

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล์ (AOAC, 2000)

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 สารเร่งปฏิกิริยาใช้สีลีเนียม
- 1.1.2 โซเดียมซัลเฟต
- 1.1.3 กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) เข้มข้นร้อยละ 32
- 1.1.4 สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4
- 1.1.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล
- 1.1.6 อินดิเคเตอร์

1.2 วิธีการวิเคราะห์

- 1.2.1 ชั่งตัวอย่างให้น้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน
- 1.2.2 เติมสารเร่งปฏิกิริยา 1 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำไปใส่ชุดย่อยในตู้ดูดควันจนกระทั่งได้สารละลายสีเขียวใส ปล่อยให้ทิ้งไว้ให้เย็น
- 1.2.3 นำไปกลั่น โดยใช้โซเดียมซัลเฟต เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 32 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร
- 1.2.4 รองรับสิ่งที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- 1.2.5 เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด
- 1.2.6 กลั่นให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลายกรดบอริก
- 1.2.7 ไทเทรตสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพูอ่อน
- 1.2.8 ทำ blank ด้วยวิธีการเดียวกันตั้งแต่ข้อ 2-7

1.3 การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \frac{0.0014 \times A \times (B-C) \times 100 \times 6.25}{0.1 \times D}$$

- เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล
- B คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
- C คือ ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไทเทรตกับ Blank (มิลลิลิตร)
- D คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

2.1 สารเคมี

2.1.1 ปีโตรเลียมอีเทอร์

2.2 วิธีการวิเคราะห์

2.2.1 ชั่งน้ำหนักของพลาสติกสกัดไขมัน แล้วจดน้ำหนักที่แน่นอนไว้

2.2.2 ชั่งตัวอย่างอาหาร 5 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ทิมเบล (thimble)

2.2.3 เติมปีโตรเลียมอีเทอร์ลงในพลาสติกสำหรับสกัดไขมัน 150 มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำทิมเบลใส่ลงไป

2.2.4 วางพลาสติกลงในเครื่องสกัดไขมัน ทำการสกัดประมาณ 2 ชั่วโมง

2.2.5 แยกเอาพลาสติกออกจากเครื่องสกัดแล้วใช้คีมคีบทิมเบลที่ใส่ตัวอย่างอาหารออกจากพลาสติก

2.2.6 นำพลาสติกไประเหยเอาปีโตรเลียมอีเทอร์ออก โดยอบที่ 100 องศาเซลเซียส จนกว่าตัวทำละลายจะระเหยหมด จากนั้นทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้นชั่งน้ำหนัก

2.3 การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไขมัน} = \frac{A}{B} \times 100$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักไขมัน

B คือ น้ำหนักตัวอย่างอาหาร

3. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

3.1 วิธีการวิเคราะห์

3.1.1 นำถ้วยเปล่าอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนัก

3.1.2 ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแล้วประมาณ 2 กรัม นำไปทำการเผาบนเตาไฟฟ้า จนหมดควัน

3.1.3 นำตัวอย่างที่เผาไล่ควัน แล้วไปเผาต่อในเตาเผา (Muffer furnace) อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปิดสวิทช์เตาเผา เปิดฝาเตาออกรอจนอุณหภูมิภายในเตาลดเหลือประมาณ 100 องศาเซลเซียส

3.1.4 นำถ้วยออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็นแล้วชั่งน้ำหนัก

3.2 การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์เถ้า} = \frac{(A-B) \times 100}{A}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนการเผา

B คือ น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

4. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

4.1 วิธีการวิเคราะห์

4.1.1 ชั่งน้ำหนักอาหารตัวอย่างประมาณ 5 กรัม

4.1.2 นำไปอบในตู้อบที่ช่วงอุณหภูมิ 100-105 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

4.1.3 นำออกจากตู้อบปล่อยให้เย็นใน desiccator แล้วชั่งน้ำหนัก เมื่อทำการอบซ้ำ น้ำหนักที่ได้ในแต่ละครั้งไม่ควรต่างกันเกิน 0.05 กรัม แล้วนำไปคำนวณตามสมการ

4.2 การคำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{A \times 100}{B}$$

เมื่อ A คือ น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ

B คือ น้ำหนักตัวอย่าง

5. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Anson, 1938)

5.1 สารเคมี

5.1.1 สารละลายเคซีน 2% โดยละลายเคซีน 2.0 กรัม ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 M pH 7.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ต้มด้วยไฟอ่อนจนเคซีนละลาย จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์

5.1.2 สารละลาย trichloroacetic acid (TCA) 0.4 M โดยละลาย TCA 6.535 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

5.1.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) 0.4 M โดยละลาย Na_2CO_3 42.396 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

5.1.4 สารละลายฟอลินฟีนอล นำสารละลายฟอลินฟีนอลมาเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:3 (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

5.1.5 สารละลายมาตรฐานกรดอะมิโนไทโรซีน โดยละลายไทโรซีน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สารละลายนี้มีความเข้มข้นของไทโรซีน 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 วิธีการวิเคราะห์

5.2.1 นำตัวอย่างส่วนใส 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเคซีน 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.2.2 หยุดปฏิกิริยาและตกตะกอนโปรตีนด้วยการเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid : TCA) ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง whatman เบอร์ 1

5.2.3 นำส่วนใสที่ได้ 1 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต เข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

5.2.4 เติมสารละลายฟอสฟอรัสที่ละลายน้ำในอัตราส่วน 1:3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มทิ้งไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร

5.2.5 ทำหลอดควบคุม (control) โดยเติม TCA ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ก่อนเติมสารละลายเคซีน ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3-4

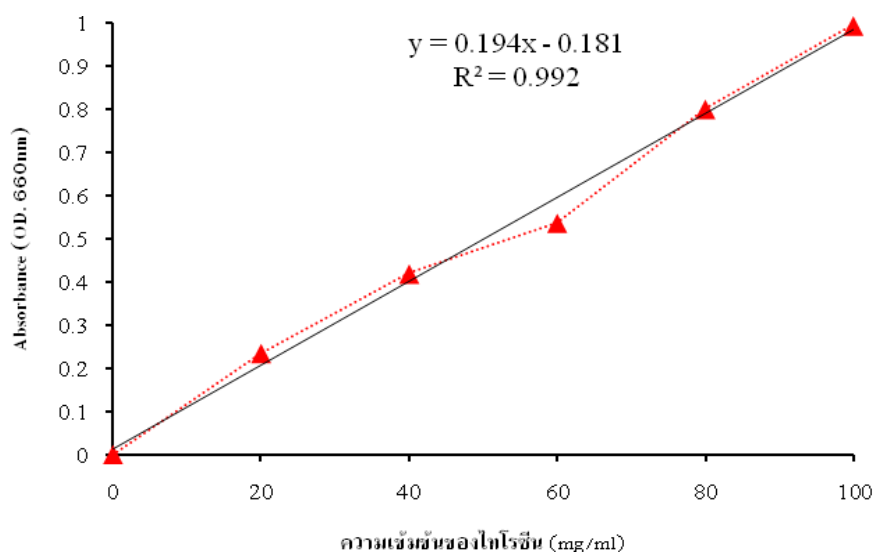
5.2.6 ทำแบลนด์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4

5.2.7 ทำกราฟมาตรฐานไทโรซีนความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เขียนกราฟระหว่างค่า OD660 และความเข้มข้นของไทโรซีน เพื่อนำไปคำนวณหากิจกรรมของเอนไซม์

5.3 การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (enzyme activity)} = \frac{\text{ค่า OD} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{สไลซ์ของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

1 หน่วยเอนไซม์ (enzyme unit) หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายเคซีนได้ไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ใช้ในการทดลอง



ภาพ 13 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน

ตาราง 11 ความสามารถของเอนไซม์เปปซินในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

blank (pH2.0)	OD. 660nm	-B	/slope	Ug/ml
1.383	1.554	0.171	1.062	4.250
	1.602	0.219	1.310	5.239
	1.591	0.208	1.253	5.013
				4.834

ตาราง 12 ความสามารถของเอนไซม์ปาเปนในการย่อยสลายเคซีน เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

blank (pH6.2)	OD. 660nm	-B	/slope	Ug/ml
1.366	1.777	0.411	2.300	9.198
	1.86	0.494	2.727	10.910
	1.807	0.441	2.454	9.817
				9.934

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตาราง 13 การวิเคราะห์ทางสถิติของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก
เศษเหลือส่วนเครื่องในปลาหับทิม ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน

		SS	df	MS	F	Sig.
%ENZYME	Between Groups	.969	9	.042	.809	.681
	Within Groups	.156	17	.052		
	Total	1.125	26			
TEMP	Between Groups	70.329	9	35.165	3.710	.039
	Within Groups	227.453	17	9.477		
	Total	297.782	26			
TIME	Between Groups	7648.170	9	3824.085	420.682	.000
	Within Groups	218.165	17	9.090		
	Total	7866.335	26			

หมายเหตุ: แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 14 การวิเคราะห์ทางสถิติของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก
เศษเหลือส่วนเครื่องในปลาหับทิมที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

		SS	df	MS	F	Sig.
%ENZYME	Between Groups	.539	9	.060	1.735	.157
	Within Groups	.586	17	.034		
	Total	1.125	26			
TEMP	Between Groups	561.000	9	62.333	12.180	.000
	Within Groups	87.000	17	5.118		
	Total	648.000	26			
TIME	Between Groups	5205.000	9	578.333	.894	.550
	Within Groups	10995.000	17	646.765		
	Total	16200.000	26			

หมายเหตุ: แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 15 การวิเคราะห์ทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตผงจากเศษเหลือส่วนเครื่องในปลาหีบเทียบกับเปปโตนทางการค้า

Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
%protein	278.471	1	.002	94.68000	90.3599	99.0001
%lipid	10.333	1	.061	.15500	-.0356	.3456
%ash	5.886	1	.107	4.12000	-4.7743	13.0143

หมายเหตุ: แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 16 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตผงจากเศษเหลือส่วนเครื่องในปลาหีบเทียบกับเปปโตนทางการค้า

Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
L	9.932	1	.064	70.52000	-19.6941	160.7341
a	1.416	1	.392	1.26000	-10.0485	12.5685
b	28.902	1	.022	23.55500	13.1994	33.9106

หมายเหตุ: แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตาราง 17 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้เทียบกับเปปโตนทางการค้า

Test Value = 0						
	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
					Lower	Upper
<i>E.coli</i>	29.933	1	.021	22.45000	12.9203	31.9797
<i>S.aureus</i>	7.280	1	.087	57.15000	-42.5937	156.8937
<i>B.subtilis</i>	1.670	1	.343	48.85000	-322.8065	420.5065

หมายเหตุ: แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาคผนวก ค

การเผยแพร่ผลงานวิชาการ

- 1) การประชุมวิชาการ วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 3 วันที่ 14 – 15 มีนาคม 2554
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือปลา: สภาวะการย่อยเครื่องในปลาทั้งตัว (*Tilapia nilotica*) โดยเอนไซม์ปาเปน
พีริยาไรเกท¹ ปวีณา น้อยทัพ^{1*} โอโรส รุกชาติ¹ และ เจริญทอง สิงห์จางูสง¹

Protein hydrolysate from fish waste: Conditions for red tilapia (*Tilapia nilotica*) viscera hydrolysis with papain
Peeriya raikate¹ Paweena Noitup^{1*} Orose Rugchati¹ and Riantong Singanusong¹

¹คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก 65000

*Corresponding author E-mail: paweenan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

การนำเศษเหลือจากเครื่องในปลาทั้งตัวมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือให้เกิดประโยชน์ องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทั้งตัวประกอบไปด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่า pH เท่ากับ 6.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาทั้งตัวโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปน ปริมาตรร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ (w/w) pH 6.3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที เป็นสภาวะที่ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุด ร้อยละ 70.35 และผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวร้อยละ 40 นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13

คำสำคัญ : โปรตีนไฮโดรไลเซต, ปาเปน, ปลาทั้งตัว, เศษเหลือปลา

Abstract

Utilization of fish waste such as viscera from Thai red tilapia to produce protein hydrolysates is one way of value added of the fish waste. The chemical composition of Thai red tilapia viscera contained 9.14% protein, 5.98% lipid, 76.73% moisture, 1.61% ash and pH 6.3. The appropriate conditions for protein hydrolysate extraction by using papain hydrolysis of Thai red tilapia viscera were studied. It was found that the use of 0.75% papain (w/w) with pH 6.3 at 25 °C for 90 minutes provided the highest degree of hydrolysis of 70.35% and yield of 40%. Moreover, the produced protein hydrolysates contained 23.13% protein.

Keywords: protein hydrolysate, papain, red tilapia, fish waste

1. คำนำ

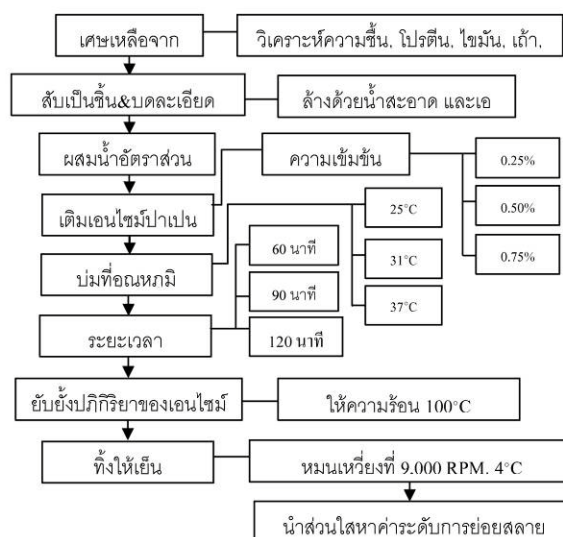
ปัจจุบันมีการขยายตัวของอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้น จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2553 ของกรมประมง ระบุว่ามูลค่าผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดในประเทศไทยปี 2551 มีปริมาณปลาทั้งตัวร้อยละ 34.41 ซึ่งนับว่าเป็นอัตราส่วนที่สูง และจากมูลค่าการส่งออกปลาทั้งตัวแช่แข็งของไทยปี พ.ศ. 2546 – 2550 พบว่ามีอัตราการขยายตัวต่อปีคิดเป็นร้อยละ 56.50 ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้นด้วย ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ส่วนมากโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะจำหน่ายให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก หากเป็นผู้แปรรูปขนาดเล็กก็จะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่นๆ และเนื่องจากเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi *et al.*, 1995) จึงมีการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าโดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์

ต่างๆ โดยเฉพาะโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต โดยอาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (protease) ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส เนื่องจากมีราคาถูก ให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูง เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อ pH ของวัตถุดิบ และสามารถเลือกใช้สภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้สามารถใช้เป็นแหล่งในโตรเจนสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ หรืออาหารมนุษย์ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเศษเหลือจากเครื่องในจากปลาที่นำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. วัตถุดิบและวิธีการ

2.1 วัตถุดิบเศษเหลือจากปลาที่ต้ม

เก็บส่วนเครื่องในทั้งหมดของปลาที่ต้ม จากตลาดร่วมใจ (พิษณุโลก) โดยระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนนำมาเตรียมเป็นวัตถุดิบไม่เกิน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมล้างด้วยน้ำ และล้างด้วย 95% เอทานอล เพื่อล้างไขมันบางส่วนออก จากนั้นสับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยเครื่องบดเนื้อคูลูกเกล้าให้ผสมกันดี ขั้นตอนดังรูปที่ 1 บรรจุใส่ถุงแล้วเก็บที่ -18 องศาเซลเซียสเพื่อเก็บรักษาไว้ก่อนนำมาทดลอง โดยก่อนทดลองทำการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินงาน

2.2 เอนไซม์ปาเปน (papain : EC 3.4.22.2)

เอนไซม์ปาเปนของบริษัท Sigma มีค่าประสิทธิภาพการเกิดปฏิกิริยา (activity) เท่ากับ 3.36 U/mg ซึ่งปาเปนเป็นเอนไซม์โปรติเอสชนิดเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) จัดอยู่ในกลุ่มซิสเทอีน โปรติเอส (Cysteine/ thiol protease)

2.3 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา

วิเคราะห์องค์ประกอบทั้งความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และค่า pH ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000)

2.4 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด 3 ชนิดตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย 25 31 และ 37 องศาเซลเซียส เวลา 60 90 และ 120 นาที และความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.25 0.50 และ 0.75 ต่อวัตถุดิบ (w/w) โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 3 x 3 Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลือกสภาวะที่เหมาะสมด้วย response surface model เทียบจากระดับการย่อยสลาย (%DH) โดยการตกตะกอนกรดอะมิโนอิสระด้วย TCA (Hoyle and Merritt, 1994) แล้วคำนวณด้วยสมการที่ 1

$$\%DH = \frac{\text{TCA soluble nitrogen} * 100}{\text{total nitrogen}} \quad (1)$$

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา

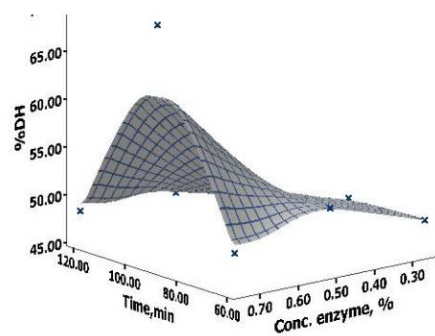
การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของเครื่องในปลาที่ต้ม พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่า pH เท่ากับ 6.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเครื่องในปลาที่ต้มมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เป็นอย่างดี และยังพบว่า มีไขมันและเฝ้าน้อยกว่าหัวและก้างปลาคูบักกุกที่มีไขมันร้อยละ 11.41 เถ้าร้อยละ 6.51 (พงษ์เทพ วิไลพันธ์, 2540)

3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

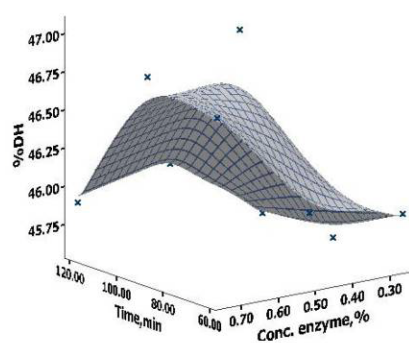
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาที่ต้มด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยแปรเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ พบว่ามีระดับการย่อยสลายในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระดับการย่อยสลายของเอนไซม์ปาเปนที่สกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตของแต่ละสภาวะ

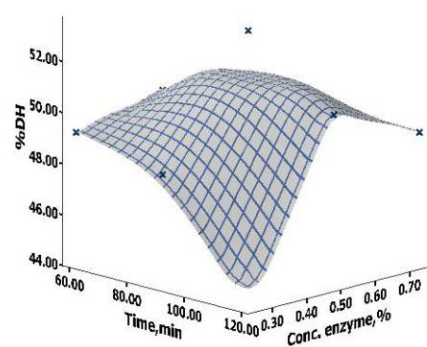
เวลาในการย่อย (นาที)	ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละต่อวัตถุดิบ)	ระดับการย่อยสลาย (%DH)		
		25 องศาเซลเซียส	31 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
0	0.00	21.66 ± 0.56	21.98 ± 1.29	22.21 ± 0.61
60	0.25	63.32 ± 0.23	63.32 ± 0.61	39.87 ± 0.04
60	0.50	68.01 ± 1.65	65.66 ± 1.21	44.56 ± 0.01
60	0.75	65.66 ± 0.54	58.63 ± 1.45	42.21 ± 0.11
90	0.25	68.01 ± 0.25	60.97 ± 0.07	44.56 ± 1.08
90	0.50	65.66 ± 0.52	65.66 ± 1.13	42.21 ± 2.21
90	0.75	70.35 ± 0.07	58.63 ± 2.01	44.56 ± 1.65
120	0.25	68.01 ± 0.01	63.32 ± 0.87	39.87 ± 2.13
120	0.50	60.97 ± 0.87	60.97 ± 1.07	44.56 ± 0.30
120	0.75	63.32 ± 1.08	60.97 ± 2.34	44.56 ± 0.12



รูปที่ 2 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 3 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายจากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนโดย RSM ดังรูป 2-4 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการย่อย พบว่า การใช้เอนไซม์ร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 90 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของปลาที่ต้มได้ ระดับการย่อยสลาย 70.35% ซึ่งมากกว่ารายงานของ Bhaskar et al. (2008) ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลากระโทงแทง (*Catla catla*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.5% (v/w) อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 135 นาที ที่ pH เท่ากับ 8.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดได้ระดับการย่อยสลาย 50% และรายงานของมัลลิกา ธนศุคนธ์ (2552) ทดลองผลิต โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดด้วยเอนไซม์ปาเปนที่มี activity เท่ากับ 17,123 unit/g พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม และเห็ดนางรม คือ ใช้เอนไซม์ร้อยละ 15 นาน 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่า %DH สูงสุด เท่ากับ 79.0, 78.6, 72.9 และ 77.7 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %DH มากกว่าการใช้กรด

4. สรุป

ส่วนเครื่องในของปลาที่ต้มประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่า pH เท่ากับ 6.3 ซึ่งมีโปรตีนในปริมาณมากพอที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปนคือใช้เอนไซม์ปาเปนปริมาณร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ ค่า pH ของวัตถุดิบคือ 6.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 90 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 70.35 โดยจะได้โปรตีนไฮโดรไลเซตเห็ดร้อยละ 40 ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้ นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13 ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนสำหรับผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้จากปริมาณโปรตีนที่มีอยู่

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ประจำปี 2553

6. เอกสารอ้างอิง

- กรมประมง. (2553). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย เอกสารฉบับที่ 13/2553. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พงษ์เทพ วิลพนันท์. (2540). จุลชีววิทยาประมง ห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มัลลิกา ธนศุคนธ์. (2552). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. กรุงเทพฯ.
- A.O.A.C. (2000). Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists. (14th ed.) Washington D.C.: Association Official Analytical Chemist.
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 76-79.
- Shahidi, F., Han, X. Q., and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R.G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99, 335-343.



- 2) จัดแสดงนิทรรศการ ในงานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 วันที่ 27 – 31 กรกฎาคม 2554
คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร



โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

ผลการวิจัยที่ให้พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ใส่จากการย่อยสลายเนื้อในรูปผงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพที่ต่ำกว่าได้มี ส่วนประกอบของกรดอะมิโนหลากหลายชนิดที่เหมือนกับโปรตีนจากนม มีต้นทุนการผลิต และขั้นตอนในการผลิตน้อยกว่าการย่อยสลายเนื้อสด การนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่มีกลิ่นที่อ่อนแอไปใช้ผสมในอาหารสัตว์ และนำไปใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับสัตว์ และนำไปใช้เพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับสัตว์ ซึ่งปัจจุบันนักวิจัยได้พยายามนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต เพื่อใช้สำหรับนำไปใช้ประโยชน์สำหรับเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับมนุษย์มากขึ้น



ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
คณะเกษตรศาสตร์
ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม



โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต
Fish protein hydrolysate






งานเกษตรนเรศวร ครั้งที่ 9 (เกษตรภาคเหนือตอนล่าง)

“เกษตรกรรมไทยสู่ธุรกิจยั่งยืน”

27 - 31 กรกฎาคม 2554

ณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

การจัดนิทรรศการและถ่ายทอดเทคโนโลยี

เรื่อง การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของปลาเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

รายชื่อผู้เข้าชมงาน

เลขที่	ชื่อ-สกุล	ลายเซ็น
1	อ.ดร.กมลวรรณ นิสัย	อ.ดร.กมลวรรณ
2	อ.ดร.ศิริพร นิมมานะ	อ.ดร.ศิริพร
3	น.ส. ทศพร นิลนุช	น.ส. ทศพร
4	น.ส. สรวิศ นิลนุช	น.ส. สรวิศ
5	นางอัมมวดี นิลนุช	อ.อัมมวดี
6	อ.ดร. วราภรณ์ นิลนุช	อ.ดร. วราภรณ์
7	อ.ดร. กนกนที นิลนุช	อ.ดร. กนกนที
8	อ.ดร. จิราภา นิลนุช	อ.ดร. จิราภา
9	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
10	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
11	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
12	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
13	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
14	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
15	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา
16	อ.ดร. ชลธิชา นิลนุช	อ.ดร. ชลธิชา

3) การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย 7 วันที่ 29 – 30 มีนาคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร



กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Proceedings การประชุมวิชาการ “นเรศวรวิจัย” ครั้งที่ 7

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลาที่ต้มด้วยเปปซินและปาเปนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต
พีริยา ไรเกศ¹, โอโรส รุกชาติ¹, เจริญทอง สิงห์จางสูงศักดิ์ และ ปวีณา น้อยทัพ^{1*}

Optimization condition for hydrolysis of red tilapia viscera using enzyme pepsin and papain
for preparing protein hydrolysate

Peeriya raikate¹, Orose Rugchati¹, Riantong Singanusong¹ and Paweena Noitup^{1*}

¹ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

¹Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok Province.

*Corresponding author E-mail: paweenan@nu.ac.th

บทคัดย่อ

การนำเศษเหลือจากเครื่องในจากปลาทับทิม (*Oreochromis niloticus*) มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือให้เกิดประโยชน์ โดยนำเครื่องในปลาทับทิมซึ่งประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.3 ล้างด้วยน้ำสะอาดและเอทานอล 95% ก่อนนำมาบดละเอียดแล้วย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและปาเปนจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาทับทิมโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน พบว่าจากการใช้เอนไซม์เปปซินปริมาณร้อยละ 0.50 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่าง 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 53.23 และผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 32.50 ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปนคือใช้เอนไซม์ปาเปนปริมาณร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่างของวัตถุดิบคือ 6.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 83.83 โดยให้โปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13

คำสำคัญ: โปรตีนไฮโดรไลเซต, เปปซินปาเปน, ปลาทับทิม, เศษเหลือปลา

Abstract

Utilization of fish waste such as viscera from red tilapia (*Oreochromis niloticus*) to produce protein hydrolysates is one way of value added of the fish waste. Viscera of red tilapia composed of 9.14% protein, 5.98% lipid, 76.73% moisture, 1.61% ash and pH 6.3. The viscera were washed with distilled water and 95% ethanol before grinding and then hydrolyzed with pepsin and papain. The appropriate conditions for protein hydrolysate extraction by using pepsin hydrolysis of red tilapia viscera were studied. It was found that the use of 0.50% pepsin (w/w) with pH 2 at 37 °C for 90 minutes provided the highest degree of hydrolysis of 53.23% and yield of 40%. The produced protein hydrolysates contained 32.50% protein. By the way, the appropriate conditions for protein hydrolysate extraction by using papain hydrolysis were 0.75% papain (w/w) with pH 6.3 at 25 °C for 90 minutes provided the highest degree of hydrolysis of 83.83% and yield of 40%. Moreover, the produced protein hydrolysates contained 23.13% protein.

Keywords: protein hydrolysate, pepsin, papain, red tilapia, fish waste

บทนำ

ปัจจุบันการขยายตัวของอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำเพิ่มสูงขึ้น จากสถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2553 ของกรมประมง ระบุว่ามูลค่าผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดในประเทศไทยปี 2551 มีปริมาณปลาที่ต้มร้อยละ 34.41 ซึ่งนับว่าเป็นอัตราส่วนที่สูง และจากมูลค่าการส่งออกปลาทับทิมแช่แข็งของไทยปี พ.ศ. 2545 – 2550 พบว่ามีอัตราการขยายตัวต่อปีคิดเป็นร้อยละ 56.50 ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้นตาม



ไปด้วย ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เพราะเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ส่วนมากโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะจำหน่ายให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก หากเป็นผู้แปรรูปขนาดเล็กจะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่น ๆ และเนื่องจากเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi et al., 1995)

การนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าโดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มีเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (protease) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลง เช่น เปปซิน และปาเปน โดยเปปซิน (EC 3.4.23.1) เป็นเอนไซม์ชนิดเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) อยู่ในกลุ่มแอสปาร์ติกโปรติเอส (aspartic protease) หรือเอซิดโปรติเอส (acid protease) พบทั่วไปในน้ำย่อย (gastric juice) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และประกอบด้วยโพลีเพปไทด์สายเดี่ยว กรดอะมิโนมีจำนวน 321 ตัว ขนาดมวลโมเลกุล 35,500 มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 2 และมีความจำเพาะต่ออนุโมลกรดอะมิโนทริปโตเฟน (Trp) ฟีนอลอะลานีน (Phe) ไทโรซีน (Tyr) เมไทโอนีน (Met) และลิวซีน (Leu) และพบว่าชอบการไฮโดรไลซ์อนุโมลกรดอะมิโนประเภทอะโรมาติกของสับสเตรท ส่วนปาเปน (EC 3.4.22.2) เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ในกลุ่มซิสเทอีนโปรติเอส (cysteine protease) หรือซัลไฟด์โปรติเอส (sulphydryl protease) พบมากในยางมะละกอ (*Carica papaya*) เป็นโปรตีนเชิงเดี่ยว (simple protein) ประกอบด้วยกรดอะมิโนเพียงอย่างเดียว กรดอะมิโนมีจำนวน 212 ตัว ขนาดมวลโมเลกุลประมาณ 23,900 มีค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมคือ 6 และมีความจำเพาะต่ออนุโมลกรดอะมิโน อาร์จินีน (Arg) โลซีน (Lys) และ โกลซีน (Gly) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีราคาถูก มีความจำเพาะต่อวัตถุดิบ ให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูง และสามารถเลือกใช้สภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ หรืออาหารมนุษย์ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเศษเหลือจากเครื่องในจากปลาที่ต้มมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบเศษเหลือจากปลาที่ต้ม

เก็บส่วนเครื่องในทั้งหมดของปลาที่ต้ม จากตลาดร่วมใจ (พิษณุโลก) โดยระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนนำมาเตรียมเป็นวัตถุดิบไม่เกิน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ และล้างด้วยเอทานอล 95% เพื่อล้างไขมันออกจากนั้นสับเป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วบดด้วยเครื่องบดเนื้อคูลูกเคล้าให้ผสมกันดี บรรจุใส่ถุงพลาสติก เก็บที่ -18 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ก่อนนำมาทดลอง โดยก่อนทดลองทำการละลายน้ำแข็งในตัวอย่างเครื่องในปลาที่ต้มที่อุณหภูมิ 4 - 10 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. เอนไซม์

เอนไซม์เปปซิน จากน้ำย่อยของหมู (activity = 800 U/mg) ผลิตโดย Sigma Aldrich, Germany และเอนไซม์ปาเปน จากยางมะละกอ (activity = 3.36 U/mg) ผลิตโดย Sigma Aldrich, Germany

3. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา

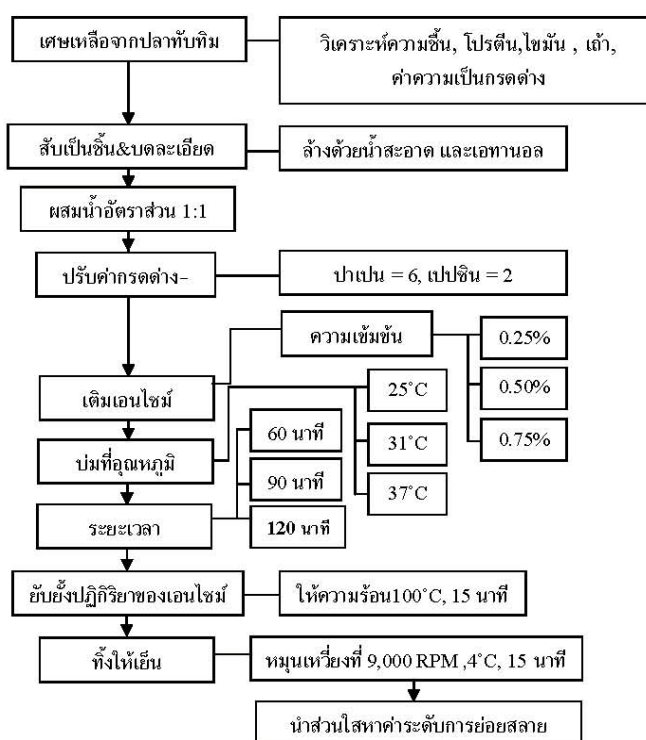
วิเคราะห์องค์ประกอบของเศษเหลือจากปลาทั้งความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และค่าความเป็นกรดต่าง ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000)



4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด 3 ชนิดตัวแปร ได้แก่ อุณหภูมิที่ใช้ในการย่อย 25, 31 และ 37 องศาเซลเซียส เวลา 60, 90 และ 120 นาที และความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0.25, 0.50 และ 0.75 ต่อวัตถุดิบ (w/w) ขั้นตอนดังรูปที่ 1 โดยนำตัวอย่างเศษเหลือจากปลาจากข้อ 1 มาปรับค่าความเป็นกรดต่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ให้เป็น 2 สำหรับเอนไซม์เปปซิน ส่วนเอนไซม์ปาเปนใช้ค่าความเป็นกรดต่างตามวัตถุดิบเริ่มต้น จากนั้นเติมเอนไซม์ปริมาณตามกำหนด บ่มที่อุณหภูมิและระยะเวลาแต่ละสภาวะตามที่กำหนด เมื่อครบระยะเวลาของแต่ละสภาวะ นำไปหยุดปฏิกิริยาด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทั้งไว้ให้เย็น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 RPM ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000) เมื่อได้ค่าร้อยละของโปรตีนที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซต เหลวจึงนำมาคำนวณระดับการย่อยสลาย (%DH) ด้วยการตกตะกอนกรดอะมิโนอิสระด้วย TCA (Hoyle & Merritt, 1994) แล้วคำนวณด้วยสมการที่ 1 เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์แต่ละสภาวะ โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 3 x 3 Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 ซ้ำ เลือกสภาวะที่เหมาะสมด้วย response surface model

$$\%DH = \frac{\text{TCA soluble nitrogen} * 100}{\text{total nitrogen}} \quad (1)$$



รูปที่ 1 ขั้นตอนการดำเนินงาน



ผลการศึกษา

1. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา

องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาที่บดหั่นเรียงจากปริมาณมากไปน้อยประกอบด้วย ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ตามลำดับ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาที่บดหั่น

pH	องค์ประกอบทางเคมี			
	โปรตีน (%)	ไขมัน (%)	ความชื้น (%)	เถ้า (%)
6.3	9.14	5.98	76.73	1.61

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาที่บดด้วยเอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ปาเปน โดยแปรเปลี่ยนปัจจัย คือ อุณหภูมิ เวลา และปริมาณของเอนไซม์ ในระดับต่าง ๆ พบว่า ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์เปปซิน เวลาและความเข้มข้นไม่ส่งผลต่อระดับการย่อยสลาย ในขณะที่อุณหภูมิมีผลต่อระดับการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงดังตารางที่ 2 และระดับการย่อยสลายในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปนแสดงดังตารางที่ 3 ซึ่งพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อระดับการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับเปปซิน

ตารางที่ 2 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่บดด้วยเอนไซม์เปปซินของแต่ละสภาวะ

เวลาในการย่อย (นาฬิกา)	ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละต่อวัตถุดิบ)	ระดับการย่อยสลาย (% DH)		
		25 องศาเซลเซียส	31 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
0	0.00	21.66	21.98	22.21
60	0.25	41.67 ^C	45.90 ^C	49.21 ^{AB}
60	0.50	51.72 ^A	46.03 ^C	50.00 ^A
60	0.75	52.94 ^A	46.77 ^{BC}	50.23 ^A
90	0.25	51.77 ^A	45.59 ^{AB}	48.44 ^{BC}
90	0.50	51.85 ^A	49.12 ^{AB}	53.23 ^A
90	0.75	51.85 ^A	46.88 ^{AB}	52.03 ^A
120	0.25	45.61 ^C	45.59 ^C	45.66 ^C
120	0.50	48.15 ^{BC}	42.86 ^C	50.79 ^A
120	0.75	41.38 ^C	45.90 ^C	50.21 ^A

ตารางที่ 3 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่บดด้วยเอนไซม์ปาเปนของแต่ละสภาวะ

เวลาในการย่อย (นาฬิกา)	ปริมาณเอนไซม์ (ร้อยละต่อวัตถุดิบ)	ระดับการย่อยสลาย (% DH)		
		25 องศาเซลเซียส	31 องศาเซลเซียส	37 องศาเซลเซียส
0	0.00	21.66 ^C	21.98 ^C	22.21 ^C
60	0.25	75.22 ^A	47.17 ^B	37.96 ^B
60	0.50	76.06 ^A	49.43 ^A	37.27 ^B
60	0.75	77.71 ^A	50.01 ^A	35.52 ^C
90	0.25	75.03 ^A	51.03 ^A	32.60 ^C
90	0.50	80.51 ^A	51.88 ^A	31.34 ^C
90	0.75	83.83 ^A	45.48 ^B	37.16 ^B
120	0.25	77.48 ^A	48.20 ^B	35.62 ^C
120	0.50	73.41 ^A	48.45 ^B	39.45 ^B
120	0.75	71.32 ^A	50.02 ^A	40.90 ^B

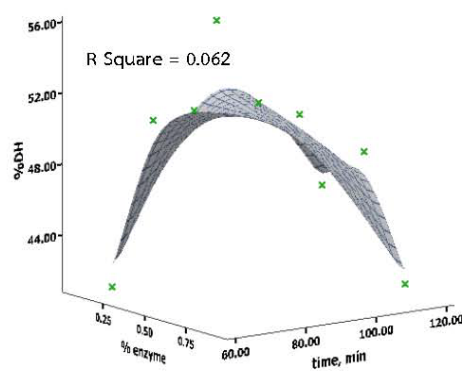


อภิปรายผลการศึกษา

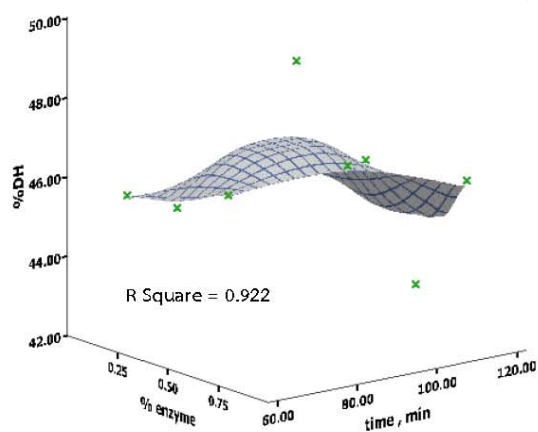
จากการวิเคราะห์ห้วงคัปประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาหับทิม ดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าเครื่องในปลาหับทิมมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่ามีไขมันและเถ้าน้อยกว่าหัวและก้างปลาตุ๋นบักกุ่มที่มีไขมันร้อยละ 11.41 และเถ้าร้อยละ 6.51 (พงษ์เทพ, 2540)

เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายโดย RSM จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่มีการปรับค่าความเป็นกรดต่างเป็น 2 เพื่อให้เหมาะสมกับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ดังรูปที่ 2 - 4 เป็นการเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายในแต่ละอุณหภูมิ โดยเทียบระหว่างปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กับระยะเวลาในการย่อย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการย่อย พบว่า การใช้เอนไซม์ร้อยละ 0.50 ต่อวัตถุดิบ อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของปลาหับทิม โดยให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 53.23 และเมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายโดย RSM จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ไม่มีการปรับค่าความเป็นกรดต่างเนื่องจากในตัวอย่างตั้งต้นมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่แล้ว คือค่าความเป็นกรดต่างเป็น 6.3 ดังรูปที่ 5 - 7 เป็นการเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายในแต่ละอุณหภูมิ โดยเทียบระหว่างปริมาณเอนไซม์ที่ใช้กับระยะเวลาในการย่อย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละกระบวนการย่อย พบว่า การใช้เอนไซม์ร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ อุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 90 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของปลาหับทิม ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 83.83

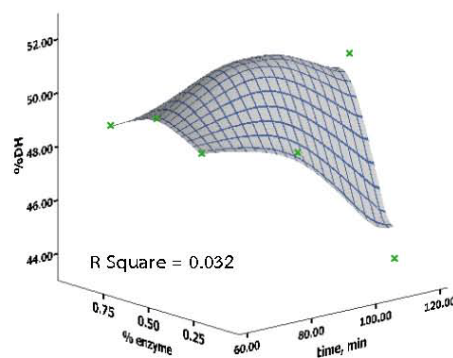
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนให้ระดับการย่อยสลายมากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พิษญา (2539) ซึ่งพบว่าการย่อยส่วนหัวและก้างปลาทูด้วยเอนไซม์ปาเปนที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้สูงสุดเท่ากับ 4.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้สูงสุดเท่ากับ 3.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนยังให้ค่าระดับการย่อยสลายที่มากกว่า Bhaskar et al. (2008) ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลากระโทงเตง (*Catla catla*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่า ใช้ปริมาณเอนไซม์ร้อยละ 1.5 (v/w) อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการย่อย 135 นาที ที่ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 8.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุด ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 50 และรายงานของมัลลิกา (2552) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดด้วยเอนไซม์ปาเปนที่มี activity เท่ากับ 17,123 unit/g พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเห็ดฟาง เห็ดนางฟ้า เห็ดหอม และเห็ดนางรม คือ ใช้เอนไซม์ร้อยละ 15 นาน 18 ชั่วโมง อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ค่า %DH สูงสุด เท่ากับ 79.0, 78.6, 72.9 และ 77.7 ตามลำดับ ซึ่งมีค่า %DH มากกว่าการใช้กรด



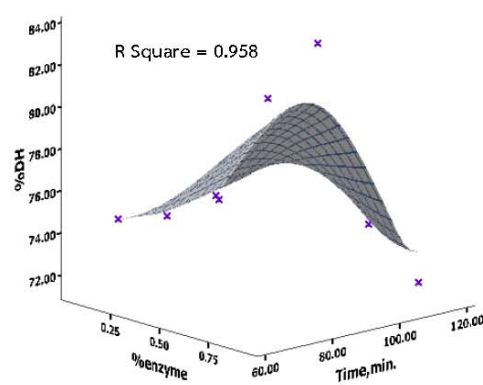
รูปที่ 2 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



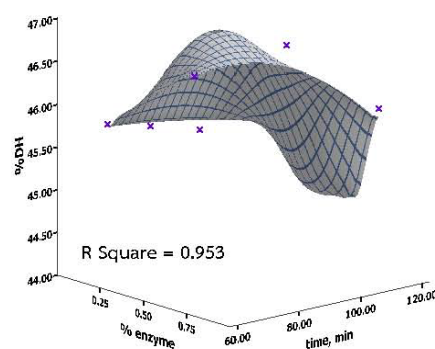
รูปที่ 3 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



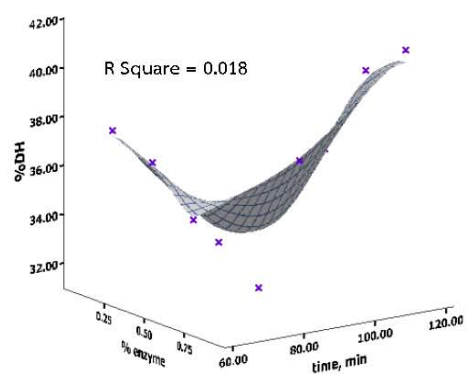
รูปที่ 4 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ปล่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ปล่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ปล่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



สรุปผลการศึกษา

ส่วนเครื่องในของปลาที่ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่าความเป็นกรดต่าง 6.3 ซึ่งมีโปรตีนในปริมาณมากพอที่จะสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์เปปซินคือ ใช้เอนไซม์เปปซินปริมาณร้อยละ 0.50 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่างของวัตถุดิบคือ 2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 53.23 โดยจะได้โปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้ นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 32.50 ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปนคือใช้เอนไซม์ปาเปนปริมาณร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่างของวัตถุดิบคือ 6.3 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 83.83 โดยจะได้โปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้ นอกจากนี้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13 ซึ่งการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนมีค่ามากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เปปซิน โดยมีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งของไนโตรเจนสำหรับผลิตเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้จากปริมาณโปรตีนที่มีอยู่

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2553

เอกสารอ้างอิง

- พิชญา อินอุปราวัฒน์. (2539). การผลิตเปปโตินจากปลาอุกบักและจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาอุกบัก. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ ,
- มัลลิกา ธนสุนทร. (2552). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- กรมประมง. (2553). สถิติการประมงแห่งประเทศไทย เอกสารฉบับที่ 13/2553. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. (2540). จุลชีววิทยาประมง ห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจวิเคราะห์. กรุงเทพฯ: ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- A.O.A.C. (2000). *Official Methods of the Association of Official Analytical Chemists*. (14th ed.) Washington D.C.: Association Official Analytical Chemist.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R.G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99, 335–343.
- Hoyle, N.T. & Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 76–79.
- Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285–293.