกษาต่อไป

Chu (2007) พบแบคทีเรีย 35 สายพันธุ์ที่สามารถปล่อยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสซึ่งแยกได้จากดินและน้ำเสียที่อยู่ใกล้โรงงานนม โดยสายพันธุ์ APP1 พบผลผลิตสุทธิ (yield) ของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 2,560 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น *Bacillus* sp.

มีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารมากมาย ตัวอย่างเช่น เอนไซม์อัลคาเลส เป็นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ผลิตในทางการค้า สามารถย่อยโปรตีนที่ได้จากพืช เนื้อปลา หรือเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ โดยการสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน อาจนำมาย่อยเนื้อสัตว์ เพื่อให้ได้กลิ่นและรสที่ดี นำไปเป็นซุปก้อนหรือซุปเข้มข้น โดยใช้กรดอะมิโนอิสระ ไดเปปไทด์ หรือไตรเปปไทด์ที่สามารถตกตะกอนได้ในการผลิต เป็นต้น (Pedersen, et al., 1994)

เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สร้างจากเชื้อจุลินทรีย์

การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากรา

เชื้อราเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายประเภท เช่น อะไมเลส (amylase) เซลลูเลส (cellulase) เพคติเนส (pectinase) รวมทั้งเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสด้วย

Abbas and Gander (1989) ได้ศึกษาการผลิตเอนไซม์ serine protease จาก เชื้อรา *Penicillium charlessi* พบว่าช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 7 ถึง 9 และช่วงของความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์คือ 3 ถึง 10 เมื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์โดยวิธี Sephacryl S-200 gel permeation chromatography, DEAE-Sepharose anion-exchange chromatography และ fast protein liquid chromatography (FPLC) พบกิจกรรมของเอนไซม์แบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็น major activity (protease PII, ร้อยละ 82) และ minor activities (protease PI และ PIII, ร้อยละ 10 และ 8 ตามลำดับ) ซึ่ง protease PII มีมวลโมเลกุล 40,000 ดาลตัน และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)

Malathi and Chakraborty (1991) ทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Aspergillus flavus* โดยวิธีการหมักแบบ solid-substrate พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างเอนไซม์คือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส โดยที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความชื้นร้อยละ 63 เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 7.5 และ 9.5

Garcia-Gomez (2009) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* ภายใต้การหมักด้วยตัวยึดเกาะ เพื่อให้สร้างเอนไซม์โปรติโอไลติกเปรียบเทียบกับเอนไซม์สกัดทางการค้า คือ ฟลาโวโซม (Flavourzyme) พบว่าเอนไซม์ทั้งสองแหล่งนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8 และอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส โดยมีครึ่งชีวิตที่ 52 และ 25 นาที ตามลำดับ และเมื่อนำไปทดสอบการย่อยในเนื้อปลา พบว่าเอนไซม์ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อมีความสามารถในการย่อยโปรตีน (degree of hydrolysis; %DH) ได้ดีกว่า โดยเท่ากับร้อยละ 22.2 และ 9.1 ตามลำดับ

การผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรีย

ในช่วงปี ค.ศ. 1990 เป็นต้นมา พบว่ามีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ส่วนมากจะพบในกลุ่ม *Bacillus* เช่น *Bacillus amyloliquefaciens* (George, et al., 1995), alkalophilic *Bacillus* sp. NO221 (Hirokoshi, 1971), *Bacillus* sp. KSM-K16 (Kobayashi, et al., 1995), *B. stearothermophilus* F1 (Rahman, et al., 1994), *B. mycoides* (Abdel-Naby, et al., 1998), *B. licheniformis* (Ferrero, et al., 1996; Manachini and Fortina, 1998) และ *B. subtilis* (Yang, et al., 2000) เป็นต้น

นอกจากแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* แล้วยังพบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์อื่น เช่น *Microbacterium* sp. (Gessesse and Gashe, 1997) *Pimelobacter* sp. Z-483 (Oyama, et al., 1997) เป็นต้น

การสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียที่หายาก เช่น *Kurthia spiroforme* sp. nov. ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเกลียว สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้ (Steel, et al., 1992) และยังพบการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจาก *Psiloteredo healdi* ซึ่งเป็น symbiotic marine shipworm (Greene, Cotta and Griggin, 1989)

แบคทีเรียแกรมลบก็สามารถสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสได้เช่นกัน ตัวอย่างเช่น *Pseudomonas* (Guzzo, et al., 1990) และ *Pseudomonas aeruginosa* PST-01 (Ogino, et al., 1999) ซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดก่อให้เกิดโรค นอกจากนั้นพบการสร้างเอนไซม์ได้จาก

Xanthomonas maltophila (Debette, 1991) และ *Vibrio metschnikovii* RH530 (Kwon, et al., 1994) เป็นต้น อ้างอิงใน จุฑาพร แสวงแก้ว, 2543, หน้า 16

ปัจจุบันมีการนำเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสมาใช้ในทางการค้าอย่างแพร่หลาย โดยมีชื่อทางการค้าแตกต่างกันไปตามแหล่งที่ผลิตดังตาราง 4 และพบสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส แสดงดังตาราง 5

ตาราง 4 เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่ใช้ในการค้า

แหล่งที่มา	ชื่อทางการค้า	แหล่งผลิต
Bacillus licheniformis	Alcalase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic *Bacillus* sp.	Savinase, Esperase	Novo Nordisk, Denmark
Alkalophilic *Bacillus* sp.	Maxacal, Mazatase	Gist-brocades, The Netherlands
Alkalophilic *Bacillus* sp.	Opticlean, Optimase	Solvay Enzyme GmbH,Germany
Alkalophilic *Bacillus* sp.	Proleather	Amano Pharmaceuticals, Japan
Aspergillus sp.	Protease P	Amano Pharmaceuticals, Japan
Protein engineered variant of Savinase®	Durazym	Novo Nordisk, Denmark
Genetic engineered Donor-*B. Lentus* Expressed in *Bacillus* sp.	Purafact	Genecor International, U.S.A

ที่มา: จุฑาพร แสวงแก้ว, 2543

ตาราง 5 สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส

แบคทีเรีย	แอคติโนมัยซีท	เชื้อรา	ยีสต์
Bacillus alcalophilus ATCC 21522	*Dermatophilus congolesis*	*Aspergillus candidus*	*Candida lipolytica*
B. circulans	*Nocardiopsis* sp.	*A. flavus*	*Aureobasidium pullulans*
B. firmus	*N. dassonvillei*	*A. niger*	*Oerskovai xanthineolytica*
B. lentus	*Streptomyces moderatus*	*A. sojai*	*Yarrowia lipolytica*
B. pumilus	*S. diastaticus*	*Cephalosporium* sp. KSM 388	
B. sphaericus	*S. griseus*	*Fusarium graminearum*	
B.subtilis	*S. corchorusii ST36*	*Paecilomyces marquandii*	
Bacillus sp.	*S. fradiae*	*Penicillium griseofulvin*	
Pseudomonas sp.	*S. pactum*	*Rhizopus oryzae*	
Thermus aquaticus	*Thermoactinomycestes* sp.	*Scedosporium apiospermum*	
Staphylothermus marinus		*Malbranchea pulchella*	
Vibrio metschnikovi		*Tritirachium album*	

ที่มา: จุฑาพร แสวงแก้ว, 2543

การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา

เศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปปลา ถือได้ว่าเป็นส่วนที่มีโปรตีนสูง ไม่ว่าจะเป็นโครง เครื่องใน หรือเนื้อปลา เป็นต้น เมื่อนำมาผ่านกระบวนการย่อยสลายแล้ว จะได้เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ดีขึ้นในด้านต่างๆ เช่น คุณสมบัติการละลาย การเกิด หรือการกระจายตัวอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายคุณสมบัติร่วมกัน ทำให้สามารถนำโปรตีนไฮโดรไลเซทไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง ไม่ว่าจะเป็นการนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ รวมถึงอาหารจุลินทรีย์ เป็นต้น

การนำไปใช้เป็นอาหารมนุษย์

มีการนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาไปผสมกับแป้งดัดแปรในปริมาณร้อยละ 10 เพื่อทำ milk analog จะช่วยเพิ่มค่า protein efficiency ratio ; PER จาก 0.66 ไปเป็น 2.5 นอกจากนั้น พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันหรือการจับตัวของเนื้อผลิตภัณฑ์ ลดการสูญเสียระหว่างการให้ความร้อนกับผลิตภัณฑ์และลดต้นทุนการผลิต เป็นต้น (Rutman and Heimlich, 1974; Mohr, 1978) นอกจากนั้น มีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้จากปลา *Oreochromis mossembicus* มาผลิตข้าวเกรียบโดยใช้ปริมาณร้อยละ 10 พบว่ามีอัตราการพองตัวของข้าวเกรียบสูงสุด และเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส จะให้ค่าสีความกรอบ และลักษณะปรากฏดีกว่าตัวอย่างควบคุม นอกจากนี้ยังเป็นการเพิ่มปริมาณไนโตรเจนให้สูงขึ้นอีกด้วย (Yu and Tan, 1990) มีการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาแทนอัลบูมินเพื่อเสริมในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ไอศกรีม คุกกี้ เพื่อให้เกิดคุณสมบัติที่ดี ได้แก่ ความสามารถในการเกิดฟอง ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น (Miller and Groninger, 1976; Ostrander, Nystrom and Martinsen, 1977 อ้างอิงใน สุปราณี แย้มพราย, 2539, หน้า 14)

การนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์

โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้จากการใช้ปลาคอดเป็นวัตถุดิบ นำมาผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 30 นาที ทำให้โปรตีนร้อยละ 30 ถึง 50 เปลี่ยนเป็นเปปไทด์สายสั้นลง ง่ายต่อการละลายและเหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 84.8 เถ้าร้อยละ 6.2 ไขมันร้อยละ 2 สามารถนำมาใช้ทดแทน เคซีนได้ แต่ไม่ควรเกินร้อยละ 60 เพราะอาจทำให้การใช้ประโยชน์จากอาหารสัตว์มีค่าลดลง (Mackie, 1974)

Green and Mattick (1979) ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาด้วยเอนไซม์ปาเปน จะได้กรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับเคซีน ใช้เป็นอาหารไก่และหมูได้

Diaz-Castaneda and Brisson (1987) นำโปรตีนไฮโดรไลเซทปลามาใช้ทดแทนโปรตีนจากหางนมในการเลี้ยงโคตัวผู้อายุ 3 ถึง 5 ปี พบว่าถ้าใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาร้อยละ 67 ของโปรตีนหางนมจะไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว แต่การใช้ประโยชน์จากอาหารจะลดลงเป็นเส้นตรงเมื่อให้อาหารนาน 8 สัปดาห์ และความสามารถในการย่อยของไขมันและโปรตีนจะลดลง Jenkins, et al. (1982) พบว่าเมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาไม่เกินร้อยละ 40 ของโปรตีนหางนมเป็นอาหารเลี้ยงโคอายุ 3 ถึง 63 วัน การใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้หางนมร้อยละ 100

การนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โดยนำไปผลิตเป็นเปปโตน ซึ่งใช้ส่วนของของเหลวที่สกัดแยกจากเศษเหลือจากปลา (soluble fish extract) เป็นวัตถุดิบในการย่อยสลาย เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อปลา red hake ด้วยเอนไซม์ธรรมชาติในเนื้อปลา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยสลายส่วนของของเหลวที่สกัดจากปลาทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดีเท่ากับ beef extract และดีมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อปลา red hake (Gildberg, 1993)

Sen, et al. (1962); Sripathy, et al. (1962) ศึกษาการใช้เอนไซม์ปาเปนย่อยโปรตีนปลา เพื่อผลิตเปปโตนสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นการเริ่มต้นการศึกษาปฏิกิริยาการย่อยอย่างเป็นระบบ โดยศึกษาจากจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกตัดออกและมีการศึกษาถึงผลของตัวแปรในการย่อยที่มีต่อลักษณะการละลาย และความยาวเฉลี่ยของสายเปปไทด์ สภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการคือ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยเมื่อเปรียบเทียบโปรตีนที่ละลายน้ำซึ่งได้จากกระบวนการนี้กับเปปโตนที่ใช้ในทางการค้า พบว่ามีผลผลิตมากกว่าร้อยละ 60 เมื่อนำไปทดสอบคุณค่าทางโภชนาการในหนูทดลอง พบว่ามีปริมาณทริปโตเฟนต่ำกว่านมผงสกัดไขมัน

เปปโตน

เปปโตนเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยบางส่วน (partial hydrolysis) ของสารประเภทโปรตีนซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ให้กลายเป็นสารที่มีโมเลกุลเล็กลง โดยใช้กรด (acid) ด่าง (base) หรือเอนไซม์โปรติโอไลติก ซึ่งการย่อยจะเกิดขึ้นตามลำดับ (Brody, 1965 อ้างอิงใน วิชชุลดา ช่วยฉิม, 2544, หน้า 4) ดังนี้

โปรตีน → โปรตีโอส → เปปโตน → โพลีเปปไทด์ → กรดอะมิโน

(protein) (proteose) (peptone) (polypeptide) (amino acid)

องค์ประกอบทางเคมีของเปปโตนยังไม่เป็นที่ทราบอย่างแน่นอน สมบัติของเปปโตนมีความแตกต่างกันขึ้นกับความคงที่ของกระบวนการย่อยสลาย หลังจากการย่อยถึงจุดที่เหมาะสมแล้วการย่อยจะถูกหยุดปฏิกิริยาลงและถูกนำไปทำให้แห้ง เปปโตนที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาลละลายน้ำได้ และไม่ตกตะกอนด้วยความร้อน เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดก่อโรค (pathogenic bacteria) ในปัจจุบันเปปโตนได้มาจากการย่อยสลายเนื้อสัตว์ เคซีน และโปรตีนจากพืช เนื่องจากเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ซึ่งเป็นสารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที เปปโตนจึงเป็นส่วนประกอบสำคัญสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น นิวเตรียนอะการ์ (nutrient agar) นิวเตรียนบรอท (nutrient broth) และบรอมครีซอลเพอเพิลบรอท (bromcresol purple broth) (พงษ์เทพ วิไลพันธ์, 2540) เป็นต้น

ปัจจุบันนิยมใช้เปปโตนเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์สูตรต่างๆ เปปโตนที่รู้จักกันดี ได้แก่ bacteriological peptone ของบริษัท Oxoid และ bacto-peptone ของบริษัท Difco ที่ผลิตจากการย่อยสลายโปรตีนจากสัตว์ด้วยเอนไซม์ ซึ่งผลิตและจำหน่ายเป็นการค้าไปทั่วโลก (พิชญา ชินอุปราวัฒน์, 2539, หน้า 4)

Stephens, et al. (1976) ศึกษาการสกัดเปปโตนจากหัว และเปลือกกุ้ง ซึ่งเป็นเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปกุ้ง โดยการปล่อยให้เกิดกระบวนการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำของเหลวที่ได้ไปเข้ากระบวนการทำแห้ง นำไปทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี และทดสอบการใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยการวัดปริมาณชีวมวล (biomass) ที่เกิดขึ้นภายหลังการเพาะเลี้ยง

Clausen, Gildberg and Raa (1985) ศึกษาการเตรียมและการทดสอบสารที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองในสภาพที่เป็นกรดของเครื่องในปลา (acidified and autolyzed fish viscera) ในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้เครื่องในปลาคอด นำไปบด ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2.5 และเก็บที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำส่วนของเหลวชั้นล่างประกอบด้วยโปรตีน เปปไทด์ และกรดอะมิโนไปกรองแล้วทำให้เข้มข้นโดยใช้การระเหยสุญญากาศ (vacuum evaporator) เปรียบเทียบกับแบคโตทริปโตน (bacto-tryptone) จาก Difco Laboratory พบว่า FPA (fish viscera protein autolysis) มีกรดอะมิโนทั้งหมด (total amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบเหมือนในปลาคอด และไม่แตกต่างจากแบคโต ทริปโตนมากนัก ยกเว้นไฮดรอกซีโพรลีน ซีสเตอีน (cysteine) และทอรีน ซึ่งไม่พบในแบคโต ทริปโตนแต่พบใน FPA สำหรับการทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหาร

สำหรับการเจริญของแบคทีเรียพบว่า ให้ผลการเจริญที่ดีทั้งแบคทีเรียที่แยกจากสภาวะแวดล้อมในทะเลและแบคทีเรียที่แยกจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่ใช่ทะเล

ไพรัตน์ โสภโณดร (2532) ศึกษาการใช้หัวกุ้งจากโรงงานแปรรูป เพื่อทำการผลิตเปปโตนด้วยการย่อยตัวเองและการย่อยโดยการเติมเอนไซม์ ซึ่งสภาวะย่อยตัวเองที่เหมาะสมประกอบด้วยการใช้ฟอสเฟตซิเตรทบัฟเฟอร์ (phosphate citrate buffer) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับหัวกุ้ง ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.5 ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 52.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ผลผลิตของโปรตีนเฉลี่ยเป็นร้อยละ 71

Vecht-Lifshitz, Almas and Zomer (1990) ศึกษาการนำเปปโตนจากเศษเหลือของโรงงานแปรรูปปลามาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำเปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลาผสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อระหว่างสูตรอาหารที่ใช้แบคโตเปปโตนทางการค้า (bacto-peptone) และเปปโตนจากปลา (fish peptone) ที่เตรียมได้จากห้องทดลอง ทดสอบกับเชื้อ 9 ชนิด คือ *Streptomyces tenda*, *Gibberella fujikuroi*, *B. sphaericus*, *B. thuringiensis*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, *S. aureus*, *Serratia marcescens* และ *P. vulgaris* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเปปโตนจากปลาเป็นส่วนผสมอยู่สามารถทำให้เชื้อเจริญได้ดีมีขนาดของโคโลนีใหญ่กว่าเชื้อบนอาหารที่มีเปปโตนทางการค้า นอกจากนี้อัตราการเจริญของเชื้อในระยะเพิ่มจำนวน (exponential phase) ประมาณ 3 ถึง 8 ชั่วโมง ในอาหารที่มีเปปโตนจากปลามีมากกว่าถึง 55 เท่า และอัตราการเจริญโดยรวมมีมากกว่าถึง 3.2 เท่า นั่นคือ อาหารที่มีเปปโตนจากปลานอกจากจะเพิ่มอัตราการเจริญแล้ว ยังเพิ่มปริมาณเซลล์ได้มากกว่าอาหารที่มีเปปโตนทางการค้าเป็นส่วนผสมอีกด้วย

มาตรฐานโปรติเอสเปปโตน

มาตรฐานโปรติเอสเปปโตนเป็นมาตรฐานทางเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างเปปโตนที่ผลิตได้จากการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส (Agar peptone and other, 1960) โดยกำหนดไว้ว่า Standard plate count ต้องพบน้อยกว่า 5,000 โคโลนีต่อมิลลิลิตร Yeasts and molds ต้องพบน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ไม่พบ Coliforms และ Salmonella ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในตัวอย่างเปปโตนเริ่มต้นก่อนการนำไปเป็นอาหารในการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ต่อไป

กรดอะมิโน

กรดอะมิโนมีสูตรโครงสร้างเป็น NH_2–CHR–COOH โดยกรดอะมิโนที่พบมากในธรรมชาติมีอยู่ 20 ชนิด ได้แก่ ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) วาลีน (valine) ลิวซีน (leucine) ไอโซลิวซีน (isoleucine) ฟินิลอะลานิน (phenylalanine) ทริปโตเฟน (tryptophan) ไทโรซีน (tyrosine) ซีสเตอีน (cysteine) เมตไทโอนีน (methionine) กรดแอสปาร์ติค (aspartic acid) กรดกลูตามิก (glutamic acid) ไลซีน (lysine) อาร์จินีน (arginine) ฮิสทิดีน (histidine) แอสพาราจีน (asparagines) กลูตามีน (glutamine) เซอรีน (serine) ทรีโอนีน (threonine) และโพรลีน (proline) ส่วนหนึ่งของกรดอะมิโนเหล่านี้ถูกนำไปใช้สังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ของร่างกาย แต่อีกส่วนหนึ่งจะถูกสลายต่อไปเป็นพลังงานคะตาบอลิซึม (catabolism) ของกรดอะมิโนจะได้สารตัวกลางที่สามารถป้อนเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) และวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway)

ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทขึ้นกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนในวัตถุดิบเริ่มต้น กรดอะมิโนที่พบมากในโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ ทอรีน (taurine) อาร์จินีน ไกลซีน ไลซีน ลูซีน โพรลีน กรดกลูตามิก (Chen, et al., 1992) ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากหัวกุ้งกุลาดำ โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 65 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ประกอบด้วยกรดกลูตามิกสูงสุดคือ ร้อยละ 11.92 รองลงมาคือกรดแอสปาร์ติก ร้อยละ 8.81 ลูซีน ร้อยละ 5.59 และไกลซีน ร้อยละ 5.47 ตามลำดับ โดยมีปริมาณซีสเตอีนต่ำสุดคือ ร้อยละ 0.84 และเมื่อพิจารณาองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสที่ดีซึ่งประกอบด้วย กรดกลูตามิก กรดแอสปาร์ติก ไกลซีน ซีรีน ทรีโอนีน อะลานีน และโพรลีน ซึ่งให้รสหวาน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวกุ้งกุลาดำประกอบด้วยกรดกลูตามิก และกรดแอสปาร์ติกในปริมาณที่สูง (ไตรตะวัน คงแก้ว, 2542) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้จากเครื่องในปลาทูน่า พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโนที่สูงเช่นกัน โดยเฉพาะปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นได้แก่ ฟินิลอะลานีน ลูซีน ไลซีน เมตไทโอนีน และทรีโอนีน (อัจฉริยา เชื้อช่วยชู, 2542) ส่วน Kim, et al. (1997) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากส่วนที่เหลือหลังจากการแล่เนื้อปลาคอด โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากไส้ติ่งปลาทูน่า จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่ามีกรดกลูตามิก ไกลซีน แอสพาราจีน อะลานีน ไลซีน ซีรีนและอาร์จีนีนในปริมาณที่สูง ส่วนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาคาเพลิน (capelin) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยกรดแอสปาร์ติก ไลซีน ลิวซีน และอะลานีนในปริมาณสูง ส่วนทริปโตเฟนและเมตไทโอนีนมีปริมาณน้อย เนื่องจากกรดอะมิโนทั้งสองเกิดการ

สูญเสียไปในระหว่างกระบวนการวิเคราะห์ (Shahidi, Han and Synowiecki, 1995 อ้างอิงในวันชัย เกียรติพิมล, 2545, หน้า 17)

Chen, et al. (1992) ได้ทดลองผลิตสารละลายที่ได้จากการย่อยเศษกุ้ง (shrimp hydrolysate) โดยการใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ *Cellulomonas flavigena* NTOU1 ที่ผ่านการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ (enzyme activities) อยู่ในช่วง 1.3 ถึง 1.9 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อนำมาย่อยสับสเตรท พบว่าปริมาณผลผลิตที่ได้สูง ร้อยละ 63.5 และมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ คือ ทอรีน อาร์จีนีน ไกลซีน ไลซีน ลิวซีน โพรลีน และกรดกลูตามิก ซึ่งมีมากกว่าในผลผลิตที่ไม่ผ่านการหมักด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าว ประมาณ 1.9 เท่า