

บรรณานุกรม

- กรมประมง. (2553). **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย เอกสารฉบับที่ 12/2553**. กรุงเทพฯ: ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กัลยากร วงศ์กาฬสินธุ์. (2540). **การโคลนยีนโปรติเอสจาก *Bacillus subtilis* TISTR25 สู่ *Escherichia coli* ด้วยระบบหลอมกับจีเอสทียีน**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- กำเนิด สุภณทวงศ์. (2534). **จุลชีวอุตสาหกรรม**. เชียงใหม่: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ณัฐวุฒิ ส่งแสง. (2550). **การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว โดยเอนไซม์โปรติเอส**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.
- ตรีสินธุ์ โพธารส. (2546). **การสกัดเปปโตินจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บัญญัติ สุขศรีงาม. (2534). **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.
- ประทีปพันธุ์ปลา. (ม.ป.ป.). **พันธุ์ปลาน้ำจืดของไทย**. สืบค้นเมื่อ 9 กุมภาพันธ์ 2555, จาก http://www.bestfish4u.com/oreochromis_niloticus_tubtim.php.
- ประสิทธิ์ศิลป์ ชัยยะวัฒน์โยธิน. (1 สิงหาคม 2552). ปลาทับทิม. **เจาะตลาด**, 21(460), 97.
- ปราณี อานเป็รื่อง. (2534). **เอนไซม์ทางอาหาร**. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิชญา ชินอุปาววัฒน์. (2539). **การผลิตเปปโตินจากปลาดุกบักอูยและจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาดุกบักอูย**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ไพรัตน์ โสภณดร. (2532). **การผลิตเปปโตินจากหัวกุ้ง**. วารสารอาหารและอุตสาหกรรมเกษตร, 3(1), 22-35.
- มัลลิกา ธนสุคนธ์. (2552). **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ.
- รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. (2545). **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตไขมันต่ำ จากของเหลืออุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ**. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- ฤทัยรัตน์ หวานจำ. (2547). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตผงแห้งจากเศษเหลือของโรงงานผลิต
ซูริมิ: การผลิตในระดับน้ำร่ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วรพงษ์ อัสวเกษตร. (2538). การผลิตเปปโตินจากหัวกุ้ง. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัย
 เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิมล เหมะจันทร์. (2540). **ชีววิทยาปลา.** กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2552). **ศักยภาพการผลิตและการตลาดปลานิล. เอกสารวิจัย
 เศรษฐกิจการเกษตร เลขที่ 119.** กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- สุปราณี แยมพราย. (2539). การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อ
 ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุพิมพ์ ศิริสายัณห์. (2541). การเจริญเติบโตของปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linnaeus) ใน
 บ่อบำบัดน้ำเสียชุมชนเทศบาลเมืองเพชรบุรี. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัย
 เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สุภาพร มหันตกิจ. (2549). การใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำเป็น
 แหล่งโปรตีนทดแทนปลาป่นในอาหารปลากะพงขาว (*Lates calcarifer* Bloch).
 วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, กรุงเทพฯ.
- อัจฉราภรณ์ อ่อนทรวง. (2552). กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสของจุลินทรีย์ผลิตกรดแลคติกที่
 คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านประเภทเนื้อและปลา. วิทยานิพนธ์ วท.ม.,
 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
- A.O.A.C. (2000). Official methods of the association of official analytical chemists (14th ed.).
 Washington D.C.: Association Official Analytical Chemist.
- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food protein. (pp. 110-169). New York:
 Vanderblit.
- Adler-Nissen, J. (1993). Protease. Enzyme in food processing. (pp. 159-203). San Diego:
 Academic Press.
- Anson, M.L. (1938). Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *Journal of
 General Physiology*, 22, 7-89.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J., and Vincent, G.H. (2005). Hydrolysates from Atlantic cod (*Gadus
 morhua* L.) viscera as components of microbial growth media. *Process Biochemistry*,
 40, 3714-3722.



- BD Bionutrients. (2006). **BD Bionutrients™ Technical Manual Advanced Bioprocessing** (Vol.3). USA: Waters Corporation.
- Bhaskar, N., and Mahendrakar, N.S. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**, 99(10), 4105-4111.
- Boller, T. (1986). Roles of proteolytic enzymes in interaction of plant and other organisms. In Dalling MJ (Eds.), **Plant Proteolytic Enzymes**. (Vol.1, pp. 67-96). Boca Raton: CRC Press.
- Brody, J. (1965). **Fishery By-Product Technology**. Connecticut: The AVI Publ.
- Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao D.G., and Jyothirmayi, T. (2010). Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. **Food Chemistry**, 120, 652-657.
- Clausen, E., Gildberg, A., and Raa, J. (1985). Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(6), 1556-1557.
- Cohen, L.W., Coghlan, V.M., and Dihel, L.C. (1986). Cloning and sequencing of papain-encoding cDNA, 48, 219-227.
- Condalab. (n.d.). **Agars, Peptones & Others**. Retrieved February 9, 2012, from www.condalab.com
- Cronk, J.D. (August 4, 2010). **Biochemistry dictionary**. Retrieved February 9, 2012, from <http://guweb2.gonzaga.edu/faculty/cronk/biochem/Pindex.cfm?definition=protease>
- Fountoulakis, M., and Lahm, H.W. (1998). Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. **Journal of Chromatography A**, 826, 109-134.
- Gildberg, A. (1993). Enzymic processing of marine raw materials. **Process Biochemistry**, 28, 1-15.
- Hill, R.L. (1965). Hydrolysis of Protein. **Advances in Protein Chemistry**. New York: John Wiley and Son.
- 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.

- Jeffrey, L.D., and Kenneth, F.B. (1972). Differential amino acid requirements for sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, 112(1), 345-355.
- Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. (2000). Kinetics of the hydrolysis of atlantic salmon (*Salmosalar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**, 36, 131-139.
- Light, A., and Smith, E.L. (1963). **Methods of protein hydrolysis. In The Protein (Composition, Structure and Function)**. London: Academic Press.
- Mackie, I.M. and Ritchie, A.H. (1981). Differentiation of Atlantic cod *Gadus morhua morhua* and pacific cod *Gadus morhua macrocephalus* by electrophoresis and by isoelectric focusing of water-soluble proteins of muscle tissue. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, 68(2), 173-175.
- Mahadeva Iyer, K., Gopakumar, K., Shenoy, A.V., James, M.A., and Nair, M.R. (1978). Peptone from threadfin bream (*Nemipterus japonicus* Block): Preparation and suitability as microbiology growth media. In **Proceeding of the 18th symposium on fish utilization technology and marketing in the IPFC region**, (8-17 March, pp. 523-526). Philippines: Indo-Pacific Fishery Commission.
- Moriyama, K. (1967). Chemical nature of the active site of papine. I. inhibition by carbonyl reagents with active methylene groups. **Journal of Biochemistry**, 62, 250.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D., and Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. **Journal of Food Science**, 61, 270-274.
- Olcott, H.S., and Fraenkel, H.C. (1947). Acid hydrolysis of food protein. **Journal Biological Chemistry**, 171, 583-586.
- Payne, J. W. (1980). Transport and utilization of peptides by bacteria. **Microorganisms and Nitrogen Sources: Transport and Utilization of Amino Acids, Peptides. Proteins, and Related Substrates**, (Vol.21, pp. 1- 256). New York: John Wiley & Sons.
- Ruth, A.L., James, A.L., and Nicola, C.J. (1995). The amino acid requirements of *Staphylococcus aureus* isolated from cases of bovine mastitis. **Institute For Animal Health**, 268(1), 1-7.

- Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**, 68, 2196-2200.
- Stein, I.A., Svein, J.H., and Vincent, G.H.E. (2005). Enzymatic hydrolysis of atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. **Process Biochemistry**, 40, 1957–1966.
- Suryanarayana, R.S.V., Saraswathi, C.R. and Dwarakanath, C.T. (1998). Studies on the utilization of fishery wastes for the production of microbiological media. In **Proceeding of the 18th symposium on fish utilization technology and marketing in the IPFC region**, (Vol.62, pp. 597-635). Philippines: Indo-Pacific Fishery Commission.
- Vecht-Lifshitz, E., Almas, K.A., and Zomer, K.A. (1990). Microbial growth on peptone from fish industrial wastes. **Left. In Appl. Microbiol**, 10, 183-186.
- Watson, J. (1979). **Nursing: The philosophy and science of caring**. Boston: Little Brown.
- Wu, Y.F., Baek, H.H., Gerard, P.D., and Cadwallader, K.R. (2000). Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP). **Journal of Food Science**, 65(7), 1220-1227.

ภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีเจลดาล์ (AOAC, 2000)

1.1 สารเคมี

- 1.1.1 สารเร่งปฏิกิริยาใช้ซีลีเนียม
- 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 แล้วไปเผาคือในเตาเผา (Muffler furnace) อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วปิดสวิทช์เตาเผา เปิดฝาเตาออกจนอุณหภูมิภายในเตาลดเหลือประมาณ 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 สารละลายโพลีนีโนล นำสารละลายโพลีนีโนลมาเจือจางด้วยอัตราส่วน 1:3 (เตรียมเมื่อต้องการใช้)

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

5.2 วิธีการวิเคราะห์

5.2.1 นำตัวอย่างส่วนใด 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายเคซิน 2 เปอร์เซนต์ 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 เติมสารละลายฟอลิโนฟีนอลที่ละลายน้ำในอัตราส่วน 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 ก่อนเติมสารละลายเคซิน ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 3-4

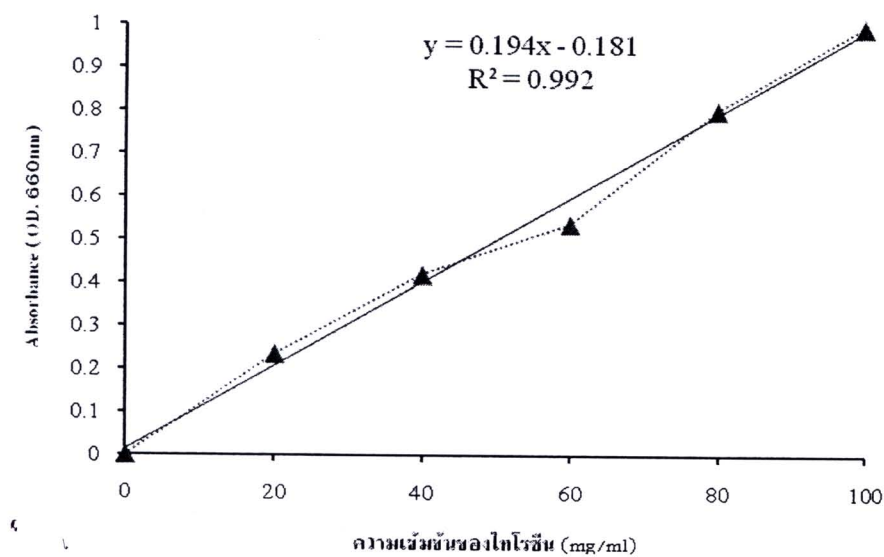
5.2.6 ทำแบลนด์ (blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์ ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 4

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

5.3 การคำนวณ

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

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



ภาพ 13 กราฟมาตรฐานของไทโรซิน

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
เศษเหลือส่วนเครื่องในปลาทับทิม 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
เศษเหลือส่วนเครื่องในปลาทับทิมที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน

		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 การวิเคราะห์ทางสถิติขององค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตผงจาก
เศษเหลือส่วนเครื่องในปลาหับทิมเทียบกับเปปโตनทางการค้า

Test Value = 0						
		Sig.		Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
t	df	(2-tailed)			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 การวิเคราะห์ทางสถิติของค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตผงจากเศษเหลือส่วน
เครื่องในปลาหับทิมเทียบกับเปปโตนทางการค้า

Test Value = 0						
		Sig.		Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
t	df	(2-tailed)			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 การวิเคราะห์ทางสถิติของน้ำหนักแห้งของจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่เลี้ยงในอาหาร
ที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้เทียบกับเปปโตนทางการค้า

Test Value = 0						
		Sig.		Mean Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
t	df	(2-tailed)			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 มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือปลา: สภาวะการย่อยเครื่องในปลาทับทิม (*Tilapia nilotica*) โดยเอนไซม์ปาเปน
พีริยา ไรเกท¹ ปวีณา น้อยทัพ^{1*} โอโรส รุกชาติ¹ และ เจริญทอง สิงห์จางวงศ์¹

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 มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ พิชญ์โลก 65000

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

บทคัดย่อ

การนำเศษเหลือจากเครื่องในปลาทับทิมมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์ องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทับทิมประกอบไปด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่า pH เท่ากับ 6.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาทับทิมโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปน ปริมาตรร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ (w/w) pH 6.3 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที เป็นสภาวะที่ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุด ร้อยละ 70.35 และผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเหลือร้อยละ 40 นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13

คำสำคัญ : โปรตีนไฮโดรไลเซต, ปาเปน, ปลาทับทิม, 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 มีปริมาณปลาทับทิมร้อยละ 34.41 ซึ่งนับว่าเป็นอัตราส่วนที่สูง และจากมูลค่าการส่งออกปลาทับทิมแช่แข็งของไทยปี พ.ศ. 2546 – 2550 พบว่าเมื่ออัตราการขยายตัวต่อปีคิดเป็นร้อยละ 56.50 ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้นด้วย ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาคือสิ่งแวดล้อม เพราะเกิดการเน่าเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ส่วนมากโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะจำหน่ายให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก หากเป็นผู้แปรรูปขนาดเล็กก็จะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่นๆ และเนื่องจากเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่จำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi *et al.*, 1995) จึงมีการนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าโดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์



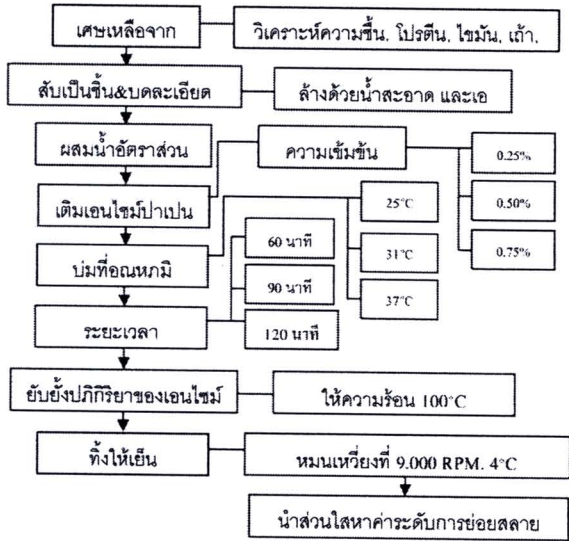


ต่างๆ โดยเฉพาะ โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต โดยอาศัยหลักการทำงานของเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส (protease) ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส เนื่องจากมีราคาถูก ให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูง เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อ pH ของวัตถุดิบ และสามารถเลือกใช้สภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ หรืออาหารมนุษย์ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเศษเหลือจำพวกเครื่องในจากปลาที่ต้มมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. วัตถุดิบและวิธีการ

2.1 วัตถุดิบเศษเหลือจากปลาหับทิม

เก็บส่วนเครื่องในทั้งหมดของปลาหับทิม จากตลาดรวมใจ (พิษณุโลก) โดยระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนนำมาเตรียมเป็นวัตถุดิบไม่เกิน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ และล้างด้วย 95% เอทานอล เพื่อล้างไขมันบางส่วนออก จากนั้นตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วบดด้วยเครื่องบดเนื้อคลุกเคล้าให้ผสมกันดี ขั้นตอนดังรูปที่ 1 บรรจุใส่ถุงแล้วเก็บที่ -18 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ก่อนนำมาทดลอง 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) โดยการคกตะกอนกรดอะมิโนอิสระด้วย TCA (Hoyle and Merriut, 1994) แล้วคำนวณด้วยสมการที่ 1

$$\%DH = \frac{\text{TCA soluble nitrogen} \times 100}{\text{total nitrogen}} \tag{1}$$

3. ผลและวิจารณ์

3.1 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเศษเหลือจากปลา

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีบางประการของเครื่องในปลาหับทิม พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่า pH เท่ากับ 6.3 ซึ่งจะเห็นได้ว่าเครื่องในปลาหับทิมมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เป็นอย่างดี และยังพบว่าไขมันและเถ้ามีน้อยกว่าหัวและก้างปลาคุกกี้กอยที่มีไขมันร้อยละ 11.41 เถ้าร้อยละ 6.51 (พงษ์เทพ วิไลพันธ์, 2540)

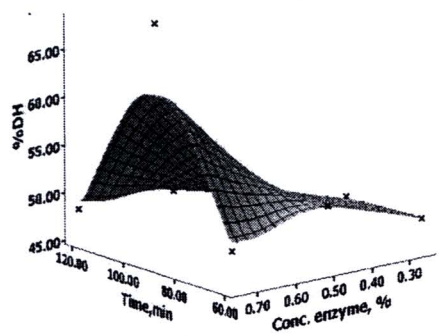
3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัด โปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือของการแปรรูปปลาหับทิมด้วยเอนไซม์ปาเปน โดยแปรเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ พบว่ามีระดับการย่อยสลายในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังตารางที่ 1

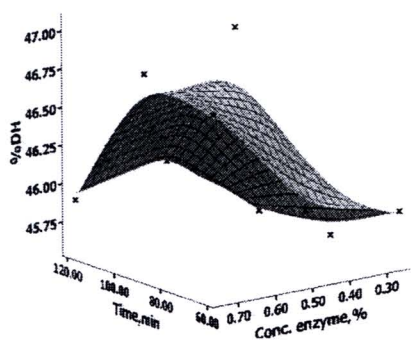
ตารางที่ 1 ระดับการย่อยสลายของเอนไซม์ปาเปนที่สกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตของแต่ละสภาวะ

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

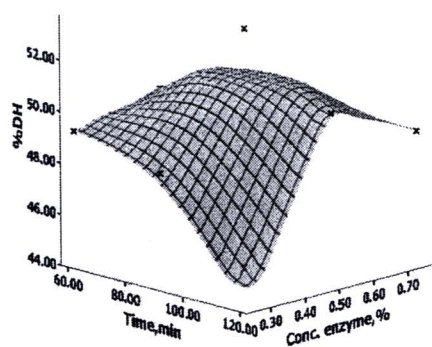




รูปที่ 2 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

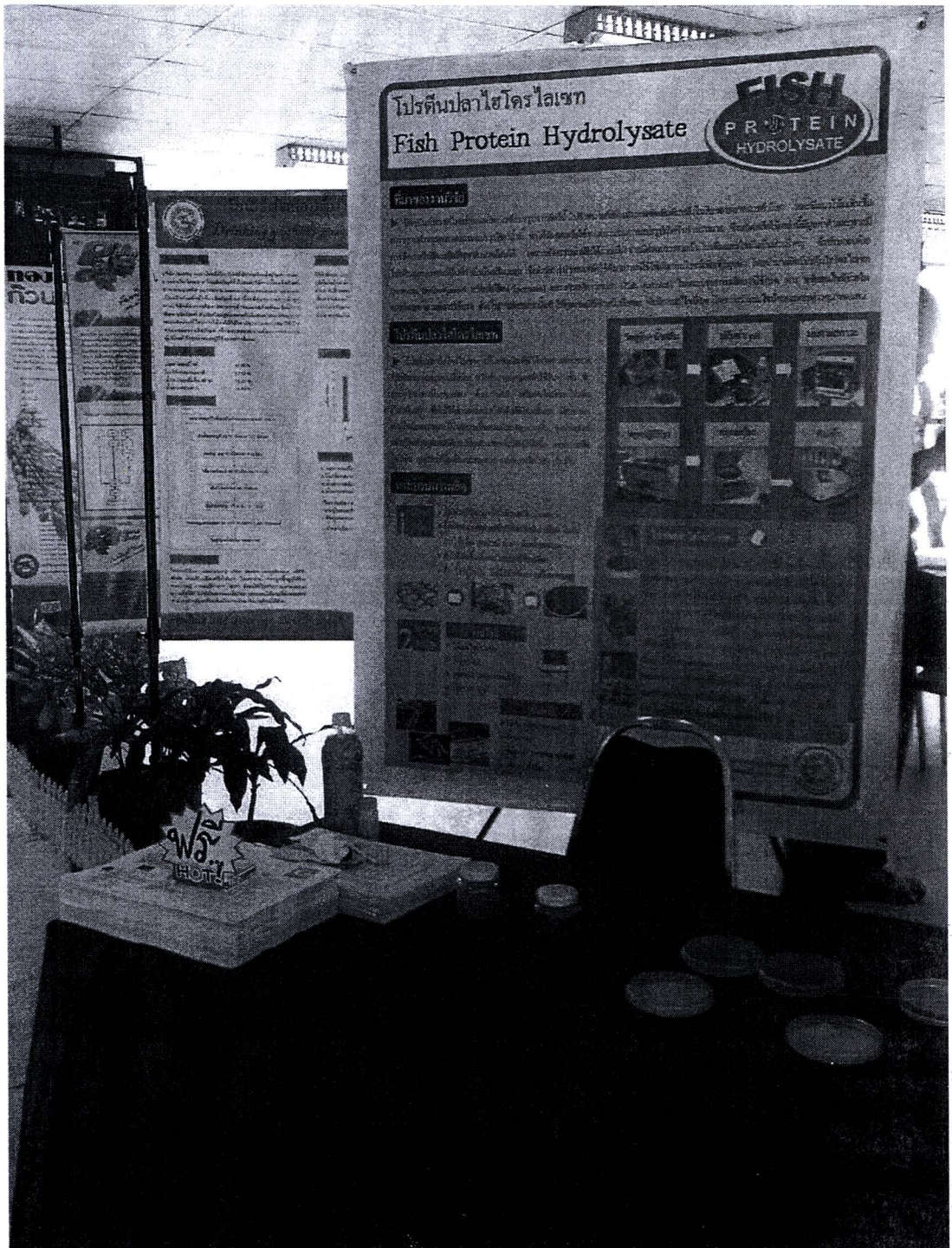


รูปที่ 3 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

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



FISH **PROTEIN** **HYDROLYSATE** **โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต** **Fish protein hydrolysate**

ที่มา

ปัจจุบันประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์แปรรูปจากสัตว์น้ำไปยังต่างประเทศมีมูลค่าเพิ่มขึ้นเป็นอันดับสองของโลก

จากการขยายตัวทางเศรษฐกิจและสังคม การขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำมีและเพิ่มขึ้นไม่แพ้กัน การขยายตัวของอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำมีจำนวนมาก ซึ่งทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำจำนวนมาก ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการไม่ดีจะก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ เพราะการทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำสาธารณะจะทำให้เกิดปัญหามลพิษและเพิ่มปริมาณน้ำเสีย ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณน้ำเสียจำนวนมาก และหากมีการจัดการไม่ดีจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษและเพิ่มปริมาณน้ำเสีย ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณน้ำเสียจำนวนมาก และหากมีการจัดการไม่ดีจะก่อให้เกิดปัญหามลพิษและเพิ่มปริมาณน้ำเสีย ซึ่งประเทศไทยมีปริมาณน้ำเสียจำนวนมาก

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากส่วนเนื้อของปลา หรือส่วนของกระดูกปลา เช่น หัว และอวัยวะภายในของปลา ซึ่งสารเคมี หรือเอนไซม์ย่อยโปรตีน (โปรตีน) เพื่อให้ได้สารละลายโปรตีนที่มีรสชาติอร่อย มีส่วนประกอบโปรตีนและกรดอะมิโนอิสระเป็นจำนวนมากขึ้น จากประโยชน์เพื่อสุขภาพและคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนให้ดีขึ้น เช่นการผลิตผลิตภัณฑ์จากปลาและกระดูกปลา และกระดูกปลา เป็นต้น

กระบวนการผลิต

1. เตรียมวัตถุดิบ

- ▶ เก็บตัวอย่างเศษเหลือส่วนเครื่องในของปลา
- ▶ ล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดไขมัน เกล็ด ไขมัน เตาใช้ล้างด้วยน้ำสะอาด
- ▶ สับให้เป็นชิ้นเล็ก และแช่ในถังแช่เย็น
- ▶ ล้างภาชนะบรรจุ โดยให้ตากแดด

```

    graph LR
      A[วัตถุดิบ] --> B[ล้างทำความสะอาด]
      B --> C[สับให้เป็นชิ้นเล็ก]
      C --> D[แช่เย็น]
      D --> E[ล้างภาชนะบรรจุ]
      E --> F[ตากแดด]
      F --> G[บรรจุภัณฑ์]
      G --> H[จัดส่ง]
  
```

วิธีวิเคราะห์คุณภาพ

```

    graph LR
      A[วิเคราะห์คุณภาพ] --> B[Protein]
      A --> C[pH]
      A --> D[Moisture]
      A --> E[Fat]
      A --> F[Ash]
      A --> G[Color Hunter Lab]
      A --> H[Amino acid analyzer]
      A --> I[O.D. Spectrophotometer]
  
```

กระบวนการ

- ▶ เติมน้ำ
- ▶ ใช้เตาไฟฟ้า
- ▶ ที่ pH 6.2
- ▶ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
- ▶ เวลา 10 นาที

```

    graph LR
      A[วัตถุดิบ] --> B[ล้างทำความสะอาด]
      B --> C[สับให้เป็นชิ้นเล็ก]
      C --> D[แช่เย็น]
      D --> E[ล้างภาชนะบรรจุ]
      E --> F[ตากแดด]
      F --> G[บรรจุภัณฑ์]
      G --> H[จัดส่ง]
  
```

อุณหภูมิ

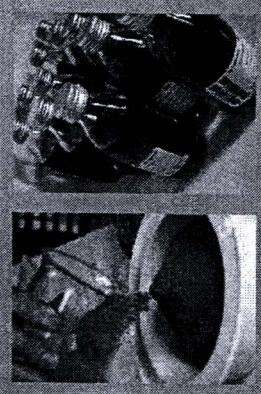
- ▶ ใช้เตาไฟฟ้า
- ▶ ที่ pH 7.5
- ▶ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- ▶ เวลา 6 ชั่วโมง

```

    graph LR
      A[วิเคราะห์คุณภาพ] --> B[Protein]
      A --> C[pH]
      A --> D[Moisture]
      A --> E[Fat]
      A --> F[Ash]
      A --> G[Color Hunter Lab]
      A --> H[Amino acid analyzer]
      A --> I[O.D. Spectrophotometer]
  
```

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

ผลการวิจัยที่ได้พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ใช้จากปลา
 อย่างเช่นปลาในทะเลจะมีคุณสมบัติที่มีคุณค่าทางโภชนาการ โดย
 ส่วนประกอบของกรดอะมิโนและกรดไขมันที่มีอยู่ในปลาไฮโดรไลเซต
 นั้น มีคุณค่าทางโภชนาการ และในขั้นตอนในการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต
 นี้ใช้วิธีการที่ปลอดภัย และช่วยในการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพและ
 มีประโยชน์ การนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตไปใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทางเกษตร
 ไร่กับสัตว์ และนำไปใช้ผสมอาหารสัตว์กับเนื้อสัตว์และพืช ซึ่ง
 โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีประโยชน์ในการเพิ่มการเจริญเติบโต เพื่อให้สัตว์
 นำไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นและเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการให้กับผลิตภัณฑ์

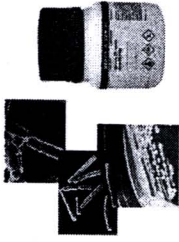


ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
 คณะเกษตรศาสตร์
 ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม



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	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
2	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
3	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
4	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
5	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
6	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
7	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
8	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
9	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
10	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
11	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
12	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
13	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
14	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
15	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์
16	นางสาว พงษ์ศักดิ์	นางสาว พงษ์ศักดิ์

17	พาราม นันทวัฒน์ พอสถาน	พาราม น
18	ท. วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	ท. วัฒน
19	กมลชนก อภัย วัชร	กมล อภัย
20	กมล วัชร	กมล
21	กัญญาธิ์ ขวัญทอง	กัญญาธิ์
22	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
23	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
24	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
25	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
26	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
27	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
28	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
29	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
30	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
31	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
32	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
33	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
34	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
35	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
36	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
37	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
38	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
39	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน
40	กมล วัฒนพงศ์ วัฒนพงศ์	กมล วัฒน

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



กลุ่มวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

Proceedings การประชุมวิชาการ “นเรศวรวิจัย” ครั้งที่ 7

สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลาที่ต้มด้วยเปปซินและปาเปนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต
พีริยา ไรเกศ¹ ไอรอส รุกชชาติ¹ เจริญทอง สิงห์จามูนสงศ์¹ 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

การนำเศษเหลือจากเครื่องในปลาที่ต้ม (Oreochromis niloticus) มาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยนำเครื่องในปลาที่ต้มซึ่งประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 9.14 ไขมันร้อยละ 5.98 ความชื้นร้อยละ 76.73 เถ้าร้อยละ 1.61 และค่าความเป็นกรดค่าเท่ากับ 6.3 ล้างด้วยน้ำสะอาดและเอทานอล 95% ก่อนนำมาบดละเอียดแล้วย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและปาเปนจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาที่ต้มโดยการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน พบว่าจากการใช้เอนไซม์เปปซินปริมาณร้อยละ 0.50 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่าง 2 ลูทงูมี 37 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 53.23 และผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 32.50 ส่วนสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดด้วยเอนไซม์ปาเปนคือใช้เอนไซม์ปาเปนปริมาณร้อยละ 0.75 ต่อวัตถุดิบ ค่าความเป็นกรดต่างของวัตถุดิบคือ 6.3 ที่ลูทงูมี 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 90 นาที ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 83.83 โดยให้โปรตีนไฮโดรไลเซตเหลวประมาณร้อยละ 40 ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้ ซึ่งมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 23.13

คำสำคัญ: โปรตีนไฮโดรไลเซต, เปปซินปาเปน, ปลาที่ต้ม, 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 ระบุว่ามีมูลค่าผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดในประเทศไทยปี 2551 มีปริมาณปลาที่ต้มร้อยละ 34.41 ซึ่งนับว่าเป็นอัตราส่วนที่สูง และจากมูลค่าการส่งออกปลาที่ต้มแช่แข็งของไทยปี พ.ศ. 2545 – 2550 พบว่ามีอัตราการขยายตัวคือปีติดเป็นร้อยละ 66.50 ทำให้มีเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปมากขึ้นตาม



ไปด้วย ซึ่งเศษเหลือเหล่านี้มีมูลค่าต่ำและหากมีการจัดการที่ไม่ดีพอจะเกิดปัญหาดังสิ่งแวดล้อม เพราะนำเสียได้ง่ายเนื่องจากมีส่วนประกอบส่วนใหญ่เป็นโปรตีน ส่วนมากโรงงานแปรรูปขนาดใหญ่จะจำหน่ายให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ในราคาถูก หากเป็นผู้แปรรูปขนาดเล็กจะทิ้งเศษเหลือเหล่านี้ร่วมกับขยะอื่นๆ และเนื่องจากเศษเหลือเหล่านี้ประกอบด้วยโปรตีนและกรดอะมิโนที่มีจำเป็นในปริมาณสูง (Shahidi et al., 1995)

การนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าโดยนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ 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 มีความเป็นกรดต่ำที่เหมาะสมคือ 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 มีความเป็นกรดต่ำที่เหมาะสมคือ 6 และมีความจำเพาะต่ออนุโมลกรดอะมิโน อาร์จินีน (Arg) ลิซีน (Lys) และ กลูตามีน (Glu) เนื่องจากเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้มีราคาถูก มีความจำเพาะต่อวัตถุดิบ ให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูง และสามารถเลือกใช้สภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม เพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สกัดได้สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ใช้เป็นอาหารสัตว์น้ำ หรืออาหารมนุษย์ได้ ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเศษเหลือจากพวกเครื่องในจากปลาที่บดหั่นมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. วัตถุดิบเศษเหลือจากปลาที่บดหั่น

เก็บส่วนเครื่องในทั้งหมดของปลาที่บดหั่น จากตลาดร่วมใจ (พิษณุโลก) โดยระยะเวลาตั้งแต่ปลาตายจนนำมาเตรียมเป็นวัตถุดิบไม่เกิน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำ และล้างด้วยเอทานอล 95% เพื่อล้างไขมันออกจากนั้นสับเป็นชิ้นเล็กๆ แล้ววัดด้วยเครื่องบดเนื้อคลุกเคล้าให้ผสมกันดี บรรจุใส่ถุงพลาสติก เก็บที่ -18 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บรักษาไว้ก่อนนำมาทดลอง โดยก่อนทดลองทำการละลายน้ำแข็งในตัวอย่างเครื่องในปลาที่บดหั่นที่อุณหภูมิ 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

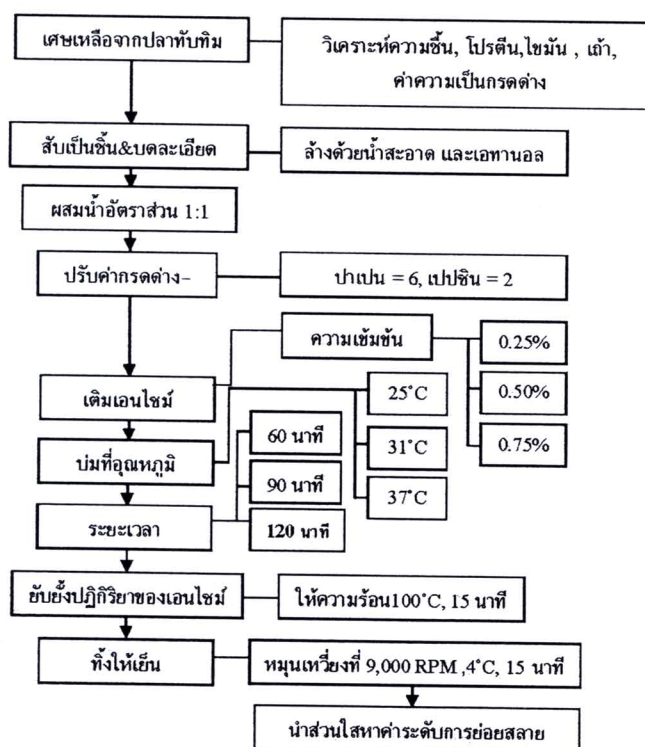
วิเคราะห์องค์ประกอบของเศษเหลือจากปลาทั้งความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า และค่าความเป็นกรดต่าง ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000)



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 มาปรับค่าความเป็นกรดด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (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 จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธีของ A.O.A.C. (2000) เมื่อได้ค่าร้อยละของโปรตีนที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเซต เหลวจึงนำมาคำนวณระดับการย่อยสลาย (%DH) ด้วยการตกตะกอนกรดอะมิโนอิสระด้วย TCA (Hoyle & Merritt, 1994) แล้วคำนวณด้วยสมการที่ 1 เพื่อใช้เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยของเอนไซม์แต่ละสภาวะ โดยใช้แผนการทดลองแบบ $3 \times 3 \times 3$ Factorial in CRD ทำการทดลอง 3 จำลองเลือกสภาวะที่เหมาะสมด้วย response surface model

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



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

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

ตารางที่ 2 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินของแต่ละสภาวะ

เวลาในการย่อย (นาที)	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 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนของแต่ละสภาวะ

เวลาในการย่อย (นาที)	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

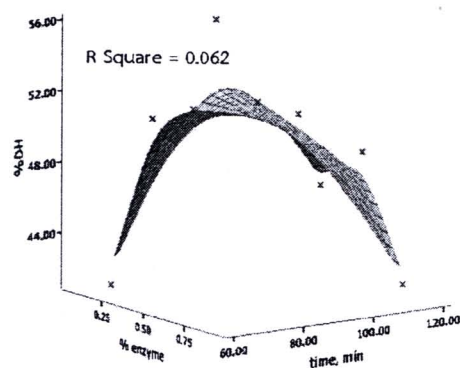


อภิปรายผลการศึกษา

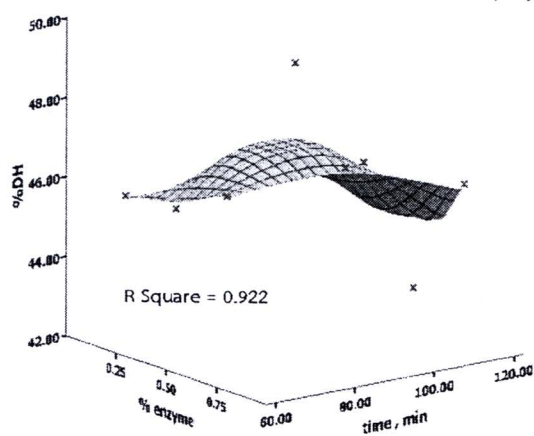
จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาหับทิม ดังตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าเครื่องในปลาหับทิมมีโปรตีนอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ยังพบว่ามีไขมันและเถ้าน้อยกว่าหัวและก้างปลาตุ๋นบักกุ่มที่มีไขมันร้อยละ 11.41 และเถ้าร้อยละ 6.51 (พงษ์เทพ, 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

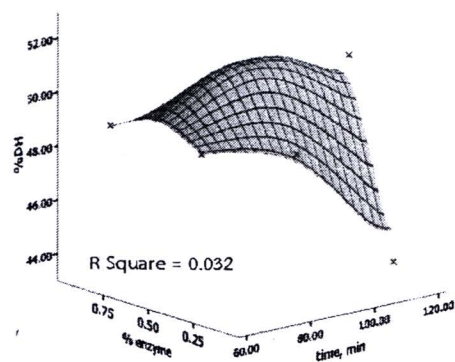
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนให้ระดับการย่อยสลายมากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พิษญา (2539) ซึ่งพบว่าการย่อยส่วนหัวและก้างปลาตุ๋นด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดต่างเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้สูงสุดเท่ากับ 4.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ให้ปริมาณโปรตีนเฉลี่ยในสารละลายที่ได้สูงสุดเท่ากับ 3.67 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นอกจากนี้การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนยังให้ระดับการย่อยสลายที่มากกว่า Bhaskar et al. (2008) ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเครื่องในปลากระโทงเตง (*Calla calla*) 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



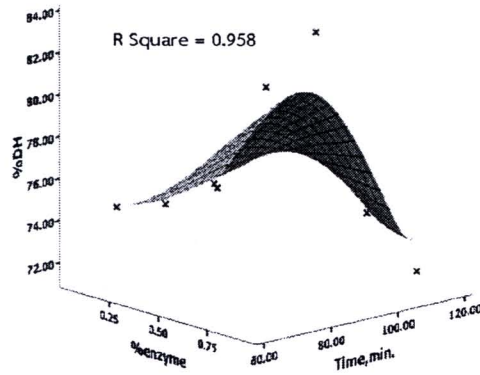
รูปที่ 2 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



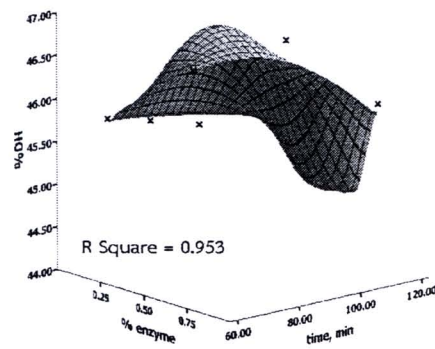
รูปที่ 3 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



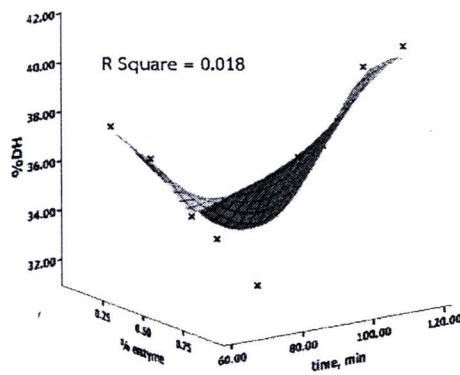
รูปที่ 4 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 5 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส



รูปที่ 6 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7 กราฟ RSM ของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



สรุปผลการศึกษา

ส่วนเครื่องในของปลาที่หมักประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 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). การผลิตเปปโตनจากปลาอุกบักกอยและจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาอุกบักกอย. วิทยานิพนธ์ วท., ม.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ ,
- มลลิกา ธนสุคนธ์. (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.

