สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตซอสโดยใช้สารสกัดจากเศษเหลือทิ้งปลาซาร์ดีน

นางสาว ทัศนาพร บุญเสนอ
นางสาว ปาริตา ปัทมรังสรรค์
นางสาว สิริกัญญา นุสคง

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 67278
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549

.b. 11662385
.i..........

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

The production of sauce from sardine by-products hydrolysates

Miss. Tassanapond Boonsaner

Miss. Parita Pattamarungson

Miss. Sirikanya Nuskong

A Speacial Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the
Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

โครงงานพิเศษเรื่อง	การผลิตซอสปลาโดยใช้สารสกัดจากเศษเหลือทิ้งปลาซาร์ดีน		
นักศึกษา	นางสาวทัศนาพร	บุญเสนอ	รหัสประจำตัว 45050202
	นางสาวปาริตา	ปัทมรังสรรค์	รหัสประจำตัว 45050213
	นางสาวสิริกัญญา	นุสคง	รหัสประจำตัว 45050248
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ลินจง สุขลำภู		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
คณะวิทยาศาสตร์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง		

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.มาริสา จาตุพรพิพัฒน์	ม. จาตุ
กรรมการ	อ.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์	คนึงกานต์ กลั่นบุศย์
กรรมการ	ผศ.ลินจง สุขลำภู	ลินจง สุขลำภู

....

(..)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงงานพิเศษเรื่อง การผลิตซอสโดยใช้สารสกัดจากเศษเหลือทิ้งปลาซาร์ดีน
นักศึกษา นางสาวทัศนาพร บุญเสนอ
นางสาวปาริตา ปัทมรังสรรค์
นางสาวสิริกัญญา นุสดง
ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา 2548
อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ลินจง สุขลำภู

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีนโดยใช้เอนไซม์ และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น โดยทำการย่อยหัวปลาซาร์ดีนด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างเอนไซม์อัลคาเลส (2.4 L) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ (500 L) จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทในหัวปลาซาร์ดีนพบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จะให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีปริมาณโปรตีนสูงสุด(ร้อยละ 63.20 ของน้ำหนักแห้ง) และปริมาณผลได้สูงสุด(ร้อยละ 55.07 ของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน (L* = 66.7 a* = +4.1 และ b* = +25.49) มีกลิ่นปลาหมึกแห้งและมีคุณสมบัติในการละลายที่ดี และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทพบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 63.20 ไขมันร้อยละ 4.3 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 19 และเถ้าร้อยละ6.8 ของน้ำหนักแห้ง เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นโดยแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 3 4 5 6 และ 7 โดยน้ำหนักของส่วนผสมทั้งหมด และนำซอสที่ได้มาเป็นส่วนผสมในหมูผัดซอส ซึ่งจากการทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสพบว่าความชอบทางด้านสี กลิ่น และความหนืดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยทางด้านรสชาติและการยอมรับโดยรวมของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่มีการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซทร้อยละ 5 มีคะแนนการยอมรับสูงสุด และจากการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และคุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของซอสชนิดข้นที่เติมโปรตีนไฮโดรไลเซทร้อยละ 5 พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพ และเคมีใกล้เคียงกับซอสหอยนางรมและมีคุณภาพด้านจุลินทรีย์อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน มอก.1317-2538

Special Project title The production of sauce from sardine by-products hydrolysates
Name Miss. Tassanapond Boonsaner
Miss. Parita Pattamarungson
Miss. Sirikanya Nuskong
Department Applied Biology
Program Biotechnology
Academic year 2005
Special Project Advisor Asst. Prof. Linchong Suklumphoo

Abstract

The objectives of this study were to study the production of fish protein hydrolysates (FPHs) from sardine heads by enzymatic treatment and utilized the FPH as flavoring agent in thick sauce product. Sardine heads were hydrolyzed by enzyme mixture, Alcalase (2.4 L) and Flavozyme (500 L). The optimal conditions of fish protein hydrolysis were investigated.The results found that using Alcalase at 0.3 % (w/w of protein content in the samples) at 60 °C for 2 hours and Flavozyme at 0.5 % (w/w of protein content in the samples) at 55 °C for 6 hours gave FPH with the highest protein content (63.20 % dry basis) and % yield (55.07 % dry basis). The obtained FPH was light-brown powder (L^*= 66.7 a^*= +4.1 b^*= +25.49) with an odor of dry squid and had good solubility. The proximate composition showed 19 % carbohydrate, 63.20% protein, 4.3% fat and 6.8% ash. The FPH powder was used at the concentration of 3, 4, 5, 6 and 7 % (w/w) for making flavoring agent in thick sauce production and their thick sauces were added in fried pock. Sensory evaluation showed that there were no significant differences in terms of color, flavor and viscocity ($p>0.05$) in all five samples. However, means of taste and overall acceptance of thick sauce with 5 % FPH had the highest score. Physicochemical properties and microbiological qualities of the thick sauce with 5 % FPH were evaluated. It was found that the product had Physicochemical properties similar to oyster sauce, and was microbiologically safe for industrial standard TIS 1317-2538.

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษเรื่องการผลิตซอสโดยใช้สารสกัดจากเศษเหลือทิ้งปลาซาร์ดีนจะสำเร็จลงไม่ได้ด้วยดี หากไม่ได้รับความช่วยเหลือ ความร่วมมือ และคำปรึกษาจากบุคคลต่างๆ ดังกล่าวนี้

1. ผศ. ลินจง สุขลำภู ที่ได้ให้คำปรึกษาโครงงานพิเศษด้วยความอุตสาหะตลอดจนให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำโครงงานพิเศษ

2. ผศ. ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ และ อ.คนึงกานต์ กลั่นบุศย์ ประธานกรรมการ และกรรมการที่ได้ให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการจัดทำโครงงานพิเศษ

3. คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ คุณประสิทธิ์ แผ้วบาง คุณวิทยา เขียวเขิน และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่มิได้กล่าวนาม ณ ที่นี้ที่ให้ความกรุณาเบิกอุปกรณ์และให้ความรู้ในการใช้เครื่องมือ

4. เพื่อนๆนักศึกษาชั้นปีที่ 4 และน้องๆนักศึกษาชั้นปีที่ 3 ทุกท่าน ที่ให้ความร่วมในการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส รอยยิ้มที่มีให้กัน

5. บริษัท ลัคกี้ แคนเนอรี่ จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ปลาซาร์ดีนในการจัดทำโครงงานพิเศษในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณอย่างสูง

นางสาวทัศนาพร บุญเสนอ
นางสาวปาริตา ปัทมรังสรรค์
นางสาวสิริกัญญา นุสคง

สารบัญ

หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ข
กิตติกรรมประกาศ ค
สารบัญ ง
สารบัญตาราง ฉ
สารบัญรูป ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
    1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ 1
    1.2 วัตถุประสงค์ 2
    1.3 ขอบเขตของการวิจัย 2
    1.4 ขั้นตอนของการวิจัยและวิธีการดำเนินงาน 2
    1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ 4
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย 41
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ 50
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 60
เอกสารอ้างอิง 62
ภาคผนวก 67

สารบัญตาราง

หน้า
ตารางที่ 2.1 รสชาติของ L-amino acid และ D-amino acid 24
ตารางที่ 2.2 แหล่งของโปรติโอไลติกเอนไซม์ที่ใช้มากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม 26
ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของซอสชนิดข้น 48
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีน 50
ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนและปริมาณYieldของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะต่างๆ 52
ตารางที่ 4.3 คุณภาพทางเคมีและทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่เหมาะสม 54
ตารางที่ 4.4 คุณภาพทางด้านสีของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่แปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ 55
ตารางที่ 4.5 คุณภาพด้านความหนืดและปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่แปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ 56
ตารางที่ 4.6 การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของซอสชนิดข้นที่แปรร้อยละของโปรตีนไฮโดรไลเซทในปริมาณต่างๆ 57
ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของซอสชนิดข้นที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับซอสหอยนางรมที่วางจำหน่ายในท้องตลาด 58
ตารางที่ 4.8 เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับเกณฑ์คุณภาพของซอสหอยนางรม มอก. 1317-2538 59

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 2.1 การเกิดพันธะเพปไทด์ของโปรตีน 5

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโน 20 ชนิด 8

รูปที่ 2.3 การสลายกรดอะมิโนต่างๆให้เป็นตัวกลางในไกลโคไลซิส และวัฏจักรเครบส์ 9

รูปที่ 2.4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของโปรตีน 11

รูปที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของโปรตีน 13

รูปที่ 2.6 ลักษณะโครงสร้างของกลุ่มเพปไทด์ 14

รูปที่ 2.7 โครงสร้างทุติยภูมิแบบเกลียว 15

รูปที่ 2.8 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพับ 15

รูปที่ 2.9 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพับ anti-parallel และ parallel ตามลำดับ 16

รูปที่ 2.10 ลักษณะปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ 25

รูปที่ 3.1 เครื่อง Water bath (Memmert ,UIC) 42

รูปที่ 3.2 เครื่องวัดพีเอช (pH meter) 42

รูปที่ 3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ FALCON 6/300 43

รูปที่ 3.4 เครื่อง Deep Freeze (VX350) 43

รูปที่ 3.5 เครื่อง Freeze drier (Labconco) 44

รูปที่ 3.6 เครื่องสกัดไขมัน (Soxtherm apparatus) ของ BUCHI 810 44

รูปที่ 3.7 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน Gerhardt 45

รูปที่ 3.8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน 47

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีศักยภาพสูงในการผลิตอาหาร เพราะเป็นประเทศที่มีพื้นฐานด้านการผลิตภาคการเกษตรที่มั่นคงและมั่งคั่ง ทำให้มีผลผลิตที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการแปรรูปอย่างหลากหลายและต่อเนื่อง โรงงานอุตสาหกรรมอาหารของไทยมีมากกว่า 50,000 โรงงาน (เป็นโรงงานผลิตอาหารทะเลแปรรูปประมาณ 300 โรงงาน) กระจายอยู่ทั่วไปในทุกภาคของประเทศ โดยเฉพาะทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีโรงงานมากที่สุดประมาณ ร้อยละ 65 ของจำนวนโรงงานอุตสาหกรรมอาหารทั้งหมด (http://203.151.85.13/newirp/02plan/plan-branch01-3.html)

ปัจจุบันมีการขยายตัวของอุตสาหกรรมประเภทปลากระป๋อง กุ้งแช่เยือกแข็งและผลิตภัณฑ์อื่นๆ ทำให้มีของเหลือทิ้ง จากกระบวนการแปรรูปอันได้แก่ น้ำจากการนึ่งปลา หัว เครื่องใน กระดูก ก้างปลา หัวกุ้ง และเปลือกกุ้ง เป็นต้น เนื่องจากของเหลือทิ้งเหล่านี้มีมูลค่าต่ำ และเมื่อมีการจัดการไม่ดีพอจะก่อให้เกิดปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม เพราะของเหลือทิ้งเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากมีส่วนประกอบของโปรตีนและไขมันเป็นส่วนใหญ่ การแก้ไขปัญหาในส่วนนี้ของโรงงานคือ การจำหน่ายของเหลือทิ้งดังกล่าวในราคาถูกให้แก่โรงงานผลิตอาหารสัตว์ เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ต่อไป ดังนั้นจึงมีผู้ศึกษาเกี่ยวกับการนำของเหลือทิ้งจากกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำมาใช้ประโยชน์ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่า และยังเป็นการใช้ทรัพยากรให้เกิดประโยชน์สูงสุด (Knorr, 1982 ; วิสิฐ, 2532 ; สุทธวัฒน์และไพรัตน์, 2533) ตัวอย่างเช่น การสกัดโปรตีนเหลวเข้มข้น (protein concentrate) จากของเหลือทิ้งจากกุ้งและปลา (Poulter and Disney, 1978) การใช้สารสกัดจากปลาแบบเข้มข้นเป็นสารให้รสชาติปลา (Fish flavor enhancer) การใช้สารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากปลาเป็นอาหารเสริมทดแทนโปรตีนจากธัญพืช ผสมในอาหารทารก ซุป และเครื่องดื่มโปรตีน (Fingerman and Nagabhushanam, 2002)

โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นผลิตผลที่ได้จากการย่อยโปรตีน โดยการตัดสายเพปไทด์ที่มีสายโซ่ยาวให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์สายสั้นๆ การเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสามารถกระทำได้โดยการใช้กรด ด่าง หรือเอนไซม์ (Adler-Nissen, 1986) โดยมีการควบคุมสภาวะเช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ พีเอช เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามที่ต้องการ(Windser and Barlow 1981) ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซท เช่น เป็นแหล่งโปรตีน เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ต่างๆ เป็นต้น

จากการที่เศษเหลือทิ้งส่วนใหญ่ถูกนำไปแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ เป็นการทำให้เกิดรายได้ซึ่งมีมูลค่าน้อย ดังนั้นถ้าเราสามารถนำเศษเหลือทิ้งเหล่านี้มาทำให้เกิดประโยชน์โดยการนำมาย่อยและ

ผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อใช้เป็นสารเพื่อกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทิ้งได้อย่างคุ้มค่า นับว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าเศษเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมอาหารได้อีกวิธี

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญของส่วนที่เหลือทิ้งจากปลาซาร์ดีน
2. เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีนและศึกษาคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้
3. นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลาซาร์ดีนมาใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาองค์ประกอบที่สำคัญของส่วนเหลือทิ้งจากปลาซาร์ดีน แล้วนำส่วนเหลือทิ้งจากปลาซาร์ดีนมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อนำไปใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น

1.4 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

ขั้นตอนการวิจัย	เดือนที่									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
จัดหาวัตถุดิบ	↔									
ศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ที่ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท		↔	↔	↔						
ศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซท					↔	↔				
การผลิตซอสโดยแปรปริมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้							↔			
วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการทดลอง								↔	↔	
จัดทำรายงาน										↔

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นการนำของเหลือทิ้งมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์และเป็นการเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้ง
2. ได้ผลิตภัณฑ์ชนิดใหม่ที่มีความหลากหลายให้กับผู้บริโภค
3. เป็นการเสริมคุณค่าทางโภชนาการ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 2

ทฤษฎีและหลักการ

2.1 โปรตีน (http://www.bioinfo.org.cn)

โปรตีนเป็นสารอาหารที่มีอยู่ทั้งในเนื้อสัตว์ และพืชบางชนิด ดังนี้

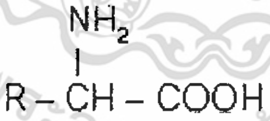
1. โปรตีนที่ได้จากสัตว์ เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูง พบมากในเนื้อสัตว์ทุกชนิด เช่น หมู วัว เป็ด ไก่ ปลา กุ้ง หอย นม ไข่ เป็นต้น

2. โปรตีนที่ได้จากพืช พบมากในถั่วเมล็ดแห้ง เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วดำ ถั่วแดง ถั่วลิสง รวมทั้งผลิตภัณฑ์จากถั่ว เช่น เต้าหู้ เต้าเจี้ยว เต้าฮวย เป็นต้น นอกจากนี้ในข้าวและข้าวโพดก็มีโปรตีนอยู่บ้าง อย่างไรก็ดี โปรตีนที่ได้จากพืชมีคุณภาพต่ำกว่าโปรตีนที่ได้จากสัตว์ ยกเว้น โปรตีนที่ได้จากถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง

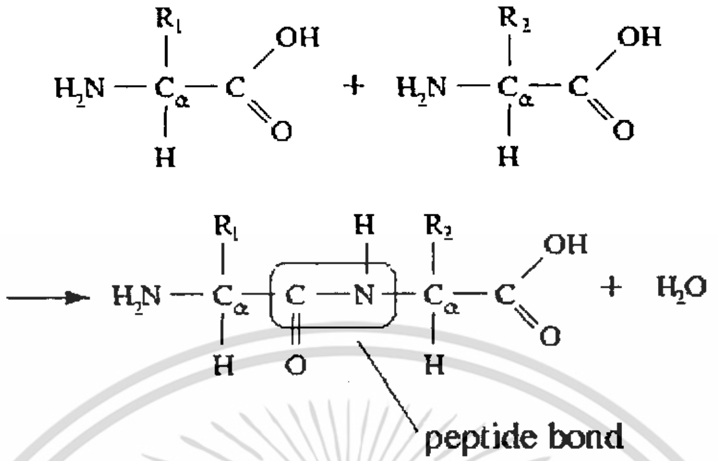
ประโยชน์ต่อร่างกาย คือ

1. สร้างความเจริญเติบโตและซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอให้แก่ร่างกาย
2. ให้พลังงานแก่ร่างกาย
3. สร้างน้ำย่อย ฮอร์โมน น้ำมัน และสารภูมิคุ้มกันโรค
4. ช่วยรักษาสมดุลของน้ำในหลอดเลือด เนื้อเยื่อ และเซลล์
5. ช่วยรักษาสมดุลของกรดและด่างของร่างกาย

โปรตีนเป็นโพลิเมอร์ของกรดอะมิโน เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโน ด้วยพันธะเพปไทด์ได้เป็นโพลีเพปไทด์ โปรตีนเป็นโพลิเพปไทด์ที่มีมวลมากกว่า 5,000 ดาลตัน

กรดอะมิโน มีสูตรทั่วไปเป็น  $\underset{}{R-\overset{\overset{\displaystyle NH_2}{|}}{C}H-COOH}$ ส่วน R เป็นหมู่ฟังก์ชันอื่น ๆ ในสิ่งมีชีวิตจะมีกรดอะมิโนประมาณ 20 ชนิด ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acids) ที่ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ได้ 10 ชนิด คือ อาร์จินีน ฮิสทิดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมทไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนิน ทริปโตเฟน และวาลีน

การเกิดโพลิเมอไรเซชันของกรดอะมิโน มีลักษณะเฉพาะ เช่นปฏิกิริยาไดเมอไรเซชันดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 การเกิดพันธะเพปไทด์ของโปรตีน

ที่มา : http://www.bioinfo.org.cn/lectures/index-90.html

โปรตีนเป็นสารอินทรีย์ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด มีโครงสร้างซับซ้อนและมีมวลโมเลกุลมาก โปรตีนมีหน่วยย่อยคือ กรดอะมิโน เรียงต่อกันด้วยพันธะเพปไทด์ โปรตีนมีหน้าที่สำคัญต่อโครงสร้างและกิจกรรมภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งไวรัสด้วย

โปรตีนหลายชนิดทำหน้าที่เป็นเอนไซม์หรือหน่วยย่อยของเอนไซม์ โปรตีนอื่น ๆ ทำหน้าที่ทางด้านโครงสร้าง เช่น โครงสร้างภายในเซลล์ (cytoskeleton) และกลไกทางกายภาพ และบางชนิดยังมีหน้าที่เป็นภูมิคุ้มกันคอยปกป้องร่างกายจากสิ่งแวดล้อม นอกจากนั้นยังมีหน้าที่เป็นขนส่งสารภายในระบบร่างกาย และเป็นแหล่งสำรองพลังงานยามขาดแคลนอีกด้วย โปรตีนในอาหารนั้นเป็นแหล่งของกรดอะมิโนให้แก่สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนเหล่านั้นได้เอง

โปรตีนเป็นหนึ่งใน มหโมเลกุล (macromolecules) เช่นเดียวกับ โพลีแซคคาไรด์ (คาร์โบไฮเดรต) และกรดนิวคลีอิก (สารพันธุกรรม) ซึ่งเป็นองค์ประกอบพื้นฐานของสิ่งมีชีวิต **โปรตีนถูกค้นพบครั้งแรกโดย en:Jöns Jacob Berzelius ในปี พ.ศ. 2381 (ค.ศ. 1838)**

โปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญหลายอย่าง ยกตัวอย่าง เช่น นำสารเข้าออกเซลล์เป็นแหล่งเก็บพลังงานหรือสาร โมเลกุลขนาดเล็ก เป็นโครงร่างของเซลล์และเนื้อเยื่อ เป็นแอนติบอดีและสารที่ทำให้เลือดแข็งตัว นอกจากนี้ เอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาต่างๆในระบบ

เมตาบอลิซึมก็จัดเป็นโปรตีนอีกด้วย โปรตีนเป็นโมเลกุลที่มีความซับซ้อนชนิดหนึ่ง ประกอบด้วยกรดอะมิโนเป็นหน่วยย่อย

2.2 กรดอะมิโน (amino acid)

โปรตีนทุกชนิดเป็นโพลีเมอร์ประกอบด้วยหน่วยย่อยคือกรดอะมิโนชนิดแอลฟา (α-amino acid) โดยกรดอะมิโนทุกชนิดจะมีแอลฟาคาร์บอน (α-carbon) ตรงกลางที่เชื่อมด้วย

1. หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group)
2. หมู่อะมิโน (amino group)
3. อะตอมไฮโดรเจน (hydrogen atom)
4. หมู่แขนงข้าง (side chain)

2.2.1 การจัดจำแนกชนิดของกรดอะมิโนตามลักษณะของแขนงข้าง

กรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิดจะมีแขนงข้างที่แตกต่างกันทั้งหมดตามคุณสมบัติทางเคมี เช่น ขนาด รูปร่าง คุณสมบัติการละลายน้ำ ธรรมชาติของการมีขั้วหรือไม่มีขั้ว การมีหรือไม่มีหมู่ที่แตกตัวได้ เราสามารถจัดจำแนกกรดอะมิโนได้ 7 ประเภทดังนี้

1. กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นอัลเคน (alkane) หรือ หมู่อะลิฟาติก (aliphatic group)

กรดอะมิโนประเภทนี้ได้แก่ ไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) วาลีน (valine) ลิวซีน (leucine) และไอโซลิวซีน (isoleucine) โดยแขนงข้างประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนและไฮโดรเจนเท่านั้น กรดอะมิโนที่สั้นและง่ายที่สุดคือ ไกลซีนซึ่งแขนงข้างมีเพียงอะตอมของไฮโดรเจนหนึ่งอะตอม (-H) เท่านั้น กรดอะมิโนอะลานีนมีความซับซ้อนเป็นลำดับต่อมาคือ มีแขนงข้างเป็นหมู่เมธิล ($-CH_3$) ส่วนในกรดอะมิโนวาลีน ลิวซีน และไอโซลิวซีนมีแขนงข้างเป็นหมู่ไฮโดรคาร์บอนที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (3-4 คาร์บอนอะตอม) การที่แขนงข้างมีหมู่คาร์บอนจำนวนมากขึ้นทำให้คุณสมบัติในการละลายน้ำของกรดอะมิโนลดลง ตัวอย่างเช่น กรดอะมิโนลิวซีนมีแนวโน้มละลายในตัวทำละลายไฮโดรคาร์บอนได้ดีกว่ากรดอะมิโนไกลซีน เราจะพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยละลายน้ำ เช่น ไอโซลิวซีนภายในโมเลกุลของโปรตีนซึ่งไม่สัมผัสกับน้ำ

2. กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นหมู่อะโรมาติค (aromatic group)

กรดอะมิโนประเภทนี้มีด้วยกัน 3 ชนิด ได้แก่ ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ไทโรซีน (tyrosine) และทริปโทเฟน (tryptophan) ฟีนิลอะลานีนมีแขนงข้างเป็นวงแหวนที่ต่อกับหมู่เมธิลีน ($-CH_2-$) ไทโรซีนมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เพิ่มขึ้นมาที่แขนงข้างของฟีนิลอะลานีน ทำให้ไทโรซีนมีคุณสมบัติไฮโดรฟิลิค (ชอบน้ำ) มากกว่า ทริปโทเฟนมีแขนงข้างเป็นวงแหวน อินโดล (indole ring) ที่ต่อกับหมู่เมธิลีน ภายในวงแหวนจะมีอะตอมของไนโตรเจนเพิ่มจากคาร์บอนและไฮโดรเจน ฟีนิลอะลานีนและทริปโทเฟนมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิค (เกลียดน้ำ) มาก

กรดอะมิโนชนิดอะโรมาติคมีคุณสมบัติที่เด่นมากคือ มีความสามารถในการดูดกลืนแสงในสเปคตรัมบริเวณใกล้รังสีอุลตร้าไวโอเลต โดยไทโรซีนและทริปโทเฟนดูดกลืนแสงได้ดีที่ความยาว

คลื่น 280 นาโนเมตร ส่วนฟีนิลอะลานีนดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร คุณสมบัตินี้ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน โดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ได้

3. กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างประกอบด้วยซัลเฟอร์ (sulfur)

กรดอะมิโนประเภทนี้มีเพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ ซิสเทอีน (cysteine) และเมทไทโอนีน (methionine) ซิสเทอีนมีแขนงข้างประกอบด้วยหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl group) (-SH) และเมทไทโอนีนมีแขนงข้างประกอบด้วยอะตอมของซัลเฟอร์ในพันธะแบบไทโอเอสเทอร์ (thioester) ($S-CH_3$) แขนงข้างทั้งสองมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิค ซิสเทอีนมีบทบาทสำคัญในการกำหนดรูปร่างของโปรตีนจากการเกิดพันธะของไดซัลไฟด์ (-S-S-)

การเกิดพันธะไดซัลไฟด์ทำได้โดยนำซิสเทอีน 2 โมเลกุลทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่า ซิสทีน (cystine) ซึ่งไม่จัดเป็น 1 ใน 20 ชนิดของกรดอะมิโน เนื่องจากไม่ได้ถูกถอดและแปลรหัสมาจากดีเอ็นเอ

4. กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group)

กรดอะมิโนประเภทนี้มี 2 ชนิด ได้แก่ เซอรีน (serine) และ ทรีโอนีน (threonine) ซึ่งแขนงข้างมีหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) อยู่ เซอรีนเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่อะตอมของไฮโดรเจนในหมู่เมธิลของอะลานีน ส่วนทรีโอนีนเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิลแทนที่หมู่เมธิลของวาลีน การมีหมู่ไฮดรอกซิลทำให้กรดอะมิโนมีคุณสมบัติไฮโดรฟิลิคมากขึ้น กรดอะมิโนทรีโอนีนและไอโซลิวซีน ประกอบด้วยอะตอมของคาร์บอนที่ไม่สมมาตร 2 อะตอม ส่วนไกลซีนไม่มีคาร์บอนที่ไม่สมมาตร นอกนั้นเป็นกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยคาร์บอนที่ไม่สมมาตรเพียง 1 อะตอมเท่านั้น

5. กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นเบส

กรดอะมิโนประเภทนี้ได้แก่ ฮีสทีดีน (histidine) ไลซีน (lysine) และอาร์จีนีน (arginine) กรดอะมิโนในกลุ่มนี้มีความเป็นขั้วสูง โดยที่แขนงข้างจะมีหมู่ที่เป็นเบส ใน 3 ตัวนี้ ฮีสทีดีนมีความเป็นเบสน้อยที่สุด โดยที่แขนงข้างจะเป็นวงแหวนอิมิดาโซล (imidazole ring) ฮีสทีดีนอาจอยู่ในรูปที่มีประจุบวก หรือไม่มีประจุก็ได้ ขึ้นกับสภาวะของสิ่งแวดล้อม ความเป็นกรดด่างของสารละลาย โดยปกติจะพบฮีสทีดีนในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์โดยที่แขนงข้างจะสามารถแลกเปลี่ยนโปรตอนได้ กรดอะมิโนอีก 2 ชนิด คือ ไลซีนและอาร์จีนีนมีประจุเป็นบวกที่สภาวะที่เป็นกลาง มีความเป็นเบสที่แรงกว่าฮีสทีดีนและมีขั้วมากกว่า ทำให้พบกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้บนพื้นผิวบริเวณรอบนอกของโปรตีน แขนงข้างของอาร์จีนีนและฮีสทีดีนมีความยาวมากที่สุดในบรรดากรดอะมิโนทั้ง 20 ชนิด

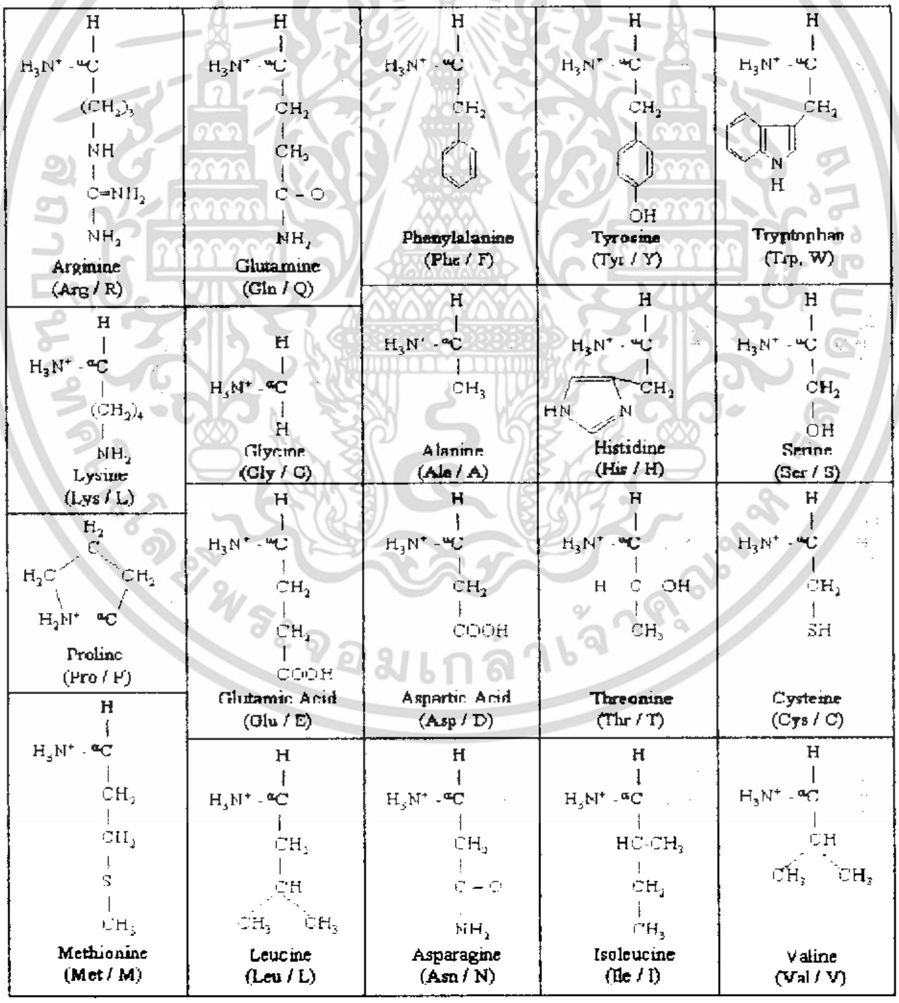
6. กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเป็นกรด

กรดอะมิโนประเภทนี้ได้แก่ กรดแอสปาร์ติค (aspartic acid) และกรดกลูตามิค (glutamic acid) โดยปกติเราจะเรียกกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้ว่า แอสปาร์เตท (aspartate) และ กลูตาเมท

(glutamate) ตามลำดับ เพื่อเน้นว่าแขนงข้างมีประจุเป็นลบเสมอในสภาวะที่เป็นกลาง อนุพันธ์ของแอสปาร์เตทและกลูตาเมทที่ไม่มีประจุ คือแอสปาราจีน (asparagine) และกลูตามีน (glutamine) โดยเกิดจากการแทนที่ของหมู่คาร์บอกซิเลท (carboxylate group) ในแขนงข้างด้วยหมู่เอมีด (amide group)

7. กรดอะมิโนที่มีแขนงข้างเป็นอิมิโน (imino group)

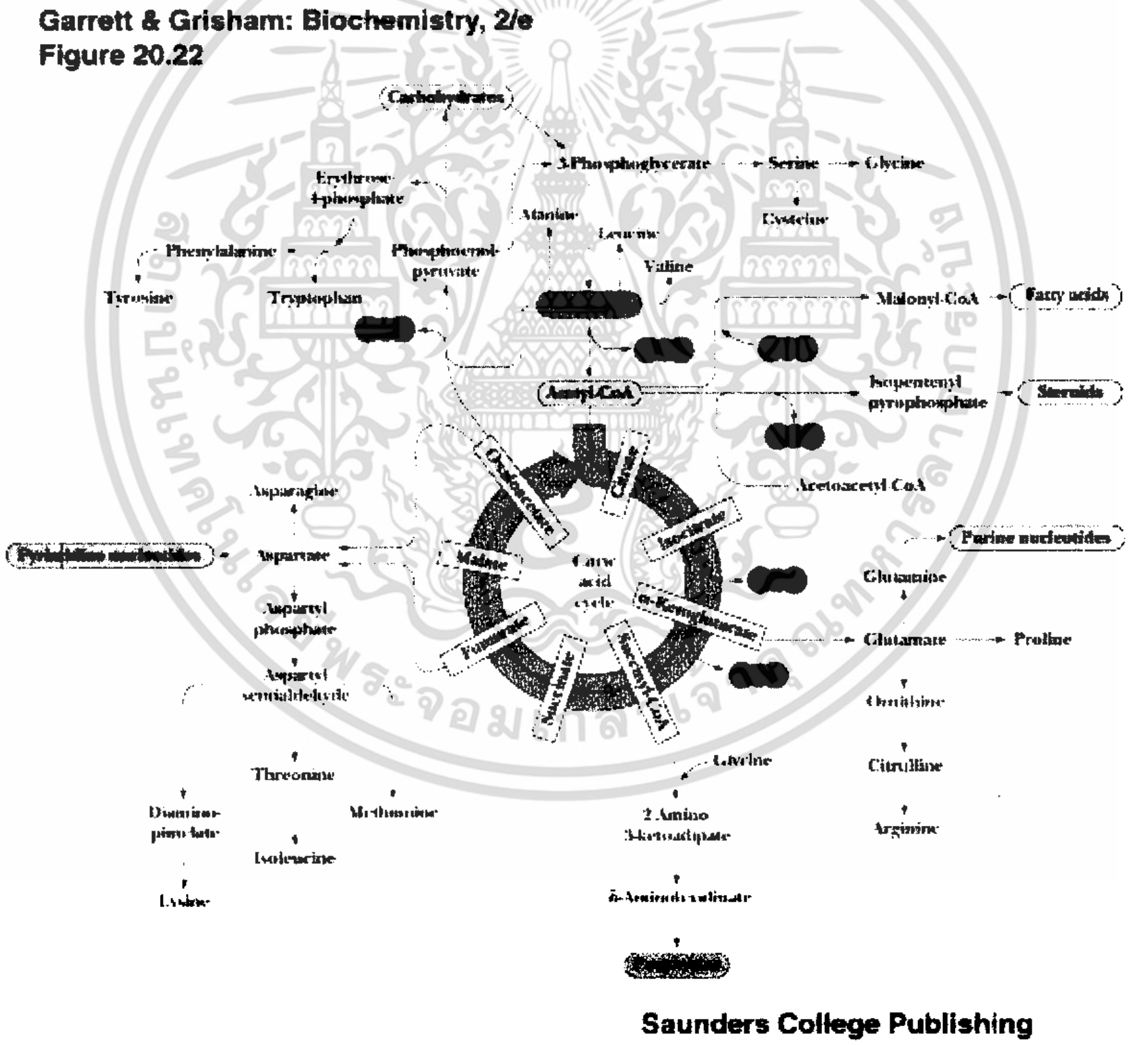
กรดอะมิโนเพียงชนิดเดียวในกลุ่มนี้คือ กรดอะมิโนโพรลีน (proline) ประกอบด้วยแขนงข้างที่เป็นหมู่อะลิฟาติคเหมือนกับข้อที่ 1 แต่ไม่สามารถจัดแบ่งประเภทเหมือนกรดอะมิโนข้างต้น เนื่องจากแขนงข้างซึ่งเป็นไฮโดรคาร์บอนจับทั้งแอลฟาคาร์บอนและอะตอมของไนโตรเจนของหมู่อะมิโน ทำให้เกิดโครงสร้างเป็นวงแหวน (ring structure) โดยปกติจะพบโพรลีนบริเวณสายของโปรตีนบริเวณจุดพับหรือหักงอ โพรลีนประกอบด้วย หมู่อะมิโนชนิดทุติยภูมิมากกว่า ปฐมภูมิ ในบางครั้งเราอาจจะเรียกโพรลีนว่าเป็นกรดอิมิโน (imino acid) ได้


Arginine
(Arg / R)
Glutamine
(Gln / Q)
Phenylalanine
(Phe / F)
Tyrosine
(Tyr / Y)
Tryptophan
(Trp, W)
Lysine
(Lys / L)
Glycine
(Gly / G)
Alanine
(Ala / A)
Histidine
(His / H)
Serine
(Ser / S)
Proline
(Pro / P)
Glutamic Acid
(Glu / E)
Aspartic Acid
(Asp / D)
Threonine
(Thr / T)
Cysteine
(Cys / C)
Methionine
(Met / M)
Leucine
(Leu / L)
Asparagine
(Asn / N)
Isoleucine
(Ile / I)
Valine
(Val / V)

รูปที่ 2.2 โครงสร้างของกรดอะมิโน 20 ชนิด

ที่มา : http://www.biologydaily.com/biology/upload/c/c5/Amino_acids_2.png

กรดอะมิโนที่พบมากในธรรมชาติมีอยู่ 20 ชนิด ได้แก่ glycine, alanine, valine, leucine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine, cysteine, methionine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, aspargine, glutamine, serine, threonine และ proline ส่วนหนึ่งของกรดอะมิโนเหล่านี้ถูกนำไปใช้สังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์ของร่างกาย แต่อีกส่วนหนึ่งจะถูกสลายต่อไปเป็นพลังงานคะตะบอลิซึมของกรดอะมิโน จะได้สารตัวกลางที่สามารถป้อนเข้าสู่ วัฏจักรเครบส์ และวิถีไกลโคไลซิส ดังแสดงในรูปที่ 3 วิถีการสลายกรดอะมิโนให้เป็นสารตัวกลางในวัฏจักรเครบส์หรือวิถีไกลโคไลซิส อาจจะให้ NADH, $FADH_2$ หรือ NADPH บางกรณีต้องใช้ ATP ไปในการสลายตัวกรดอะมิโนนั้น แต่ ATP ส่วนใหญ่เกิดจากการสลายตัวกลางหรือผลที่ได้จากกรดอะมิโนในวัฏจักรเครบส์ให้กลายเป็นคาร์บอนไดออกไซด์



Garrett & Grisham: Biochemistry, 2/e
Figure 20.22

Carbohydrates
3-Phosphoglycerate
Serine
Glycine
Erythrose-4-phosphate
Alanine
Cysteine
Leucine
Phenylalanine
Phosphoenol-pyruvate
Valine
Tyrosine
Tryptophan
Malonyl-CoA
Fatty acids
Acetyl-CoA
Isopentenyl pyrophosphate
Steroids
Oxaloacetate
Citrate
Acetoacetyl CoA
Asparagine
Isocitrate
Purine nucleotides
Pyrimidine nucleotides
Aspartate
Malate
Citric acid cycle
Glutamine
α-Ketoglutarate
Aspartyl phosphate
Fumarate
Glutamate
Proline
Aspartyl semialdehyde
Succinate
Succinyl-CoA
Ornithine
Glycine
Threonine
Citrulline
Diaminopimelate
Methionine
2-Amino-3-ketoadipate
Arginine
Isoleucine
Lysine
δ-Aminolevulinate

Saunders College Publishing

รูปที่ 2.3 การสลายกรดอะมิโนต่างๆให้เป็นตัวกลางในไกลโคไลซิสและวัฏจักรเครบส์

ที่มา : http://www.bmb.psu.edu/courses/bmb211/pratt/krebs2.html

นอกจากจะได้พลังงานแล้ว กรดอะมิโนที่สลายแล้วได้ acetyl Co A อาจจะทำให้เกิด คีโตนบอดี (ketone bodies) ได้ ดังนั้นเรียกกรดอะมิโนเหล่านี้ว่า ketogenic amino acids ส่วนกรดอะมิโนที่ให้ตัวกลางอื่นๆ ได้แก่ pyruvate oxaloacetate α-ketoglutarate succinyl CoA และ fumarate ซึ่งจะนำไปสู่การสังเคราะห์กลูโคสได้นั้น เรียกว่า glucogenic amino acids

กรดอะมิโนอาจจะแบ่งตามผลของคะตะบอลิซึมได้เป็น 5 กลุ่มดังแสดงในรูปที่ 2.3

1. กลุ่มที่ให้ Pyruvate

มีกรดอะมิโนอยู่ในกลุ่มนี้ 5 ตัวได้แก่ alanine เปลี่ยนเป็นไพรูเวทโดย transaminase serine เปลี่ยนเป็น pyruvate โดย dehydratase และ cystine สูญเสีย H_2S หรือ SO_2 กลายเป็น pyruvate glycine จะได้รับคาร์บอนจาก methylene tetrahydrofolate (FH_4) กลายเป็น serine ซึ่งจะสลายให้ pyruvate ส่วน threonine จะถูกสลายโดย aldolase กลายเป็น glycine กับ acetyl CoA

2. กลุ่มที่ให้ Oxaloacetate

ได้แก่ aspartate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น oxaloacetate โดย transaminase และ asparagine จะถูกสลายด้วยน้ำให้เป็น aspartate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น oxaloacetate ต่อไป

3. กลุ่มที่ให้ α-ketoglutarate

α-ketoglutarate จะเป็นผลของปฏิกิริยาการสลาย glutamate ที่เร่งโดยเอนไซม์ glutamate dehydrogenase ซึ่งใช้ NAD^+ แต่ glutamine จะถูกสลายด้วยน้ำเป็น glutamate ส่วน histidine และ proline จะถูกสลายให้เป็น glutamate ก่อน แล้วจึงให้ α-ketoglutarate arginine จะสลายเป็นยูเรียและ ornithine โดยเอนไซม์ arginase ของวัฏจักรยูเรีย ตามด้วยการเปลี่ยน ornithine ให้เป็น glutamate

4. กลุ่มที่ให้ Acetyl CoA

Lysine จะสลายได้ตาม 2 วิถีเป็น glutaryl CoA แล้วเป็น acetoacetyl CoA ซึ่งจะสลายให้ 2 acetyl CoA กรดอะมิโนอีก 4 ตัว จะเข้าวิถีเดียวกัน leucine จะสลายเป็น acetyl CoA กับ acetoacetyl CoA tryptophan จะสลายเป็น alanine กับ glutaryl CoA phenylalanine จะเปลี่ยนเป็น tyrosine ซึ่งจะสลายเป็น glutaryl CoA กับ fumarate

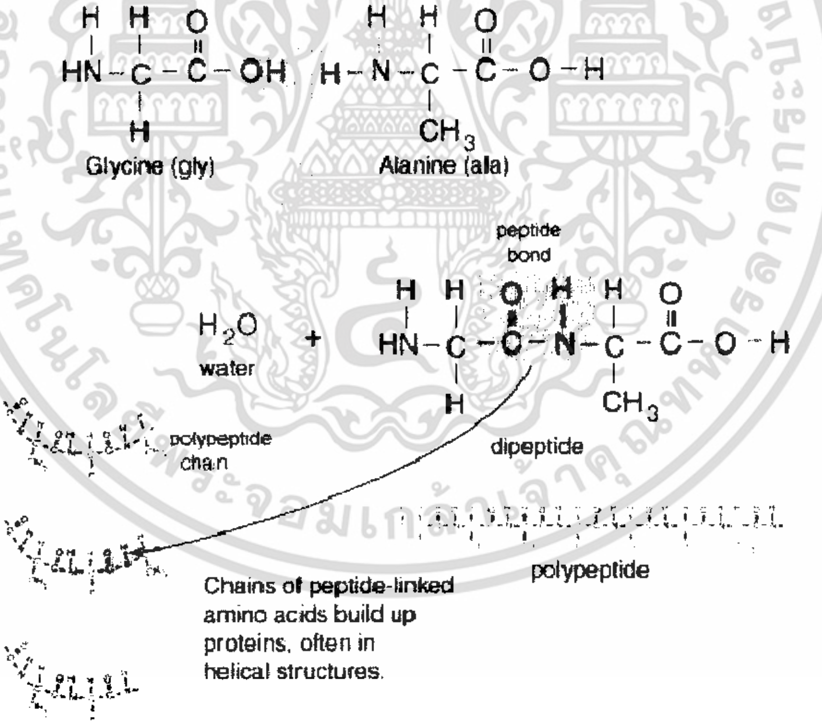
5. กลุ่มที่ให้ Succinyl CoA

Threonine จะสลายให้เป็น 2-ketobutyrate, propionyl CoA, methylmalonyl CoA และ succinyl CoA ตามลำดับ กรดอะมิโนอีก 3 ตัวจะเข้าสู่วิถีนี้ตามจุดต่างๆดังนี้ valine สลายเป็น methylmalonyl CoA isoleucine สลายเป็น propionyl CoA กับ acetyl CoA และ methionine สลายเป็น 2-ketobutyrate และ serine

2.3 เพปไทด์และพันธะเพปไทด์

กรดอะมิโนสามารถเชื่อมกันด้วยพันธะเอมีนระหว่างหมู่อะมิโนและหมู่คาร์บอกซิล โดยเรียกพันธะชนิดนี้ว่าพันธะเพปไทด์ (peptide) และเรียกผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นว่าเพปไทด์ (peptide) ไดเพปไทด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการนำกรดอะมิโน 2 ตัวมาต่อกัน เช่น ไกลซิลอะลานีนเกิดจากไกลซีนต่อกับอะลานีน ปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นการดึงน้ำออก 1 โมเลกุลจากหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนตัวหนึ่งและหมู่อะมิโนของกรดอะมิโนตัวถัดไป

ไตรเพปไทด์ (tripeptide) เกิดจากการต่อกรดอะมิโนอีก 1 ตัวกับไดเพปไทด์ แต่ละครั้งของการเติมกรดอะมิโน 1 ตัวจะสูญเสียน้ำไป 1 โมเลกุลเสมอจากการเกิดพันธะเพปไทด์ เส้นสายของเพปไทด์ที่เกิดจากการต่อของกรดอะมิโนประมาณ 20 ตัวเรียกว่า โอลิโกเพปไทด์ (oligopolypeptide) ที่ปลายข้างหนึ่งจะมีหมู่อะมิโนอิสระอยู่ เรียกปลายด้านนั้นว่า amino terminus หรือ N-terminus ส่วนอีกด้านที่มีหมู่คาร์บอกซิลอิสระอยู่ เรียกว่า ปลาย carboxyl terminus หรือ C-terminus อย่างไรก็ตาม สารต่างๆเหล่านี้ เรียกรวมกันว่า เพปไทด์ ดังรูปที่ 2.4


Glycine (gly)
Alanine (ala)
peptide bond
H2O
water
+
dipeptide
polypeptide chain
polypeptide
Chains of peptide-linked amino acids build up proteins, often in helical structures.

รูปที่ 2.4 การเกิดพันธะเพปไทด์ของโปรตีน

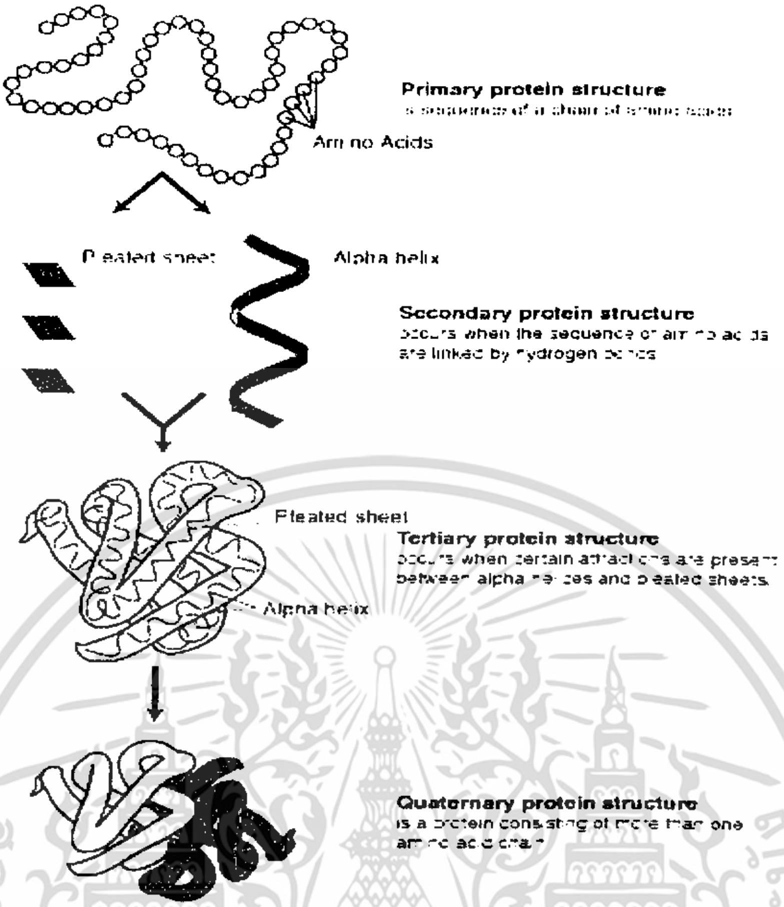
ที่มา : http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/amino.html

โปรตีนเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยสายของโพลีเพปไทด์หนึ่งสายหรือมากกว่านั้น สายของโพลีเพปไทด์ประกอบด้วยกรดอะมิโนอยู่ในช่วง 40 ถึงมากกว่า 4,000 โมเลกุล เนื่องจากกรดอะมิโนมีค่าเฉลี่ยมวลเท่ากับ 110 ดาลตัน ดังนั้นโปรตีนจึงมีมวลโมเลกุลเฉลี่ยระหว่าง 4 ถึง 440 กิโลดาลตัน โปรตีนจัดเป็นศูนย์กลางของกิจกรรมต่างๆทางชีวภาพ โดยอาจทำหน้าที่เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาทางเคมีในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้ โปรตีนอาจทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมปฏิกิริยาผ่านทางเอนไซม์และฮอร์โมนและอาจทำหน้าที่ขนส่งและเป็นแหล่งเก็บสารชีวภาพที่สำคัญต่างๆ ทำให้เกิดการเคลื่อนและการหดตัวของกล้ามเนื้อ

2.4 โครงสร้างของโปรตีน

เราสามารถจัดโครงสร้างของโปรตีนได้ 4 ระดับคือ

1. โครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) เป็นลำดับของกรดอะมิโนในสายโพลีเพปไทด์
2. โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) เป็นการจัดเรียงตัวของสายโพลีเพปไทด์ 1 เส้นโดยไม่คำนึงถึงรูปแบบของแขนงข้าง
3. โครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) เป็นโครงสร้างสามมิติของโพลีเพปไทด์ทั้งหมด
4. โครงสร้างจตุรภูมิ (quaternary structure) เช่นหน่วยย่อย (subunit) ของโปรตีน

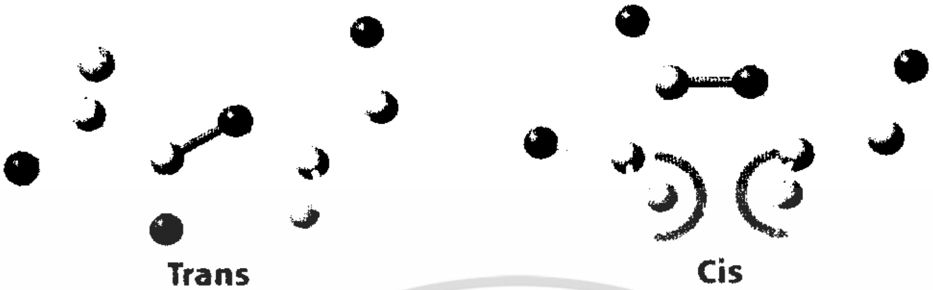

Primary protein structure
is sequence of a chain of amino acids
Amino Acids
Pleated sheet
Alpha helix
Secondary protein structure
occurs when the sequence of amino acids
are linked by hydrogen bonds
Pleated sheet
Tertiary protein structure
occurs when certain attractions are present
between alpha helices and pleated sheets.
Alpha helix
Quaternary protein structure
is a protein consisting of more than one
amino acid chain

รูปที่ 2.5 ลักษณะโครงสร้างของโปรตีน

ที่มา : http://folding.stanford.edu/education/Assets/protein

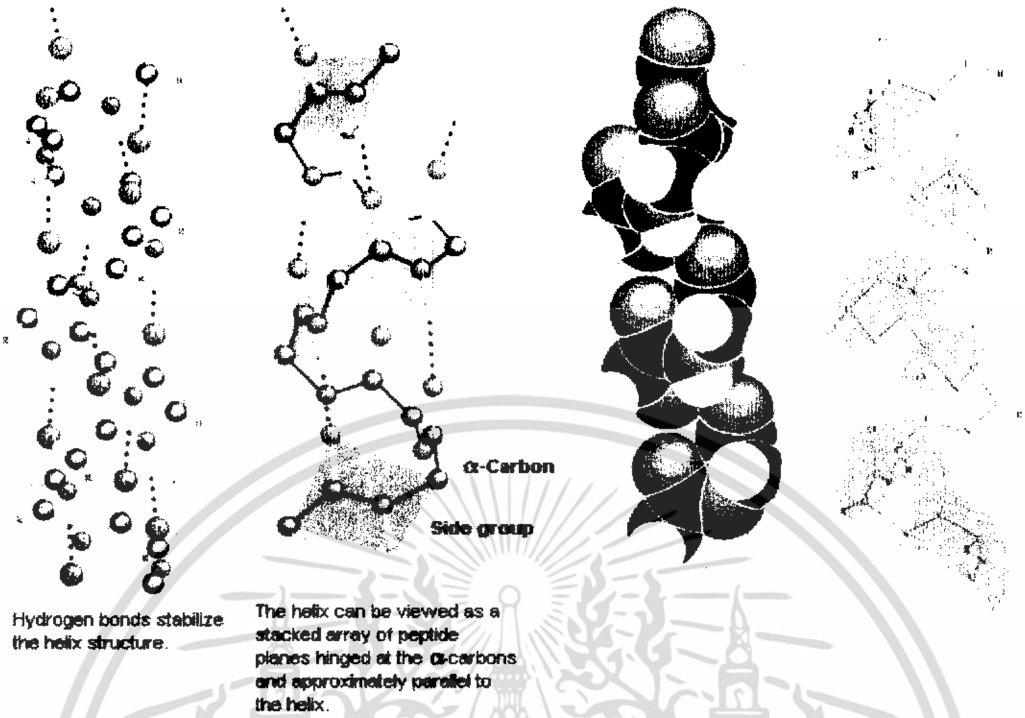
ในระหว่างปี ค.ศ. 1930-1940 Linus Pauling และ Robert Corey วิเคราะห์โครงสร้างของกรดอะมิโนและไดเพปไทด์หลายชนิดด้วยรังสีเอกซ์ พบว่า กลุ่มเพปไทด์มีโครงสร้างที่แน่นอนและพันธะเพปไทด์อยู่ในระนาบ (planar) เนื่องจากผลของปฏิสัมพันธ์ของเรโซแนนซ์ทำให้พันธะเพปไทด์ประมาณร้อยละ 40 อยู่ในรูปของพันธะคู่ (double bond)

โดยส่วนใหญ่แล้ว กลุ่มของเพปไทด์จะแบ่งโครงสร้างเป็น 2 แบบ ตามมุมของการเกิดพันธะนั่นคือ แบบซิส (cis-peptide group) และแบบทรานส์ (trans-peptide group)



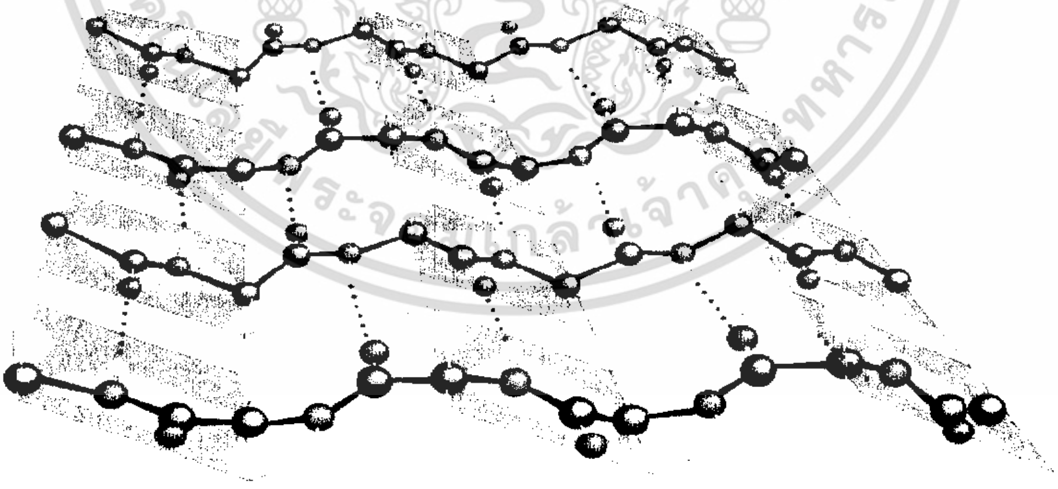
รูปที่ 2.6 ลักษณะโครงสร้างของกลุ่มเพปไทด์
ที่มา : http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch03/Slide35.jpg

โครงสร้างทุติยภูมิแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ แบบเกลียว (α-helix) และแบบพับ (β-pleated sheet) แบบเกลียวจะพบมากกว่าแบบพับ โดยเพปไทด์จะหมุนเวียนขวา ใน 1 รอบประกอบด้วยกรดอะมิโน 3.6 ตัวและมีระยะห่างระหว่างเกลียวเท่ากับ 5.4 อังสตรอม พันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดอะมิโน จะทำหน้าที่ให้เกลียวคงรูปโครงสร้างทุติยภูมิแบบพับจะสามารถพบได้ 2 แบบคือ antiparallel เกิดจากการยึดเกาะของโพลีเพปไทด์ 2 สายที่อยู่ในทิศทางตรงกันข้ามด้วยพันธะไฮโดรเจนและแบบ parallel เกิดจากการยึดเกาะของโพลีเพปไทด์ 2 สายที่อยู่ในทิศทางเดียวกันด้วยพันธะไฮโดรเจน โครงสร้างแบบพับชนิด antiparallel จะมีความเสถียรมากกว่าแบบอื่นๆ


α-Carbon
Side group
Hydrogen bonds stabilize the helix structure.
The helix can be viewed as a stacked array of peptide planes hinged at the α-carbons and approximately parallel to the helix.

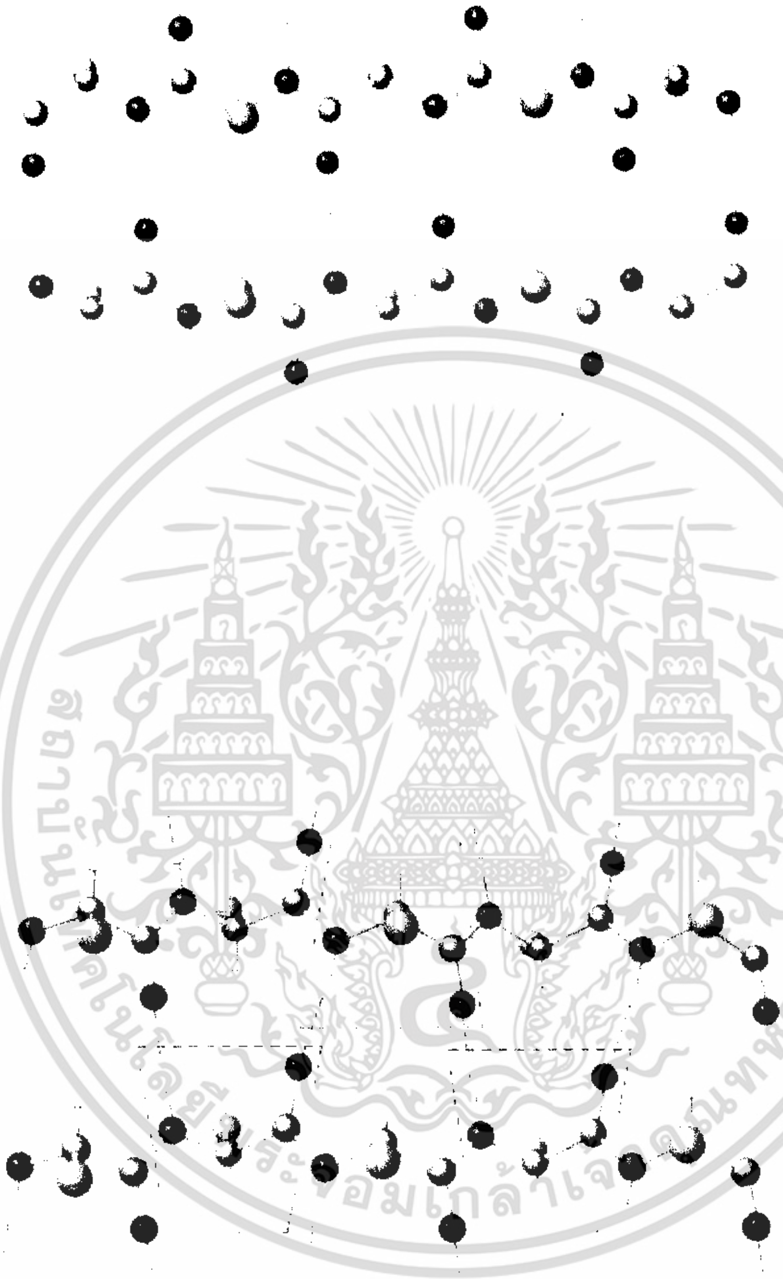
รูปที่ 2.7 โครงสร้างทุติยภูมิแบบเกลียว

ที่มา : http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/ahelixgarrett.gif



รูปที่ 2.8 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพับ

ที่มา : http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/bsheetgarrett.gif



รูปที่ 2.9 โครงสร้างทุติยภูมิแบบพับ anti-parallel และ parallel ตามลำดับ

ที่มา : http://oregonstate.edu/instruction/bb450/lecturenoteskevin/proteinstructureIoutline.html

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5 เปปโตน (Peptone)

เปปโตน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายของสารอาหารประเภทโปรตีน ซึ่งการย่อยจะเกิดขึ้นตามลำดับดังนี้

โปรตีน → โปรตีโอส → สารสกัดโปรตีน → โพลีเพปไทด์ → กรดอะมิโน

ตัวอย่างเช่น การย่อยเนื้อโดยเอนไซม์เปปซิน (pepsin) เอนไซม์เปปซินจะย่อยสารประกอบในเนื้อมีผลทำให้เกิดการผสมผสานระหว่างโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำกับโพลีเพปไทด์(polypeptide) ไดเพปไทด์ (dipeptide) และกรดอะมิโน (amino acid) ที่ละลายน้ำเกิดสารประกอบที่เรียกว่าเปปโตน (peptone) องค์ประกอบทางเคมีของสารที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลาย ซึ่งประกอบอยู่ในรูปเปปโตนยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน และคุณสมบัติของเปปโตนอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความคงที่ของกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะควบคุม หลังจากที่การย่อยสลายถึงจุดที่เหมาะสม ผู้ผลิตจะหยุดกระบวนการย่อยโดยปรับสภาพให้เป็นกลาง (neutralization) และทำให้สารละลายที่ได้แห้ง เปปโตนที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงสีเหลือง อมน้ำตาล ซึ่งสามารถละลายได้ดีในน้ำอุ่นตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้ สารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ทริปโตน (tryptone) ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการใกล้เคียงกันโดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้น (Bender, 1975)

Difco Laboratories กล่าวว่าเปปโตนประกอบด้วยกรดอะมิโน และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ซึ่งเป็นสารที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ทันที เปปโตนจึงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น Nutrient Agar, Nutrient Broth, Bromcresol purpul Broth (พงษ์เทพ, 2540)

ปัจจุบันมีความต้องการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการศึกษา และใช้สำหรับห้องปฏิบัติการตรวจสอบจุลินทรีย์เป็นจำนวนมากปริมาณการใช้เปปโตน ไม่สามารถระบุได้แน่ชัด เนื่องจากเป็นสินค้านำเข้าที่จัดอยู่ในเคมีภัณฑ์เบ็ดเตล็ด ซึ่งรวมอยู่ในรายการของอาหารเพาะเชื้อปรุงแต่งสำหรับจุลินทรีย์ (พิชญา, 2539)

Brody (1965) ได้รวบรวมวิธีการสกัด เปปโตนจากเนื้อปลาแซลมอน ซึ่งการสกัดมี 4 วิธีดังนี้

1. การย่อยสลายโดยเอนไซม์เปปติก (Peptic enzyme hydrolysis)

สารละลายเนื้อปลากับน้ำ ให้ความร้อนครั้งแรก 5-10 นาที อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อทำลาย Vegetative cell แล้วทำให้เย็นที่ 37 องศาเซลเซียส ปรับพีเอชให้เป็น 2.0 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริก แล้วเติม intestinal mucosa ซึ่งมีเอนไซม์เปปติก ที่เก็บไว้ไม่น้อยกว่า 2 สัปดาห์ โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำให้เป็นผง

67278

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การย่อยสลายโดยเอนไซม์ ทริปติก (Tryptic enzyme hydrolysis)

สารละลายเนื้อปลากับน้ำ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เพื่อทำลาย Vegetative cell แล้วทำให้เย็นที่ 37 องศาเซลเซียส แล้วปรับพีเอชเป็น 8.5 จากนั้นเติมลำไส้ (pyloric caece) ที่มีเอนไซม์ ทริปติก แล้วเก็บไว้ประมาณ 1 สัปดาห์ ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส สารละลายที่ได้สามารถเก็บรักษาได้โดยการเติมโทลูอีน

3. การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis)

สารละลายเนื้อปลากับน้ำ เติมกรดไฮโดรคลอริก นำไปย่อยภายใต้ความดัน ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นนำสาละลายที่ได้นำไปกรองแล้วปรับพีเอชให้เป็นกลาง แล้วทำให้เข้มข้นที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งโดยใช้ Partial vacuum

4. การย่อยสลายด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis)

สารละลายเนื้อปลากับน้ำ เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปย่อยภายใต้ความดันที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง สารละลายที่ได้นำไปกรองแล้วปรับพีเอชให้เป็นกลาง แล้วทำให้เข้มข้นที่อุณหภูมิไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส แล้วทำให้แห้งโดยใช้ Partial vacuum

โดยเปปโตนที่ได้จากการสกัดจากทั้ง 4 วิธี มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม โดยกลิ่นและลักษณะปรากฏคล้ายกับ เปปโตนที่ผลิตทางการค้า

ไพรัตน์ (2532) ได้ศึกษาการใช้หัวกุ้งจากโรงงานแปรรูปกุ้ง เพื่อทำการผลิตเปปโตนด้วยกระบวนการย่อยตัวเองและกระบวนการย่อยสลายโดยการเติมเอนไซม์ ซึ่งสภาวะย่อยตัวเองที่เหมาะสม ประกอบด้วยการใช้ ฟอสเฟต-ซิเตรท บัฟเฟอร์ ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับกุ้ง ที่ความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชให้เป็น 7.5 ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 52.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้ผลผลิตของโปรตีนเฉลี่ยเป็นร้อยละ 71 และทำการย่อยหัวกุ้งโดยเอนไซม์เปปซินในอัตราร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก โดยใช้พีเอชเท่ากับ 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่พีเอช เท่ากับ 6.2 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณโปรตีนที่ได้เป็น ร้อยละ 92 และ 82 ตามลำดับ สำหรับผลการตรวจสอบองค์ประกอบทางเคมี และความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า เปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยโดยการเติมเอนไซม์ที่มีคุณภาพใกล้เคียงหรือดีกว่าเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง

Mahadeva et al. (1978) ศึกษาการผลิตเปปโตนจากปลาทรายแดง (*Nemipterus japonicus)* โดยใช้ปลาทั้งตัวบดละเอียด เนื้อปลาบดไม่สกัดน้ำมันและเนื้อปลาบดที่สกัดน้ำมัน ด้วยกระบวนการย่อยสลายโดยเอนไซม์ปาเปน วิธีการ คือ นำตัวอย่างผสมน้ำในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 10 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 1:30 (เอนไซม์ : โปรตีนไนโตรเจน) เปปโตนที่ผลิตได้นำไปทดสอบหาองค์ประกอบทางเคมี คือ ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า และปริมาณไขมัน และความสามารถในการใช้

สารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ คือ ค่าไบโอแมส โดยการวัดค่า optical density ของเซลล์ที่เจริญใน เปปโตน เปรียบเทียบกับ Difco peptone และ catfish peptone พบว่า ปริมาณของเปปโตนที่ผลิตได้มีค่าต่ำกว่า Difco peptone และมีปริมาณไขมันต่ำกว่าทั้ง Difco peptone และ catfish peptone สำหรับความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญและการเพิ่มปริมาณของจุลินทรีย์ พบว่าเปปโตนที่สกัดได้จากเนื้อปลาทรายแดงบดละเอียดสกัดน้ำมัน ให้ผลการเจริญของจุลินทรีย์ดีที่สุดโดยเฉพาะ marine bacteria

Clausen et al. (1985) ศึกษาการเตรียมและการทดสอบที่ได้จากการย่อยสลายตัวเองในสภาพที่เป็นกรดของเครื่องในปลา (acidified and autolyzed fish viscera) ในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้เครื่องในปลาคอด (*Gadus morhua*) นำไปบดปรับพีเอชให้ได้ 2.5 และเก็บที่อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ นำส่วนของเหลวชั้นล่างประกอบด้วยโปรตีน เพปไทด์ และกรดอะมิโนไปกรองแล้วทำให้เข้มข้น โดยใช้ vacuum evaporator วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ น้ำหนักแห้ง ปริมาณเถ้า และกรดอะมิโน ตลอดจนทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของแบคทีเรียเปรียบเทียบกับ Bacto-tryptone (Difco Laboratory) พบว่า FPA (fish viscera protein autolysis) มีกรดอะมิโนทั้งหมด (total amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบเหมือนในปลาคอด และไม่แตกต่างจาก Bacto-tryptone มากนัก ยกเว้น ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) ซีสเตอีน (cysteine) และ ทอรีน (taurine) ซึ่งไม่พบใน Bacto-tryptone แต่พบใน FPA สำหรับการทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับของแบคทีเรียพบว่า ให้ผลการเจริญที่ดีทั้งแบคทีเรียที่แยกจากสภาวะแวดล้อมในทะเลและแบคทีเรียที่แยกจากสภาวะแวดล้อมที่ไม่ใช่ทะเล

Jissim (1988) นำเศษเหลือใช้จากการแปรรูปปลา รวมทั้งหัว กระดูก และครีบมารวมกันแล้วแช่ลงในเอนไซม์ ทริปซิน (trypsin) ที่ความเข้มข้น 0.4 กรัม/เดซิลิตร อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 7.0-8.0 นาน 1 คืน แยกส่วนที่เป็นของเหลวออกนำไปสกัดน้ำมัน จากนั้นจึงเติมถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ปริมาณ 2 กรัม/เดซิลิตร ลงในของเหลวที่ได้ และให้ความร้อนจนถึง 60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อลดกลิ่นแล้วกรองผ่านซีไรท์ (cerite) ของเหลวที่ผ่านการกรองแยกเป็น 2 ส่วน เพื่อไปทำให้แห้งโดยวิธี freeze drying และ oven drying โดยทั่วไปจะได้ผลผลิตประมาณร้อยละ 7-9 (w/w) ของน้ำหนักวัตถุดิบที่ใช้จากนั้นจึงนำสารสกัดจากเศษปลาที่ได้ ไปทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหาร สำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการเตรียมอาหารสูตรต่างๆ 8 สูตร เพื่อเปรียบเทียบกัน ทดสอบเชื้อชนิดต่างๆ พบว่า สารสกัดที่ได้ เมื่อผ่านการทำแห้งทั้ง 2 วิธีจะมีกลิ่นหลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยและสามารถละลายน้ำได้ เมื่อละลายได้สารละลายที่มีสีเหลืองฟาง การทดสอบความสามารถในการใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่าสารละลายที่ได้จากการสกัดเศษสิ่งเหลือใช้จากปลาโดยเอนไซม์สามารถใช้ทดแทน beef extract ได้เป็นอย่างดี จุลินทรีย์ที่ทำการศึกษาสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มี FE (fish extract) ที่ผ่านการทำ

แห้งทั้ง 2 วิธีได้อย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งสูตรอาหารที่มีสารสกัดจากของเหลือใช้จากปลาทั้งสูตรที่เป็นอาหารแข็ง (agar media) และสูตรอาหารที่เป็นของเหลว (broth) ตลอดจนให้ผลการสร้าง Staphylococcal toxin เหมือนกับอาหารที่มี beef extract และ protease peptone ผสมอยู่

Vechit-Lifshitz et al. (1990) ศึกษาการนำเปปโตนจากเศษเหลือของโรงงานแปรรูปปลามาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยนำเปปโตนที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายตัวเองของเครื่องในปลา (Raa and Gilberg, 1976) ผสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อระหว่างสูตรอาหารที่ใช้ Bacto-peptone ที่มีจำหน่ายในท้องตลาด และ fish peptone ที่เตรียมได้จากห้องทดลอง ทดสอบกับเชื้อ 9 ชนิด คือ *Streptomyces tendae, Gibberella fujikuroi, Bacillus sphaericus, B.thuringiensis, E.coli, Salmonella typhi, Staphylococcus aureus, Serratai marcescens* และ *Proteus vulgaris* พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี fish peptone เป็นส่วนผสมอยู่สามารถทำให้เชื้อเจริญได้ดี มีขนาดของโคโลนีใหญ่กว่าเชื้อบนอาหารที่มี Bacto-peptone นอกจากนี้ อัตราการเจริญของเชื้อในระยะ exponential phase (ประมาณ 3-8 ชั่วโมง) ในอาหารที่มี fish peptone มีมากกว่าถึง 55 เท่า และ อัตราการเจริญโดยรวมมีมากกว่าถึง 3.2 เท่า นั่นคือ อาหารที่มี fish peptone นอกจากจะเพิ่มอัตราการเจริญแล้ว ยังเพิ่มปริมาณเซลล์ได้มากกว่าอาหารที่มี Bacto-peptone เป็นส่วนผสมอีกด้วย

2.6 โปรตีนไฮโดรไลเซท (Protein Hydrolysates)

โปรตีนไฮโดรไลเซท เริ่มทำเป็นการค้าในปี 1990 ที่ประเทศจีนและญี่ปุ่น วัตถุดิบที่ใช้ผลิตได้แก่ กลูเตนข้าวสาลี เคซีน แป้ง ปลา เจลาติน ยีสต์ และกลูเตนข้าวโพด เป็นต้น เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร กลิ่นรสที่ได้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้น

2.6.1 โปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา (Fish Protein Hydrolysate)

เป็นโปรตีนปลาที่ถูกย่อยจนได้โพลีเพปไทด์ เปปโตน กรดอะมิโนอิสระ กรรมวิธีการผลิตขั้นแรก บดปลากับน้ำย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส กรดหรือด่าง หลังการย่อยแล้ว นำไปให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ปรับพีเอช ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ กรดไฮโดรคลอริก นำไปทำให้เข้มข้นและทำแห้ง (Ockerman, 1992) โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลาไขมันน้อย มีองค์ประกอบคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้งดังนี้ โปรตีนร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้า ร้อยละ 6-7 (Hall and Ahmad, 1992)

ปัจจุบันมีการนำโปรติโอไลติกเอนไซม์ (proteolytic enzyme) มาใช้ในการย่อยโปรตีน ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์จากพืช สัตว์ หรือจุลินทรีย์ ได้แก่เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์โบรมิเลน จากพืช เอนไซม์ทริปซินเอนไซม์เปปซิน จากสัตว์ เอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และเอนไซม์จากเชื้อรา *Aspergillus oryzae* เป็นต้น เนื่องจากการผลิตเอนไซม์บริสุทธิ์ทางอุตสาหกรรม

มากขึ้น การใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์โปรตีนเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดจะให้ปริมาณเพปไทด์สูง เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น พีเอช ความคงทนต่อความร้อน มีความจำเพาะต่อตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งจึงสามารถเลือกใช้ชนิดเอนไซม์ได้ตามความเหมาะสม ข้อเสียของการใช้เอนไซม์ในการไฮโดรไลซ์โปรตีน คือ เอนไซม์มีราคาแพง และอาจมีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับ (Brody, 1965 ; Light and Smith, 1963 ; Peterson, 1974)

ตัวอย่างเช่น การย่อยเนื้อโดยเอนไซม์เปปซิน (pepsin) เอนไซม์เปปซินจะย่อยสารประกอบในเนื้อมีผลทำให้เกิดการผสมผสานระหว่างโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำกับโพลีเพปไทด์ (polypeptide) ไดเพปไทด์ (dipeptide) และกรดอะมิโน (amino acid) ที่ละลายน้ำเกิดสารประกอบที่เรียกว่าสารสกัดโปรตีน (peptone) องค์ประกอบทางเคมีของสารที่ได้จากปฏิกิริยาการย่อยสลายซึ่งประกอบอยู่ในรูปสารสกัดโปรตีนยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน และคุณสมบัติของสารสกัดโปรตีนอาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความคงที่ของกระบวนการย่อยสลายภายใต้สภาวะควบคุมหลังจากที่การย่อยสลายถึงจุดที่เหมาะสมผู้ผลิตจะหยุดกระบวนการย่อยโดยปรับสภาพให้เป็นกลาง (neutralization) และทำให้สารละลายที่ได้แห้ง สารสกัดโปรตีนที่ได้จะมีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอมน้ำตาล ซึ่งสามารถละลายได้ดีในน้ำอุ่นตามความเข้มข้นที่ต้องการใช้ สารประกอบที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน คือ ทริปโตน (tryptone) ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการใกล้เคียงกันโดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้น (Bender, 1975)

ได้มีการศึกษาการผลิตซอสปรุงรสกุ้งจากเศษเหลือทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมการผลิตกุ้งเยือกแข็ง โดยนำเศษเหลือทิ้งได้แก่ น้ำต้มกุ้ง มาย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 90 นาที พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จนได้เป็นน้ำต้มกุ้งสกัด จากนั้นนำน้ำต้มกุ้งสกัดที่ได้มาผลิตเป็นซอสกุ้ง ผลิตภัณฑ์ซอสกุ้งผลิตได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบทางด้านคุณภาพกับซอสหอยนางรมที่จำหน่ายตามท้องตลาดพบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นหากมีการนำไปผลิตเป็นอุตสาหกรรมก็น่าจะสามารถเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่จะทำให้เพิ่มความหลากหลายให้กับผู้บริโภคอีกประการหนึ่งด้วย (วันชัย, 2545)

2.6.2 โปรตีนปลาเข้มข้น (Fish Protein Concentrate)

เป็นโปรตีนที่ได้จากเนื้อหรือเศษปลา กรรมวิธีการผลิตเริ่มจากนำส่วนของเนื้อหรือเศษปลามาล้างด้วยน้ำเพื่อแยกส่วนของสี เลือด ไขมัน เอนไซม์ และสารให้กลิ่นรสออกไป จากนั้นนำมาสกัดเอาไขมัน สารให้กลิ่นรสที่เหลือออกไปโดยใช้ตัวทำละลาย เช่น เอทานอล ไอโซโปรปานอล หลังจากกำจัดตัวทำละลายออกไปแล้ว นำไปทำแห้ง บด โปรตีนปลาเข้มข้นที่ได้ควรมีความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 2° 4 (Rutman, 1974) โปรตีนปลาเข้มข้นมีหลายชนิด เช่น ชนิดเอ ไม่มีกลิ่นรส มีไขมัน ไม่เกินกว่าร้อยละ 0.75 ชนิดบี เป็นผงไม่กำจัดกลิ่น มีไขมันไม่เกินกว่าร้อยละ 3 และชนิดซี เป็นปลาป่นทั่วไปในสภาพที่ถูกอนามัย มีการนำโปรตีนปลาเข้มข้นชนิดเอและบีไปใช้เป็นอาหาร

หลายชนิด เช่น พาสต้า ขนมปัง ซุป เป็นต้น แต่ไม่เติมในระดับสูงมากนักเพราะมีคุณสมบัติบางอย่างยังไม่ดี เช่น การละลาย การพองตัว (Hall and Ahmad 1992) ได้มีการศึกษาเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติทางหน้าที่ของโปรตีนโดย ได้ศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอสหลายชนิด มาทำการย่อยเนื้อปลา red hake เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติการละลายพบว่า เมื่อใช้เอนไซม์โปรเนส (pronase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ได้จาก *Streptomyces griseus* มาย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1 (โดยน้ำหนักเนื้อปลา) ที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 8.5 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จะให้โปรตีนปลาเข้มข้นที่มีการละลาย ได้สูงขึ้นถึงร้อยละ 94 (Tannenbaum et al. 1970)

2.6.3 วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งโปรตีนที่ย่อยสลายแล้วจะประกอบด้วยกรดอะมิโน เพปไทด์สายสั้นๆรวมทั้งโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลง การผลิตวิธีการผลิตโดยทั่วไปมี 3 วิธี ได้แก่

2.6.3.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acid Hydrolysis)

ปัจจุบันมีการใช้กรดไฮโดรคลอริกแทนกรดซัลฟูริก เพราะมีความสามารถในการทำให้พันธะเพปไทด์ แตกออกได้มากกว่ากรดซัลฟูริก ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกันในการย่อยจะใช้กรดไฮโดร คลอริกร่วมกับความร้อน แต่อาจเกิดปัญหาคือ จะเกิดตะกอนดำ (Black humin) ในระหว่างการย่อย อันเป็นผลมาจากการรวมตัวของทริปโตเฟน (tryptophan) กับคาร์โบไฮเดรตที่มีในตัวอย่าง และอีกปัญหา คือ กรดอาจมีผลต่อการทำลายกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ ซีสเตอีน (cystein) และ ทริปโตเฟน (tryptophan) โดยการทำลายเกิดมากหรือน้อยเพียงใด ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของโปรตีน อุณหภูมิ ระยะเวลาการย่อย และความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการย่อย (วรพงษ์, 2538)

2.6.3.2 การย่อยด้วยด่าง (Alkaline hydrolysis)

ด่างที่ใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ แบเรียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับการให้ความร้อน การใช้ด่างย่อยนี้ไม่ค่อยนิยม เนื่องจากด่างจะไปทำลายกรดอะมิโนหลายชนิด ได้แก่ อาร์จินีน ซีรีน ทรีโอนีน ซีสตีน และ ซีสเตอีน (Bailey, 1967)

การย่อยสลายโปรตีนโดยใช้กรดหรือด่างมีข้อเสียหลายประการ คือ

1. จะต้องทำภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรง ใช้ความเข้มข้นของกรดหรือด่างสูงภายใต้อุณหภูมิสูงมาก และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน
2. ก่อให้เกิดปัญหาเรื่องการกัดกร่อนอุปกรณ์เครื่องมือ เนื่องจากกรดหรือด่าง
3. การย่อยสลายโปรตีนด้วยกรดหรือด่าง จะมีผลทำให้กรดอะมิโนบางชนิด เช่น ทริปโทเฟน (tryptophan) ซีสทีน (cystiene) ซีรีน (serine) เป็นต้น ถูกทำลายได้

4. กรดอะมิโนบางชนิดอาจเกิดปฏิกิริยา racemization ซึ่งเป็นการเปลี่ยนจาก L-form เป็น D-form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Olcott and Fraenkel 1974)

5. การเกิดตะกอนสีดำ (Back humin) ในระหว่างกระบวนการย่อย เกิดจากการรวมตัวของกรดอะมิโนทริปโตเฟน (tryptophan) กับคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในวัตถุดิบ แต่สามารถกำจัดคาร์โบไฮเดรตได้โดยใช้กรดที่มีความเข้มข้น และปริมาณมากขึ้น

6. ทำลายกรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ ทริปโตเฟน (tryptophan) และซีสเตอีน (cysteine) การทำลายจะมากหรือน้อยเท่าใดขึ้นอยู่กับปัจจัยต่อไปนี้ คือ องค์ประกอบของโปรตีนอุณหภูมิ ระยะเวลาการย่อย และความเข้มข้นของโปรตีนในการไฮโดรไลซ์

2.6.3.3 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Enzyme hydrolysis)

การย่อยโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ ควรคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย ถ้าขนาดโมเลกุลของโปรตีนมีขนาดใหญ่ อาจได้โพลีเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ แต่จะได้กรดอะมิโนที่ต้องการปริมาณน้อย หรือใช้เอนไซม์ที่ไม่ตัดพันธะของกรดอะมิโน จะทำให้ได้ปริมาณกรดอะมิโนที่ต้องการน้อย (Light and Smith, 1963)

ปัจจัยที่มีผลต่อการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์ (Mohr,1988)

1. ชนิดและขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นสารตั้งต้น เช่น ขนาดของโมเลกุล มีขนาดใหญ่มาก และเอนไซม์ไม่ใช่เอนไซม์ที่ตัดพันธะของกรดอะมิโน โอกาสที่จะได้กรดอะมิโนก็น้อยกว่าการย่อยโปรตีนที่มีโมเลกุลเล็ก

2. พันธะที่ถูกย่อย เช่น พันธะที่ถูกย่อยอยู่ในรูปของโมเลกุลขนาดใหญ่ ผลของกระบวนการย่อยอาจทำให้ได้โพลีเพปไทด์หรือโปรตีนที่ยังคงมีขนาดใหญ่ แต่จะได้กรดอะมิโนที่ต้องการในปริมาณน้อย ค่าการไฮโดรไลซ์จะต่ำแต่ถ้าเอนไซม์ที่ใช้สามารถย่อยทีละหน่วยจนได้กรดอะมิโน หรือตัดเพปไทด์สายสั้น ๆ ได้ในระยะเวลาเท่า ๆ กัน ก็จะได้ค่าไฮโดรไลซ์และกรดอะมิโนมากกว่า แต่จะเหลือโปรตีนที่เป็นโมเลกุลใหญ่น้อยลง

2.6.3.4 การเกิดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซท

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์มักก่อให้เกิดปัญหาในเรื่องรสขม เป็นที่สังเกตว่าความขมมักเกิดกับอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง รสขมนี้เกิดจากเพปไทด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลายด้วย proteolytic enzyme เพปไทด์มีหลายชนิดแต่มีบางชนิดเท่านั้นที่ให้รสขม กรดอะมิโนเดี่ยวๆส่วนใหญ่จะมีรสหวาน ขม เค็ม เปรี้ยว หรือมีรสเหมือนผงชูรส (Kirimura et al. 1969) แตกต่างไปตามชนิดของกรดอะมิโน กรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้นเนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ มักจะมีความขมมากกว่ากรดอะมิโนที่มีอยู่ตามธรรมชาติ นอกจากนี้เพปไทด์ที่มีขั้วซึ่งมี side chain ที่มีสมบัติเป็น hydrophobic เป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูงมักจะมีรสขม (Metoba and Hata, 1972)

มีสารประกอบหลายชนิดที่ให้รสขม โดยปกติระดับของความขมมักจะมีน้อยกว่าความหวาน เปรี้ยว และเค็ม เป็นเรื่องยากที่จะอธิบายถึงความสัมพันธ์ของรสชาติเหล่านี้กับโครงสร้างของมัน อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ของโครงสร้างกรดอะมิโนกับความขมเกี่ยวข้องกับ L-amino acid หลายชนิดที่มีโมเลกุลของ side chain เป็น hydrophobic group ในขณะ D-amino acid ที่มี side chain เป็น hydrophobic group เช่นเดียวกันกลับมีรสหวาน (Kier and Pharm, 1972)

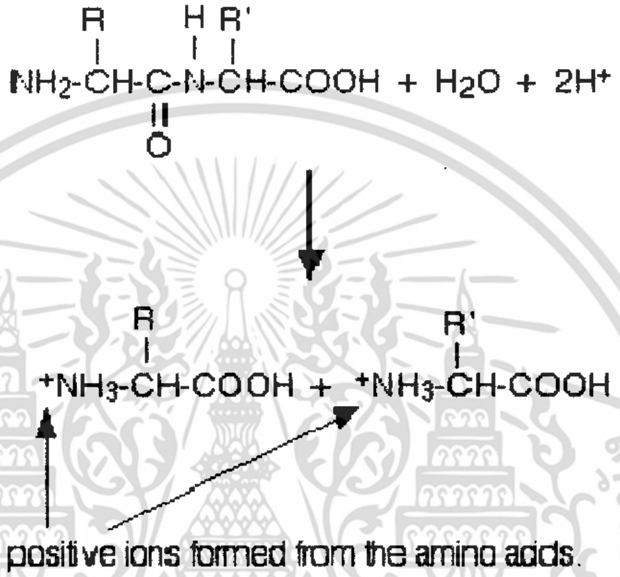
ตารางที่ 2.1 แสดงรสชาติของ L-amino acid และ D-amino acid

	Taste (times sucrose)	
Amino acid	**L-Isomer**	**D-Isomer**
Tryptophan	Bitter	Sweet
Phynylalanine	Bitter	Sweet
Histidine	Bitter	Sweet
Tyrosine	Bitter	Sweet
Leucine	Bitter	Sweet
Alanine	Sweet	Bitter or Sweet
Glycine	Sweet	Sweet
Arginine	Flat or Bitter	Sligthly sweet
Aspatic acid	Flat	Flat
Isolucine	Flat or Bitter	Flat or Bitter
Lysine	Flat or Bitter	Flat or Bitter
Proline	Flat	Flat
Serine	Flat or Bitter	Flat or Bitter
Threonine	Flat or Bitter	Flat or Bitter
Valine	Flat or Bitter	Flat or Bitter
Cysteine	Sulfurous	Sulfurous
Glutamic acid	Unique	-
Methionine	Sulfurous or bitter	Sulfurous or sweet

ที่มา : Kier and Pharm (1972)

2.6.3.5 เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme)

โปรติโอไลติกเอนไซม์เป็นเอนไซม์ที่สำคัญชนิดหนึ่งในระบบการย่อยอาหารสู่ร่างกาย เช่นเอนไซม์เพปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน โดยโปรติโอไลติกเอนไซม์จะทำการย่อยพันธะเพปไทด์ของโปรตีน ทำให้ได้เพปไทด์สายสั้นๆ และกรดอะมิโน โปรติโอไลติก เอนไซม์มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปทิเดส โปรติเอส โปรติเนส เพปไทด์ไฮโรเลส มีลักษณะปฏิกิริยา คือ สลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ


R
H R'
NH2-CH-C-N-CH-COOH + H2O + 2H+
O
R
R'
+NH3-CH-COOH + +NH3-CH-COOH
Notice the positive ions formed from the amino acids.

รูปที่ 2.10 ลักษณะปฏิกิริยาการสลายพันธะเพปไทด์ด้วยน้ำ

ที่มา : http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/hydrolprotein

แหล่งสำคัญของโปรติโอไลติกเอนไซม์ พบในร่างกายมนุษย์หรืออาจได้จากพืช สัตว์ เชื้อราและแบคทีเรีย (Bailey, 1967) ปัจจุบันโปรติโอไลติกเอนไซม์ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ได้รับการยอมรับมาก เพราะมีต้นทุนในการผลิตต่ำ โดยแหล่งของโปรติโอไลติกเอนไซม์ที่ใช้มากในทางอุตสาหกรรมได้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2.2 แหล่งของโปรติโอไลติกเอนไซม์ที่ใช้มากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม

การนำไปใช้ประโยชน์	แหล่งของเอนไซม์
Oriental fermentation	*Aspergillus oryzae*
	Aspergillus falvus
Bread making	*Aspergillus oryzae*
Cheese coagulation	*Mucor miechei*
	Mucor pusillus
Cheese ripening	*Penicillium roqueforti*
Meat tenderization	*Penicillium caserilum*
	Stomach of ruminant
	Bacillus substilis
Solubilization of fish protein	*Aspergillus oryzae*
	Papaya, pineapple and figs
Protein hydrolysate (flavor)	*Bacillus subsitilis*
	Papaya
Plasteins	*Bacillus subsitilis*
	Papaya
Detergent and cleaning	*Bovine and porcine stomach*
	Papaya
	Bacillus liquidformis
	Bacillus substilis
	Steptomyces griscus

ที่มา : Loffler (1986)

2.6.3.6 การจำแนกชนิดโปรติโอไลติกเอนไซม์

การจำแนกชนิดของโปรติโอไลติกเอนไซม์พบโดยทั่วไป คือ การจำแนกโดยหลักการในการทำปฏิกิริยา (Hartley, 1960) และกลไกการทำงาน (ปราณี, 2535) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภทคือ

1. ซีรีนโปรติเอส (Serine protease)

เอนไซม์ในกลุ่มนี้ทั้งหมดเป็นพวก endopeptidase เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในพีเอชที่เป็นด่าง (ยกเว้นโปรติเอสบางชนิดที่ผลิตโดย *Streptomyces* sp. เอนไซม์เหล่านี้มีสมบัติเหมือนกัน คือ ถูกยับยั้งโดย DPF (di-isopropyl-phosphorofluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริล (seryl residue) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กล่างอีกนัยหนึ่งคือมีอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่งเอนไซม์ ที่มีหมู่เซริลอยู่ที่บริเวณที่ไม่ใช่โปรติเอส ก็มีเช่น phosphoglucomutase, alkaliphosphatase นอกจากนี้สมบัติอีกอย่างหนึ่งคือมีหมู่ imidazole อยู่บริเวณเร่ง (ปราณี, 2535)

2. ซีสตีนโปรติเอส (Cysteine protease)

จะคล้ายกับซีรีนโปรติเอส คือ จัดเป็นพวก endopeptidase แต่มีหมู่ SH แทนหมู่ OH ในบริเวณเร่ง เอนไซม์เหล่านี้จะไวต่อออกซิเจนพบทั่วไปในพืช แต่ก็สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ กิจกรรมเอนไซม์พบสูงสุดช่วงพีเอชเป็นกลางตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ปาเปนซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเพปไทค์สายเดี่ยวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 กรดอะมิโน และมีมวลโมเลกุล 23900 ดาลตัน ที่บริเวณเร่งมีอนุมูล cystine, histidine หรือ aspartic acid

3. เมทัลโลโปรติเอส (Metalloprotease)

หมายถึง โปรติเอสที่มีอิออนของโลหะรวมในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อย กล่าวคือ อยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์ เช่น สังกะสี เอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนมากจัดเป็นพวก Exopeptidase มี กิจกรรมที่เหมาะสมในช่วงพีเอช ที่เป็นกลาง ความคงทนเพิ่มขึ้นเมื่อมีแคลเซียมอิออน ในอีกทางหนึ่งจะเป็น chelating agents อย่างแรง จะไปขัดขวางเอนไซม์ โดยการเคลื่อนย้ายอะตอมของสังกะสี (ปราณี, 2535)

4. แอสปาร์ติกโปรติเอส (Aspartic protease)

มีหมู่คาร์บอกซิลจากกรดแอสปาร์ติกในบริเวณเร่งเอนไซม์นี้พบโดยทั่วไป และมีการทำปฏิกิริยาย่อยสูงสุดในช่วงพีเอชที่เป็นกรด ซึ่งตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เรนนิน เป็นต้น (ปราณี, 2535)

2.6.3.7 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์

ในปัจจุบันใช้โปรติโอไลติกเอนไซม์ (Proteolytic Enzyme) จากพืช เช่น ปาเปน โบรมิเลน จากสัตว์ เช่น เปปซิน และจากจุลินทรีย์ เช่นเอนไซม์จากแบคทีเรีย *Bacillus substilis* (Mohr, 1988) โดยกำหนดสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนจะดีกว่าการใช้กรดและด่าง เพราะ เอนไซม์จะเข้าทำปฏิกิริยาบริเวณพันธะเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแต่ละชนิดจับกันโดยไม่ทำลายกรดอะมิโน แต่ข้อเสียของวิธีนี้ คือ เอนไซม์บริสุทธิ์มีราคาสูง (Light and Smith 1963)

เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในโปรตีน แบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ๆ

1. เอ็กโซเปปทิเดส (Exopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในโปรตีนทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิลเท่านั้น ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส คาร์บอกซิลเปปทิเดส ไดเปปทิเดส และฟลาโวไซม์ เป็นต้น

2. เอ็นโดเปปทิเดส (Endopeptidases) เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่ง ไม่เฉพาะปลายด้านทั้งสองด้านเท่านั้น ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ ได้แก่

-โปรติเอสในระบบทางเดินอาหาร (gastrointestinal proteases) เช่น เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin)

- โปรติเอสในจากพืช เช่น ปาเปน *(papain)* โบรมิเลน *(bromilain)* และไฟซิน *(ficin)*

- โปรติเอส ภายในเซลสัตว์ เช่น คาเธปซิน (cathepsins)

- โปรติเอสจากแบคทีเรียและราบางชนิด เช่น ซับทิลิซิน (subtilisins) นิวทรัลโปรติเอส (neutral proteases) แอลคาไลโปรติเอส (alkaline protiases) และอัลคาเลส (alkalases)

เนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส มีข้อได้เปรียบกว่าการใช้กรดหรือด่าง ดังกล่าวมาแล้ว ทำให้มีงานวิจัยที่ทดลองผลิต โปรตีนไฮโดรไลเซทจากแหล่งโปรตีนต่างๆโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส ดังนี้

Adler-Nissen (1997) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ alcalase พบว่าอัตราการย่อยสลายสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C และ pH 8.0

Chhuy and Day (1978) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อไก่โดยใช้เนื้อไก่บดละเอียดผสมน้ำ จากนั้นเติมเอนไซม์โปรติเอสและควบคุมอุณหภูมิในการเกิดปฏิกิริยาที่ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 5 เป็นเวลา 120 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยปรับ พีเอช ให้เป็น 7 นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ผสมกับ cysteine hydrochloride thiamine และน้ำ ในอัตราส่วน cysteine hydrochloride : น้ำ : โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ : thiamine เท่ากับ 44 : 600 : 70 : 22 แล้วนำไป refluxเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อพัฒนาให้เกิดสารประกอบที่ให้กลิ่นรสจากปฏิกิริยาเคมี ผลิตภัณฑ์ที่ได้เมื่อทำแห้งแบบพ่นฝอย (spray dry) แล้วนำมาทดลองใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสไก่ใน chicken noodle soup พบว่าเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

Ishida et al. (1979) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกระดูกไก่เพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส โดยวิธีการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ พบว่าส่วนของโปรตีนจากกระดูกไก่ที่เป็นซาโคพลาสมิกโปรตีน (ร้อยละ 26 เของโปรตีนทั้งหมด) ถูกย่อยสลายด้วยเอ็นโดเปปทิเดสได้โดยง่าย และไฮโดรไลเซทที่ได้ไม่มีรสขม ในขณะที่ไฮโดรไลเซท ที่ได้จากไมโอไฟบริลโปรตีน

(ร้อยละ 10) มีรสขมมากที่สุด และส่วนของสโตรมาโปรตีน (ร้อยละ 56 ของโปรตีนทั้งหมด) จะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ดังกล่าวได้ไม่ดีนัก ทำให้กลิ่นของไฮโดรไลเซทที่ได้ค่อนข้างอ่อน แม้ว่าอัตราส่วนการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นโดยการให้ความร้อนที่ 95 องศาเซลเซียส ก่อนก็ตาม

การให้ความร้อนโดยการต้มกระดูกไก่ ก่อนการย่อยสลายด้วยการใช้เอ็นไซม์เอนโดเปปติเดสและเอ็กโซเปปติเดสร่วมกัน จะทำให้ได้ผลผลิตของ (yield) สารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์สูง ส่วนประกอบที่สำคัญในผลิตภัณฑ์ คือ เพปไทด์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ซึ่งมีรสขมเล็กน้อย แต่สามารถทำให้รสขมหายไปได้โดยการผสมด้วยอัตราเร็วสูง

Rebeca et al. (1991) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลาโดยใช้เอนไซม์ โปรติเอสจากจุลินทรีย์ 3 ชนิด คือ HT-200 , protease N และ Pescalase 560 พบว่าเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนและให้ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ (soluble nitrogen) สูงสุดคือ Pescalase 560 โดยสภาวะที่เหมาะสมคือใช้เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักย่อยสลายที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 9.5

Sanguandeekul et al. (2535) ทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากน้ำนึ่งปลาทูน่าเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร โดยวิธีย่อยสลายด้วยเอนไซม์ neutrase พบว่าที่สภาวะที่เหมาะสมคือใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1.0-1.5 ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และเวลาในการทำปฏิกิริยา 10 นาที โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้สามารถนำไปใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารได้ดี

Surowka and Fik (1992) ได้ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวไก่บด โดยใช้เอนไซม์ Neutrase สภาวะที่เหมาะสมคือเติมน้ำลงในหัวไก่บดละเอียดร้อยละ 75 โดยน้ำหนัก ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 เติมเอนไซม์ร้อยละ 0.2 โดยน้ำหนัก ควบคุมอุณหภูมิขณะเกิดปฏิกิริยาย่อยสลายที่ 55 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าได้ผลผลิตค่อนข้างสูง กล่าวคือ เริ่มต้นด้วยหัวไก่บด 1 กิโลกรัม ย่อยสลาย 6 ชั่วโมง จะได้ผลผลิตคือไฮโดรไลเซท 75 กรัม (dry hydrolysate) ซึ่งมีโปรตีนร้อยละ 78.1 (N x 6.25) ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาดี มีสีน้ำตาล ไม่มีรสขม ละลายน้ำได้ดี แต่มีสมบัติการเป็น emulsifier ไม่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีของการทำแห้งมีผลต่อสีของผลิตภัณฑ์ กล่าวคือ ไฮโดรไลเซทแห้งที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freez drying) จะมีสีครีมอ่อน ในขณะที่ไฮโดรไลเซทที่ได้จากการทำแห้ง โดยเครื่องอบแห้งแบบสุญญากาศ (vacuum drying) จะมีสีน้ำตาล

บุศราภา และ ปราณี (2536) ศึกษาสภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้ปาเปนและนิวเตรสตรึงรูปพบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ ประกอบด้วยความชื้นร้อยละ 92.9 โปรตีนร้อยละ 4.59 ไขมันร้อยละ 0.2 เถ้าร้อยละ 1.73 และเกลือร้อยละ 1.37 เมื่อทดลองนำผลิตภัณฑ์สารสกัดจากปลาดังกล่าวที่ผ่านการทำให้เข้มข้น และทำแห้งโดยใช้เครื่องทำแห้ง แบบพ่นฝอย (spray drying) มาใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสปลา (fish flavour enhancer) ในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด พบว่า

ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของยากิโทริ (บาบิคิวไก่) ที่ใช้สารสกัดจากปลาเข้มข้นและซุป บะหมี่รสปลาที่ใช้สารสกัดจากปลาแบบแห้ง อยู่ในระดับดีทั้งลักษณะ สี กลิ่น รส และการยอมรับ รวม

2.7 การใช้ประโยชน์ของเสียจากปลา

มีการใช้ประโยชน์ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมประมง โดยการพัฒนาคุณภาพให้เหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ อาหารมนุษย์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากของเหลือใช้ได้แก่ ปลาป่น ปลาหมัก โปรตีนปลาเข้มข้น ไขมันปลา โปรตีนไฮโดรไลเซทและเจลาติน เป็นต้น ผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป

1. ปลาป่น (Fish meal) เป็นส่วนของแข็งที่ได้จากการกำจัดน้ำและไขมันออกจากเศษปลา โดยวิธีการบีบอัดหรือปั่นเหวี่ยงส่วนน้ำและไขมันออกไป มีคุณค่าทางโภชนาการสูงสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ องค์ประกอบของปลาป่นประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 50-77 ความชื้นร้อยละ 6-12 ไขมันร้อยละ 5-15 เถ้าร้อยละ 8-33 เส้นใยน้อยกว่า ร้อยละ 1 กรดอะมิโนจำเป็นและวิตามินบางชนิดได้แก่ B12 โคลีน ไนอะซิน กรดแพนโททินิก (Ockerman, 1992)

2. ปลาหมัก (Fish silage) เป็นของเหลวที่ได้จากการหมักปลาทั้งตัวหรือเศษปลาด้วยเอนไซม์ตามธรรมชาติ เช่น เปปซิน คาเทปซิน ภายใต้สภาวะเป็นกรดเพื่อหลีกเลี่ยงการเน่าเสียจากจุลินทรีย์อาจเติมกรดโดยตรงหรือหมักให้ได้กรดแลกติก เนื่องจากไม่สามารถควบคุมการย่อยสลายจึงมักจะได้เพปไทด์ขนาดเล็กหลายชนิดและกรดอะมิโนอิสระ (Hall and Ahmad, 1992)

3. โปรตีนปลาเข้มข้น (Fish Protein Concentrate) เป็นโปรตีนที่ได้จากเนื้อหรือเศษปลา โดยนำส่วนของเนื้อหรือเศษปลามาล้างด้วยน้ำเพื่อแยกส่วนของสี เลือด ไขมัน เอนไซม์ และสารให้กลิ่นรสออกไป จากนั้นนำมาสกัดเอาไขมัน สารให้กลิ่นรสที่เหลือออกไปโดยใช้ตัวทำละลาย เช่น เอทานอล ไอโซโปรปานอล หลังจากกำจัดตัวทำละลายออกไปแล้ว นำไปทำแห้ง บด โปรตีนปลาเข้มข้นที่ได้ควรมีความชื้นอยู่ ในช่วงร้อยละ 2-4 (Rutman, 1974) โปรตีนปลาเข้มข้นมีหลายชนิด เช่น ชนิดเอ ไม่มีกลิ่นรส มีไขมันไม่เกินร้อยละ 0.75 ชนิดบี เป็นผงไม่กำจัดกลิ่น มีไขมันไม่เกินกว่าร้อยละ 3 และ ชนิดซี เป็นปลาป่นทั่วไปในสภาพที่ถูกอนามัย มีการนำโปรตีนปลาเข้มข้น ชนิดเอและบีไปใช้เป็นอาหารหลายชนิด เช่น พาสต้า ขนมปัง ซุป เป็นต้น

4. โปรตีนไฮโดรไลเซทปลา (Fish Protein Hydrolysate) เป็นโปรตีนปลาที่ถูกย่อยจนได้โพลีเพปไทด์ เปปโทน กรดอะมิโนอิสระ โดยบดปลากับน้ำ จากนั้นย่อยด้วยเอนไซม์ โปรติเอส กรดหรือด่าง หลังการย่อยแล้ว นำไปให้ความร้อนเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ปรับ พีเอช ให้เป็นกลางด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริก นำไปทำให้เข้มข้นและทำแห้ง โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลาจะมีไขมันน้อย มีองค์ประกอบคิดเป็นร้อยละโดยน้ำหนักแห้งดังนี้ โปรตีนร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้าร้อยละ 6-7 (Hall and Ahmad, 1992)

2.8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาโดยใช้เอนไซม์

จุดประสงค์หลักของการย่อยสลายโปรตีนปลา คือ ให้ได้โปรตีนปลาเข้มข้นที่มีคุณสมบัติหน้าที่ที่ดีเหมาะสมต่อการใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทั้งคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส ความคงตัว กลิ่นรส ดังนั้น จึงต้องเลือกชนิดของเอนไซม์ สภาวะในการย่อยได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของสารตั้งต้นและเอนไซม์ เป็นต้น มีการใช้แอซิดและอัลคาไลน์โปรติเอส (acid, alkali protease) ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา เอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อทิศทางในการย่อยสลาย โดยเอนไซม์ที่เป็นเอ็นโดเปปติเดส(endopeptidase) จะเริ่มย่อยสลายพันธะเพปไทด์จากด้านใน ส่วนเอ็กโซเปปติเดส(exopeptidase) จะเริ่มย่อยสลายพันธะเพปไทด์ทางด้านปลายสายมาก่อน (Adler-Nissen, 1986)

2.8.1 การใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา

เนื้อปลาหรือส่วนของปลาที่มีโปรตีนสูง เมื่อนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสจะได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ดีขึ้นในด้านต่างๆ เช่น การละลาย การเกิดอิมัลชัน หรือการกระจายตัวอย่างใดอย่างหนึ่งหรือหลายอย่างรวมกัน ทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง เช่น

1. อาหารสัตว์ โดยนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้จากการใช้ปลาคอดเป็นวัตถุดิบมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนเป็นเวลา 30 นาที ทำให้โปรตีนร้อยละ 30-50 เปลี่ยนเป็นเปปไทด์สายสั้นลง ง่ายต่อการละลายและเหมาะสมต่อการใช้เป็นอาหารสัตว์ โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่ได้มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 84.8 เถ้าร้อยละ 6.2 ไขมันร้อยละ 2 (Mackie, 1974)

Green and Mattick (1979) ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาด้วยเอนไซม์ปาเปน จะได้กรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสคล้ายกับเคซีน ใช้เป็นอาหารไก่และหมูได้

Jenkins et al. (1982) พบว่าเมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาไม่เกินร้อยละ 40 ของโปรตีนหางนม เป็นอาหารเลี้ยงโคอายุ 3-63 วันการใช้ประโยชน์จากไนโตรเจนลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้หางนมร้อยละ 100

2. อาหารมนุษย์ มีการนำโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาไปผสมกับแป้งดัดแปรในปริมาณร้อยละ 10 เพื่อทำ Milk analog จะช่วยเพิ่มค่า PER จาก 0.66 ไปเป็น 2.5 นอกจากนั้นพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่มีความสามารถในการเกิดอิมัลชันหรือการจับตัวกันของเนื้อผลิตภัณฑ์ ลดการสูญเสียระหว่างการให้ความร้อนผิตภัณฑ์และลดต้นทุนการผลิต เป็นต้น

3. อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยผลิตเป็นเปปโทน(peptone) ซึ่งใช้ส่วนของเหลวที่สกัดแยกจากปลา(solution fish eatract) เป็นวัตถุดิบในการไฮโดรไลซีส เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อปลา red hake ด้วยเอนไซม์ธรรมชาติในเนื้อปลา พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จาก

การไฮโดรไลซีสส่วนของเหลวที่สกัดจากปลาทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีเท่ากับ beef extract และดีมากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยสลายเนื้อปลา red hake (Gildberg, 1993)

4.น้ำมันปลา น้ำมันปลาสามารถแยกจากส่วนของเนื้อปลา หัวปลา ตาปลา เครื่องในและของเหลวที่ออกจากตัวปลาในช่วงของการให้ความร้อน มีการนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายประการ เช่น ใช้เป็นน้ำมันบริโภค ใช้ในอุตสาหกรรมยา เครื่องสำอาง อาหารสัตว์ อุตสาหกรรมฟอกหนังเพื่อทำให้หนังนิ่ม ใช้ทำหมึกพิมพ์เพื่อช่วยให้หมึกติดทน ใช้ในอุตสาหกรรมผงซักฟอกเพื่อให้ความคงตัวของสี และสะดวกต่อการทำความสะอาด นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมหล่อลื่น และอุตสาหกรรมสีทาเรือ เป็นต้น (อรัญและคณะ, 2541)

5. อาหารแมวบรรจุกระป๋อง จะใช้วัตถุดิบจำพวก หัว หาง กระดูก หนัง และเศษเนื้อสีดำ โดยบรรจุลงกระป๋องและมีส่วนผสมของเหลว เช่น น้ำเกลือ เจลลี่ หรือน้ำผัก เป็นต้น(อรัญและคณะ, 2541)

6. เครื่องในผง (Fish Liver Powder) เครื่องในผงผลิตโดยการย่อยสลายเครื่องในด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ใช้สำหรับให้กลิ่นรส ในอาหารสัตว์ มีลักษณะเป็นผงดูดความชื้นได้รวดเร็ว มีสีน้ำตาลคล้ำ และละลายน้ำได้ดี ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตในประเทศไทยประกอบด้วยความชื้นน้อยกว่าร้อยละ 10 โปรตีนมากกว่าร้อยละ 60 ไขมันร้อยละ 8-18 (อรัญและคณะ, 2541)

7. แคลเซียม กระดูกหรือก้างของปลาทูน่าสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตแคลเซียมสำหรับมนุษย์ การผลิตเริ่มจากการล้างกระดูกเพื่อแยกเศษเนื้อหรือหนัง แล้วบด ทำการล้างอีกครั้ง และกำจัดโปรตีนที่เหลือโดยใช้สารละลายด่างอ่อนภายหลังกระบวนการล้างหลายครั้ง ทำการฆ่าเชื้อ ทำแห้งแล้วบดเป็นผงและร่อน (อรัญและคณะ, 2541)

8.น้ำสกัดเข้มข้นจากปลา เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำนึ่งปลามาย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส การย่อยโปรตีนทำให้ได้สารเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ ทำให้มีสมบัติการละลายที่ดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง นำมาทำให้อยู่ในรูปเข้มข้นสามารถใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส หรือทำเป็นเครื่องจิ้มอาหาร (สุทธวัฒน์และคณะ, 2541)

วิกรมนัส (2546) ได้ศึกษาการสร้างกรดไขมัน EPA (eicosapentaenoic acid) และ DHA (docosahaxanoic acid) ของ *Shewanella putrefaciens* เมื่อเลี้ยงในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมันจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่า ซึ่งพบว่า *Sh. Putrefaciens* สายพันธุ์ DMS 5115 มีความสามารถในการสร้างกรดไขมัน EPA และ DHA ได้ดี เมื่อเลี้ยงในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมันออกจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่า โดยมีปริมาณเท่ากับ 0.49 และ 1.81 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักเซลล์แห้งตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างกรดไขมัน EPA และ DHA ของแบคทีเรียดังกล่าวในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมัน ออกจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่าพบว่า สภาวะที่เซลล์มีการสร้างกรดไขมัน EPA และ DHA ได้ดีเป็นระยะที่เซลล์มีอัตราการเจริญต่ำหรืออยู่ในระยะพักตัวโดยเมื่อพิจารณาจากผลผลิตกรดไขมัน EPA

และ DHA ที่ได้ทั้งหมดจากการเลี้ยงเชื้อ สภาวะที่เหมาะสมคือ การเลี้ยงในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมันออกจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่าที่ไม่ได้ทำการเจือจาง ไม่เติมผงสกัดจากยีสต์และน้ำมันที่สกัดได้จากเมล็ดลินิน เลี้ยงเชื้อที่พีเอช เริ่มต้น 7.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเขย่าขวดเลี้ยงเชื้อด้วยความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงเชื้อเพื่อให้มีปริมาณเซลล์จำนวนมากในระยะแรกแล้วปรับสภาวะให้เซลล์อยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญโดยการเลี้ยงในสภาวะขาดแคลนอาหาร พบว่าปริมาณการสร้างและผลผลิตกรดไขมัน EPA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ปริมาณการสร้างและผลผลิตกระไขมัน DHA กลับลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติ

9.ไส้กรอกปลา ส่วนของเนื้อปลาที่มีสีดำสามารถนำมาผลิตเป็นไส้กรอกปลาโดยการปรับสีของเนื้อปลาด้วยกรดแอสคอร์บิกและโซเดียมไนไตรท์และใช้ซูริมิเป็นส่วนผสม เพื่อให้ได้ไส้กรอกที่เหนียว (อรัญและคณะ, 2541)

10. แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ น้ำนึ่งปลาทูน่าสามารถใช้เป็นแปล่งอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว

สุวิทย์ (2541) ได้ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Rhodocyclus gelatinosus* R7 ในน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เจือจางด้วยน้ำต้มกุ้ง 10 เท่า ภายใต้สภาวะไร้อากาศ มีแสง เลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน ได้ปริมาณมวลชีวภาพสูงสุดเท่ากับ 5.6 กรัมต่อลิตร เซลล์มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 52.6 แคโรทีนอยด์ 1.2 มิลลิกรัมต่อกรัมน้ำหนักเซลล์แห้งและวิตามินบี 12 เท่ากับ 1.27 ไมโครกรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง

11.สกัดเอนไซม์ พูนสุขและทิพรัตน์(2541) ได้ศึกษาผลของพันธ์ปลาทูน่าและ บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ พันธุ์ครีบเหลือง และพันธุ์โอดำต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและ ไลเปส พบว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอช 10.0 โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและ ไลเปส เท่ากับ 72.17 และ 1.26 ยูนิต ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอดำให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและ ไลเปสต่ำสุด ส่วนการศึกษาประเภทของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของโปรติเอส และ ไลเปสของพันธุ์ท้องแถบ พันธุ์ครีบเหลือง และพันธุ์โอดำ คือ พีเอช 10.0 10.0 และ 9.5 ตามลำดับ และเอนไซม์ที่สกัดได้มีความคงตัวต่อพีเอชที่ดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (พีเอช 9.5-10.0) ดังนั้นเอนไซม์ที่สกัดได้จึงเป็นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสและ ไลเปส

Maurin and Yves (1996) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ esterase ที่สกัดได้จากลำไส้ Zpyloric caeca) ของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง พบว่าเป็นเอนไซม์ hydrophobic esterase มีน้ำหนักโมเลกุล 60 กิโลดาลตัน มีเอนไซม์แอคทิวิตี้ที่เหมาะสมที่พีเอชเท่ากับ 8

Hajjou and Yves (1993) ได้สกัดแยกเอนไซม์ aminopeptidase จากตับอ่อนปลาทูน่า แล้วทำการตรึงเอนไซม์ด้วย DEAE cellulose และ Sephadex G-200 ซึ่ง yield ของการตรึงเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 53 และ เท่ากับร้อยละ 65 ตามลำดับ ซึ่งผลจากการตรึงเอนไซม์ทำให้เอนไซม์สามารถเกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิต่างๆได้

Smine et al. (1993) ได้ศึกษาคุณลักษณะ pancreatic esterase จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง พบว่าเอนไซม์นี้มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน มีแอคทิวิตี้ที่เหมาะสมที่พีเอช 8.6 อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียส

2.8.2 คุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซทปลา

1. องค์ประกอบทางเคมี องค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าปลามีไขมันมากโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาจะมีปริมาณไขมันสูงเนื่องจากเป็นไขมันชนิดไม่อิ่มตัว จึงต้องกำจัดออกหรือใช้สารยับยั้งหรือชะลอปฏิกิริยาการหืน

2. น้ำหนักโมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลมีความสำคัญในการบ่งบอกคุณสมบัติหน้าที่ของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทปลา ถ้าระดับการย่อยสูงจะมีกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมากทำให้ละลายได้ดีแต่ขาดคุณสมบัติบางอย่างไป แต่ถ้าโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาประกอบด้วยเพปไทด์ขนาดใหญ่ อาจจะไม่สามารถละลายได้เพียงพอที่จะแสดงคุณสมบัติทางหน้าที่ออกมาได้ การกำจัดโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทปลาอาจทำได้โดยใช้การกรองด้วยเมมเบรน การกำหนดขนาดโมเลกุลที่ผ่านเมมเบรนได้จะระบุเป็น Cut off No. กล่าวคือ Cut off No. เท่ากับ 1,000 หมายถึง สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1,000 สามารถผ่านเนื้อเยื่อนี้ออกไปได้ ดังนั้นจึงใช้การกรองด้วยเมมเบรนในการคัดเลือกโปรตีนที่มีคุณสมบัติทางหน้าที่ตามต้องการได้ (Greenberg and Ship, 1979)

3. ระดับการย่อยสลาย(Degree of Hydrolysis) การวัดปริมาณการย่อยสลายโปรตีนเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับปฏิกิริยาการย่อยสลายเพื่อแสดงถึงจำนวนพันธะที่ถูกทำลายระหว่างปฏิกิริยา จึงมีการกำหนดค่าที่ใช้บ่งบอกถึงความก้าวหน้าของปฏิกิริยาในรูปของร้อยละไนโตรเจนที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก(trichloroacetic acid) เข้มข้นร้อยละ 10 (น้ำหนัก/ปริมาตร) เทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ(Greenberg and Ship, 1979) ระดับการย่อยสลายคือ เปอร์เซ็นต์พันธะเพปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเพปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบถ้าระดับการย่อยสลายสูงแสดงว่าโปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก

4. ความยาวของสายเพปไทด์(Peptide Chain Length) ความยาวของสายเพปไทด์เป็นจำนวนเฉลี่ยของกรดอะมิโนในโพลีเปปไทด์ สามารถคำนวณได้จากระดับการย่อยสลาย(DH) กล่าวคือ ความยาวของสายเพปไทด์เท่ากับ 100/DH ถ้าระดับการย่อยสลายสูงสายเพปไทด์จะสั้นลงนั่นคือโปรตีนถูกย่อยสลายจนเป็นเพปไทด์สายสั้นๆ(Adler and Nissen, 1997)

5. องค์ประกอบของกรดอะมิโน องค์ประกอบของกรดอะมิโนมีความสำคัญ 2 ประการ คือ ให้กลิ่นรสและคุณค่าทางโภชนาการ โปรตีนไฮโดรไลเซทปลาที่มีเพปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่บริเวณปลายสายจะมีรสขม รสขมที่ได้อาจเนื่องจากแหล่งของโปรตีนและชนิดของเอนไซม์ เช่น ถ้าใช้เอนไซม์เอนโดเปปติเดสย่อยสลายโปรตีนในถั่วเหลืองหรือเคซีนจะได้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีรสขม กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเพปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่อกรดอะมิโนอยู่อิสระ (Hall and Ahmad, 1992) เพปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและมีกรดอะมิโนที่เป็นกลางอยู่ปลายสายจะมีรสขม ถ้ามีกรดอะมิโนที่เป็นกรดอยู่ปลายสายจะให้รสหวานคล้ายน้ำซุป (Noguchi and Yamashita, 1975)

6. ความสามารถในการละลาย (Solubility) ความสามารถในการละลายของโปรตีนเป็นคุณสมบัติที่มีผลต่อคุณสมบัติอื่นๆมากมายการละลายของโปรตีนขึ้นกับ พีเอช ของสารละลาย ชนิดและปริมาณของตัวถูกละลายอื่นๆที่ผสมอยู่ด้วย ความสามารถในการละลายวัดในรูปของดัชนีการละลายของไนโตรเจน (Nitrogen Solubility Index, NSI) ซึ่งคำนวณจากร้อยละของไนโตรเจนที่ละลายได้ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เทียบกับร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซท (Quaglia and orban, 1987)

7. ความสามารถในการเกิดอิมัลชั่น (Emulsifying capacity) หมายถึง ความสามารถของสารที่ทำหน้าที่ เป็นสารช่วยในการรวมตัวของน้ำกับไขมัน โดยหุ้มรอบเม็ดไขมันเอาไว้ทำให้อิมัลชั่นคงตัว (นิธิยา, 2534)

2.9 ประโยชน์อื่นๆที่ได้จากปลาซาร์ดีน

2.9.1 วิตามินคิว (*vitamin Q*)

วิตามินคิว หรือ โคเอนไซม์ Q-10 เป็นวิตามินที่ทำให้อายุยืน ช่วยชะลอความแก่ ทำให้ผิวพรรณเปล่งปลั่ง วิตามินคิวเป็นวิตามินที่ละลายในไขมันทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ไม่ให้ทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ช่วยให้ร่างกายนำออกซิเจนมาใช้ได้มากขึ้น และหน้าที่ที่สำคัญมาก คือเป็นตัวจุดประกายให้ไมโตคอนเดรียในเซลล์สามารถสร้างพลังงานให้กับร่างกาย การขาดวิตามินคิวจะทำให้ร่างกายขาดพลังงาน วิตามินคิวจึงจำเป็นมากสำหรับอวัยวะที่ทำงานหนักและต้องใช้พลังงานมากเป็นพิเศษ เช่น หัวใจ รวมถึง ตับและไต

ความสามารถของวิตามินคิว

1. ปกป้องหลอดเลือดแดง

วิตามินคิวมีความสามารถในการป้องกันการจับตัวเป็นก้อนแข็งของโคเลสเตอรอล จึงช่วยปกป้องให้หลอดเลือดแดงไม่อุดตันด้วยโคเลสเตอรอลชนิด LDL อันเป็นสาเหตุของอีกหลายโรคที่จะตามมา โดยความสามารถในด้านนี้ของวิตามินคิวสูงกว่าวิตามินอีและเบต้า-แคโรทีน

2. ป้องกันหัวใจล้มเหลว

เป็นโรคที่ต่อเนื่องจากหลอดเลือดแดงตีบตัน ทำให้เลือดไปเลี้ยงหัวใจน้อยลง หัวใจจึงต้องทำงานหนักขึ้น จนเกิดภาวะหัวใจโต กล้ามเนื้อหัวใจอ่อนแรง เป็นผลทำให้กำลังสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงร่างกายน้อยลง ร่างกายจึงเกิดอาการอ่อนเพลีย เหนื่อยง่าย ถ้าปล่อยให้เป็นเช่นนี้นาน กล้ามเนื้อหัวใจอาจหยุดทำงาน จากการวิจัยของแพทย์ พบว่า สาเหตุหนึ่งที่ทำให้คนเป็นโรคหัวใจ เนื่องจากการขาดวิตามินคิว นอกจากนี้ งานวิจัยในญี่ปุ่นถึง 25 ชิ้น ยังพบว่า ผู้ป่วยโรคหัวใจร้อยละ 70 มีอาการดีขึ้นหลังจากได้รับวิตามินคิว

3. ป้องกันสมองเสื่อม

โดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ ไม่เพียงแต่จะความจำเสื่อมเท่านั้น ยังทำให้พฤติกรรมต่างๆ เปลี่ยนไป อาทิ กลายเป็นคนอารมณ์ร้าย พูดจาไม่สุภาพ และอาจถึงขั้นเป็นอัมพาต ช่วยเหลือตัวเองไม่ได้ทีเดียว ปัจจุบันยังไม่พบสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคทั้งสองนี้ ซึ่งนักวิทยาศาสตร์ส่วนหนึ่งเชื่อว่า วิตามินคิวสามารถป้องกันโรคสมองเสื่อมได้ โดยการปกป้องไมโตคอนเครีย ให้พ้นจากการจู่โจมของอนุมูลอิสระ อันเป็นสาเหตุให้เซลล์สมองเกิดการเสื่อม นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยของมหาวิทยาลัยแคลิฟอร์เนีย ที่ชี้ให้เห็นว่า วิตามินคิวสามารถบรรเทาอาการของโรคพาร์กินสันได้ แต่ทั้งนี้ผู้ป่วยต้องบริโภควิตามินถึงวันละ 1,200 มิลลิกรัม

4. ป้องกันมะเร็ง

เนื่องจากวิตามินคิวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ไม่ให้ทำลายเซลล์ จนถึง DNA อันจะทำให้เซลล์กลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็ง นอกจากนี้สำหรับผู้ที่ป่วยเป็นมะเร็งแล้ว การวิจัยยังพบว่า การใช้วิตามินวันละ 390 มิลลิกรัมกับหญิงที่ป่วยเป็นมะเร็งที่เต้านม มีผลให้เซลล์มะเร็งมีขนาดเล็กลง และไม่ลุกลามไปยังอวัยวะอื่น

5. ป้องกันการแก่ก่อนวัย

เนื่องจากวิตามินคิวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จึงช่วยป้องกันอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายผนังเซลล์ผิวหนัง อันเป็นสาเหตุให้ผิวหนังเหี่ยวย่นและรอยตีนกา

6. ป้องกันเบาหวาน

เนื่องจากวิตามินคิวมีบทบาทสำคัญในการสร้างพลังงานให้กับร่างกาย ซึ่งเกี่ยวพันกับการใช้อาหารจำพวกแป้ง และน้ำตาล จึงสันนิษฐานว่า วิตามินคิวอาจจะมีส่วนเกี่ยวพันกับระดับน้ำตาลในเลือด จากการศึกษาพบว่ากลุ่มคนที่เป็นเบาหวาน ประเภท2 มีระดับของวิตามินคิวในร่างกายต่ำกว่าคนปกติทั่วไป (http://lib.src.ku.ac.th)

2.9.2 แคลเซียม (calcium)

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีมากที่สุดในร่างกาย คือประมาณ 1,250 กรัม ซึ่งร้อยละ 55 จะอยู่ในกระดูกและฟัน โดยจับกันเป็นผลึกอยู่กับฟอสฟอรัส เป็นเกลือ แคลเซียม ฟอสเฟต ดังนั้น เวลา

กล่าวถึง แคลเซียมในร่างกาย จึงมักนึกถึงเฉพาะกระดูก ทั้งที่จริงแล้วยังมีแคลเซียมอีกส่วนอยู่ในเลือดโดยจับอยู่กับโปรตีนในเลือดและอยู่เป็นแคลเซียมอิสระ

หน้าที่ของแคลเซียม

นอกจากจะเป็นส่วนประกอบของกระดูกแล้ว ยังมีหน้าที่อื่นๆ อีกได้แก่ ช่วยในการแข็งตัวของเลือด เกี่ยวกับการทำงานของกล้ามเนื้อระบบประสาท ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อทั่วไป รวมทั้งกล้ามเนื้อหัวใจให้เป็นไปตามปกติ นอกจากนั้นแคลเซียมยังเป็นตัวกระตุ้นการทำงานของโปรตีนอื่นๆ เช่น Osteocalcin ซึ่งเป็น carboxylated- glutamic acid ให้จับกับแคลเซียมของ Hydroxyapatite ช่วยในกระบวนการสร้างและสลายกระดูก เรื่องที่สำคัญอีกอย่าง คือ แคลเซียมจากกระดูกยังทำหน้าที่ในการควบคุมความสมดุลของกรดและด่างในร่างกายด้วย

ความสมดุลของแคลเซียมในร่างกาย

โดยทั่วไปแคลเซียมที่มีในจะมีการสลายออก (resorption) และยังสร้างขึ้นใหม่ (formation) อยู่ตลอดเวลา โดยขึ้นกับความสมดุลของฮอร์โมน หลายตัว ได้แก่ Parathyroid Hormone (PTH) ,Calcitonin (CT) และ 1,25[OH2]D3 ซึ่งช่วยให้มีการดูดซึมแคลเซียม ไม่ถูกละลายออกจากกระดูก และ Parathyroid hormone จะทำให้เกิดขบวนการ Resorption ขึ้น ซึ่งปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาแต่เมื่ออายุมากขึ้น โดยเฉพาะในหญิงหลังหมดประจำเดือนอาจเกิดการขาดดุลของแคลเซียมอย่างรวดเร็วคือ มีกระบวนการสลายมากกว่าการสร้างเพราะการขาด estrogen ซึ่งช่วยยับยั้งการสลายของกระดูก ทำให้กระดูกเกิดการผุกร่อนเปราะและหักง่ายเรียกว่า "ภาวะกระดูกพรุน" (Osteoporosis)

แหล่งให้และขัดขวางการดูดซึมของแคลเซียม

นมและผลิตภัณฑ์ของนมเป็นแหล่งแคลเซียมที่สำคัญที่สุด โดยเฉพาะนมวัว กระดูกต่างๆก็เป็นแหล่งแคลเซียมเช่นกันโดยเฉพาะกระดูกปลาที่สามารถเคี้ยวกลืนได้ เช่น ปลาซาร์ดีน ปลาราก-กล้วย ปลาซิว เป็นต้น นอกจากกระดูกแล้วเนื้อสัตว์และผักใบเขียวต่างๆก็มีแคลเซียม แต่แคลเซียมพวกนี้ถูกดูดซึมเข้าทางเดินอาหารได้น้อย เนื่องจากมีใยอาหารและ phytate (inositol phosphate) และ oxalate อยู่ซึ่งขัดขวางการดูดซึมแคลเซียม นอกจากนี้ยังมีสารและยาบางชนิด ขัดขวางการดูดซึมของแคลเซียมด้วย เช่น Alcohol ยากันชัก ยาพวก tetracyclines เป็นต้น

ความต้องการแคลเซียม

ในคนปกติมีความต้องการแคลเซียมประมาณ 800-1,500 มก./วัน สำหรับสตรีในระยะตั้งครรภ์และให้นมบุตรต้องการเพิ่มจากปกติอีก 400 มก./วัน ในวัยหมดประจำเดือนจนกระทั่งวัยสูงอายุในขณะนี้มีแนวโน้มต้องการถึง 1,500 มก./วัน

การใช้แคลเซียม

การใช้แคลเซียมในรูปยาเม็ดแต่ละ prepatation จะให้ธาตุแคลเซียมไม่เท่ากันเช่น

Ca lactate ให้ธาตุแคลเซียมได้ ร้อยละ 13
Ca gluconate ให้ธาตุแคลเซียมได้ร้อยละ 13
Ca carbonate ให้ธาตุแคลเซียมได้ร้อยละ 13

(http://www.pharm.chula.ac.th/osotsala/botanay-food/sub5_3.htm)

2.9.3 โอเมก้า- 3 (omega-3)

สารสำคัญที่อยู่ในกลุ่มโอเมก้า - 3 นี้แบ่งได้เป็นสองชนิดใหญ่ คือ ชนิดที่หนึ่งได้แก่พวก EPA ย่อมาจาก EICOSAPANTAENOIC ACID และ DHA ย่อมาจาก DOCOSAHEXA NOIC ACID ซึ่งพบมากในปลา ใต้ทะเลลึก เช่น ปลาแซลมอน และแม็คเคอเรล (salmon and mackerel) ซึ่งมีไขมันที่เรียกว่า น้ำมันปลา จำนวนสูงกว่าปลาน้ำจืด ส่วนชนิดที่สองชื่อ กรดอัลฟาไลโนเลอิก (ALPHA - LINOLEIC ACID) ซึ่งเป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า - 3 ซึ่งพบมากในอาหารพวกธัญพืช ร่างกายของเราสามารถเปลี่ยนแปลงกรดไขมันที่มีอยู่ในพืชตัวนั้น ให้เป็นกรด ที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า คือ EPA และ DHA น้ำมันพืชที่มีกรดไขมันตัวนี้สูง คือ *Canola oil* และ Faxseed oil ส่วนพืชพวกข้าวโพด ถั่วเหลือง เมล็ดทานตะวัน และผลิตภัณฑ์ทางอาหาร ที่ทำจากพืชและน้ำมันพวกนี้ เช่น เนยเทียม ย่อมมีกรดไขมันที่มีประโยชน์ตัวนี้อยู่มากเช่นกัน อย่างไรก็ตาม นักวิจัยด้านโภชนาการเสนอแนะว่า ร่างกายคนเราควรได้รับ กรดไขมัน ทั้งสองชนิด ในสัดส่วนที่สมดุลกัน

กลไกการทำงานของกรดไขมันในร่างกายเรานั้นเชื่อกันว่า เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์ทุกชนิดของร่างกายโดยเฉพาะ DHA ซึ่งพบมากในน้ำนม และรกเป็นแหล่งสำคัญ ของการผลิตฮอร์โมนสำหรับทารกในครรภ์ มีความสำคัญในการเจริญเติบโต ของสมองของทารกเช่นเดียวกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ ทุกวัน ร่างกายของคนเรา ผลิตสารกลุ่มหนึ่ง ที่มีคุณสมบัติ คล้ายฮอร์โมน ชื่อ "EICOSANOIDS" สารกลุ่มนี้มี ส่วนเกี่ยวข้อง ในการควบคุม ระบบการแข็งตัวของเลือด การหดตัวของหลอดเลือด และการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบ ซึ่งเป็นกลุ่มกล้ามเนื้อ ที่อยู่ตามอวัยวะต่าง ๆ ของร่างกาย และอยู่นอกการบังคับด้วย เส้นประสาท ชนิดที่บังคับแขนขา คือ เป็นกลุ่มกล้ามเนื้อที่อยู่ภายใต้การควบคุมของ ระบบประสาทอัตโนมัติ เช่น กล้ามเนื้อของมดลูก นอกจากนี้ สารนี้ ยังจำเป็นในกรณีที่ ร่างกายเกิดการอักเสบ เพราะต่อสู้กับเชื้อโรคหรือความผิดปกติต่าง ๆ ในการผลิตกลุ่มสารชื่อ EICOSANOIDS นี้ร่างกายต้องใช้วัตถุดิบ คือ ทั้งกรดไลโนเลอิก (Linoleic acid) และกลุ่มโอเมก้า - 3 แต่ถ้าร่างกายได้รับกลุ่มโอเมก้า - 3 น้อยไป และมีกรดไลโนเลอิก เป็นสัดส่วนเกินพอดี เมื่อเทียบกับกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า - 3 ทำให้ร่างกายมีปัญหา เกี่ยวกับลิ่มเลือดแข็งตัว ปวดท้องน้อยเวลามีประจำเดือน และข้ออักเสบ

กรดไขมันกลุ่มนี้ช่วยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ มีกลไกการปั๊มเข้าออก สารต่าง ๆ เช่น แคลเซียม โซเดียมคลอไรด์และประจุไฟฟ้าอื่น ดำเนินไปอย่างปกติ เพื่อควบคุมการยืด และหดตัวของ

กล้ามเนื้อหัวใจ ถ้ากรดโอเมก้า - 3 ขาดหายไป การเต้นของหัวใจ ย่อมผิดปกติ เรียกว่า การเต้นผิดจังหวะ (Arrhythmia) ซึ่งเป็นสาเหตุการตายที่พบบ่อย และเกิดแทรกซ้อนหลังจากหัวใจวายดังปรากฏในการทดลองกับกลุ่มผู้ชาย 295 คน ที่เมืองซีแอตเติลที่รับประทานปลาอย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง จะมีอัตราการเกิด ภาวะหัวใจล้มเหลว เนื่องจากการเต้นหัวใจผิดจังหวะเพียงครึ่งหนึ่งของกลุ่มที่ไม่รับประทานอาหารแบบเดียวกัน ส่วนในประเทศอังกฤษผู้ชายจำนวน 883 คน ที่เคยมีอาการหัวใจวายแล้วดำรงชีวิตต่อมาเป็นเวลา 2 ปี โดยการรับประทานอาหารกลุ่มที่มีไขมัน โคเลสเตอรอลต่ำ และรับประทานปลาทะเล ที่มีกรดไขมันโอเมก้า-3อยู่เป็นจำนวนมาก อย่างน้อยสองถึงสามครั้งต่อสัปดาห์ ผู้ชายกลุ่มนี้มีอัตราการตายลดลงร้อยละ 29 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับประทานอาหารที่มีองค์ประกอบของโอเมก้า-3 (Lancet, 1989)

นอกจากนี้ เยื่อหุ้มเซลล์ในสมองมีส่วนประกอบที่เป็นสาร DHA ถึงร้อยละ 30 ด้วยเหตุนี้ จิตแพทย์ Dr.Joseph R.Hibbeln แห่ง National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism เชื่อว่าถ้าปริมาณสาร DHA ในเยื่อหุ้มเซลล์ของสมองต่ำลง ย่อมก่อให้เกิดปัญหาในการสื่อสารทางสมองจนเกิดความผิดปกติทางด้านอารมณ์ โดยเฉพาะทางซึมเศร้า เพราะเขาเฝ้าติดตามดูในคนไข้ที่มีปัญหานี้ และนักศึกษาชาวญี่ปุ่น 22 คน ที่มีอาการเครียด ก้าวร้าว ในช่วงก่อนสอบถ้าได้รับอาหารเสริมที่มีกรดไขมันกลุ่มนี้แล้วมีอาการก้าวร้าวลดลง

ด้วยเหตุนี้ นักวิจัยที่สนับสนุนการรับประทานอาหารที่มีกรดไขมันโอเมก้า-3 สูง ได้เสนอให้พยายามเลือกอาหารปลาชนิดต่างๆ เช่น ปลา ซาลมอนอบขนาด 3 ออนซ์ ให้ EPA และ DHA ถึง 2 กรัม ซึ่งนับว่าเป็น 10 เท่าของปริมาณโดยเฉลี่ยที่คนอเมริกันรับประทานในแต่ละวัน คือ น้อยกว่าหนึ่งในยี่สิบห้าของช้อนชา นอกจากนี้พวก *Canola oil* หรือ *Flaxseed oil* รวมทั้งเนยที่ทำจาก Canola oil มีประโยชน์ต่อร่างกายเช่นเดียวกัน ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาถึงผลเสียที่อาจเกิดขึ้น ในระยะยาว ถ้ารับประทานอาหารเสริม เช่น น้ำมันปลาที่ผลิตในรูปเม็ดแคปซูลเป็นจำนวนมาก การได้รับกรดไขมันตัวนี้อาจเป็นสาเหตุให้ร่างกายมีความต้องการวิตามินดีสูงขึ้น ส่วนคนที่มีปัญหาทางด้านความดันโลหิตสูง ความผิดปกติทางการแข็งตัวของเลือด หรือคนที่ได้รับยาทำให้เลือดแข็งตัวยาก ไม่ควรรับประทานอาหารเสริมเป็นแคปซูล ปริมาณของอาหารเสริมที่เหมาะสมคือ จำนวน EPA และ DHA ประมาณ 1 กรัม (http://www.elib-online.com/doctors/food_fishoil2.html)

2.9.4 วิตามินบี 12 (Vitamin B12)

จำเป็นในการสร้างเม็ดเลือด การทำงานของระบบประสาทส่วนกลางและการดูดซึมของทางเดินอาหาร อาการที่ปรากฏเมื่อขาดวิตามินบี 12 คือโลหิตจาง อ่อนเพลีย เกิดความบกพร่องของระบบประสาทส่วนกลาง วิตามินบี 12 พบมากในเนื้อสัตว์ เนื้อปลา นม เนย

1. **มีส่วนสำคัญในการสร้างเม็ดเลือดแดง**
2. **มีส่วนสำคัญในการทำงานของระบบประสาท**

3. มีส่วนในการสร้างกรดนิวคลีอิค (nucleic acid) ซึ่งเป็นพื้นฐานของกรรมพันธุ์
4. มีส่วนช่วยในการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรต
5. มีส่วนช่วยให้ร่างกายนำไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ไปใช้ได้อย่างสมบูรณ์
6. มีส่วนช่วยในการทำงานของระบบประสาท
7. ช่วยในการเจริญเติบโตของเด็กๆ คือ มีความต้านทานต่อโรค มีน้ำหนักและส่วนสูงมากกว่า

(http://www.thaifitway.com/Education/Ndata/N3db/question.asp?QID=15)

2.9.5 ไอโอดีน (iodine)

ไอโอดีนเป็นองค์ประกอบพื้นฐานที่ใช้ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนไทรอยด์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและเติบโตของสมอง

(http://www.dumex.co.th/index.php/consumer/childdev/foundation/nutrition/66)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 3

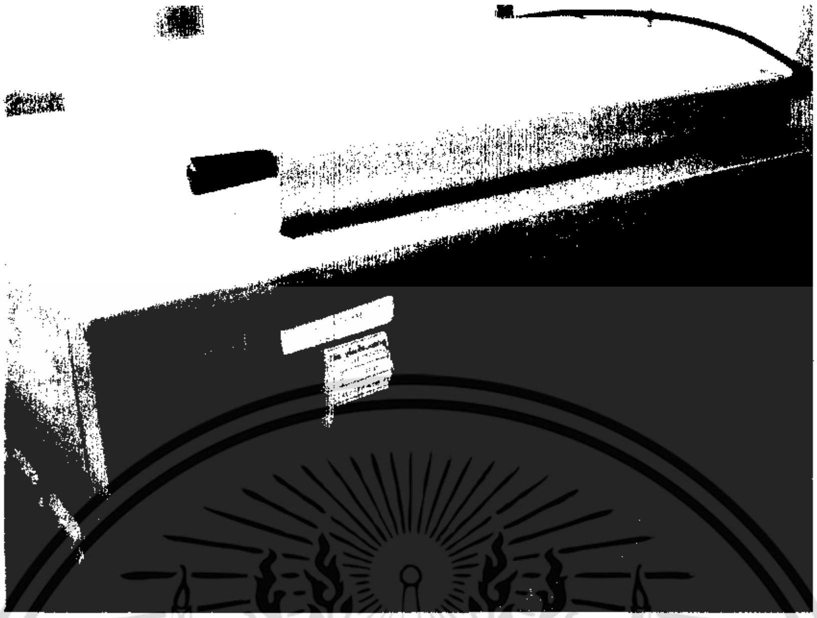
วิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

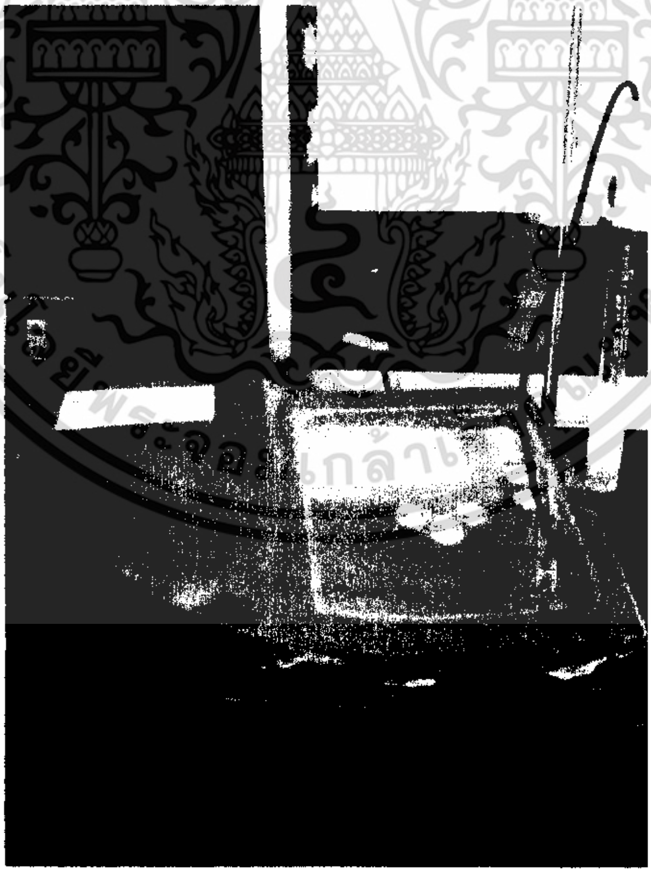
1. หัวปลาซาร์ดีน (*Sadina pilchardus*)
2. Flavourzyme 500 L (EAC)
3. Alcalase 2.4 L (EAC)
4. กรดซิตริก (Citric acid,food grade)
5. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid)
6. โซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3)
7. แป้งดัดแปร (modified starch)
8. ซีอิ๊วขาว
9. น้ำตาลทราย
10. ซีอิ๊วหวาน
11. เกลือ
12. ผงชูรส

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

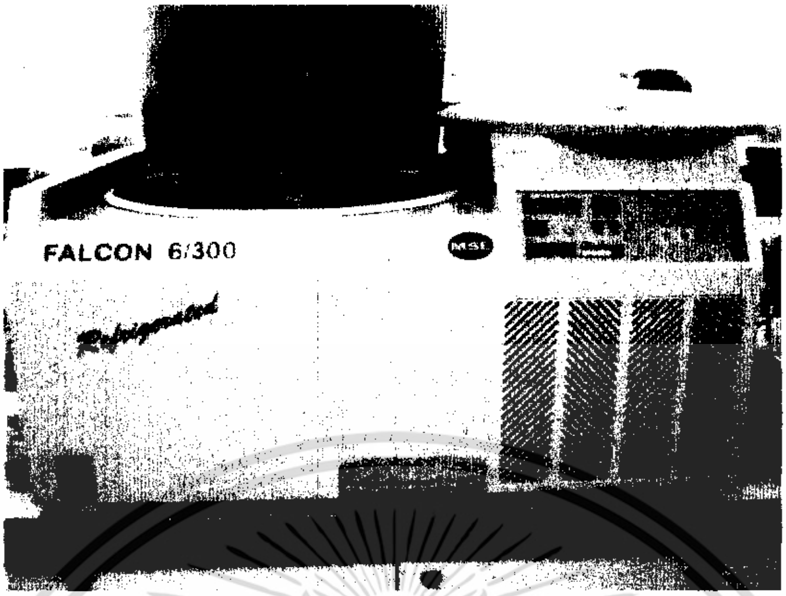
1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Sarrorius)
2. เครื่องวัด pH
3. เครื่องทำแห้ง (Freeze drier) ของ Labconco
4. เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ FALCON 6/300
5. Water bath (Memmert ,UIC)
6. Blender (Mulinex)
7. Refractometer
8. Deep freeze (VX350)
9. เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer)
10. เครื่องสกัดไขมัน (Soxtherm apparatus) ของ BUCHI 810
11. เครื่องวิเคราะห์โปรตีนของ Gerhardt
12. เครื่องวัดความหนืด (visco meter)
13. เตาเผา (muffle furnace)
14. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)



รูปที่ 3.1 เครื่อง Water bath (Memmert ,UIC)

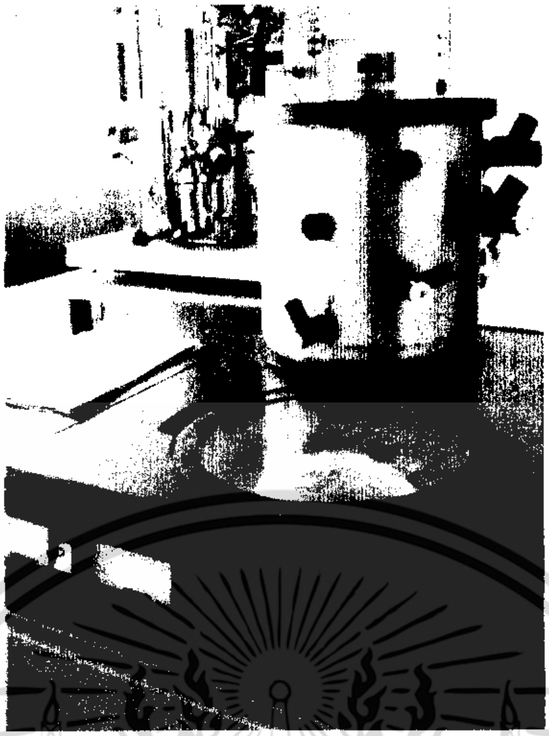


รูปที่ 3.2 เครื่องวัดพีเอช (pH meter)

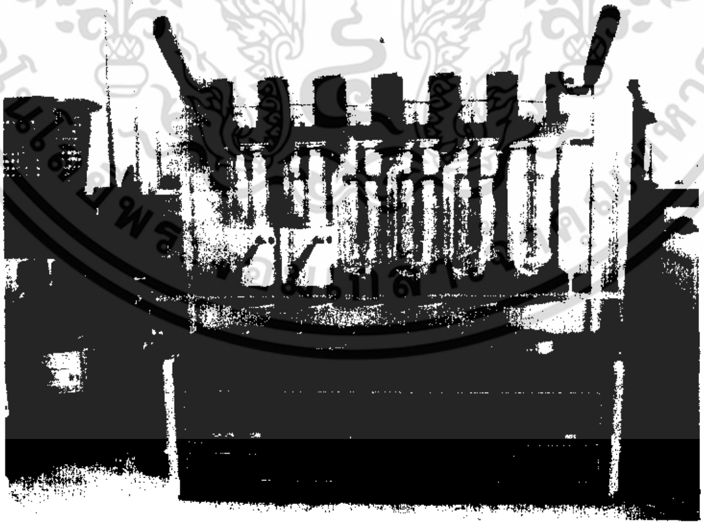

FALCON 6/300
MSE
Refrigerated

รูปที่ 3.3 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ของ FALCON 6/300

รูปที่ 3.4 เครื่อง Deep Freeze (VX350)



รูปที่ 3.5 เครื่องทำแห้ง (Freeze drier) ของ Labconco



รูปที่ 3.6 เครื่องสกัดไขมัน (Soxtherm apparatus) ของ BUCHI 810

รูปที่ 3.7 เครื่องวิเคราะห์โปรตีน Gerhardt

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีน

วัตถุดิบที่ใช้คือ เศษหัวของปลาซาร์ดีน ที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ลัคกี้ แคนเนอรี่ จำกัด (จังหวัดสมุทรสาคร) นำหัวปลาซาร์ดีนมาบดโดยใช้เครื่อง Blender จากนั้นนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบโดยประมาณตามวิธีของ AOAC (1995) ได้แก่

1.) ปริมาณความชื้น

2.) ปริมาณโปรตีน

3.) ปริมาณไขมัน

4.) ปริมาณเถ้า

3.3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน(Suthasince; et. al. 2003)

โดยศึกษาความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ที่เหมาะสมซึ่งพิจารณาจากร้อยละของปริมาณโปรตีน และปริมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้รวมทั้งคุณสมบัติในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดเป็นร้อยละ 0.3 0.4 และ 0.5 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง วางแผนการทดลองแบบ 3x3 factorial in completely randomized design โดยมีขั้นตอนดังรูปที่ 3.8

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปลาบดผสมน้ำในอัตราส่วน 1 : 1

↓

ให้ความร้อนที่ 85°C เป็นเวลา 20 นาที

↓

ควบคุมอุณหภูมิที่ 60°C และพีเอชให้อยู่ในช่วง 6.5-7.0

↓

เติมเอนไซม์อัลคาเลสโดยแปรความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.3 0.4 และ 0.5 ของปริมาณโปรตีน
และกวนส่วนผสมตลอดเวลานาน 2 ชั่วโมง

↓

ควบคุมอุณหภูมิเป็น 55°C และพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0-5.5

↓

เติมเอนไซม์ฟลาโวไซม์โดยแปรความเข้มข้นเป็นร้อยละ 0.3 0.4 และ 0.5 ของปริมาณโปรตีน
และกวนตลอดเวลานาน 6 ชั่วโมง

↓

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 90°C เป็นเวลา 10 นาที
และทำให้เย็นทันที

↓

นำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง

↓ → เศษกระดูก

นำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm เป็นเวลา 15 นาที

↓ → ตะกอน

โปรตีนไฮโดรไฮเซทที่เป็นของเหลว

↓

นำไปทำให้เข้มข้นจนมี
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 30° brix

↓

แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

↓

ทำให้แห้งโดยใช้ Freeze Drier

↓

โปรตีนไฮโดรไลเซทผง

รูปที่ 3.8 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน

3.3.3 การวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัดได้

ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.2 จากนั้นนำมาวิเคราะห์คุณภาพ ได้แก่

1. ความเป็นกรด – ด่าง โดยใช้ pH meter
2. ปริมาณความชื้น
3. ปริมาณโปรตีน
4. ปริมาณไขมัน
5. ค่าสีในระบบ L^* a^* b^* โดยใช้ colorimeter (Minolta CR 300)

3.4 การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากหัวปลาซาร์ดีนจากข้อ 3.3.3 มาประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสปลาในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น โดยแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 3 4 5 6 และ 7 ของปริมาณสัดส่วนทั้งหมด ซึ่งมีขั้นตอนการผลิตดังนี้

ตารางที่ 3.1 ส่วนผสมของซอสชนิดข้น

ส่วนผสม	ปริมาณที่ใช้ (ร้อยละ)
โปรตีนไฮโดรไลเซท	3 4 5 6 7 (ของสัดส่วนทั้งหมด)
แป้งดัดแปร (modified starch)	5
ซีอิ๊วขาว	12
ซีอิ๊วหวาน	2
น้ำตาลทราย	1
ผงชูรส	1
เกลือ	4
น้ำ	75

วิธีการ

1. นำแป้งดัดแปรมาผสมกับน้ำ
2. ให้ความร้อนเพื่อให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. เติมโปรตีนไฮโดรไลเซท และส่วนผสมทั้งหมด ลงไปขณะให้ความร้อน
4. ทิ้งให้เย็น
5. บรรจุในขวดแก้วฝาเกลียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปิดฝาทันที

นำซอสที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพทางเคมีได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน ตามวิธีการของ AOAC (1995) คุณภาพทางกายภาพ ได้แก่ ความหนืด ค่าสี ทางจุลินทรีย์ได้แก่

Total plate count และ ยีสต์รา ตามวิธีการAOAC (1995) คุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้มาเป็นส่วนผสมในการทำหมูผัดซอส แล้วทำการประเมิน~~ความชอบ~~ใน ด้าน สี กลิ่น รสชาติ ความหนืด และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้ทดสอบที่ได้รับคำแนะนำ 25 คน ใช้แบบทดสอบ ชนิด Hedonic scale แบ่งคะแนนเป็น 9 ระดับ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SPSS version 12

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีน

เนื่องจากปลาซาร์ดีนโดยทั่วไปที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอุตสาหกรรมปลากระป๋อง ในกระบวนการผลิตจะมีของเหลือทิ้งจากทางโรงงานปลากระป๋องเช่น หัวปลา ไส้ปลา เครื่องในปลา หางปลา เป็นต้น

สำหรับการทดลองในครั้งนี้ใช้ หัวปลาซาร์ดีน เนื่องจากปลาซาร์ดีนเป็นวัตถุดิบสำคัญในกระบวนการผลิตประเภทอุตสาหกรรมปลากระป๋อง ซึ่งจะมีของเหลือทิ้งจากการผลิตในระดับอุตสาหกรรมเป็นจำนวนมาก และนำมาวิเคราะห์เพื่อตรวจสอบหาองค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งพบว่าหัวปลาซาร์ดีนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองมีปริมาณความชื้นร้อยละ 51.03 โปรตีนร้อยละ 18.29 ไขมันร้อยละ 9.28 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 2.27 และเถ้าร้อยละ 16.16

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีน

องค์ประกอบทางเคมี	ปริมาณ (ร้อยละของน้ำหนักเปียก)
ความชื้น	51.03
โปรตีน	18.29
ไขมัน	9.28
คาร์โบไฮเดรต	2.27
เถ้า	16.16

จะเห็นได้ว่าหัวปลาซาร์ดีนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทดลองมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงคือร้อยละ 18.29 ดังนั้นการใช้หัวปลาซาร์ดีนจึงน่าจะมีศักยภาพที่ดีในการนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ

4.2 การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้เอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลสมีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส (endopeptidase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีน ส่วนเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส (endopeptidase) และเอ็กโซเพปทิเดส (exopeptidase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ภายในและปลายสายของโปรตีน และได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ 2 ชนิดคือเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็น 0.3 0.4 และ 0.5 โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่ได้ปริมาณโปรตีนและปริมาณผลได้ให้มากที่สุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำ ซึ่งได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากตารางที่ 4.2 เมื่อปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณเท่ากันแต่ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทและปริมาณผลได้เพิ่มขึ้นเนื่อง จากเอนไซม์อัลคาเลสมีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนแบบสุ่มทำให้เกิดโมเลกุลของโพลีเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระจำนวนมากและมีปริมาณใกล้เคียงกัน เพราะเวลาที่ใช้ในการทดลองในช่วงแรกเป็นเวลาที่เท่ากันคือ 2 ชั่วโมง แต่ในสภาวะการทดลองในช่วง 6 ชั่วโมงหลังโดยใช้เอนไซม์ฟลาโวไซม์ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส (endopeptidase) และ เอ็กโซเพปทิเดส (exopeptidase) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลายพันธะเพปไทด์ภายในโมเลกุลของโปรตีนเช่นเดียวกันกับเอนไซม์อัลคาเลส ดังนั้นปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทและปริมาณผลได้จึงเพิ่มขึ้นตามปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์และจากการทดลองได้พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะที่ 3 ซึ่งมีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสเป็นร้อยละ 0.3 และปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์เป็นร้อยละ 0.5 นั้น พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการทดลองมีปริมาณโปรตีนในระดับที่สูงที่สุดคือร้อยละ 63.20 และปริมาณyieldของโปรตีนไฮโดรไลเซทสูงที่สุดคือร้อยละ 55.07

และเมื่อพิจารณาปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสเพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณเอนไซม์ฟลาโวไซม์เท่ากัน พบว่ามีผลทำให้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทและปริมาณผลได้ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงโดยลดลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้ประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนมีประสิทธิภาพลดลง

เมื่อนำเอาโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้แต่ละสภาวะมาทดสอบรสขมโดยใช้วิธีการชิม พบว่ารสขมที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลสมีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส (endopeptidase) โดยสามารถย่อยภายในโมเลกุลของโปรตีนซึ่งอาจทำให้ได้กรดอะมิโนอิสระที่มีรสขมเช่น tryptophan จึงมีผลทำให้

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้นั้นมีรสขมซึ่งอาจทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงใช้เอนไซม์อัลคาเลสทำงานร่วมกับเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เพื่อลดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยที่เอนไซม์ฟลาโวไซม์มีคุณสมบัติเป็นเอ็นโดเพปทิเดส (endopeptidase) และ เอ็กโซเพปทิเดส(exopeptidase) และมีคุณสมบัติสามารถย่อยเพปไทด์ที่มีรสขม ดังนั้นจากการทดสอบความขมโดยวิธีการชิมจึงพบว่ารสขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทจะน้อยลงเมื่อใช้ปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์ฟลาโวไซม์เพิ่มขึ้น

คุณสมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจะแสดงถึงปริมาณร้อยละของสารประกอบไนโตรเจนที่ละลายน้ำได้ เมื่อเทียบกับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด(total nitrogen)โดยที่ความสามารถในการละลายจะขึ้นอยู่กับขนาดของโมเลกุลที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ จากการศึกษาคุณสมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากทุกสภาวะที่มีการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ โดยนำมาทดสอบการละลายลงในน้ำปริมาณที่เท่ากันและคนให้เข้ากัน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีความสามารถในการละลายที่ใกล้เคียงกัน และละลายน้ำได้ภายในเวลา 1 นาที ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีคุณสมบัติในการละลายที่ดี

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนและปริมาณYieldของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะต่างๆ

สภาวะ	ปริมาณอัลคาเลส (ร้อยละ)	ปริมาณฟลาโวไซม์ (ร้อยละ)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ ของน้ำหนักแห้ง)	ปริมาณYield (ร้อยละ ของน้ำหนักแห้ง)
1	0.3	0.3	50.27^{de}	49.18^{b}
2	0.3	0.4	59.05^{ab}	50.70^{b}
3	0.3	0.5	63.20^{a}	55.07^{a}
4	0.4	0.3	41.36^{f}	50.06^{c}
5	0.4	0.4	51.94^{de}	44.92^{d}
6	0.4	0.5	58.25^{bc}	48.30^{c}
7	0.5	0.3	46.94^{e}	39.14^{e}
8	0.5	0.4	48.42^{e}	39.20^{e}
9	0.5	0.3	53.75^{d}	45.38^{c}

$^{a, b, c ...}$ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากปริมาณร้อยละของโปรตีน และปริมาณผลได้ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการแปรปริมาณความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ในระดับต่างๆ รวมทั้งทดสอบคุณสมบัติเชิงหน้าที่โดยศึกษาคุณสมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทและความขมของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทได้แก่ การใช้ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสที่ร้อยละ 0.3 และปริมาณเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ร้อยละ 0.5

4.3 คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีนที่ใช้เอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 0.5

จากผลการทดลองที่ได้จากข้อ 4.2 ดังกล่าว ทำให้สามารถเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่เหมาะสม ที่จะนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหัวปลาซาร์ดีน เพื่อที่จะนำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสปลาในการผลิตซอสชนิดข้น

เมื่อทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยเลือกใช้สภาวะในการผลิตที่มีความเหมาะสมจากข้อ 4.2 แล้วนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและทางกายภาพได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน ความเป็นกรด-ด่าง และค่าสี (ตารางที่ 4.3) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อนมีกลิ่นคล้ายปลาหมึกแห้งซึ่งมีค่า L* a* และ b* เท่ากับ 66.7 +4.1 และ +25.49 ตามลำดับ และมีปริมาณความชื้นคิดเป็น ร้อยละ 6.7 ปริมาณโปรตีนเป็นร้อยละ 63.20 ปริมาณไขมันเป็นร้อยละ 4.3 ตามลำดับ

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จะเห็นว่ามีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงสามารถใช้เป็นส่วนผสมเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหารจำพวกโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆได้ดี นอกจากนี้พบว่าปริมาณไขมันในโปรตีนไฮโดรไลเซทเมื่อเทียบกับปริมาณไขมันในวัตถุดิบจะมีปริมาณน้อยลงเนื่องจากไขมันส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกไปพร้อมกับโปรตีนที่ไม่ละลายได้ (insoluble protein) ในกระบวนการปั่นเหวี่ยงโดยใช้เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ซึ่งการที่โปรตีนไฮโดรไลเซทมีปริมาณไขมันน้อย จะส่งผลทำให้อายุการเก็บรักษาของโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นเกิดการเสื่อมเสียเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นน้อยลงทำให้สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น (Synowiecki and Al-Khateeb, 2000 ; Diniz and Martin, 1997)

ตารางที่ 4.3 คุณภาพทางเคมีและทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 0.3 และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ร้อยละ 0.5

คุณภาพทางเคมีและทางกายภาพ		
ค่าสี[1]	L*	66.7
	a*	+4.1
	b*	+25.49
ความเป็นกรด-ด่าง		7.2
ปริมาณความชื้น (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		6.7
ปริมาณโปรตีน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		63.20
ปริมาณไขมัน (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		4.3
ปริมาณคาร์โบไฮเดรต (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		19.0
ปริมาณเถ้า (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)		6.8

[1] L* แสดงถึง ความสว่าง (0 = สีดำ 100 = สีขาว)

a* แสดงถึง ช่วงสีแดงถึงช่วงสีเขียว (+ = สีแดง - = สีเขียว)

b* แสดงถึง ช่วงสีเหลืองถึงช่วงสีน้ำเงิน (+ = สีเหลือง - = สีน้ำเงิน)

4.4 การประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากหัวปลาซาร์ดีนในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นปลาในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น โดยแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 3 4 5 6 และ 7 ของน้ำหนักสูตร แล้วทำการศึกษาคุณภาพด้านสี ความหนืด และปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ที่ได้

จากตารางที่ 4.4 พบว่า ค่าสีของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่มีการแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทในปริมาณต่างๆกัน มีแนวโน้มสูงขึ้นตามร้อยละของปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยมีค่า L* อยู่ระหว่าง 94.91 ถึง 96.17 ค่า a* อยู่ระหว่าง +0.28 ถึง +0.37 และค่า b* อยู่ระหว่าง +1.70 ถึง +1.84 ทั้งนี้เนื่องจากสีของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อน จึงมีผลทำให้ค่าสี โดยเฉพาะค่า a* เป็นบวกเพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึง มีสีแดงเข้มขึ้นและค่า b* เป็นบวกเพิ่มขึ้นซึ่งหมายถึงมีสีเหลืองที่เพิ่มขึ้นดังนั้นจึงมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ซอสปลาที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มขึ้นตามปริมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.4 คุณภาพทางด้านสีของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่แปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซท (ร้อยละ)	ค่าสี[1]		
	L*	a*	b*
3	94.91^{d}	$+0.28^{c}$	$+1.70^{c}$
4	95.35^{f}	$+0.28^{c}$	$+1.74^{d}$
5	95.74^{c}	$+0.33^{b}$	$+1.79^{b}$
6	96.04^{b}	$+0.36^{a}$	$+1.77^{c}$
7	96.17^{a}	$+0.37^{a}$	$+1.84^{a}$

[1] L* แสดงถึง ความสว่าง (0 = สีดำ 100 = สีขาว)

a* แสดงถึง ช่วงสีแดงถึงช่วงสีเขียว (+ = สีแดง - = สีเขียว)

b* แสดงถึง ช่วงสีเหลืองถึงช่วงสีน้ำเงิน (+ = สีเหลือง - = สีน้ำเงิน)

[a, b, c ...] ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.5 แสดงค่าความหนืดและปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่มีการแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นร้อยละ 3 4 5 6 และ 7 พบว่าค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีค่าเป็น 12,458 12,457 12,459 12,458 และ 12,458 เซ็นติพอยส์ตามลำดับ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทในผลิตภัณฑ์ซอสจึงไม่มีผลต่อค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ และพบว่าค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีค่าใกล้เคียงกันกับค่าความหนืดของผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดซึ่งมีค่าเท่ากับ 17,953 เซ็นติพอยส์และเมื่อนำไปตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น ที่มีการแปรปริมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นปริมาณต่างๆ พบว่ามีค่าเท่ากับ ร้อยละ 2.13 2.25 2.34 2.39 และ 2.46 ตามลำดับ ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 4.5 คุณภาพด้านความหนืดและปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่แปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ

ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซท (ร้อยละ)	ความหนืด^{ns} (เซ็นติพอยส์)	ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)
3	12458	2.13^{e}
4	12457	2.25^{d}
5	12459	2.34^{c}
6	12458	2.39^{b}
7	12458	2.46^{a}

$^{a, b, c \ldots}$ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \le 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

การทดสอบการยอมรับของผู้ทดสอบต่อผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่แปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยการนำซอสชนิดข้นที่ได้มาเป็นส่วนผสมในการทำหมูผัดซอส แล้วให้ผู้ทดสอบจำนวน 25 คน ชิมผลิตภัณฑ์ที่ได้ ใช้แบบทดสอบชนิด Hedonic scale ประเมินความชอบในด้าน สี กลิ่น รส ความหนืด และความชอบโดยรวม จากนั้นนำผลแบบทดสอบที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ด้วยโปรแกรม SPSS version 12 (ตารางที่ 4.6) ซึ่งพบว่าความชอบทางด้านสี ความหนืด และกลิ่นของผลิตภัณฑ์ซอสปลาชนิดข้นที่มีการแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แสดงว่าการเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทในผลิตภัณฑ์ซอสไม่มีผลต่อความชอบทางด้าน สี ความหนืด และกลิ่น ในตัวอย่างที่ทดสอบ ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่แปรปริมาณในผลิตภัณฑ์ซอสมีปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับปริมาณของส่วนผสมทั้งหมด จึงมีผลทำให้ผู้ทดสอบไม่สามารถรู้สึกถึงความแตกต่าง นอกจากนี้ยังพบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบทางด้านรสชาติค่อนข้างสูง โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 6.76 ถึง 7.48 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาอาจมีสารช่วยเพิ่มกลิ่นรสให้มีมากขึ้น

ดังนั้นจากการที่ความชอบของผู้บริโภคในด้านรสชาติและกลิ่นมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเมื่อแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทในซอสเพิ่มขึ้น จึงส่งผลทำให้มีคะแนนความชอบโดยรวมมีค่าเฉลี่ยค่อนข้างสูง และพบว่าการเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นปริมาณที่

เหมาะสมในการทำซอสปลาชนิดข้น เนื่องจากพิจารณาการยอมรับทางด้านรสชาติและความชอบโดยรวมซึ่งมีคะแนนเฉลี่ยมากที่สุด

ตารางที่ 4.6 การยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของซอสชนิดข้นที่แปรร้อยละของโปรตีนไฮโดรไลเซทในปริมาณต่างๆ

ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซท (ร้อยละ)	คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส				
	สี^{ns}	ความหนืด^{ns}	รสชาติ	กลิ่น^{ns}	ความชอบโดยรวม
3	7.08	6.2	6.56^{bc}	5.64	6.44^{c}
4	6.92	6.6	6.48^{c}	5.76	6.6^{bc}
5	6.2	6.4	7.48^{a}	6.08	7.36^{a}
6	7.12	6.16	7.4^{ab}	6.12	7.24^{ab}
7	6.72	6.08	6.76^{abc}	6.24	6.8^{abc}

$^{a, b, c \ldots}$ ตัวอักษรต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

4.5 คุณภาพของซอสชนิดข้นที่ได้จากการเติมโปรตีนไฮโดรไลเซท

จากผลการทดลองทำให้สามารถเลือกผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความเหมาะสมได้แก่ร้อยละ 5 โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะที่ดีของซอสปลาได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ ความหนืด และความชอบโดยรวม อีกทั้งยังมีปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม (ตารางที่ 4.5 และ 4.6) ดังนั้นจึงได้เลือกซอสชนิดข้นที่มีปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็น ร้อยละ 5 มาศึกษาคุณภาพโดยเปรียบเทียบซอสปลาชนิดข้นที่ได้กับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมที่มีจำหน่ายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาด ได้แก่

4.5.1 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณภาพทางเคมีของซอสชนิดข้นที่ผลิตได้

จากตารางที่ 4.7 เป็นคุณภาพทางกายภาพและเคมีของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับซอสหอยนางรม เมื่อพิจารณาค่าสีที่วัดได้ในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น พบว่ามีค่า L* เท่ากับ 95.74 a* เท่ากับ +0.33 และ b* เท่ากับ +1.79 ส่วนในผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม มีค่าดังนี้ L* เท่ากับ 97.09 a* เท่ากับ +0.33 และ b* เท่ากับ +1.94 ตามลำดับ

เมื่อศึกษาปริมาณความชื้นของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น โดยเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม พบว่าผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น มีปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ 82.32 ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม มีปริมาณความชื้นเท่ากับร้อยละ 80.33 ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีปริมาณความชื้นมากกว่าผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมซึ่งเป็นผลมาจากผลิตภัณฑ์ซอสชนิด

ข้นมีปริมาณน้ำในสูตรมากกว่าและมีความหนืดน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม เมื่อศึกษาค่าความหนืดซึ่งมีหน่วยเป็น เซ็นติพอยส์ (cps) พบว่าในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีค่าความหนืดเป็น 12,458 เซ็นติพอยส์ ในขณะที่ซอสหอยนางรมมีค่าความหนืดเป็น 17,953 เซ็นติพอยส์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำในสูตรของการทำซอสชนิดข้นมีสัดส่วนมากกว่ารวมทั้งคุณสมบัติของสารข้นหนืด (thickener) ที่ใช้มีความแตกต่างกันจึงส่งผลทำให้ค่าความหนืดที่ได้มีค่าน้อยกว่าซอสหอยนางรม และเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม จะพบว่าค่าสีและความหนืดของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมทั่วไป

ตารางที่ 4.7 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของซอสชนิดข้นที่ผลิตได้โดยเปรียบเทียบกับซอสหอยนางรมที่วางจำหน่ายในท้องตลาด

องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพ	ซอสชนิดข้น	ซอสหอยนางรม	
		ตามท้องตลาด	มาตรฐาน มอก.
ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)	2.34	3.66	-
ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)	4.3	0.19	-
ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)	82.32	80.33	-
ความเป็นกรด-ด่าง	5.2	4.99	ไม่น้อยกว่า 4.4
ความหนืด (เซ็นติพอยส์)	12,458	17,953	ไม่เกิน 18,000
ค่าสี			
L*	95.74	97.09	-
a*	+0.33	+0.33	-
b*	+1.79	+1.94	-

[1] L* แสดงถึง ความสว่าง (0 = สีดำ 100 = สีขาว)

a* แสดงถึง ช่วงสีแดงถึงช่วงสีเขียว (+ = สีแดง - = สีเขียว)

b* แสดงถึง ช่วงสีเหลืองถึงช่วงสีน้ำเงิน (+ = สีเหลือง - = สีน้ำเงิน)

จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีปริมาณเท่ากับ ร้อยละ 2.34 ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม ไม่พบปริมาณโปรตีนหรือมีปริมาณน้อยกว่าร้อยละ 1 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมันของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมจะพบไขมันในปริมาณที่เท่ากันคือ น้อยกว่าร้อยละ 1 หรือไม่พบไขมันในผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งตามมาตรฐานมาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิต (มอก.) ไม่ได้กำหนดปริมาณของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรม (เกณฑ์คุณภาพของซอสหอยนางรมตามมาตรฐาน มอก. 1317-2538)

4.5.2 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของซอสชนิดข้นที่ผลิตได้

จากตารางที่ 4.8 เป็นการเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับซอสหอยนางรมตามมาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิต (มอก.) เพื่อศึกษาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์รา พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้ของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นมีปริมาณ $4.3x10^{2}$ โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับมาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิต หรือ มอก. แล้วจะพบว่าปริมาณ จุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นอยู่ในเกณฑ์คุณภาพของ มอก. ซึ่งกำหนดไว้ว่าต้องมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน $1x10^{4}$ โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง (เกณฑ์คุณภาพของซอสหอยนางรมตามมาตรฐาน มอก. 1317-2538)

ส่วนปริมาณยีสต์และรา พบว่าตรวจพบในปริมาณต่ำกว่า 10 โคโลนีต่อกรัม ซึ่งเกณฑ์คุณภาพของมาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิต หรือ มอก. ได้กำหนดเกณฑ์ไว้ว่าจะต้องพบปริมาณยีสต์และรา ในปริมาณที่น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง แสดงว่าปริมาณยีสต์และราที่ตรวจพบในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นนั้นอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ (เกณฑ์คุณภาพของซอสหอยนางรมตามมาตรฐาน มอก. 1317-2538)

ตารางที่ 4.8 *เกณฑ์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นกับเกณฑ์คุณภาพของซอสหอยนางรม มอก. 1317-2538*

คุณภาพทางจุลินทรีย์	ซอสชนิดข้น	ซอสหอยนางรม
ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง)	$4.3x10^{2}$	ไม่เกิน $1x10^{4}$
ปริมาณยีสต์รา (โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง)	น้อยกว่า 10	น้อยกว่า 10

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ซอสที่ผลิตได้ เมื่อนำมาเปรียบเทียบคุณภาพกับซอสหอยนางรมที่จำหน่ายตามท้องตลาด รวมทั้งเกณฑ์มาตรฐานอุตสาหกรรมการผลิต หรือ มอก. แล้วพบว่ามีความใกล้เคียงกันและคุณภาพโดยรวมผ่านเกณฑ์ตามที่กฎหมายกำหนดไว้ ดังนั้นหากมีการนำไปปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ดีขึ้น ก็น่าจะสามารถผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ที่จะทำให้สามารถเพิ่มความหลากหลายให้กับผู้บริโภค

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของหัวปลาซาร์ดีนซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต เถ้า เป็นร้อยละ 51.03 18.29 9.28 2.27 และ 16.16 ตามลำดับ เมื่อนำหัวปลาซาร์ดีนไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสและเอนไซม์ฟลาโวไซม์ พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ที่ปริมาณความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ของปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง จะได้ปริมาณโปรตีนและปริมาณ yieldสูงที่สุด ได้แก่ ร้อยละ 63.20 และ 55.07 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะที่เหมาะสมของการใช้เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลอ่อน โดยมีค่าสี L* a* และ b* เป็น 66.7 +4.1 และ +25.49 ตามลำดับ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 ส่วนปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และ เถ้า พบว่ามีปริมาณร้อยละ 6.7 63.20 4.3 19.0 และ 6.8 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ และจากการศึกษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทพบว่า มีคุณสมบัติในการละลายน้ำที่ดี

จากการประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ความเข้มข้นต่างๆในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นแล้วนำเอาผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสพบว่า ความชอบทางด้านสี กลิ่น และความหนืดของซอสชนิดข้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) แต่ความชอบในด้านรสชาติ และความชอบโดยรวมของการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทร้อยละ 5 ในผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับมากที่สุด และจากการวิเคราะห์คุณภาพของซอสชนิดข้นที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทร้อยละ 5 พบว่ามีความหนืดเท่ากับ 12,458 เซ็นติพอยส์ ค่าสี L* a* และ b* เท่ากับ 95.74 +0.33 และ +1.79 ตามลำดับ และองค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน มีปริมาณร้อยละ 82.32 2.34 และ น้อยกว่า 1 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ซอสหอยนางรมที่จำหน่ายตามท้องตลาด คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ของซอสชนิดข้นตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดเท่ากับ $4.3\text{x}10^2$ โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง และปริมาณยีสต์รา น้อยกว่า 10 โคโลนีต่อกรัมตัวอย่าง ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน มอก.1317-2538

ข้อเสนอแนะ

1. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้อาจนำเอาไปประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสม เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารทารก บะหมี่กึ่งสำเร็จรูป โจ๊ก เป็นต้น
2. โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้สามารถนำเอาไปประยุกต์ใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น ขนมขบเคี้ยว ผงปรุงรสสำเร็จรูป
3. ในการเก็บรักษาโปรตีนไฮโดรไลเซทควรเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำและบรรจุในถุงที่มีคุณสมบัติป้องกันการซึมผ่านของออกซิเจนและป้องกันแสงได้ดี เพื่อป้องการเหม็นหืนเนื่องจากแสงและอากาศ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2534. *คอลลอยด์*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บุศราภา โรจนสุนทร และ ปราณี อ่านเปรื่อง. 2536. *รายงานการวิจัยเรื่องการย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เอนไซม์ปาเปนและนิวเตรส*. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. *เอนไซม์ทางอาหารตอน 1*. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2540. *จุลชีววิทยาประมง ห้องปฏิบัติการและวิธีการตรวจวิเคราะห์*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และทิพรัตน์ หงภัทรคีรี. 2541. *รายงานการวิจัยเรื่องการสกัดแยกเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า*. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไพรัตน์ โสภโณดร. 2532. การผลิตเปปโทนจากหัวกุ้ง. *อาหารและอุตสาหกรรมเกษตร* 3(1): 22-35.

พิชญา ชินอุปราวัฒน์. 2539. *การผลิตเปปโตนจากปลาดุกบิ๊กอุยและจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาดุกบิ๊กอุย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วรพงษ์ อัศวเกศมณี. 2538. *การผลิตเปปโทนจากหัวกุ้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วันชัย วรวัฒนเมธีกุล. 2545. การผลิตซอสปรุงรสกุ้ง. *สัตว์น้ำเศรษฐกิจ* 37: 97-100.

วิกรมนัส เอื้อทูทิช. 2546. *การศึกษาการสร้างกรดไขมัน EPA (Eicosapentaenoic acid) และ DHA (Docosahexaenoic acid) ของ Shewanella putrefaciens เมื่อเลี้ยงในน้ำที่ได้จากขั้นตอนการแยกน้ำมันออกจากน้ำของโรงงานผลิตน้ำมันปลาทูน่า*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิสิฐ จะวะสิต. 2532. การประยุกต์ใช้สารสกัดจากเปลือกของปูและกุ้งในอุตสาหกรรมอาหาร. *การประมง* 42(6): 463-467.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล และ ไพรัตน์ โสภโณดร. 2533. การผลิตไคโตแซนจากเปลือกกุ้งแชบ๊วย. *สงขลานครินทร์* 12(4): 431-437.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล, ไพรัตน์ โสภโณดร และพรชัย ศรีไพบูลย์. 2541. *รายงานการวิจัยเรื่องการใช้ประโยชน์เศษเนื้อปลาทูน่าในการผลิตแฮมปลา*. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวิทย์ สุวรรณโณ. 2541. *รายงานการวิจัยเรื่องการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำเสียของกระบวนการผลิตปลาทูน่ากระป๋อง*. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลนครศรีธรรมราช.

อรัญ หันพงษ์กิตติกูล, ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี และปิยรัตน์ ธนโกเศศ. 2541. *รายงานการวิจัยเรื่อง การย่อยสลายโปรตีนของหัวปลาทูน่าด้วยเอนไซม์โปรตีนที่ผลิตทางการค้า*. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic hydrolysis of protein for increased solubility. *J. Food chem*. 24: 105-109.

Adler-Nissen, J. 1997. Mung-bean protein isolates were hydrolysed by two proteases alcalase and neutrase. *Food Sci. and Technol*. 11: 281-287.

AOAC. 1995. *Offical Method of the Association of Offical Analytical Chem*ists. 14th ed. Washington D.C.

Bailey, J. 1967. *Techniques in Protein Chemistry*. 2nd ed. New York: Elsevier Publishing Company.

Bender, E. 1975. *Dictionary of nutrition and Food Technology*, pp. 250. 4th ed. London: The Whitefriars Press Ltd.

Brody, J. 1965. *Fishery By-Product Technology*, pp 232. Connecticut: The AVI publishing Company Inc.

Chhuy, L.C. and Day F. 1978. Protein hydrolysate from Chicken were hydrolysed by protease. *J. Food Science*. 21: 564-580.

Clausen, E., Gildberg, A. and Raa, J. 1985. Preparation and testing of an autolysate of fish viscera as growth substrate for bacteria. **App. and Envir. Mic**. 50(6): 1556-1557.

Diniz, A.M. and Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the htdrolysates. *Inter. J.Food Sci. and Nutri*. 48: 191-200.

Fingerman, M. and Nagabhushanam, R. 2002. Fish Protein Hydrolysates and their Potential Use in the Food Industry. *Recent Advances in MarineBiotechnology.V.7: Seafood Safety & Human Health*. 1: 157-182.

Gildberg, A. 1993. Enzymatic processing of marine raw materials. *Process Biochem*. 28: 1-15.

Green, J.H. and Mattick, J.F. 1979. Fishery waste management. In: *Food processing waste management*, pp. 208-210. USA: Finishing News Books.

Greenberg, N.A. and Ship W.F. 1979. Comparison of abilities of TCA, picric, sulphosalicylic and tungstic acids to precipitate protein hydrolysates and proteins. *J. Food Sci.* 44: 735-737.

Hajjou, M. and Yves, L. 1993. Immobilization of tuna pancrease aminopeptidase on solid supports. *J. Marine Biotechnol.* 1: 51-54.

Hall, GM. And Ahmad, N.H. 1992. Functional properties of fish protein hydrolysates. In: *Fish processing Technol*, pp. 249-274. New York: Pergamon Press.

Hartley, B.S. 1960. Proteolytic enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 29: 45 – 72.

http://www.elib-online.com/doctors/food_fishoil2.html

http://folding.stanford.edu/education/Assets/protein

http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/amino.html

http://lib.src.ku.ac.th

http://oregonstate.edu/instruction/bb450/lecturenoteskevin/proteinstrutureIoutline.html

http://oregonstate.edu/instruction/bb450/stryer/ch03/Slide35.jpg

http://www.pharm.chula.ac.th/osotsala/botanay-food/sub5_3.htm

http://www.bioinfo.org.cn

http://www.bioinfo.org.cn/lectures/index-90.html

http://www.biologydaily.com/biology/upload/c/c5/Amino_acids_2.png

http://www.bmp.psu.edu/courses/bmb211/pratt/krebs2.html

http://www.chemguide.co.uk/organicprops/aminoacids/hydrolprotein

http://www.dumex.co.th/index.php/consumer/childdev/foundation/nutrition/66

http://www.people.virginia.edu/~rjh9u/gif/ahelixgarrett.gif

http://www.people.virginia.edu//~rjh9u/gif/bsheetgarrett.gif

http://www.thaifitway.com/Education/Ndata/N3db/question.asp?QID=15

http://203.151.85.13/newirp/02plan/plan-branch01-3.html

Ishida, M.J., Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1979. Protein hydrolysates from chicken's bone wastes. *J. Agric. Food Chem.* 45 : 3423-3430.

Jenkins, K.J., Emmons, D.B., Larmond, E. and Sauer, F.D. 1982. Soluble partially hydrolysed fish protein concentrate in calf milk replacers. *J. Darily Sci.* 65: 784.

Jissim, O.J. 1988. Enzymic processing of marine raw material. *Process Biochem.* 28 : 1-15.

Kier, L.B. and Pharm, J. 1972. A molecular theory of sweet taste. *J. Food Sci.* 61(9): 1394-1397.

Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T. And Katsuya, N. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. *Food Chem.* 17: 4.

Knorr, D. 1982. Functional properties of chitin and chitosan. *J. food sci.* 47: 593-595.

Lancet, M.J. 1989. Effects of omega-3 on the human health. *J. food chem.* 32: 87-95.

Light, A. and Smith, E.L. 1963. Method of protein hydrolysis. In: *The Protein (Composition, Structure and Function)*, pp. 32-39. London: Acadamic Press.

Loffler, A. 1986. Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol.* 40: 63-70.

Mackie, J.M. 1974. Proteolytic enzymes in recovery of protein from fish waste. *Process Biochem.* 9: 12-14.

Maurin, C. and Yves, L. 1996. Characterization of hydrophobic esterase from tuna (*Thunnus albacora*) pyloric caeca. *J. Marine Biotechnol.* 4: 87-90.

Medaheva, K., Gopakumar, K., Shenoy, A.V., James, M.A. and Nair, M.R. 1978. Peptone from threadfin bream (Nemipterus japonicus Block). In: *Preparation and suitability as microbiology growth media*, pp. 523-526. Philippines.

Metoba, M. and Hata, T. 1972. Relationship between bitterness of peptide and their chemical structure. *Agr. Biol.Chem.* 36(8): 1423-1431.

Mohr, V. 1988. Fish protein concentrated production by enzymatic hydrolysis. In: *Biochemical Aspects of New Protein Food*, pp. 53-62. Oxford: Pergamon.

Noguchi, M., Yamashita M., Arai, S. and Fujimaki, M. 1975. On the bitter masking activity of a glutamic acid-rich oligopeptide fraction. *J. Food Sci.* 40: 367-369.

Ockerman, H.W. 1992. Fishery by-products. In: *Fish Processing Technology*, pp. 155-192. New York: Van Nostrand Reinhold.

Olcott, H.S. and Fraenkel, C.H. 1974. Specific group reagents for proteins. *Chem. Rev.* 41: 151–197.

Peterson, J. 1974. *Encyclopedia of Food Technology*. New York: Van Nostrand reinhold company.

Poulter, R.G. and Disney, J.R. 1978. Preparation of protein concentrates from waste fish. In: *Proceeding of the 18th Symposium on fish Utilization Technology and Marketing in the IPFC region*, pp. 559-571. Philippines.

Quaglia, G.B. and Orban, E. 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysate from sardine (*Sadina pilchardus*). *J. Food Sci.* 38: 271-276.

Rebeca, B.D., Pena-Vera, M.T. and Diaz-Castaneda, M. 1991. Production of fish protein hydrolysates with bacterial protease ; yield and nutritional value. *J. Food Sci.* 56 : 309-314.

Rutman, M. 1974. The Economic Marketing and Technology of fish Protein Concentrate. In: *The Fish protein Hydrolysate Process*, pp. 164. London: Blackie Academic & Professional.

Sanguandeekul, R., Jantawat, P. and Sukchaaroensakkul, A. 1982. *Production of Protein Hydrolysis as food Flavour from Tuna Precooking Water.* M.D.thesis. Chulalongkorn University.

Smine, A., Guerard, F. and Yves, L. 1993. Purification and characterization of pancreatic elastase from tuna (*Thunnus albacora*). *J. Marine Biotechnol.* 1: 41-46.

Surowka, K. and Fik, M. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads: II. *J. Food Sci.* 46:625-642.

Suthasinee, N., Sittiwat, L., Manop, S. and Apinya, A. 2003. *Food Industry and fermented foods and related waste treatment in Thailand.* Department of biotechnology. Faculty of Science. Mahidol University.

Synowiecki, J. and Al-Khateeb, N. 2000. The recovery of protein hydrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Cragon crangon* processing discard. *Food Chem.* 68: 147-152.

Tanenbaum, S.R., Ahmad, M. and Bates, R.P. 1970. Solubilisation of fish protein concentrate. *Food Technol.* 24: 604-608.

Vechit-Lifshitz R.E., Martin, G.J. and Flick, C.E. 1990. Modification of fishery by-products. In: *Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products.* pp. 447-452. London: AVI Publ., CT.

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น

1. การวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด

เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตต์สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA) และทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส มาทำ pour plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนีรายงานผลเป็นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในรูปโคโลนีต่อกรัม

การคำนวณ

จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x dilution factor
(โคโลนีต่อกรัม)

2. การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา

เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น จนได้ความเจือจางที่เหมาะสม ปิเปตต์สารละลายที่ระดับความเจือจางที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำการหลอมอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และทิ้งไว้ให้มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส มาทำ spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยเลือกนับเฉพาะที่มีโคโลนีอยู่ในช่วง 25-250 โคโลนีรายงานผลเป็นจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในรูปโคโลนีต่อกรัม

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม

2. Yeast Mold Agar (YMA)

Yeast extract	3.0	กรัม
Malt extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางเคมีของผลิตภัณฑ์ซอสปลาชนิดข้น

1. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น วิเคราะห์ตาม AOAC (2000)

   1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

      1.1.1 ตู้อบลมร้อน

      1.1.2 เดซิเคเตอร์

      1.1.3 ปากคีบ

      1.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

      1.1.5 ภาชนะอลูมิเนียม

   1.2 วิธีการวิเคราะห์

อบจานอลูมิเนียมพร้อมด้วยฝาปิดในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5 ชั่วโมง นำมาใส่โถอบแห้ง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อเย็นนำไปชั่งเพื่อให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน ชั่งตัวอย่างในจานอะลูมิเนียมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอนปริมาณ 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) นำตัวอย่างไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาใส่โถอบแห้ง ทิ้งไว้ให้เย็น และนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำตัวอย่างไปอบซ้ำอีก ชั่งจนได้น้ำหนักคงที่ คำนวณตามสูตร

   1.3 คำนวณ

ปริมาณความชื้น (ร้อยละ) = $\frac{100(W1-W2)}{W1-W}$

โดย W คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียม (กรัม)

W1 คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักของจานอลูมิเนียมและตัวอย่างหลังจากอบแห้งแล้ว (กรัม)

2. การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยใช้ Soxlet method

   2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

      2.1.1 เครื่องสกัดไขมัน Soxthern apparatus

      2.1.2 ทิมเบิล

      2.1.3 กระดาษกรอง

      2.1.4 เดซิเคเตอร์

      2.1.5 บีกเกอร์ของชุด Soxthern

2.1.6 ปากคีบ

2.1.7 ตู้อบลมร้อน

2.1.8 เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

2.2 สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์

2.3 วิธีการวิเคราะห์

เตรียมตัวอย่าง นำไปใส่ในถาดอะลูมิเนียมฟอยด์ อบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่างประมาณ 2-5 กรัม บนกระดาษกรอง (whatman No.1) และห่อให้มิดชิด จากนั้นนำมาใส่ในทิมเบิล (thimbles 26x60 mm.) แล้วนำทิมเบิลไปใส่ใน soxtee system โดยใช้ adapter สวม เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) ลงในถ้วยอะลูมิเนียม (extraction cups) ที่นำไปอบและชั่งน้ำหนักแล้วประมาณ 50-75 มิลลิลิตร นำเข้าไปใน soxtee system HT พร้อมทั้งโยกคันโยกลง เลื่อนคันโยกไปที่ตำแหน่ง boiling และสกัดเป็นเวลา 15-20 นาที จากนั้นเลื่อนคันโยกมาที่ตำแหน่ง rinsing ทำการกลั่ว เป็นเวลา 30-45 นาที จากนั้นระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์พร้อมกับปิด condensers valve และเปิดสวิทซ์ของอากาศ แล้วนำถ้วยอะลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งให้เย็นในโถอบแห้ง ชั่งน้ำหนัก คำนวณตามสูตร

2.4 คำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{W2-W1}{W} \times 100$$

โดย W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

W1 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมและไขมันที่สกัดได้จากตัวอย่าง (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Kjeltee system I

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 เครื่องย่อย (digestion system 1007)

3.1.2 เครื่องกลั่น (Kjeltee 1026 distilling unit)

3.1.3 หลอดย่อย (digestion tube) ขนาด 250 มิลลิลิตร และ tube stand

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 วิธีการย่อย

ชั่งตัวอย่างน้ำหนักแน่นอน 2-5 กรัม ใส่ในหลอดย่อย เติมสารคอปเปอร์ซัลเฟตและไดโพแทสเซียมซัลเฟตในอัตราส่วน 1 : 1 เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้นประมาณ 30

มิลลิลิตร เขย่าเบาๆตั้งหลอดย่อยบน stand สวมชุดดูดควันลงในเครื่องย่อยที่ตั้งอุณหภูมิ 520 องศาเซลเซียส ย่อยเป็นเวลา 30-45 นาที จนสารละลายใส ทิ้งให้เย็น

3.2.2 วิธีการกลั่น

นำขวดแก้วรูปชมพู่ซึ่งบรรจุกรดบอริก 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด จนมีสีชมพู นำไปวางที่ตำแหน่งในเครื่องกลั่น และเลื่อนฐานขุ้นให้ปลายแท่งแก้วจุ่มในสารละลาย ใส่หลอดย่อยในเครื่องกลั่น ปิดหน้าต่างป้องกัน และดึงคันโยกให้ต่ำลง เปิดไอน้ำโดยเลื่อนคันโยกของไอน้ำไปที่ตำแหน่งเปิด ตั้งเวลาที่ใช้ในการกลั่น เมื่อกลั่นเสร็จจะได้สารละลายซึ่งเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียว เลื่อนคันโยกของไอน้ำไปอยู่ในตำแหน่งปิด เลื่อนหน้าต่างป้องกันขึ้น ถอดหลอดย่อยออก ไตเตรทสารละลายที่กลั่นได้ด้วยสารละลายมาตรฐานกรดไฮโดรคลอคริก 0.2 นอร์มัล จนถึงจุดยุติ ซึ่งได้สารละลายสีชมพู

3.3 คำนวณ

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(A-B)\times 14\times N\times 100}{1000\times W}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} \times 6.25$$

โดย A คือ ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B คือ ปริมาตรกรดที่ใช้ในการไตเตรตกับ blank (มิลลิลิตร)
N คือ ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ในการไตเตรต (นอร์มัล)
W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

4. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า วิเคราะห์ตาม AOAC (1995) โดยใช้ชุดเครื่องมือ Muffle furnace

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เตาเผา Muffle furnace

4.1.2 Porcelain crucible

4.1.3 Desicator

4.2 วิธีการวิเคราะห์

4.2.1 ชั่งตัวอย่างอาหารให้ได้น้ำหนัก 2-5 กรัม ใส่ใน crucible ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาใน hood จนหมดควัน (ถ้าตัวอย่างเป็นของเหลวให้นำไปทำให้แห้งบนหม้อต้มน้ำปรับอุณหภูมิได้ก่อน) แล้วจึงนำไปเผาต่อในเตาเผาที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 500 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเถ้าเป็นสีขาว (ประมาณ 3-4 ชั่วโมง)

4.2.2 นำไปทำให้เย็นใน desicator แล้วชั่งน้ำหนักของสารที่เหลือเป็นน้ำหนักของแร่ธาตุหรือเถ้า แล้วคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์

4.3 คำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{W2-W1}{W} \times 100$$

โดย W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

W1 คือ น้ำหนักของ crucible (กรัม)

W2 คือ น้ำหนักของ crucible และน้ำหนักเถ้าภายหลังการเผา (กรัม)

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์คุณลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ซอส

1. การวิเคราะห์ค่าสี L* a* และ b*

1.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดสี Minolta รุ่น CR-300

1.2 วิธีการ

1.2.1 เทียบมาตรฐาน (standardize) เครื่อง โดยใช้ standard wgite plate

1.2.2 วัดค่าตัวอย่างอ้างอิงและกำหนดค่าต่างๆของตัวอย่าง

1.2.3 นำตัวอย่างใส่ถ้วยแก้ว นำมาวัดค่าสี โดยค่าสีที่ได้จะปรากฏให้ทราบบนหน้าจอคอมพิวเตอร์เป็นค่า L* a* และ b*

2. การวัดความหนืด

2.1 อุปกรณ์

เครื่อง Brookfield Digital Viscometer Model DV-II+

2.2 วิธีการ

2.2.1 ปรับระดับของเครื่องให้อยู่ในแนวระนาบ โดยปรับที่ขาทั้งสองข้าง จนกระทั่งลูกน้ำอยู่จุดกึ่งกลาง

2.2.2 ต่อสาย Power ของเรื่อง viscometer กับไฟฟ้า 220 โวลท์ 50 เฮิร์ท

2.2.3 ให้สำรวจดูว่าที่ชุด spindle ฝาครอบปิดอยู่หรือไม่ หากมีให้ถอดคดก

2.2.4 เปิดสวิท์ชที่ด้านหลังเครื่องให้อยู่ที่ตำแหน่งเปิด (I) ที่หน้าจอจะปรากฏข้อความดังรูป

BROOKFILED DV – 1 +	
RV	VISCOMETER

2.2.5 จากนั้นประมาณ 2-3 วินาที ก็ปรากฏข้อความดังรูป

BROOKFILED DV – 1 +
VERSION 5.0

2.2.6 และจากนั้นจะปรากฏข้อความ

REMOVE SPONDLE
PRESS ANY KEY

ขณะนี้ถ้าหากมีเข็ม spindle ติดตั้งอยู่ให้ถอดเข็มออก แล้วจากนั้นกดปุ่มใดๆ 1 ครั้ง

2.2.7 จากข้อ 6 ที่หน้าจอจะมีข้อความ “AUTOZERO” กระพริบ นั้นหมายความว่า ขณะนี้เครื่องกำลังปรับค่า zero ของเครื่องก่อนจะทำการวัดค่าตัวอย่าง

2.2.8 หลังจากเครื่องทำ zero ประมาณ 10 – 15 วินาที ก็จะปรากฏข้อความ

REPLACE SPINDLE
PRESS ANY KEY

ขณะนี้ให้นำเข็ม spindle มาติดตั้ง แต่จะต้องเลือกขนาดของเข็ม spindle ให้เหมาะกับค่า viscometer ของตัวอย่าง ซึ่งเข็ม spindle มีทั้งหมด 7 เข็ม ให้ดูตารางข้างล่าง

SPINDLE	CODE	SMC
RV1	01	1
RV2	02	4
RV3	03	10
RV4	04	20
RV5	05	40
RV6	06	100
RV7	07	400
HA1	01	1
HA2	02	4
HA3	03	10
HA4	04	20
HA5	05	40
HA6	06	100

SPINDLE	CODE	SMC
HB2	02	4
HB3	03	10
HB4	04	20
HB5	05	40
HB6	06	100
HB7	07	400
LV1	61	604
LV2	62	32
LV3	63	128
LV4	64	640
LV5	65	1280
SPIRAL	70	105

SPINDLE	CODE	SMC
T-A	91	20
T-B	92	40
T-C	93	100
T-D	94	200
T-E	95	500
T-F	96	1000

SPINDLE	CODE	SMC
ULA	00	0.64
DIN-ULA	85	1.22
TSEL-DIN-81	81	3.7
SSA-DIN-82	82	3.75
SSA-DIN-83	83	12.09
ULA-DIN-85	85	1.22
ULA-DIN-86	86	3.65
ULA-DIN-87	87	12.13
SC4-14	14	125
SC4-15	15	50
SC4-16	16	128
SC4-18	18	3.2
SC4-21	21	5
SC4-25	25	512
SC4-27	27	25
SC4-28	28	50
SC4-29	29	100
SC4-31	31	32
SC4-34	34	64
SC4-37	37	25
CPE40	40	0.327
CPE41	41	1.228
CPE42	42	0.64
CPE51	51	5.12
CPE52	52	9.83

2.2.9 หลังจากกดปุ่มใดๆ ในข้อ 8 ก็จะปรากฏข้อความดังรูป ซึ่งพร้อมที่จะทำการวัด

2.2.10 ค่าตัวอย่าง

cP 0.0	S01
0.0 RPM	% 0.0

2.2.10 ให้เทตัวอย่างที่ต้องการทดสอบใส่ในบีกเกอร์ ประมาณ 350 – 400 ml.

2.2.11 นำบีกเกอร์สารตัวอย่างมาว่างให้ตรงกับ guard ของ spindle แล้วจากนั้นปรับระดับความสูงให้เข็ม spindle ลงมาจุ่มในสารตัวอย่างจนกระทั่งให้ mark ของเข็ม spindle อยู่เสมอกับระดับผิวของสารตัวอย่าง

2.2.12 กดปุ่ม “SELECT SPINDLE”อักษรตัว “S”ด้านบนมุมขวาจะกระพริบ ขณะนี้ให้กดปุ่มลูกศร ขึ้น – ลง เพื่อเลือก CODE ของ spindle ให้ตรงกับเข็มที่ใช้งานอยู่ในขณะนั้น

2.2.13 เลือกความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบ โดยการกดปุ่ม “SET SPEED” จากนั้นให้กดปุ่มลูกศร ขึ้น – ลง เพื่อเลือกความเร็วและเมื่อได้ความเร็วที่ต้องการให้กดปุ่ม “SET SPEED” อีกครั้ง

2.2.14 กดปุ่ม “MOTOR ON/OFF” เพื่อให้เข็ม spindle หมุน ถ้า on ข้อความที่ด้านล่างมุมซ้ายจะไม่ปรากฏข้อความ “OFF”

2.2.15 รอจนกระทั่งค่าของ CP ที่หน้าจอมีค่าคงที่ จึงจะบันทึกค่า viscometer ที่ได้จากการทดลอง

2.2.16 เมื่อเสร็จการทดลองให้กดปุ่ม “MOTOR ON/OFF” ก็ปรากฏข้อความ OFF ที่มุมซ้ายด้านล่าง

2.2.17 ปิดสวิทช์เครื่องด้านหลังให้อยู่ในตำแหน่ง “o”

2.2.18 ปรับยกเข็ม spindle ให้อยู่เหนือบีกเกอร์ จากนั้นนำบีกเกอร์ออก

2.2.19 ถอดเข็ม spindle แล้วใช้แอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาด

ภาคผนวก จ

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
ผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้น

ชื่อผู้ทดสอบ .... เพศ .... อายุ ....

ตัวอย่างที่ท่านได้รับนี้เป็นผลิตภัณฑ์ซอสชนิดข้นที่มีโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนในระดับปริมาณต่างๆ กรุณาชิมซอสชนิดข้น แล้วให้คะแนนคุณภาพด้านต่างๆตามที่กำหนดไว้ โดยกำหนดคะแนนดังต่อไปนี้

9 = ชอบมากที่สุด
8 = ชอบมาก
7 = ชอบปานกลาง
6 = ชอบเล็กน้อย
5 = เฉยๆ
4 = ไม่ชอบเล็กน้อย
3 = ไม่ชอบปานกลาง
2 = ไม่ชอบมาก
1 = ไม่ชอบมากที่สุด

ตัวอย่าง	สี	ความหนืด	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบโดยรวม

ข้อเสนอแนะ

....

....

....

ภาคผนวก ฉ

ประกาศกระทรวงสาธารณสุข
(ฉบับที่ 200) พ.ศ.2543
เรื่อง ซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท

โดยที่เป็นการสมควรปรับปรุงประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่อง การแสดงฉลากของ ซอส บรรจุที่ปิดสนิท

อาศัยอำนาจตามความในมาตรา 5 และมาตรา 6(7)(10) แห่งพระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2522 บัญญัติที่มีบทบัญญัติบางประการเกี่ยวกับการจำกัดสิทธิและเสรีภาพของบุคคล ซึ่งมาตรา 29 ประกอบกั มาตรา 48 และมาตรา 50 ของรัฐธรรมนูญแห่งราชอาณาจักรไทยบัญญัติให้กระทำได้โดยอาศัยอำนาจตาม แห่งกฎหมาย รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุขออกประกาศไว้ ดังต่อไปนี้

ข้อ 1 ให้ยกเลิกประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 79 (พ.ศ.2527) เรื่อง การแสดงฉลากของซ บรรจุที่ปิดสนิท ลงวันที่ 2 มกราคม พ.ศ.2527

ข้อ 2 ให้ซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทเป็นอาหารที่ต้องมีฉลาก

ข้อ 3 ซอส หมายความว่า ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตขึ้นมีลักษณะเหลว ข้น หรือแห้ง อาจจะเป็นเนื้อเดียว และมีความมุ่งหมายใช้เป็นเครื่องปรุงรส ได้แก่

(1) ซอสชนิดต่าง ๆ ยกเว้นซอสบางชนิดและผลิตภัณฑ์ปรุงรสที่ได้จากการย่อยโปรตีนของ ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขว่าด้วยเรื่องนั้น ๆ

(2) เต้าเจี้ยว

(3) น้ำจิ้มชนิดต่าง ๆ

ข้อ 4 ผู้ผลิตหรือผู้นำเข้าซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทเพื่อจำหน่าย ต้องปฏิบัติตามประกาศกระ ว่าด้วยเรื่อง วิธีการผลิต เครื่องมือเครื่องใช้ในการผลิต และการเก็บรักษาอาหาร

ข้อ 5 การแสดงฉลากของซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทให้ปฏิบัติตามประกาศกระทรวงสาธารณ เรื่อง ฉลาก

ข้อ 6 ให้ใบสำคัญการใช้ฉลากอาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 79 (พ.ศ. 2527) ฉลากของซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท ลงวันที่ 2 มกราคม พ.ศ.2527 ซึ่งออกให้ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บัง ต่อไปได้อีกสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 7 ให้ผู้ผลิต ผู้นำเข้าซอสในภาชนะบรรจุที่ปิดสนิทที่ได้รับอนุญาตอยู่ก่อนวันที่ประกาศนี้ใช้บัง
รับเลขสารบบอาหารภายในหนึ่งปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ เมื่อยื่นคำขอดังกล่าวแล้วให้ได้รับการผ่อ
ตามข้อ 4 ภายในสองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ และให้คงใช้ฉลากเดิมที่เหลืออยู่ต่อไปจนกว่าจะหม
สองปี นับแต่วันที่ประกาศนี้ใช้บังคับ

ข้อ 8 ประกาศนี้ ให้ใช้บังคับเมื่อพ้นกำหนดหนึ่งร้อยแปดสิบวันนับแต่วันถัดจากวันประกาศในรา
เป็นต้นไป

ประกาศ ณ วันที่ 19 กันยายน พ.ศ.2

กร ทัพพะรังสี
รัฐมนตรีว่าการกระทรวงสาธารณสุข

(ราชกิจจานุเบกษา ฉบับประกาศทั่วไป เล่ม 118 ตอนพิเศษ 6 ง. ลงวันที่ 24 มกราคม พ.ศ.2544)