

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลาทับทิม

ปลาทับทิม หรือปลานิลแดงสายพันธุ์ไทยพบครั้งแรกในปี พ.ศ. 2511 ณ สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดอุบลราชธานี แต่ลักษณะสีของลำตัวปลายังไม่เด่นชัดนัก โดยเฉพาะที่ส่วนหัวยังมีสีกระดากระต่าง และอาศัยปะปนอยู่กับฝูงปลานิลธรรมดา ต่อมาได้มีการปรับปรุงพันธุ์จนกลายเป็นปลานิลแดงที่มีสีสันทึบขึ้นจนมีสีแดงทั้งตัวดังภาพ 3 และได้กระจายพันธุ์ปลานิลสีแดงไปยังสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติในปี พ.ศ. 2525 ต่อมากรมประมงได้ส่งปลานิลสีแดงไปตรวจสอบสายพันธุ์ ณ มหาวิทยาลัยสเตอร์ลิง ประเทศอังกฤษและมหาวิทยาลัยฟิลิปปินส์ ซึ่งสรุปได้ว่าปลานิลสีแดงเป็นลูกผสมระหว่างปลาหมอเทศและปลานิล โดยมีความถี่ของปลาหมอเทศ ร้อยละ 22 และปลานิล ร้อยละ 78 (สุพิมพ์ ศิริสายัณห์, 2541, หน้า 4-5) เมื่อวันที่ 2 มกราคม พ.ศ. 2527 คุณวนิช วารีกุล อธิบดีกรมประมงในขณะนั้น ได้น้อมเกล้าฯ ถวายลูกปลานิลแดงจำนวน 810 ตัว แต่สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ซึ่งพระองค์ทรงเลี้ยงไว้ในบ่อวังสวนจิตรลดา ใช้เวลาเพียง 3 เดือน ก็ทรงพระราชทานลูกปลานิลแดง จำนวน 14,509 ตัว คืนแก่กรมประมงเพื่อนำไปเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อไป และได้ทรงพระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า "ปลาทับทิม" หรือ "Thai Red Tilapia" (ประสิทธิ์ศิลป์ ชัยยะวัฒนะโยธิน, 2552, หน้า 97)



ภาพ 3 ปลาทับทิม หรือ ปลานิลแดง

ที่มา: ประทีปพันธุ์ปลา, ม.ป.ป.

ปัจจุบันความนิยมบริโภคเนื้อปลาคุณภาพเพื่อรักษาสุขภาพมีมากขึ้น ภาคเอกชนอย่างเครือเจริญโภคภัณฑ์ จึงได้ศึกษาพัฒนาสายพันธุ์ปลาเนื้อเศรษฐกิจตัวใหม่ ในชื่อพระราชทานว่า "ปลาทับทิม" โดยใช้เทคโนโลยีในการเลี้ยงในน้ำทะเล ใช้อาหารสำเร็จรูปคุณภาพสูง มีการควบคุม

คุณภาพน้ำให้เหมาะสมตลอด การเลี้ยงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่สะอาด ถูกสุขลักษณะ ปลาทับทิม มีคุณสมบัติพิเศษที่ทำให้เป็นปลาเนื้อเศรษฐกิจ คือ หัวเล็ก สันหนา มีปริมาณเนื้อต่อน้ำหนักมาก ถึงร้อยละ 40 เติบโตเร็ว เนื้อขาวแน่นละเอียด รสชาติดีมาก และมีโภชนาการสูง ปลาทับทิมจึงเป็น ปลาเศรษฐกิจ ผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาด เนื่องจากมีผู้นิยมบริโภคจำนวนมากนิยมนำปลา ทับทิมมาทำเป็นอาหาร วัสดุเศษเหลือที่ได้จากขั้นตอนการตัดแต่งปลาทับทิมมีมากถึงร้อยละ 40 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว ได้แก่ เครื่องในปลา เลือด สารให้สี และเกล็ด (สุปราณี แยมพราย, 2539) ปัจจุบันจึงมีเศษเหลือจากการแปรรูปเป็นจำนวนมาก

ส่วนประกอบเครื่องในปลา

1. กระเพาะอาหาร (stomach) กระเพาะอาหารเป็นอวัยวะส่วนหนึ่งที่ใช้ในการย่อยอาหาร โดยทั่วไปแล้วกระเพาะอาหารจะมีลักษณะเป็นท่อรูปกรวย ทอดตามความยาวของลำตัว และสามารถถูกแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ กระเพาะอาหารส่วนต้น มีชื่อเรียกว่า cardiac portion และกระเพาะอาหารส่วนปลาย มีชื่อเรียกว่า pyloric portion อย่างไรก็ตามการแบ่งส่วนของกระเพาะอาหารทั้ง 2 ส่วนนี้ยังไม่มีการแบ่งเขตที่แน่นอน โดยพื้นผิวด้านในจะย่นถี่และมีต่อมเล็กๆ ทำหน้าที่ขับน้ำย่อย ได้แก่ เปปซิน เพื่อย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลง

2. ลำไส้เล็ก (intestine) เป็นส่วนที่มีลักษณะเป็นท่อตรงหรือท่อขดม้วนทับซ้อนกันอยู่ จัดได้ว่าเป็นส่วนที่มีการคลุกอาหารกับน้ำย่อย ซึ่งมีสภาพเป็นกรดเกลือเจือจาง เพื่อให้มีโมเลกุล เล็กลง เหมาะแก่การดูดซึมของผนังลำไส้ ลำไส้เล็กแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

2.1 duodenum เป็นลำไส้เล็กส่วนแรก เป็นส่วนที่มีความยาวมากที่สุด โดยเริ่มต้นจากส่วนที่ติดกับกระเพาะอาหารซึ่งจะมีสีดำนากกว่าส่วนของกระเพาะเนื่องจากมีน้ำดีไหลเข้ามา เป็นส่วนที่มีกล้ามเนื้อแข็งแรง

2.2 jejunum เป็นลำไส้เล็กส่วนกลาง ซึ่งมีสีและขนาดไม่เหมือนลำไส้เล็กส่วนแรก มีลักษณะเป็นช่วงสั้นและคอดเล็กลงตรงส่วนที่เป็นปลายสุดของบริเวณนี้

2.3 ileum เป็นลำไส้ส่วนสุดท้ายที่มีลักษณะแคบ และสั้นกว่าส่วนอื่นๆ ทั้งหมดเป็นส่วนที่เหยียดตรงไปทางหาง

3. ลำไส้ใหญ่ (caecum) เป็นส่วนสุดท้ายของลำไส้ จะมีลักษณะเป็นแผ่นเนื้อเยื่อ ข้อนพับอยู่ หรือเป็นแผ่นที่เรียงซ้อนกันเป็นชั้นแบบบันได แผ่นเนื้อเยื่อนี้ทำหน้าที่ช่วยในการดูดซึมอาหารที่ถูกย่อยแล้วให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

4. ตับ (liver) เป็นต่อมขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของช่องท้อง มีสีน้ำตาลเหลืองหรือดำปนแดง มีลักษณะเป็นพู (loop) แต่ละพูมีความยาวไม่เท่ากัน ตับปลามีน้ำหนักประมาณร้อยละ 1.5 ของน้ำหนักตัว ตับปลามีวิตามินเอ และวิตามินบี ตับทำหน้าที่ สะสมอาหารที่ย่อยแล้ว

พวกน้ำตาลและไขมัน อาหารเหล่านี้ร่างกายจะนำมาใช้เมื่อร่างกายขาดแคลนอาหาร และช่วยกลั่นนํ้าย่อยที่จะถูกส่งต่อไปยังลำไส้ ยังไม่ทราบชนิดของนํ้าย่อยดังกล่าวที่แน่นอน

5. ถุงน้ำดี (gall bladder) มีลักษณะเป็นถุงกลมหรือยาว สีเขียวเข้มและมีผนังบางใส ถุงนี้ฝังอยู่ในตับติดกับตับทางท่อซิสติก (cystic duct) ไปสู่ลำไส้เล็ก โดยน้ำดีทำหน้าที่ในการย่อยไขมันทำให้โมเลกุลเล็กลงสะดวกต่อการดูดซึมที่ผนังลำไส้ นอกจากนี้น้ำดียังทำหน้าที่ทำให้นํ้าย่อยมีค่าความเป็นกรดต่าง ที่เหมาะต่อการย่อยอาหารในลำไส้

6. ไส้ติ่ง (appendix) เป็นต่อมมีลักษณะคล้ายนิ้วมือเป็นถุงตันมีจำนวนมาก พบอยู่ส่วนท้ายกระเพาะอาหารหรือบริเวณติ่งลำไส้ตอนบน ไส้ติ่งทำหน้าที่สร้างแลคเตส (lactase) สำหรับย่อยอาหารประเภทแป้ง

7. ตับอ่อน (pancrease) เป็นอวัยวะสร้างนํ้าย่อยมีสี่ครีมี ตั้งอยู่ส่วนท้ายของกระเพาะอาหารหรือใกล้ไส้ติ่ง และมีท่อขนาดเล็กติดต่อกับท่อน้ำดี ตับอ่อนทำหน้าที่สร้างอะไมเลส (amylase) ทริปซิน (trypsin) และสเตปซิน (stepsin) เพื่อใช้ในการย่อยแป้ง โปรตีน และไขมัน ตามลำดับ (วิมล เหมะจันทร์, 2540, หน้า 120-134)

การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือจากปลา

จากการที่อุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำมีการขยายตัวมากขึ้น ปริมาณการบริโภคสัตว์น้ำภายในประเทศและการส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศมีจำนวนสูง ทำให้อุตสาหกรรมเหล่านี้ต้องประสบปัญหาเกี่ยวกับการจัดการกับวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูป ซึ่งแต่เดิมจะนำวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมาผลิตเป็นอาหารสัตว์ ต่อมามีการพัฒนาแนวทางการนำเศษเหลือมาทำให้เกิดประโยชน์ และเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าแก่เศษเหลือเหล่านี้โดยการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ (สุภาพร มหันต์กิจ, 2549, หน้า 14-16) ดังนี้

เจลาติน

เจลาตินเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของหนังและกระดูกปลา ซึ่งสามารถนำเจลาตินมาใช้ได้กับอุตสาหกรรมต่างๆ ทั้งอุตสาหกรรมอาหาร และอุตสาหกรรมยา

ปลาป่น

ปลาป่นเป็นส่วนหนึ่งของแข็งที่ได้จากการกำจัดน้ำและไขมันออกจากปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่ำหรือได้จากเศษเหลือจากปลา โดยวิธีการบีบอัดหรือปั่นเหวี่ยงเอาส่วนน้ำและไขมันออกไป ทำให้ปลาป่นมีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็น วิตามิน และเกลือแร่ในปริมาณสูง แต่มีคุณสมบัติแข็งหนืดที่ไม่ดีนัก ส่วนใหญ่จะนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์

ปลาหมึก

ปลาหมึกเป็นผลิตภัณฑ์เหลวที่ได้จากการหมักเนื้อปลาหรือเศษเหลือจากปลาด้วยเอนไซม์โปรติเอสธรรมชาติในปลาเอง เช่น เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) หรือคาเทปซิน (cathepsin) ภายใต้สภาวะกรด ด้วยการเติมกรดอินทรีย์หรือกรดอนินทรีย์ เพื่อเป็นการป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และเป็นการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ มีผลทำให้เกิดการย่อยสลายให้ได้เปปไทด์ขนาดเล็ก และกรดอะมิโนอิสระหลากหลายชนิด ปลาหมึกมีกระบวนการผลิตคล้ายกับการผลิตน้ำปลาแต่ในการผลิตปลาหมึกจะไม่มีกระบวนการเติมเกลือในกระบวนการย่อยสลายด้วยตัวเองของการผลิตปลาหมึกจะเกิดขึ้นเร็วกว่าการผลิตน้ำปลา ซึ่งของเหลวที่ได้จากการหมักปลาจะมีรสขม (Gildberg, 1993, pp. 1-3) จึงนิยมใช้เป็นอาหารสัตว์

โปรตีนปลาเข้มข้น

โปรตีนปลาเข้มข้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตด้วยวิธีที่เหมาะสมต่อการบริโภค โดยการสกัดเอาไขมันออกจากเศษเหลือจากปลาและกำจัดสารที่ละลายได้นอกเหนือจากโปรตีนออกด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ ภายใต้อุณหภูมิ 70-100 องศาเซลเซียส จากนั้นระเหยเอาส่วนน้ำและตัวทำละลายที่ตกค้างออกไป ทำให้ได้โปรตีนที่มีความเข้มข้น แล้วนำไปทำแห้งและบดเป็นผงละเอียด ผลิตภัณฑ์นี้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงแต่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนัก อันเนื่องมาจากตัวทำละลายและอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดไขมัน จึงทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ซึ่งนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้หลายชนิด เช่น พาสต้า ขนมปังและซูป เป็นต้น

โปรตีนปลาสกัด

โปรตีนปลาสกัด เป็นผลิตภัณฑ์ที่อาศัยสมบัติการละลายของโปรตีนในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม หรือในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม แยกส่วนที่ไม่ละลาย ได้แก่ กระดูก เกล็ด หนัง และพังผืด เป็นต้น ออกจากสารละลายโปรตีนโดยการกรองหรือปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำสารละลายส่วนใสมาปรับสภาวะให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนและกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการ แล้วทำแห้งด้วยวิธีการที่เหมาะสม คุณภาพของโปรตีนปลาสกัดขึ้นอยู่กับวัตถุดิบ สภาวะการสกัด วิธีการตกตะกอน การกำจัดสี กลิ่น ไขมัน และการทำแห้ง แต่เดิมใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ ต่อมาได้มีการวิจัยพัฒนาจนนำมาใช้เป็นอาหารหลายชนิด เช่น ลูกชิ้นปลา บะหมี่แฮมเบอร์เกอร์ เป็นต้น

โปรตีนไฮโดรไลเซตหรือเปปไทด์

โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนโดยการตัดสายเปปไทด์ที่มีสายโซ่ยาวบริเวณพันธะเปปไทด์ให้เป็นของผสมของเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระสายสั้นๆ การเร่งปฏิกิริยาสามารถทำได้โดยการใช้สารเคมีที่เป็นกรด ด่าง หรือ

เอนไซม์จำพวกโปรติเอส ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของโปรตีนไฮโดรไลเซท จึงจำเป็นต้องควบคุมสภาวะในการเกิดปฏิกิริยา ทั้งเวลา อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดต่าง เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามต้องการ

เปปโติน

เปปโตินได้จากการย่อยสลายโปรตีนซึ่งมีโมเลกุลใหญ่ให้เป็นสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ทำให้เกิดการผสมผสานระหว่างโปรตีนที่ละลายในน้ำคือ โพลีเปปไทด์ (polypeptide) ไดเปปไทด์ (dipeptide) และกรดอะมิโน (amino acid) ซึ่งสารประกอบที่ได้นี้เรียกว่า เปปโติน ปัจจุบันเปปโติน ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการคือ Bacto peptone ของบริษัท Difco มีชนิด และองค์ประกอบของ กรดอะมิโนดังตาราง 1

ตาราง 1 ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในเปปโตินของบริษัทดิฟโก

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณ (ร้อยละ)	ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณ (ร้อยละ)
Arginine	6.78	Leucine	3.30
Aspartic acid	6.11	Lysine	3.93
Cystine	0.22	Methionine	0.80
Glutamic acid	9.82	Phenylalanine	2.17
Glycine	19.20	Proline	12.17
Histidine	0.72	Serine	3.27
Iso-leucine	1.60	Threonine	2.00
Leucine	3.30	Tryptophan	0.39
Lysine	3.93	Tyrosine	0.67
Iso-leucine	1.60	Valine	2.42

ที่มา: วรพงษ์ อัครเวศมณี, 2538, หน้า 43

เปปโติน มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาล สามารถละลายน้ำได้ตามความเข้มข้น ที่ต้องการ และไม่ตกตะกอนเมื่อผ่านสภาวะที่มีอุณหภูมิและแรงดันสูงของการทำให้ปลอดเชื้อ (sterilization) เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียชนิดที่ก่อให้เกิดโรค (pathogenic bacteria) คุณสมบัติของเปปโติน จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้ในการผลิตและ

วิธีการย่อยสลายโปรตีน การย่อยสลายโปรตีนเพื่อให้ได้เปปไทด์ อาจใช้ กรด ต่าง หรือเอนไซม์ แต่การย่อยด้วยกรดหรือด่าง จะทำลายวิตามินและกรดอะมิโนบางส่วน บริษัท Condalab (2012) ได้กล่าวว่าเปปไทด์ที่ได้จากเนื้อเยื่อของสัตว์จะต้องมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดไม่ต่ำกว่าร้อยละ 10 ปริมาณเถ้ามีค่าไม่เกินร้อยละ 15 และความชื้นมีค่าไม่เกินร้อยละ 6

การย่อยสลายโปรตีน

การย่อยสลายโปรตีน (protein hydrolysis) มี 3 วิธีหลักๆ ดังนี้

การย่อยสลายด้วยกรด

นิยมใช้กรดอินทรีย์ คือ กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟิวริก แต่พบว่าใช้กรดซัลฟิวริก ย่อยสลายโปรตีนจะทำให้โปรตีนมีกลิ่นไม่ดี และเมื่อทำให้เป็นกลางจะเกิดตะกอนของเกลือซัลเฟต ทั้งนี้เพราะไอออนซัลเฟตถูกแยกออกโดยการเติมเบสอย่างไฮดรอกไซด์หรือแคลเซียมออกไซด์ซึ่งจะทำปฏิกิริยาให้เบสซัลเฟตหรือแคลเซียมซัลเฟต และตะกอนดังกล่าวจะดูดซับกรดอะมิโนหรือสารประกอบอื่นๆ ที่ได้จากการย่อยโปรตีน ดังนั้นจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกมากกว่ากรดซัลฟิวริก (Hill, 1965) การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดมีข้อดีคือ สามารถทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายต่ำและใช้เวลาสั้น แต่มีข้อเสียคือเกิดการสลายตัวของกรดอะมิโนทริปโตเฟน และในบางสภาวะกรดอะมิโนฮิสทีดีน ซีรีน และเมไทโอนีนอาจถูกทำลายด้วย (Olcott and Fraenkel, 1947, pp. 583-586)

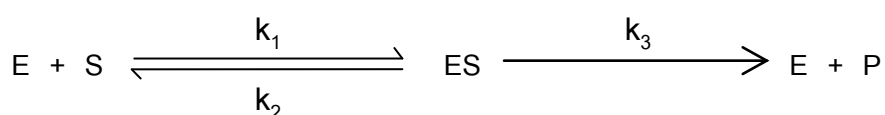
การย่อยสลายโปรตีนด้วยด่าง

ด่างที่นิยมใช้ในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ เบสเรียมไฮดรอกไซด์ และโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ สภาวะที่ใช้ทั่วไปคือใช้ด่างเข้มข้น 4-5 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 4-8 ชั่วโมง การย่อยสลายด้วยด่างแม้กรดอะมิโนทริปโตเฟนถูกทำลายน้อย แต่กรดอะมิโนบางชนิดอาจเกิดรีซีมิเซชัน (racemization) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนกรดอะมิโนในรูป L-form ไปเป็นกรดอะมิโนในรูป D-form ที่ร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้ และยังทำให้กรดอะมิโน อาร์จินีน ทรีโอนีน และซีสทีนถูกทำลายด้วย นอกจากนี้ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดี การย่อยสลายด้วยด่างจึงไม่เป็นที่นิยม (Hill, 1965)

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์

เป็นวิธีที่ให้อัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการใช้กรดและด่าง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการตัดพันธะเปปไทด์สูง โดยเป็นการเร่งปฏิกิริยาการย่อยโปรตีนด้วยน้ำ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ไฮโดรไลซิส (hydrolysis) โดยเปปไทด์สายใหม่ที่ได้จากการย่อยสลายสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ในการย่อยครั้งต่อไป (Adler-Nissen, 1993, pp. 159-203) กระบวนการย่อยสลายจะประกอบด้วยปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกัน 3 ปฏิกิริยา โดยปฏิกิริยา

แรกเกิดขึ้นจากการที่เอนไซม์ (E) จับกับสารตั้งต้น (S) เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของ Michaelis (Michaelis complex, ES) ทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่สภาพเปลี่ยนและมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง จนกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอนไซม์-ผลิตภัณฑ์ (EP complex) จากนั้น EP จึงปล่อย ผลิตภัณฑ์ที่เป็นเปปไทด์ (P) ออกมาทำให้เอนไซม์กลับมาเป็นอิสระซึ่งพร้อมจะเร่งปฏิกิริยาสลาย สารตั้งต้นต่อไป ดังสมการในภาพ 4



E: enzyme, S: substrate, ES: enzyme-substrate complex, P: resulting peptides,
k: reaction velocity constants

ภาพ 4 กลไกการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

ที่มา: Adler-Nissen, 1993

ในการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ควรคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย ถ้าขนาดโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดใหญ่ อาจได้โพลีเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ แต่จะได้กรดอะมิโนที่ต้องการปริมาณน้อย หรือใช้เอนไซม์ที่ไม่ตัดพันธะของกรดอะมิโน จะทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนที่ต้องการน้อย (Light and Smith, 1963) ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) จากพืช เช่น ปาเปน โบรมิเลน จากสัตว์ เช่น เปปซิน และจากจุลินทรีย์ เช่น เอนไซม์จากแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยมีการกำหนดสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน จะดีกว่าการใช้กรดและด่าง เพราะเอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน แต่ละชนิดจับกันโดยไม่ทำลายกรดอะมิโน แต่ข้อด้อยของวิธีนี้ คือ เอนไซม์บริสุทธิ์มีราคาสูง

ระดับของการย่อยสลายโปรตีน

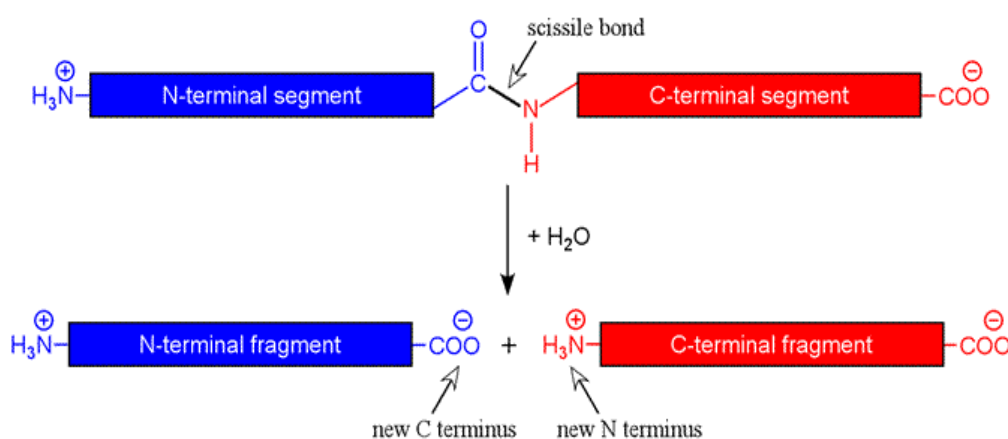
ระดับของการย่อยสลายโปรตีน (degree of protein hydrolysis, DH) เป็นวิธีการติดตามปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอส มีความสำคัญในการควบคุมขอบเขตของการย่อยสลายโปรตีน โดยดัชนีที่ใช้ควบคุมการย่อยโดยวิธีตกตะกอนด้วย TCA และนำมาคำนวณตามสูตร

$$\text{Degree of protein hydrolysis (DH)} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

ค่า Degree of protein hydrolysis หมายถึงร้อยละของพันธะเปปไทด์ที่แตกออกในระหว่างปฏิกิริยาการสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ ซึ่ง h คือ จำนวนพันธะเปปไทด์ที่แตกออก โดยวัดในรูปของปริมาณไนโตรเจนที่ถูกย่อยสลายต่อกรัมโปรตีน และ h_{tot} คือ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่อกรัมของโปรตีน (Adler-Nissen, 1986, pp. 110-169)

เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส (proteases enzyme) เป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตพบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้ สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสโปรตีนและโพลีเปปไทด์ให้ได้เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้น ๆ ดังแสดงปฏิกิริยาในภาพ 5



ภาพ 5 ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยโปรติเอส

ที่มา: Cronk, 2010

แหล่งของโปรติเอส

1. โปรติเอสที่ผลิตจากพืช (plant proteases) การผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากพืชมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น ใช้เวลานานมาก อย่างไรก็ตามมีเอนไซม์โปรติเอสจากพืชที่ผลิตใช้กันอย่างแพร่หลาย เช่น ปาเปน (papain) จากยางมะละกอ โบรมิเลน (bromelain) จากสับปะรด ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับ cysteine protease ทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 5-9 เคราติเนส (keratinase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยผมและขน มักใช้ป้องกันการอุดตันในระบบบำบัดน้ำเสีย

2. โปรติเอสที่ผลิตจากสัตว์ (animal proteases) ส่วนใหญ่มาจากตับอ่อนของสัตว์ ตัวอย่างของโปรติเอสที่ได้จากสัตว์ เช่น ทริปซิน (trypsin) จากลำไส้ ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการผลิตยา ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) จากตับ ใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรคจึงเป็นเอนไซม์ที่มี

ราคาแพง เปปซิน (pepsin) จากกระเพาะของสัตว์ ทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่าง 1-2 และเรนิน (rennin) จากกระเพาะวัว ใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมนม ทำให้ผลิตภัณฑ์นมมีความคงตัว เพิ่มกลิ่นและรสชาติให้ดีขึ้น

3. โปรติเอสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ (microbial proteases) เอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากพืชและสัตว์มีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เป็นผลทำให้การผลิตเอนไซม์จากจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญ ทั้งนี้เพราะจุลินทรีย์เจริญเร็ว ใช้เวลาในการผลิตสั้น ใช้พื้นที่น้อย ง่ายต่อการปรับปรุงสายพันธุ์และสามารถใช้วัตถุดิบในการนำมาผลิตได้หลากหลายชนิด (Suryanarayana, Saraswathi and Dwarakanath, 1998, pp. 597-635)

ประเภทของโปรติเอส

1. เอกโซเปปติเดส (exopeptidase) มีหน้าที่ในการสลายพันธะเปปไทด์จากปลายของสายเปปไทด์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Watson, 1979, p. 86)

1.1 อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้าน N-terminal ($-NH_2$) ของสายเปปไทด์และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระ ไดเปปไทด์ หรือไตรเปปไทด์ โดยทั่วไปเป็นเอนไซม์จำพวก intracellular enzymes พบได้อย่างกว้างขวางทั้งแบคทีเรียและรา เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus licheniformis*, *Aspergillus oryzae* เป็นต้น

1.2 คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidases) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเปปไทด์จากปลายด้าน C-terminal ($-COOH$) ของสายเปปไทด์และได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือไดเปปไทด์ ซึ่งแบ่งออกเป็นกลุ่ม ขึ้นกับหมู่อะมิโนที่อยู่ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site)

2. เอนโดเปปติเดส (endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านในของสายโพลีเปปไทด์หรือโปรตีน ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มใหญ่ โดยอาศัยความแตกต่างของสถานะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (อัจฉราภรณ์ อ่อนทรวง, 2552, หน้า 24-26)

2.1 ซีรีนโปรติเอส (serin protease) หรืออัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) จะมีซีรีนเรซิดิวส์ (serine residues) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ สามารถยับยั้งการทำงานโดยเติม di-isopropyl fluorophosphate (DIF) และ phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) แต่จะทนต่อภาวะที่มี ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) PMSF เข้มข้นเพียง 1 มิลลิโมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสได้ แคลเซียมคลอไรด์ช่วยให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เอนไซม์โปรติเอสชนิดนี้มีความเสถียรสูงสุดในช่วง ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0-9.0 พบได้ทั่วไปทั้งในแบคทีเรียและรา เป็นเอนไซม์โปรติเอสที่มีคุณสมบัติคล้ายกับทริปซินและไคโมทริปซินในสัตว์ พบอัลคาไลน์โปรติเอสในแบคทีเรียสายพันธุ์ *Bacillus* เป็นส่วนใหญ่ อัลคาไลน์โปรติเอส

เป็นที่รู้จักกันดีและนิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตผงซักฟอก การฟอกหนัง และอุตสาหกรรมอาหาร และมีความสำคัญในทางเศรษฐกิจมากที่สุด (กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์, 2540)

ตัวอย่างแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส เช่น *Bacillus* spp. GX6638, *Bacillus* spp. AH-101 และ *Desulfurococcus mucosus* (*Streptomyces megasporu*)

2.2 ซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine protease) หรือไธออลโปรติเอส (thiol protease) เป็นเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโนซิสเตอีน อยู่บริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยสภาวะการทำงานที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วงของความเป็นกรดต่าง 6.0-7.5 จะเร่งปฏิกิริยาได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ (reducing agent) ได้แก่ hydrogencyanide (HCN) และสารประกอบที่มีหมู่ไธออล EDTA และ เมอร์แคปโตเอทานอล (mercaptoethanol) ซิสเตอีนโปรติเอสสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วยโลหะหนักและสารที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) เช่น p-chloromercury benzoate (PCMB) เอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ โบรมิเลน ปาเปน และไฟซิน Boller (1986, pp. 67-76) กล่าวว่าเอนไซม์ โบรมิเลนเป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อพืชตระกูล *Bromeliaceae* เช่น สับปะรด (*Ananas comosus* Merr.) ซึ่งพบในส่วนลำต้น เปลือก แกน ใบ และผล โดยที่เอนไซม์โบรมิเลนมีความจำเพาะในการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่มี กลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl group) หรืออะมิโนที่มีลักษณะโครงสร้างแบบอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน หรือฟีนิลอะลานีน มีความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมช่วง 6-8 สามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาด้วยสารโลหะหนัก เช่น สารพวกปรอท (mercurials) และสามารถกระตุ้นการทำงานด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน และ เมอร์แคปโตเอทานอล

2.3 เมทัลโลโปรติเอส (metallo protease) หรือนิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะอยู่ในโครงสร้างซึ่งมักจะเป็นสังกะสี (Zn) หรือเหล็ก (Fe) น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 35,000-45,000 ดาลตัน สามารถทำปฏิกิริยาได้ดีกับกรดอะมิโนไลซีนและมีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมอยู่ในช่วงความเป็นกรดต่าง 7-8 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมทัลโลโปรติเอสจะมีความเสถียรเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมไอออนเป็นองค์ประกอบ และสามารถถูกยับยั้งปฏิกิริยาได้ด้วย EDTA เข้มข้นเพียง 10 มิลลิโมลาร์ เมทัลโลโปรติเอสจะรวมถึงเอนไซม์จากแหล่งต่างๆ เช่น คอลลาจีเนส (collagenases) จากสิ่งมีชีวิตชั้นสูง สารพิษฮีโมราจิก (hemorrhagic toxins) จากงูพิษ และเทอร์โมไลซิน (thermolysin) จากแบคทีเรีย เนื่องจากมีความเสถียรต่ำ จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ค่อนข้างจำกัด แต่ก็พบว่ามี การนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมบางประเภท เช่น อุตสาหกรรมการฟอกหนัง ผลิตเบียร์ ขนมอบ และอุตสาหกรรมอาหาร ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เทอร์โมไลซิน (thermolysin) และนิวเทรส (neutrase®)

2.4 แอซิดโปรติเอส (acid protease) หรือแอสปาร์ติกโปรติเอส (aspartic protease) จะมีปฏิกิริยาจำเพาะกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้าง (side chain) เป็นวงอะโรมาติก (aromatic amino acid) เช่น ไทโรซีน ทริปโตเฟน ฟีนิลอะลานีน เป็นต้น ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารจำพวก ไดอะโซคีโตน (diazoketone) แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารจำพวก EDTA และ DFP แอซิดโปรติเอสทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 3-4 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000-40,000 ดาลตัน เอนไซม์ในกลุ่มนี้นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักถั่วเหลือง ข้าวและธัญพืช เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว และเนยแข็ง

ประโยชน์ของโปรติเอส

โปรติเอสส่วนใหญ่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมซักล้างและอุตสาหกรรมอาหาร เมื่อเทคโนโลยีมีการพัฒนามากขึ้น และมีความต้องการในการใช้เอนไซม์เพิ่มขึ้น ทำให้มีการนำเอนไซม์โปรติเอสมาพัฒนา และนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นมากขึ้น อุตสาหกรรมที่มักมีการนำโปรติเอสไปใช้ ได้แก่ อุตสาหกรรมซักล้าง (detergents) โดยโปรติเอสเป็นหนึ่งในส่วนผสมของสารซักฟอก ซึ่งนำมาใช้ในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นสิ่งสกปรก อุตสาหกรรมฟอกหนัง (leather industry) เป็นอีกอุตสาหกรรมหนึ่งที่ใช้โปรติเอส โดยปกติใช้สารเคมี เช่น โซเดียมซัลไฟต์ ในการฟอกหนังและกำจัดขน แต่การใช้สารเคมีก่อให้เกิดปัญหามลพิษ โปรติเอสจึงถูกเลือกมาใช้ทดแทนสารเคมีเพื่อลดปัญหาทางสิ่งแวดล้อม

อุตสาหกรรมอาหารหลายกลุ่มมีการใช้โปรติเอส เช่น อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม (dairy industry) ใช้โปรติเอสในการผลิตเนยแข็งช่วยในการตกตะกอนของนม ในอุตสาหกรรมขนมอบ (baking industry) ในกระบวนการผลิตแป้งสาลีมีโปรตีนที่เรียกว่า กลูเตน (gluten) จะมีการใช้โปรติเอสผสมลงไปช่วยในการย่อยโปรตีน และลดเวลาในการผสม ทำให้ขนมอบมีปริมาณเพิ่มขึ้นในการผลิตซอสปรุงรสและน้ำปลา การใช้โปรติเอสในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากถั่ว โดยช่วยย่อยสลายโปรตีนจากวัตถุดิบ เอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในการสังเคราะห์แอสปาร์แตม ซึ่งเป็นสารที่ให้ความหวาน นำมาใช้ใน ผลิตภัณฑ์อาหารและยา ในอุตสาหกรรมยานั้นเอนไซม์โปรติเอสถูกนำมาใช้ในการพัฒนาประสิทธิภาพของยาต้านจุลินทรีย์ และใช้ร่วมกับสารปฏิชีวนะในการรักษาบาดแผล (Suryanarayana, Saraswathi and Dwarakanath, 1998, pp. 597-635)

ตาราง 2 ตัวอย่างเอนไซม์โปรติเอสที่นำมาใช้ในการย่อยโปรตีนในอาหาร

Type of protease	Name	Source	pH	Preferential specificity
Serine protease				
Animal	Trypsin	Porcine, bovine	7-9	P1: lysine, arginine
	Chymotrypsin,		8-9	P1: phenylalanine,
	Elastase			tyrosine, tryptophan
Bacterial	Subtilisin Carlsberg,	<i>Bacillus</i>	6-8	P1: alanine
	Alcalase ^b	<i>Licheniformis</i>		
	Subtilisin BPN,		6-	Broad specificity, P1
	Subtilisin Novo	<i>B. amyloliquefaciens</i>	10	mainly hydrophobic amino acid
Cysteine protease				
Plant	Papain	Papaya latex	5-8	Broad specificity, mainly
				P2: hydrophobic amino
	Bromelain	Pineapple stem	5-8	acid
	Ficin	Ficus latex	5-8	
Aspartic protease				
Animal	Pepsin	Porcine, bovine	1-4	P1 and P'1: Mainly
	Chymosin	Calf	4-6	hydrophobic amino acid
Fungal	Chymosin-like	<i>Mucor pusillus</i> ,	4-6	P1 and P'1: Mainly
		<i>M. miehei</i> ,		hydrophobic amino acid
	Aspergillopeptidase	<i>Endothia</i>	2-5	P1 and P'1: Mainly
	A	<i>parasitica</i>		hydrophobic amino acid
		<i>Aspergillus saitoi</i>	3-6	
	Neulase	<i>Rhizopus</i> sp.		Preferably glutamic acid, aspartic acid, leucine Like pepsin
Metallo protease				
Animal	Carboxy peptidase A	Pancreas	7-8	Terminal amino acid at C-terminus of peptide,
Bacterial	Neutral protease, Neutrase ^b	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5-7	except proline, arginine, lysine

ตาราง 2 (ต่อ)

Bacterial	Neutral protease, Thermolysin	<i>B. thermoproteolyticus</i>	7-9	P'1: phenylalanine, leucine, valine P'1: isoleucine, leucine, valine, phenylalanine
Technical preparations				
- Mixture of lysozyme, papain, chymopapain	Crude papain	Papaya fruit	5-9	Broad specificity
- Mixture of elastase, trypsin, c	Pancreatin	Pancreas (bovine, porcine)	7-9	Very broad specificity
chymotrypsin, carboxypeptidase				
- Mixture of serine protease, aspartic protease, metallo protease	Veron P, Biozyme A , Sumzyme LP	<i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	4-8	Very broad specificity
- Mixture of endo&exo peptidases, active at alkaline & neutral	Pronase	<i>Streptomyces</i> <i>griseus</i>	7-9	Very broad specificity

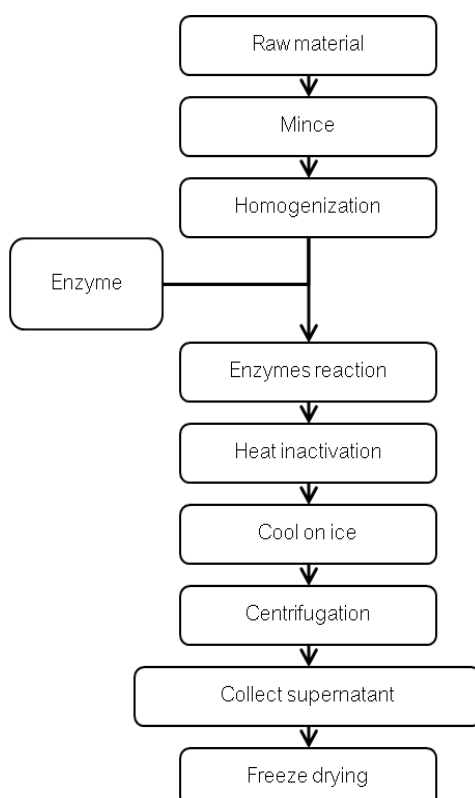
^a P_n and P'_n represent preference for amino acid at carboxylic and amino site of cleaved bond, respectively

^b Commercial preparations.

ที่มา: Adler-Nissen, 1993

ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยวิธีทางเอนไซม์

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเปปไทด์โดยเอนไซม์โปรติเอสทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์ คือ เปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ โดยปกติแล้วโปรตีนปลาสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสตามธรรมชาติในเครื่องในปลา (autolysis) เช่น เปปซิน ทริปซิน และคาเทปซิน ซึ่งวิธีการย่อยสลายนี้เป็นวิธีที่ซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในปลา มีหลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมที่แตกต่างกันทำให้ไม่สามารถควบคุมการย่อยสลายได้และใช้เวลาในการย่อยสลายนานโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ไม่ดีนัก มักใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่น ในปัจจุบันนี้การใช้เอนไซม์โปรติเอสผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังภาพ 6 เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากเอนไซม์จำเพาะต่อสารตั้งต้น และค่าความเป็นกรดต่าง จึงสามารถเลือกชนิดและสภาวะในการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม สภาวะการย่อยสลายไม่รุนแรงทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีคุณภาพดี และมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ



ภาพ 6 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยวิธีทางเอนไซม์

ที่มา: Kristinsson and Rasco, 2000, pp. 131-139

เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

งานวิจัยที่ใช้เอนไซม์ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ไพรัตน์ โสภณดร (2532) ได้ศึกษาการใช้หัวกุ้งจากโรงงานแปรรูปกุ้ง เพื่อทำการผลิตเปปโตนด้วยกระบวนการย่อยตัวเองและการย่อยสลายโดยการเติมเอนไซม์ ซึ่งสภาวะย่อยตัวเองที่เหมาะสม ด้วยการใช้ฟอสเฟตซีเตรทบัฟเฟอร์ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันกับหัวกุ้ง ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่าง เป็น 7.5 ย่อยที่อุณหภูมิ 52.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ผลผลิตของโปรตีนเฉลี่ยเป็นร้อยละ 71 และย่อยหัวกุ้งโดยเอนไซม์เปปซินในอัตราร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก โดยใช้ค่าความเป็นกรดต่าง 2.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ค่าความเป็นกรดต่าง 6.2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้คิดเป็น ร้อยละ 92 และ 82 ตามลำดับ สำหรับผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี และการทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า เปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยโดยการเติมเอนไซม์มีคุณภาพใกล้เคียงหรือดีกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง

พิชญา ชินอุปราวัฒน์ (2539) ทำการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของส่วนหัวและก้างปลาตุ๋นกับน้ำกลั่นและปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิและระยะเวลาในการย่อยที่มีผลต่อกระบวนการย่อยตัวเอง พบว่าอัตราส่วนและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยตัวเอง คือ อัตราส่วนหัวและก้างต่อน้ำกลั่น เท่ากับ 1:1 ย่อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อยนาน 2 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่าง เริ่มต้น 7.0 ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้ 3.09 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อทำการศึกษการย่อยส่วนหัวและก้างปลาตุ๋นโดยใช้เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์เปปซิน โดยศึกษาปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อย ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการย่อยซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า การย่อยโดยเอนไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้สูงสุดเท่ากับ 4.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

มัลลิกา ธนสุคนธ์ (2552) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสจากเห็ด 5 ชนิด ได้แก่ เห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดนางรม และเห็ดหูหนูดำ โดยนำเห็ดทั้ง 5 ชนิดมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยการย่อยสลายด้วยกรดไฮโดรคลอริก (acid mushroom protein hydrolysate) และย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปน (enzymatic papain mushroom protein hydrolysate) ที่มีค่าความสามารถในการย่อยเท่ากับ 17,123 ยูนิตต่อกรัม พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม เห็ดนางรม และเห็ดหูหนู

คือย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ร้อยละ 15 นาน 18 ชั่วโมง ซึ่งให้ค่าระดับการย่อยสลาย (DH) สูงสุด เท่ากับ 79.0, 78.6, 72.9 และ 77.7 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %DH มากกว่าการใช้กรด มีปริมาณเกลือ ร้อยละ 6.32-6.68 น้อยกว่าการใช้กรด และมีกรดกลูตามิกมากที่สุด เช่นเดียวกับการใช้กรด พบสารหอมระเหย 32 ชนิด ที่ให้ลักษณะกลิ่นโดยรวม คือ กลิ่นถั่ว กลิ่นโกโก้ กลิ่นได้กรอกหมักและ กลิ่นเห็ด ซึ่งสามารถนำไปผลิตผลิตภัณฑ์ processed flavor ที่ให้ความแรงของกลิ่นหมู กลิ่นนมควั่นและการยอมรับกลิ่นรสโดยรวมสูงที่สุด

ณัฐวุฒิ ส่งแสง (2550) ศึกษาการผลิต enzymatic mungbean protein hydrolysates (e-MPHs) จากกากถั่วเขียวมีโปรตีน ไขมัน เกล็ด เยื่อใย และคาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 68.49, 0.52, 3.09, 7.30 และ 20.61 (น้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (eb-MPH) และปาเปน (ep-MPH) ที่มีความสามารถในการย่อยเท่ากับ 264,221 และ 13,590 ยูนิตต่อกรัม โดยใช้ปริมาณ เอนไซม์ร้อยละ 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16, 18 และ 20 โดยน้ำหนัก เวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ที่ค่า ความเป็นกรดต่าง 6.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และหาสภาวะที่เหมาะสมด้วย response surface methodology พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิต eb-MPH คือเอนไซม์ร้อยละ 14 เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 11.12 และสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต ep-MPH คือเอนไซม์ร้อยละ 20 เวลา 24 ชั่วโมง โดยมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 2.19 ซึ่งเป็น สภาวะที่ให้ผลสอดคล้องกับการยอมรับทางประสาทสัมผัสของ eb-MPH และ ep-MPH ที่ได้รับ คະแนนกลิ่นเนื้อ กลิ่นชีอิ้ว รสหวาน รสอูมามิ และการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยรวมสูงสุด และยังมีสารให้กลิ่นรสที่เหมือนกับทางการค้า สามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในซูริมได้

Mahadeva, et al. (1978) ศึกษาการผลิตเปปโตินจากปลาทรายแดง (*Nemipterus japonicus*) โดยใช้ปลาทั้งตัวบดละเอียดไม่สกัดน้ำมันและเนื้อปลาบดที่สกัดน้ำมัน ย่อยโดยใช้ เอนไซม์ปาเปน โดยนำตัวอย่างผสมน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ความเข้มข้นของ เอนไซม์เป็น 1:30 เอนไซม์ในโตรเจนต่อโปรตีนในโตรเจน เปปโตินที่ผลิตได้นำไปทดสอบ องค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณโปรตีน เกล็ด และไขมัน และความสามารถในการใช้เป็น สารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ คือ ค่าไบโอแมส โดยการวัดค่า optical density ของ เซลล์ที่เจริญได้ในเปปโติน เปรียบเทียบกับ Difco peptone และ catfish peptone พบว่าปริมาณ ของเปปโตินที่ผลิตได้มีค่าต่ำกว่า Difco peptone และมีปริมาณไขมันต่ำกว่าทั้ง Difco peptone และ catfish peptone ความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและการเพิ่มปริมาณ ของจุลินทรีย์ พบว่าเปปโตินที่สกัดได้จากเนื้อปลาทรายแดงบดละเอียดสกัดน้ำมัน ให้ผลการเจริญ ของจุลินทรีย์ดีที่สุด

Suryanarayana, Saraswathi and Dwarakanath (1998) ศึกษาการเตรียมเปปโตินสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจากวัตถุดิบ 2 ส่วน คือ เครื่องในปลาแมคเคอเรล (mackerel) และของเสียที่ได้จากกระบวนการแปรรูปปลาสวาย (*Barbus caranticus*) โดยใช้ส่วนที่เป็นหัวและเครื่องในปลามาสับให้ละเอียด ผสมน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรต่อน้ำหนัก ย่อยโดยใช้เอนไซม์ปาเปน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักของวัตถุดิบ ทำการย่อยที่สภาวะต่างกัน คือ ส่วนเครื่องในปลาแมคเคอเรล ย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 5.0 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ส่วนหัวและเครื่องในปลาน้ำจืด ย่อยที่ 40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดต่าง 7.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า ตัวอย่างที่ได้จากการย่อยหัวและเครื่องในปลาสวายมีคุณภาพใกล้เคียงกับ Oxoid bactopectone ในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ *Lactobacillus arabinosus* และ *Streptococcus faecalis* เมื่อทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมีพบว่า ปริมาณ amino nitrogen ในเปปโตินจากเศษเหลือจากปลาสวายคิดเป็นร้อยละ 20.4 ซึ่งปริมาณใกล้เคียงกับทางการค้า

Mackie and Ritchie (1981) ศึกษาการนำเศษเหลือจากปลาคอด (cod) ซึ่งประกอบด้วย หัว เครื่องใน ก้าง และหนังปลา มาย่อยโดยใช้เอนไซม์ปาเปน ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ของน้ำหนักเนื้อปลาเป็นเวลา 30 นาที ส่วนของเหลวที่ได้มีรสขมเล็กน้อย เมื่อทำให้เข้มข้นมีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 81.8 ไขมันร้อยละ 4.2 และเถ้าร้อยละ 6.9 ปริมาณผลผลิตที่ได้คิดเป็นร้อยละ 10 ของน้ำหนักปลาเริ่มต้นซึ่งสามารถใช้แทนเคซีนในอาหารสัตว์ได้

Aspmo, Horn, and Vincent (2005) ศึกษาการย่อยเครื่องในของปลาคอด (*Gadus morhua* L.) ด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์เอนโดจีเนียส (endogenous enzyme) ปาเปน และอัลคาเลส โดยใช้เอนไซม์ร้อยละ 1 โดยน้ำหนักแห้ง ใช้เครื่องในปลาคอด 100 มิลลิกรัม ผสมน้ำ 100 มิลลิลิตร ย่อยที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ 225 รอบต่อนาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดมีค่าปริมาณไนโตรเจนอยู่ร้อยละ 12.8, 12.3 และ 11.5 โดยน้ำหนักแห้งตามลำดับ ส่วนกรดอะมิโน และวิตามินที่จำเป็นในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยทดสอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ 5 ชนิดคือ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus sakei*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Aspergillus niger* จากนั้นเปรียบเทียบกับเปปโตินที่มีจำหน่ายทางการค้า พบว่าเปปโตินที่ได้มีประสิทธิภาพดีกว่าทางการค้า และการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส มีประสิทธิภาพที่สูงสุดในการใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

Chalamaiah, et al. (2010) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไข่ของปลานวลจันทร์ (*Cirrhinus mrigala*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์ปาเปน โดยเตรียมไข่ของปลานวลจันทร์ ด้วยการอบแห้งแบบถาด (tray dry) ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนำไปร่อนผ่านตะแกรงร่อนขนาด 180 ไมโครเมตร นำตัวอย่างไข่ของปลานวลจันทร์ผงแห้ง 13 กรัม ไปผสมน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดต่างให้เหมาะสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ที่ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ที่ 50-55 องศาเซลเซียส และย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่ 60-65 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 90 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยา เอนไซม์อัลคาเลสด้วยอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที และเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 4500 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนให้ค่าระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 17.1 ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสให้ค่าระดับการย่อยสลายร้อยละ 62 และโปรตีน ไฮโดรไลเซตผงจากไข่ของปลานวลจันทร์ที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี และสามารถนำไปใช้ทดแทนเปปโตในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อได้เป็นอย่างดี

จากเอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้องข้างต้น พบว่าชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากปลาที่ให้ผลน่าพอใจและมีมูลค่าไม่สูงมาก เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการย่อยสลายเศษเหลือจากปลา คือ เอนไซม์ปาเปน และเปปซิน ผู้วิจัยจึงได้ทำการเลือกเอนไซม์ดังกล่าว มาใช้ในงานวิจัยนี้

เอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

1. เอนไซม์ปาเปน (papain) ปาเปนเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดเอนโดเปปติเดส ที่จัดอยู่ในกลุ่มซิสเทอีนโปรติเอส หรือซัลไฟดิลโปรติเอส ชื่อรหัสตาม Enzyme Commission International Union of Biochemistry ว่า EC 3.4.22.2 ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุล เล็กลง พบมากในยางมะละกอ เป็นโปรตีนเชิงเดี่ยว (simple protein) ประกอบด้วยกรดอะมิโน เพียงอย่างเดียว มีกรดอะมิโนจำนวน 212 ตัว มีขนาดมวลโมเลกุล 23,900 (พิชญา ชินอุปราชณ์, 2539, หน้า 6)

สมบัติทั่วไปของปาเปน

1. มีความเสถียรมากที่ค่าความเป็นกรดต่าง 5-7 แต่สภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างต่ำกว่า 2.8 เอนไซม์ปาเปนจะสูญเสียค่าปฏิกิริยาการทำงาน (activity) อย่างรวดเร็ว
2. มีความจำเพาะต่ออนุโมลกรดอะมิโน อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) และไกลซีน (glycine)

2. **เอนไซม์เปปซิน (pepsin)** เปปซินเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดเอนโดเปปติเดส อยู่ในกลุ่มแอสปาร์ติกโปรติเอส หรือเอซิดโปรติเอส ซึ่งรหัสตาม Enzyme Commission International Union of Biochemistry ว่า EC 3.4.23.1 ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง พบทั่วไปในน้ำย่อย (gastric juice) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และประกอบด้วยสารโพลีเปปไทด์สายเดี่ยว กรดอะมิโนมีจำนวน 321 ตัว และมีขนาดมวลโมเลกุล 35,500

สมบัติทั่วไปของเปปซิน

1. มีความเสถียรที่ค่าความเป็นกรดต่าง 2-5 ถ้าต่ำกว่านี้ค่าปฏิกิริยาการทำงานจะลดลงเนื่องจากเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และมีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมสำหรับโปรตีนทั่วไปคือ 2 และสำหรับสับสเตรทสังเคราะห์มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 4

2. มีความจำเพาะต่ออนุมูลกรดอะมิโน ทริปโตเฟน (tryptophan) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ไทโรซีน (tyrosine) เมธิโอนีน (methionine) และลิวซีน (leucine) และยังพบว่ามี ความชอบต่อการไฮโดรไลซ์อนุมูลกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกของสับสเตรท