# การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*

นางสาวธันยพร จันท์แสนโรจน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM ABALONE *Haliotis asinina*

Miss Tanyaporn Chansaenroj

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501211

| | |
|---|---|
| หัวข้อวิทยานิพนธ์ | การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* |
| โดย | นางสาวธันยพร จันท์แสนโรจน์ |
| สาขาวิชา | เทคโนโลยีทางอาหาร |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | อาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ |

---

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(อาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ธันยพร จันท์แสนโรจน์ : การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* (PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM ABALONE *Haliotis asinina*) อ. ที่ปรึกษา : อ. ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์, 109 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® และศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ในขั้นต้นศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 และ 60°C pH 8.0 ตามลำดับ โดยแปรปริมาณ Flavourzyme® 0-1.50% ของน้ำหนักตัวอย่าง แปรปริมาณ Alcalase® 0-0.20% ของน้ำหนักตัวอย่าง และแปรระยะเวลาการย่อย 0-4 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน (DH) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระ พบว่า DH ของหอยเป๋าฮื้อโดยใช้ Alcalase® สูงกว่าการใช้ Flavourzyme® แต่จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อค่า DH และปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อคือการย่อยด้วย Flavourzyme® 0.50% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ 1.00% เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการย่อยด้วย Alcalase® 0.05% และ 0.10% เป็นเวลา 3 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากมีค่า DH สูงสุด และมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมอยู่น้อย จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะที่เหมาะสมทั้งสี่ภาวะนี้ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและวิเคราะห์สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดโฟมและสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ จากการวิเคราะห์สมบัติการละลายในช่วง pH 2–10 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกัน โดยมีค่าความสามารถในการละลายในช่วง 55-61% และ 50-61% ตามลำดับ และพบว่า pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากการวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟม ของโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วง pH 4.5-7.5 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Alcalase® มีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme® และโฟมที่เกิดขึ้นมีความเสถียรดีกว่า pH และปริมาณเกลือ (0.10M) มีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับการเกิดโฟมของ BSA พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมน้อยกว่า แต่โฟมที่เกิดขึ้นจะเสถียรดีกว่า จากการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้โดยแปรปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตในช่วง 1-3% พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Alcalase® และอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรดีกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเกลือ (0.10M) มีผลต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตและความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่า แต่อิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรใกล้เคียงกัน

ภาควิชา.....เทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต.....ธันยพร จันท์แสนโรจน์.....

สาขาวิชา....เทคโนโลยีทางอาหาร.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์.....

ปีการศึกษา.....2550.....

## 4772325623 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEY WORD: ABALONE/ PROTEIN HYDROLYSATE/ FUNCTIONAL PROPERTIES

TANYAPORN CHANSAENROJ : PRODUCTION AND FUNCTIONAL PROPERTIES OF PROTEIN HYDROLYSATES FROM ABALONE *Haliotis asinina*

THESIS ADVISOR : KIATTISAK DUANGMAL, Ph.D., 109 pp.

The aims of the research were to produce hydrolysates derived from abalone *Haliotis asinina* using Flavourzyme® and Alcalase® and to study the functional properties of the obtained protein hydrolysates. Conditions for protein hydrolysis using Flavourzyme® and Alcalase® were fixed at 60°C pH 6.0 and 60°C pH 8.0, respectively. Five levels of Flavourzyme® were used (0-1.50% w/w) and digestion time was varied from 0 to 4 hours. Five levels of Alcalase® were used (0-0.20%) with 5 levels of digestion time as above. Enzyme quantity and digestion time significantly affected the degree of hydrolysis (DH) and the quantity of free amino acids ($p \leq 0.05$). The results showed that DH obtained by Alcalase® was higher than that obtained by Flavourzyme®;however, using Alcalase® yielded a lower quantity of free amino acids. Based on maximum DH and minimum quantity of bitter taste free amino acids, four optimal conditions for digesting protein from abalone were selected. These conditions were: using 0.50% Flavourzyme® for 4 hours; 1.00% Flavourzyme® for 4 hours; 0.05% Alcalase® for 3 hours; and 0.10% Alcalase® for 2 hours. Freeze dried powder obtained from each of the four optimal conditions were analyzed for their solubility, foaming and emulsifying properties. Regarding solubility, the solubility of protein hydrolysates were not affected by pH ($p>0.05$). Protein hydrolysates from Flavourzyme® and from Alcalase® had a good solubility over the wide pH range (2-10). The solubility was about 55-61% and 50-61%, respectively. Protein hydrolysates by Alcalase® exhibited a superior foam expansion (FE) and foam stability (FS) to protein hydrolysates by Flavourzyme®. FE and FS of protein hydrolysates by both enzymes were affected by pH values (4.5-7.5) and salt concentration (0.10M) ($p \leq 0.05$). These protein hydrolysates had better FE than BSA did. However, protein hydrolysates by both enzymes showed a higher FS than BSA did. The protein hydrolysates by Flavourzyme® had a better emulsifying activity index (EAI) and showed a higher emulsion stability index (ESI) than protein hydrolysates by Alcalase®. EAI and ESI of protein hydrolysates by both enzymes were significantly affected by salt (0.10M) ($p \leq 0.05$). Protein hydrolysates by both enzymes had a better EAI than BSA did; however, ESI of protein hydrolysates obtained by both enzymes and BSA were very similar.

Department.....Food Technology..... Student's signature..Tanyaporn Chansaenroj.....

Field of study.....Food Technology..... Advisor's signature.....K. Duangmal.....

Academic year.....2007.....

# กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความรู้ แนวความคิด หลักในการทำงาน ให้คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาในการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ตุลยธัญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล อาจารย์ ดร.ธนจันทร์ มหาวนิช และอาจารย์ ดร.พุทธรักษา วรานุศุภากุล ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งกรุณาชี้แนะแนวทาง ให้คำแนะนำในการปรับปรุง และตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ทำให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนวิจัยในโครงการการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารจากหอยเป๋าฮื้อโดยใช้เทคโนโลยีการแปรรูปและการบรรจุที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท อีสต์เอเชียติ๊ก (ประเทศไทย) จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์เอนไซม์ Flavourzyme® และเอนไซม์ Alcalase® เพื่อใช้ในการวิจัย

ขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ ระดับปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อน ๆ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร สำหรับกำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดการวิจัย และขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุก ๆ ด้าน

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณปู่ คุณย่า คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า และคุณอา สำหรับความรัก ความเอาใจใส่ กำลังใจ และช่วยสนับสนุนเงินทุนตลอดระยะเวลาการศึกษา และขอบใจน้อง ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดมา

# สารบัญ


หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฐ

บทที่

1 บทนำ ..... 1

2 วารสารปริทัศน์ ..... 3

2.1 หอยเป๋าฮื้อ ..... 3

2.2 กลิ่นรสในอาหารทะเล ..... 5

2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต ..... 8

2.4 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เอนไซม์ ..... 14

2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ..... 18

2.6 การนำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาใช้ประโยชน์ ..... 23

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย ..... 25

3.1 องค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อ ..... 27

3.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ..... 29

3.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ในภาวะที่เหมาะสม ..... 32

4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง ..... 35

4.1 องค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อ ..... 35

4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ..... 38

4.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ในภาวะที่เหมาะสม ..... 53

หน้า

5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ ..... 69

รายการอ้างอิง ..... 71
ภาคผนวก ..... 76
ภาคผนวก ก ..... 77
ภาคผนวก ข ..... 81
ภาคผนวก ค ..... 83
ภาคผนวก ง ..... 86
ภาคผนวก จ ..... 93
ภาคผนวก ฉ ..... 101
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ ..... 109

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 4.1 | องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* | 35 |
| 4.2 | ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อ | 38 |
| 4.3 | ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ | 39 |
| 4.4 | surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ | 44 |
| 4.5 | ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อโดยใช้เอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ | 45 |
| 4.6 | surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ | 50 |
| 4.7 | ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสม | 53 |
| 4.8 | ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ | 64 |
| 4.9 | ความเสถียรของอิมัลชันของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ | 65 |
| 4.10 | ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ | 66 |
| 4.11 | ความเสถียรของอิมัลชันของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ | 67 |
| ง.1 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อทั้งตัวขนาด 10 กรัม และ 20 กรัม | 86 |
| ง.2 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย | 86 |
| ง.3 | การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย | 87 |

ตารางที่ หน้า


ง.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย ..... 87

ง.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย ..... 87

ง.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ pH 2-10 ..... 88

ง.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ pH 2-10 ..... 88

ง.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH 88

ง.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH ..... 89

ง.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH ..... 89

ง.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH ..... 90

ง.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 90

ง.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 90

ง.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 91

ตารางที่ หน้า


ง.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 91

ง.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA ที่แต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 91

ง.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของ BSA ที่แต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อแปรปริมาณเกลือ ..... 92

จ.1 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ ..... 101

จ.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ ..... 101

จ.3 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ..... 102

จ.4 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ..... 102

จ.5 ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ..... 103

จ.6 ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ..... 103

จ.7 ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ..... 104

จ.8 ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ..... 104

จ.9 ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมของ BSA ..... 104

จ.10 ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่ไม่เติมเกลือของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ..... 105

จ.11 ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ..... 106

ตารางที่ หน้า

ฉ.12 ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่ไม่เติมเกลือของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ..... 107

ฉ.13 ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ..... 108

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญรูป


| รูปที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 2.1 | อนุกรมวิธานของหอยเป๋าฮื้อ | 3 |
| 2.2 | ภาพตัดขวางของหอยเป๋าฮื้อ | 4 |
| 2.3 | ปฏิกิริยาเคมีที่อาจเกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส | 10 |
| 2.4 | กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาโดยใช้เอนไซม์ | 16 |
| 3.1 | การเตรียมหอยเป๋าฮื้อ | 27 |
| 3.2 | การเตรียมสารสกัดจากหอยเป๋าฮื้อเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด | 28 |
| 4.1 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 | 41 |
| 4.2 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 (ก) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน (ข) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami (ค) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม | 43 |
| 4.3 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 | 44 |
| 4.4 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 | 47 |
| 4.5 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 (ก) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน (ข) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami (ค) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม | 49 |
| 4.6 | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 | 50 |
| 4.7 | ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 | 54 |

รูปที่ หน้า

4.8 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 ..... 55

4.9 ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 (ก) 0.75% F 4h, no NaCl (ข) 0.75% F 4h, 0.10 M NaCl (ค) 1.00% F 4h, no NaCl (ง) 1.00% F 4h, 0.10 M NaCl ..... 57

4.10 ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 ..... 58

4.11 ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 (ก) 0.05% A 3h, no NaCl (ข) 0.05% A 3h, 0.1M NaCl (ค) 0.10% A 2h, no NaCl (ง) 0.10% A 2, 0.1M NaCl ..... 60

4.12 ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase®ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 ..... 61

4.13 ความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่ไม่เติมเกลือ ..... 61

4.14 ความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ..... 62

4.15 ความคงตัวของโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่ไม่เติมเกลือ ..... 62

4.16 ความคงตัวของโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ..... 63

รูปที่ หน้า

ก.1 กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry ..... 80
ข.1 โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดอะมิโน ..... 82



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 1

# บทนำ

หอยเป้าฮื้อ (abalone) หรือหอยโข่งทะเล เป็นหอยทะเลฝาเดียว เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ส่วนที่นำมาบริโภคเป็นส่วนกล้ามเนื้อเท้าของหอยเป้าฮื้อ เนื้อหอยเป้าฮื้อมีลักษณะพิเศษเฉพาะตัวและมีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์ ทำให้หอยเป้าฮื้อเป็นที่นิยมบริโภคในประเทศแถบเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน และในหลายประเทศแถบยุโรปและอเมริกา ประเทศญี่ปุ่นเป็นตลาดที่สำคัญในการนำเข้าและส่งออกหอยเป้าฮื้อในระดับอุตสาหกรรม โดยนำเข้าในรูปเนื้อสดแช่แข็ง หอยกระป๋อง หอยแปรรูป และส่งออกหอยเป้าฮื้อตากแห้งไปยังไต้หวันและฮ่องกง (พายัพ ยังปักษี, 2541)

หอยเป้าฮื้อที่ค้นพบในโลกมีทั้งหมด 75 ชนิด แต่มีประมาณ 20 ชนิด ที่มีขนาดใหญ่ มีราคาสูง และสามารถเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ได้ หอยเป้าฮื้อที่เป็นที่ต้องการในตลาดต่างประเทศต้องมีขนาดความยาวประมาณ 7-12 เซนติเมตร มีน้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม ปัจจุบันประเทศที่ผลิตพันธุ์หอยเป้าฮื้อได้จำนวนมากคือประเทศออสเตรเลีย ญี่ปุ่น และเม็กซิโก สำหรับประเทศไทยพบหอยเป้าฮื้อในธรรมชาติ 3 ชนิด คือ *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis Varia* หอยเป้าฮื้อที่พบในไทยเหล่านี้มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีจำหน่ายทั่วโลก ในปีพ.ศ. 2532 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลชายฝั่งตะวันออก ระยอง ได้ผลิตพันธุ์หอยเป้าฮื้อ *Haliotis asinina* ซึ่งหอยเป้าฮื้อพันธุ์นี้มีความเป็นไปได้ทางการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์สูงเพราะมีขนาดใหญ่ที่สุดในหอยเป้าฮื้อจำนวน 3 ชนิด มีสัดส่วนของเนื้อที่ใช้เป็นอาหารมากกว่าหอยเป้าฮื้ออีก 2 ชนิด และมีลักษณะใกล้เคียงกับหอยเป้าฮื้อของประเทศเกาหลีใต้ชนิด *Haliotis diversicolor supertexta* ที่ประสบความสำเร็จอย่างสูงในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมส่งขายในตลาด (พายัพ ยังปักษี, 2541) ปัจจุบันในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงหอยเป้าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* และ *Haliotis diversicolor* เพื่อส่งขายยังภัตตาคารโดยส่งขายในลักษณะหอยสด ส่วนหอยเป้าฮื้อบรรจุกระป๋องหรือหอยเป้าฮื้อแปรรูปจะเป็นการนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งการเพาะเลี้ยงหอยจะมีหอยเป้าฮื้อที่โตช้าหรือโตไม่ได้ขนาดไม่สามารถส่งขายได้ การนำหอยเป้าฮื้อส่วนนี้มาใช้ประโยชน์จะช่วยในการลดต้นทุนการผลิตรวมทั้งเป็นการเพิ่มโอกาสในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ได้ เมื่อการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยแพร่หลายมากขึ้นย่อมนำไปสู่การเพาะเลี้ยงเพื่ออุตสาหกรรม เช่น การผลิตหอยเป้าฮื้อกระป๋อง หอยเป้าฮื้อแปรรูปชนิดต่าง ๆ ซึ่งจะมีวัสดุเศษเหลือของหอยเป้าฮื้อที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย ดังนั้นการนำหอยเป้าฮื้อที่ไม่ได้ขนาด ไม่สามารถส่งขายเป็นหอยสดหรือไม่สามารถนำไปแปรรูปได้มาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตเพื่อใช้เป็นสารปรุงแต่ง

กลิ่นรสอาหารก็จะสามารถช่วยเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ได้ การนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้ในอาหารต่าง ๆ นั้นจะต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดโฟม และสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ เป็นต้น ซึ่งกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษากระบวนการผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็ก ซึ่งเลี้ยงไม่โต ไม่ได้ขนาดตามต้องการที่จะบริโภคเป็นหอยสดหรือนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 2

# วารสารปริทัศน์

## 2.1 หอยเป๋าฮื้อ (abalone)

หอยเป๋าฮื้อ หอยโข่งทะเล หรือหอยร้อยรู เป็นหอยทะเลประเภทหอยฝาเดียว การจัดอนุกรมวิธานของหอยเป๋าฮื้อแสดงดังรูปที่ 2.1 หอยเป๋าฮื้อเป็นหอยโบราณ เปลือกมีลักษณะแบนเป็นรูปยาวรี ยอดเตี้ย ลักษณะคล้ายจานรี มีสีเขียวเข้ม น้ำตาล หรือแดงคล้ำ ตามขอบเปลือกมีช่องเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวยาวไปจนถึงขอบปาก รูบนเปลือกจะสร้างเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ เมื่อหอยโตขึ้น ไม่มีฝาปิดเปลือก เท้าใหญ่ กล้ามเนื้อเท้าแข็งแรง หอยเป๋าฮื้อมีระบบการสืบพันธุ์แบบแยกเพศ อวัยวะสืบพันธุ์จะพัฒนาอยู่รอบ ๆ ต่อมสร้างน้ำย่อย (รูปที่ 2.2) หอยเป๋าฮื้อเป็นผู้บริโภคระดับต้นของห่วงโซ่อาหาร บริโภคสิ่งมีชีวิตตามซอกหินโดยใช้อวัยวะส่วนหน้าที่เรียกว่า radula ขูดอาหาร อาหารของหอยเป๋าฮื้อ ได้แก่ สาหร่ายขนาดใหญ่และเล็กชนิดต่าง ๆ สาหร่ายขนาดใหญ่ ได้แก่ สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีเขียว และสาหร่ายสีน้ำตาล ส่วนสาหร่ายขนาดเล็ก ได้แก่ สาหร่ายเซลล์เดียว หรือไดอะตอมเกาะติด (sessile diatom) แหล่งอาศัยของหอยเป๋าฮื้อจะเป็นแนวหินหรือแนวซากปะการังที่น้ำทะเลใส พบมากที่ความลึกระหว่าง 2-8 เมตร หอยเป๋าฮื้อจะหลบซ่อนตัวตามซอกหินในเวลากลางวันและ ออกหากินอาหารในเวลากลางคืน (พายัพ ยังปักษี, 2541)

Class : Gastropoda

Subclass : Pseudobranchia

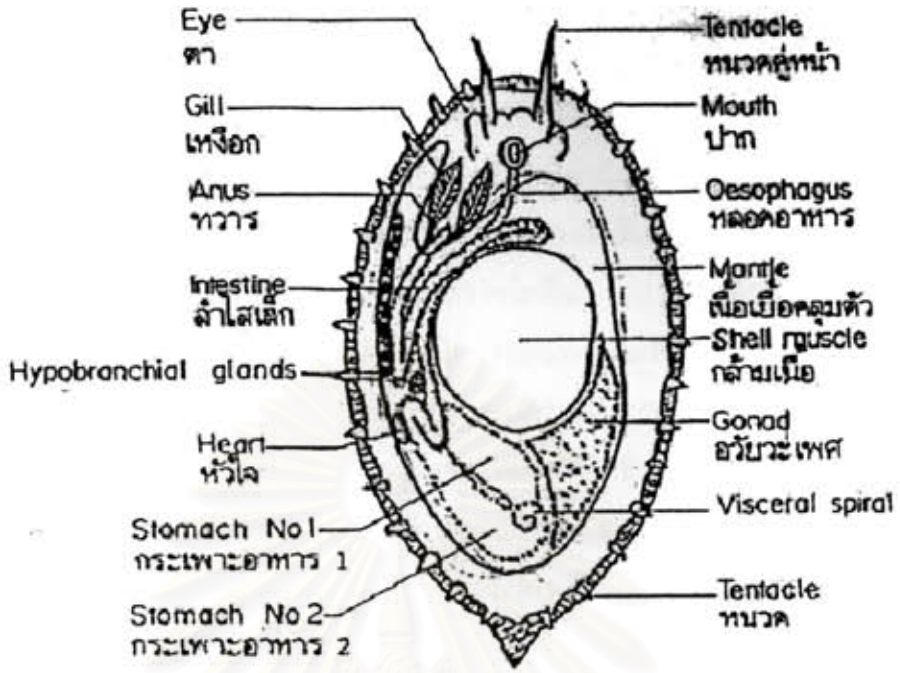
Order : Archaeogastropoda

Family : Haliotidae

Genus : Haliotis

**รูปที่** 2.1 อนุกรมวิธานของหอยเป๋าฮื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




รูปที่ 2.2 ภาพตัดขวางของหอยเป๋าฮื้อ

ที่มา: พายัพ ยังปักษี (2541)

หอยเป๋าฮื้อจัดเป็นอาหารเพื่อสุขภาพเพราะมีโปรตีนสูงแต่แคลอรี่ต่ำ มีรสชาติดี มีราคาแพง และบางคนมีความเชื่อว่าเป็นอาหารสิริมงคล จึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมากในประเทศทางเอเชีย เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีน ไต้หวัน รวมทั้งมีการบริโภคหลายประเทศในแถบยุโรปและอเมริกาด้วย โดยส่วนที่นำมาบริโภคเป็นเนื้อส่วนเท้าของหอยเป๋าฮื้อ

หอยเป๋าฮื้อมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการเพาะเลี้ยงหรือจับจากธรรมชาติมาใช้เป็นอาหาร ทำเครื่องประดับหรือนำมาเป็นส่วนผสมของยาแผนโบราณ โดยหอยเป๋าฮื้อที่พบในโลกมีทั้งหมดประมาณ 75 ชนิด สายพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อจากแหล่งต่าง ๆ เช่น

สายพันธุ์ที่พบในอเมริกาเหนือ ได้แก่ *Haliotis rufescens*, *Haliotis fulgens*, *Haliotis corrugata*, *Haliotis sorenseni*, *Haliotis assimilis*, *Haliotis cracherodii*, *Haliotis walallensis* และ*Haliotis kamtschatkana*

สายพันธุ์ที่พบในญี่ปุ่น ได้แก่ *Haliotis discus hannai*, *Haliotis fulgens*, *Haliotis corrugate*, *Haliotis sorenseni*, *Haliotis gigantean*, *Haliotis sieboldii* และ *Haliotis asinina*

สายพันธุ์ที่พบในออสเตรเลีย ได้แก่ *Haliotis ruber*, *Haliotis laevigata* และ *Haliotis roei*

สายพันธุ์ที่พบในนิวซีแลนด์ ได้แก่ *Haliotis iris*, *Haliotis australis* และ *Haliotis virginea*

สายพันธุ์ที่พบในฝรั่งเศส ได้แก่ *Haliotis tuberculata*

สายพันธุ์ที่พบในแอฟริกาใต้ ได้แก่ *Haliotis midae*

สายพันธุ์ที่พบในประเทศไทย ได้แก่ *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis varia* ซึ่งหอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ที่พบในไทยนั้นจะมีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วโลก แต่อย่างไรก็ตามหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดในหอยเป๋าฮื้อจำนวน 3 ชนิด มีขนาดประมาณ 4-10 เซนติเมตร หนักประมาณ 30-250 กรัม ต่อตัวและมีสัดส่วนของเนื้อที่ใช้เป็นอาหารมากกว่าชนิดอื่น ก็มีความเป็นไปได้สูงทางการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ เนื่องจากหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* มีลักษณะใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis diversicolor supertexta* ของประเทศเกาหลีใต้ ที่ประสบความสำเร็จอย่างสูงในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมส่งขายในตลาดหอยเป๋าฮื้อขนาดคอกเทล นอกจากนี้หอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ของไต้หวันชนิด *Haliotis diversicolor* ซึ่งเป็นหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กก็สามารถผลิตและส่งไปขายยังต่างประเทศ เช่น จีน ญี่ปุ่น และเกาหลี ได้เช่นกัน (พายัพ ยังปักษี, 2541)

หอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กสายพันธุ์ที่อาศัยในเขตร้อนสามารถนำมาบริโภคในลักษณะคอกเทลสเต็ก หรือประกอบอาหารชนิดต่าง ๆ ได้ เนื่องจากมีรสชาติดี ราคาถูก และขนาดเหมาะสมในการนำไปปรุงเป็นอาหาร จึงเป็นที่นิยมบริโภคทั้งในประเทศสหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน และกลุ่มประเทศยุโรป ส่วนหอยเป๋าฮื้อที่มีขนาดใหญ่พบได้ในเขตอบอุ่น มักนำมาบริโภคในลักษณะสเต็ก ในบรรดาประเทศที่บริโภคหอยเป๋าฮื้อทั่วโลก ญี่ปุ่นนับว่าเป็นชนชาติที่บริโภคหอยเป๋าฮื้อมากที่สุด โดยมีกรรมวิธีในการดัดแปลงเป็นสูตรอาหารหลากหลายชนิด ทั้งการต้ม นึ่ง แต่ที่นิยมบริโภคมากที่สุด คือ การวางบนหน้าข้าวปั้น (sushi) และรับประทานดิบ (sashimi) สำหรับทางยุโรปมีกรรมวิธีการปรุงไม่หลากหลายนัก ส่วนใหญ่ที่ใช้คือ การย่าง (grill) และทอดในน้ำมัน (ลิลา เรืองแป้น, 2543)

## 2.2 กลิ่นรสในอาหารทะเล

กลิ่นรส (flavor) หมายถึง ความรู้สึกทุกอย่างที่รับได้เมื่อมีอาหารในปาก ได้แก่ กลิ่น รส และสมบัติเฉพาะของอาหารแต่ละชนิด เช่น ความหยาบ ความนิ่ม ความเย็น ความเผ็ด เป็นต้น

กลิ่น (odor) หมายถึง ความรู้สึกที่สามารถรับรู้ได้ด้วยระบบการรับรู้กลิ่น ในทางอาหารกลิ่นหมายถึงสารระเหยที่ทำให้เกิดความรู้สึกต่อระบบรับรู้กลิ่น

รส (taste) หมายถึง ความรู้สึกที่เกิดจากการรับรู้จากประสาทรับรสต่าง ๆ ในปัจจุบันรสมีอยู่ด้วยกันห้ารส คือ รสหวาน รสเปรี้ยว รสเค็ม รสขม และรส umami แต่อาจมีการรับรู้ความรู้สึกต่าง ๆ นอกเหนือจากที่กล่าวมาแล้ว เช่น อาจใช้คำว่า metallic taste, alkaline taste, fatty taste อธิบายลักษณะของผลิตภัณฑ์

เนื่องจากกลิ่นและรสมีความใกล้เคียงกันมาก ดังนั้นในการศึกษาจึงมักจะทำการศึกษาไปพร้อม ๆ กัน

**2.2.1 สารประกอบที่ให้กลิ่นและรสในอาหารทะเล**

สารประกอบที่ให้กลิ่นและรสในอาหารทะเลมีมากมายหลายชนิด ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์น้ำและคุณภาพของสัตว์น้ำ โดยสามารถจำแนกได้ ดังนี้

2.2.1.1 สารประกอบไนโตรเจน

สารประกอบไนโตรเจนที่ให้กลิ่นรสในอาหารทะเลจะเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (Non-protein nitrogen compounds, NPN) ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในอาหารจะขึ้นอยู่กับชนิด ความสด และที่อยู่อาศัย เป็นต้น โดยสารประกอบกลุ่มนี้มีความสำคัญมากต่อการเกิดกลิ่นรสของอาหารทะเล ประมาณร้อยละ 85 ของสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนที่พบในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อของอาหารทะเล ประกอบด้วย กรดอะมิโนอิสระ ไดเพปไทด์ สารประกอบเอมีน สารประกอบกัวนิดีน นิวคลีโอไทด์ และผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ที่ได้จากการแตกตัวของนิวคลีโอไทด์ (Shahidi,1994)

- กรดอะมิโนอิสระ (Free amino acids)

กรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสในอาหารทะเล เช่น alanine, argenine, glycine, histidine, proline และ taurine กรดอะมิโนเหล่านี้จะพบอยู่ในโปรตีนกล้ามเนื้อ glycine จะให้รสหวาน จากการศึกษาพบว่า กุ้งและปูจะมีปริมาณ glycine มากกว่าอาหารทะเลชนิดอื่นทำให้เนื้อกุ้งและปูมีรสหวานกว่าอาหารทะเลชนิดอื่น ส่วน taurine นั้นจะพบในอาหารทะเลเกือบทุกชนิด ในหอยเป๋าฮื้อจะมี taurine อยู่ประมาณ 1000 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม (Konosu et al.,1982)

- ไดเพปไทด์ (Dipeptides)

โดยทั่วไปในสัตว์น้ำสามารถตรวจพบไดเพปไทด์เพียง 3 ชนิด คือ anserine, balenine และ carnosine โดย anserine พบมากในปลาโอ ปลาแซลมอน และปลาฉลามบางชนิด ปริมาณที่พบอยู่ในช่วง 300-600 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง balenine พบมากในวาฬ carnosine จะพบในเนื้อขาคู่แรกของ Alaska king crab เพศผู้ ส่วนเนื้อของปลาแซลมอนประกอบด้วย carnosine 4-8 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และอาจพบ carnosine ในปลาไหลหรือปลาโอแถบ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

- สารประกอบเอมีน (Quaternary ammonium bases)

สารประกอบที่เป็นเบสที่พบในอาหารทะเล ได้แก่ trimethylamine oxide (TMAO) และ betaines โดยที่ TMAO จะถูก reduce ให้เป็น trimethylamine (TMA) โดยแบคทีเรียหลังจากที่สัตว์เสียชีวิตแล้ว ซึ่งจะทำให้เกิดกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์ขึ้น (Konosu et al.,1982)

- สารประกอบกัวนิดีน (Guanidine compounds)

สารประกอบกัวนิดีนที่สำคัญ คือ creatine ซึ่งพบในเนื้อปลาในปริมาณ 300-700 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม ส่วน creatinine พบในปริมาณที่น้อยมาก (10-50 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัม) สำหรับกุ้งพบว่ามีปริมาณ creatine สูงกว่า creatinine เช่นกัน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

- นิวคลีโอไทด์ และสารประกอบที่เกี่ยวข้อง (Nucleotides and related compounds)

สารประกอบพวก 5'-nucleotides เช่น inosine monophosphate (IMP) และ guanosine monophosphate (GMP) เมื่อรวมกับ glutamic acid จะทำให้ได้กลิ่นรส umami ที่ดีขึ้น ประมาณร้อยละ 90 ของนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในกล้ามเนื้อของอาหารทะเลจะเป็นอนุพันธ์ของ purine เช่น adenosine triphosphate (ATP), adenosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine และ hypoxantine ส่วนอนุพันธ์ของ uracil และ cytosine จะพบเป็นส่วนน้อย (Konosu et al.,1982)

2.2.1.2 สารระเหย (Volatile compounds)

สารระเหยที่ให้กลิ่นในอาหารทะเลประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด ได้แก่ สารประกอบซัลไฟด์ อัลดีไฮด์ คีโตน และแอลกอฮอล์ โดยสารประกอบเหล่านี้อาจให้กลิ่นรสในอาหารทะเลที่แตกต่างกันออกไป ทั้งกลิ่นรสที่ดีและไม่ดี เช่น 1-octone-3-ol, 1,5-octadien-3-ol และ 2,5-octadiene-1-ol สามารถพบได้ในหอยนางรม ส่วน bis-methylthiomethane ให้กลิ่นไม่ดีในกุ้ง เป็นต้น (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

### 2.2.2 องค์ประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นรสในหอยเป๋าฮื้อ

ในปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเกิดการสลายตัวของ adenosine 5'-triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นสารประกอบพวกกรดนิวคลีอิกไปเป็น adenosine 5'-diphosphate (ADP) จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น adenosine 5'-monophosphate (AMP), inosine 5'-monophosphate (IMP) และ inosine ตามลำดับ สุดท้ายเปลี่ยนไปเป็น hypoxanthine ขณะที่ในสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงจาก ATP ไปเป็น ADP จากนั้นเปลี่ยนไปเป็น AMP, adenosine และ inosine ตามลำดับและสุดท้ายเปลี่ยนไปเป็น hypoxanthine สำหรับหอยเป๋าฮื้อจะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ทั้งสองแบบ แต่เนื่องจาก activity ของเอนไซม์ AMP-deaminase และ adenosine-deaminase ต่ำ ทำให้หอยเป๋าฮื้อมีการสะสมสารประกอบพวก AMP เป็นส่วนใหญ่แทนที่จะเป็น IMP หรือ adenosine ถึงแม้ AMP จะเป็นสารประกอบที่ไม่มีรสชาติแต่เมื่ออยู่รวม

กับ glutamic acid ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่ง จะทำให้เกิดรสที่เรียกว่า umami ในหอยเป๋าฮื้อ (Hatae et al., 1995)

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าการที่หอยเป๋าฮื้อมีรสชาติดีนั้นเนื่องมาจากกล้ามเนื้อประกอบด้วยกรดอะมิโนและสารนิวคลีโอไทด์ที่ให้กลิ่นรสที่ดี โดยกรดอะมิโนอิสระ 3 ชนิดที่พบในปริมาณมากที่สุด คือ glycine, alanine และ taurine (Baldwin et al.,1992) ซึ่ง glycine และ alanine เป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวาน และจากการวิเคราะห์กรดอะมิโนในหอยเป๋าฮื้อโดยใช้ amino acid analyzer พบว่ากรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุดในหอยเป๋าฮื้อได้แก่ taurine (Hatae et al.,1995 ; Hwang et al., 1997)

การเกิดกลิ่นรสในหอยเป๋าฮื้อจะขึ้นอยู่กับปริมาณของกรดอะมิโนอิสระที่อยู่ในหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในหอยเป๋าฮื้อนั้นจะขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ฤดูกาล สภาพแวดล้อม และสายพันธุ์ เป็นต้น

ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในหอยเป๋าฮื้อจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล เช่น หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis diversicolor* จะมีกรดอะมิโนอิสระสูงในฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว (Hwang et. al., 1997) หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis discus* จะมีกรดอะมิโนอิสระสูงในฤดูร้อน (Hatae et al., 1995) เป็นต้น นอกจากปริมาณของกรดอะมิโนอิสระจะเปลี่ยนแปลงแล้ว ปริมาณ ATP ในหอยเป๋าฮื้อก็มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลด้วยเช่นกัน โดยพบว่าในหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis discus* จะมีปริมาณ ATP สูงในฤดูร้อนและจะต่ำลงในฤดูหนาว (Hatae et al., 1995) สภาวะแวดล้อมก็มีผลต่อปริมาณของกรดอะมิโนอิสระในหอยเป๋าฮื้อเช่นกัน โดยหอยเป๋าฮื้อชนิดเดียวกันแต่อาศัยอยู่ในสถานที่ต่างกันจะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระไม่เท่ากัน เช่น หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis diversicolor* ที่มาจากทางตอนเหนือและทางตอนใต้ของประเทศไต้หวันจะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระไม่เท่ากัน (Hwang et. al., 1997) นอกจากนี้หอยเป๋าฮื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่างกัน เช่น หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis diversicolor* และหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis discus* จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ต่างกัน

ถึงแม้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระจะมีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล สภาวะแวดล้อม และสายพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ แต่กรดอะมิโนบางชนิด ได้แก่ alanine, arginine, glutamic acid, glycine และ taurine จะมีปริมาณมากกว่ากรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ ในขณะที่ปริมาณกรดอะมิโนชนิดอื่นจะมีการเปลี่ยนแปลงบ้างเล็กน้อยตามฤดูกาล (Hwang et. al., 1997)

## 2.3 โปรตีนไฮโดรไลเสต

โปรตีนไฮโดรไลเสต คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนโดยการตัดสายพอลิเพปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์สายสั้น ๆ โดยใช้สารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงคุณค่าทาง

โภชนาการและปรับปรุงสมบัติบางประการของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และ สมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น (Kristinsson and Rasco, 2000)

### 2.3.1 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

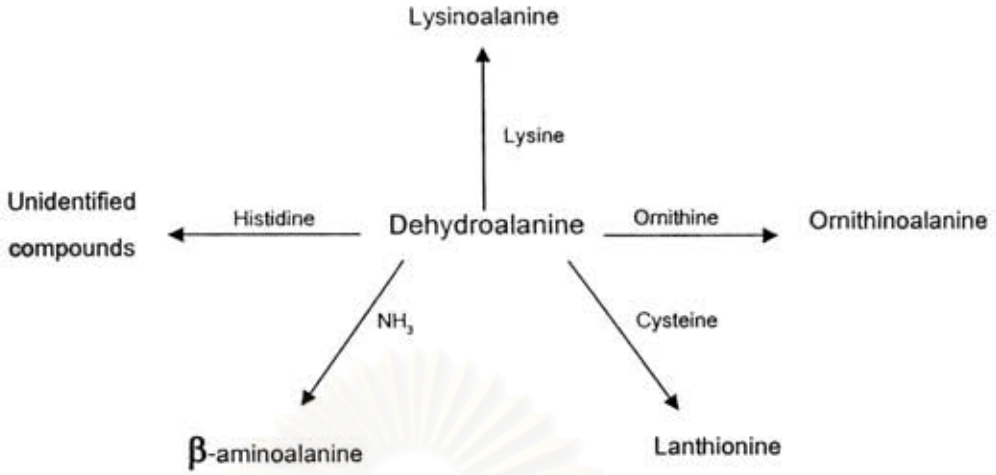
วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่

#### 2.3.1.1 การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี

เป็นการทำให้พันธะเพปไทด์แตกออกโดยใช้สารละลายกรดหรือเบส ซึ่งเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ควบคุมระดับการย่อยโปรตีนได้ยากทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ และมีข้อจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดเป็นวิธีที่มีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ สามารถย่อยโปรตีนได้รวดเร็วและให้กลิ่นรสที่ดี แต่จะทำให้ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่จำเป็นถูกทำลาย สารละลายกรดที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ กรดซัลฟูริก กรดไฮโดรคลอริก ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดทั้งสองชนิดนี้จะมีเกลือซึ่งเป็นผลจากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย โดยในการย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกนั้นจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต และการย่อยโปรตีนด้วยกรดไฮโดรคลอริกนั้นจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ในอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยโปรตีน เนื่องจากเกลือที่เกิดขึ้นในกระบวนการนั้นเป็นเกลือที่ใช้ในอาหารทั่วไป จึงไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์มากนัก (Kristinsson and Rasco, 2000)

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส สารละลายเบสที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งหากย่อยในภาวะที่รุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยา racemization ของกรดอะมิโน โดยจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนจาก L-form ไปเป็น D-form ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดี นอกจากนี้ยังจะทำให้เกิดปฏิกิริยา $\beta$-elimination ของ serine และ cysteine ทำให้เกิดสารประกอบ dehydroalanine ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่น ๆ เกิดเป็นสารประกอบต่าง ๆ หลายชนิด เช่น lysinoalanine, ornithinoalanine และ lanthionine เป็นต้น (รูปที่ 2.3) ทำให้สูญเสียสารอาหารที่สำคัญ และสารประกอบที่เกิดขึ้นบางชนิดยังก่อให้เกิดสารพิษในอาหารอีกด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000)




**รูปที่** 2.3 ปฏิกิริยาเคมีที่อาจเกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส
ที่มา: Kristinsson and Rasco (2000)

2.3.1.2 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสตัดพันธะเพปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นเพปไทด์ที่สั้นลงและกรดอะมิโนอิสระ การย่อยโปรตีนด้วยวิธีนี้มีข้อดี คือ เอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นสูง จึงไม่จำเป็นต้องใช้เอนไซม์ปริมาณมาก และสามารถย่อยโปรตีนได้ในภาวะที่ไม่รุนแรง นอกจากนี้การใช้เอนไซม์จะมีอัตราการย่อยโปรตีนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้กรดหรือด่าง การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสอาจทำให้เกิดสารประกอบที่มีรสขมได้ เนื่องจากการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ในโมเลกุลโปรตีน เช่น isoleucine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine และ valine แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยโปรตีนแล้วสารประกอบที่ให้รสขมนี้จะเกิดน้อยลง เพราะสายเพปไทด์ที่เกิดขึ้นจะจัดเรียงตัวในลักษณะที่ไม่ก่อให้เกิดรสขม จึงสามารถควบคุมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ได้ด้วยการควบคุมระดับการย่อยโปรตีน (Kristinsson and Rasco, 2000)

2.3.2 **เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน**

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทไฮโดรเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยพันธะเพปไทด์ของโปรตีน โดยจะตัดพันธะเพปไทด์ของพอลิเพปไทด์ได้เป็นเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งเป็นประเภทต่าง ๆ ได้หลายแบบ เช่น

2.3.2.1 แบ่งตามลักษณะการตัดสายยาวของพอลิเพปไทด์ จะแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ เอกซ์โซเพปติเดส (exopeptidases) และเอนโดเพปติเดส (endopeptidase)

เอกซ์โซเพปติเดส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มอะมิโนเรียกว่า aminopeptidase ขณะที่การตัดพันธะทางปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิล เรียกว่า carboxypeptidase

เอนโดเพปติเดส เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเพปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ เอนโดเพปติเดสมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูง เนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเพปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิด ทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว

2.3.2.2 แบ่งตามกลไกการทำงานได้เป็น 4 ประเภท คือ (Whitaker, 1994)

Serine protease

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็น alkali protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง pH 7-11 เป็นพวก endopeptidase มีอนุมูลเซริล (seryl residue) และหมู่ imidazole อยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดย DEP (di-isopropyl-phosphofluoride) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริลในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ elastase, thrombin, และ trypsin เป็นต้น

Sulfydryl protease หรือ Cysteine protease

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็น neutral protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง pH 6.0-7.5 เป็นพวก endopeptidase มีอนุมูลซัลไฟดริลอยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า sulfhydryl reagents ซึ่งจะทำให้อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความกระทบกระเทือนและอาจสูญเสียแอคติวิตีไปในที่สุด เอนไซม์ในกลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ bromelain และ papain เป็นต้น

Metal-containing protease

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็น neutral protease มี pH ที่เหมาะสม คือ pH 7.8 เป็นพวก exopeptidase เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นโปรติเอสที่มีอิออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลเอนไซม์หรือร่วมในปฏิกิริยาการย่อยโปรตีน โดยจะอยู่ในลักษณะของโคแฟคเตอร์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับอิออนของโลหะ (metal chelating agent ) เช่น 1,10-phenanthroline, EDTA เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ carboxypeptidase A, carboxypeptidase B, carnosinase และ prolidase เป็นต้น

Aspartic protease

เอนไซม์ในกลุ่มนี้จัดเป็น carboxyl protease และ acid protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง pH 2-4 มีหมู่คาร์บอกซิลจากอนุมูลกรดแอสปาติค 2 อนุมูลอยู่ในบริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดย pepstatin เอนไซม์ส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้จะเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ pepsin และ rennin เป็นต้น

นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมยังนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าชนิดต่าง ๆ ในการย่อยโปรตีน โดยเอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่จะได้มาจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติและภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่

Alcalase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus licheniformi* ทำหน้าที่เป็น endopeptidase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 55-60°C (130-140°F) และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 8.0-8.5 (Anonymous, 2000)

Flavourzyme® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* ทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง endopeptidase และ exopeptidase ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม มีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 50°C (120°F) และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 5.0-7.0 (Anonymous, 2000)

Neutrase® เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus amyloliquefaciens* ทำหน้าที่เป็น endopeptidase มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วง 45-55°C และ pH ที่เหมาะสมในช่วง 5.5-7.5 (Anonymous, 2000)

### 2.3.3 ระดับการย่อยโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยโปรตีน เป็นดัชนีซึ่งใช้อธิบายระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามค่า DH สามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับ ความสะดวก ความเหมาะสม และระดับความละเอียดและเที่ยงตรงที่ต้องการ (Adler-Nissen, 1986) การวิเคราะห์และคำนวณระดับการย่อยโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน การวิเคราะห์ free $\alpha$-amino groups และการไตเตรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมา (Silvestre, 1997)

การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่เหลืออยู่หลังจากตกตะกอนโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย trichloroacetic acid (TCA) สามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ วิธีของ Kjeldhal การวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง UV ของเพปไทด์ที่มีหมู่ aromatic และการวัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง 400-700 นาโนเมตร หลังจากผ่านปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี เช่น ปฏิกิริยา Biuret (Silvestre, 1997) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณได้จากสมการ (1)

$$DH = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอนด้วย TCA}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100 \quad \text{.....(1)}$$

การวิเคราะห์ free α-amino groups โดยทั่วไปจะนิยมใช้วิธี formal titration ซึ่งจะใช้สารละลาย formaldehyde ทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน แล้วไตเตรตด้วยสารละลายเบส โดยใช้ phenolphtaline เป็นอินดิเคเตอร์ (เปลี่ยนสีที่ pH 9.2) อัตราส่วนระหว่าง free α-amino nitrogen กับปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์จะสามารถประมาณค่าระดับการย่อยโปรตีนที่เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้สารประกอบที่ทำปฏิกิริยาเฉพาะกับหมู่อะมิโน เช่น ninhydrine, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), polychroniadou, fluorescamin และ orthiphtaldehyde (OPA) ก็สามารถนำมาใช้ในการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนได้เช่นกัน โดยวิธีที่เก่าแก่ที่สุดคือการใช้ ninhydrine ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะได้สารประกอบสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความไวสูง แต่มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น สารเคมีที่ใช้ไวต่อออกซิเจน มีการรบกวนจากแอมโมเนีย ค่าที่ได้จาก blank สูง และใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน (Moore and Stein, 1948) ส่วน TNBS นั้นเป็นสารที่จำเพาะต่อ primary amino groups ทำการวิเคราะห์โดยผสม TNBS กับโปรตีนไฮโดรไลเสตแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร ข้อเสียของวิธีนี้คือ ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน สารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย picric acid ทำให้ค่าที่ได้จาก blank สูง TNBS ไม่เกิดปฏิกิริยากับ proline และ hydroxyproline และ TNBS สามารถทำปฏิกิริยากับ ε-amino group ของ lysine ได้ (Adler-Nissen, 1979) สารประกอบอีกสองชนิดคือ fluorescamin และ OPA เมื่อทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนแล้วจะทำให้สามารถวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนได้ด้วยวิธี fluorometry ซึ่งวิธีนี้จะให้ความไวสูง แต่มีข้อเสียคือ อนุพันธ์ของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจะมีความเสถียรต่ำ (Church et al., 1985) โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวนได้จากสมการ (2)

$$DH = \frac{(L_t - L_0)}{(L_{max} - L_0)} \times 100 \quad \text{.....(2)}$$

$L_t$ = ปริมาณ α-amino acid ที่เวลา t

$L_0$ = ปริมาณ α-amino acid เริ่มต้น

$L_{max}$ = ปริมาณ α-amino acid หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

การไตเตรตโปรตอนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส เรียกว่าเทคนิค pH-stat ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย ซึ่งจะทำให้หมู่ amino หลุดออกมาและมีการปลดปล่อยโปรตอน ซึ่งจะทำให้ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตลดลง ดังนั้นจึง

ต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษาระดับของ pH ให้เป็นไปตามต้องการด้วย sodium hydroxide หรือ calcium hydroxide โดยระดับการย่อยโปรตีนสามารถคำนวณจากปริมาณสารละลายเบสที่ใช้ระหว่างทำปฏิกิริยา ดังสมการ (3) (Adler-Nissen, 1986)

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{M_b} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{100}{h_{tot}} \quad \text{.....(3)}$$

$B$ = ปริมาณเบสที่ใช้ (มิลลิลิตร)

$N_b$ = ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)

$M_b$ = มวลของโปรตีน (กรัม)

$\frac{1}{\alpha}$ = ค่า calibration สำหรับ pH-stat

$h_{tot}$ = จำนวนพันธะเพปไทด์ในโปรตีน

วิธีการนี้จะใช้ในการวัดระดับการย่อยโปรตีนอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ แต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะเป็นค่าสัมพัทธ์ และหากต้องการความถูกต้องแม่นยำจะต้องตรวจสอบด้วยวิธีอื่น ๆ เช่น TNBS หรือ OPA (Silvestre, 1997)

## 2.4 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้เอนไซม์

ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา (รูปที่ 2.4) เริ่มจากนำวัตถุดิบมาบดให้ละเอียด จากนั้นเติมน้ำและเอนไซม์ ย่อยที่อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ไม่ควรใช้เวลาในการย่อยมากเกินไปเพราะจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีรสขม จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยใช้ความร้อนแล้วนำไปแยกเอากากออก ส่วนที่เป็นของเหลวนำไปทำแห้งจะได้เป็นผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสต หากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณไขมันมากกว่า 1% ควรแยกไขมันออกก่อน เนื่องจากไขมันจะมีผลต่อกลิ่นรสที่ไม่ดีของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ (Gildberg, 1993)

### 2.4.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

#### 2.4.1.1 ชนิดของเอนไซม์

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ต่างชนิดกันจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ต่างกัน ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ

Shahidi และคณะ (1995) เปรียบเทียบการย่อยปลา capelin (*Mallotus villosus*) ด้วยเอนไซม์ 4 ชนิด คือ Alcalase®, Neutrase®, papain และการย่อยโปรตีนโดยปฏิกิริยา

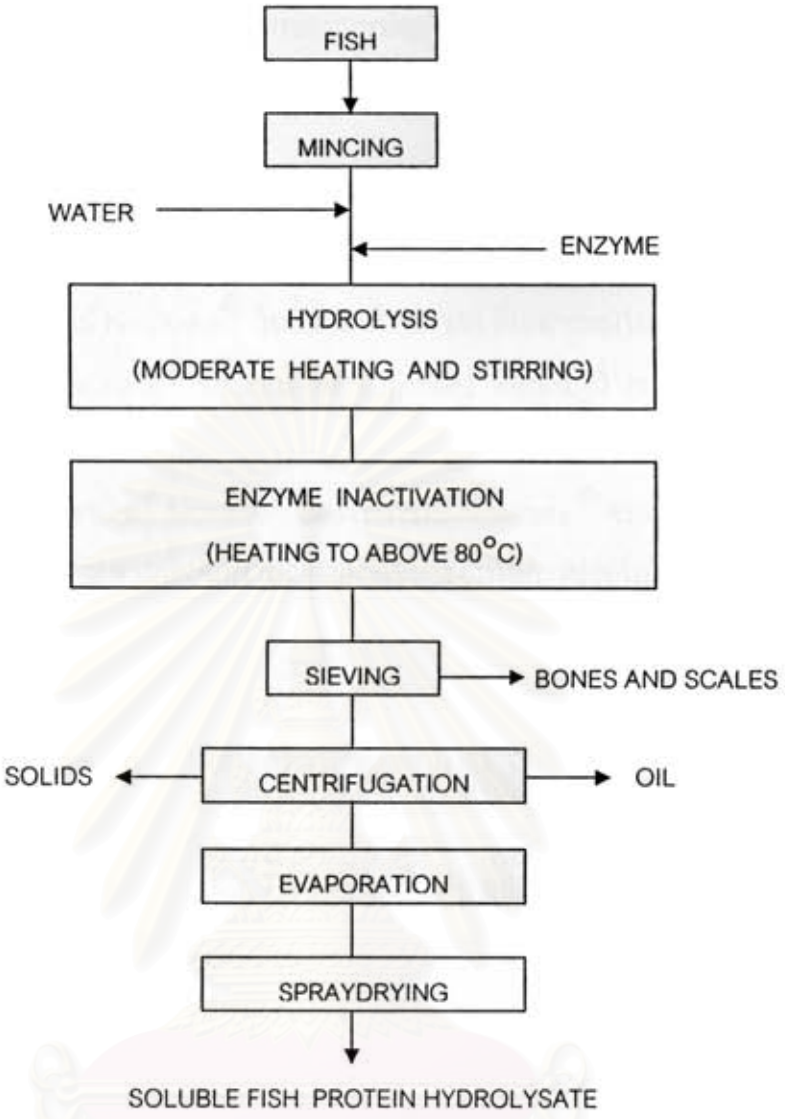
autolysis ของ endogeneous enzymes ซึ่งพบในเครื่องในของปลา ที่ภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ ที่อุณหภูมิ 45-65°C และ pH 8.5, 7.0, 6.1 และ 3.0 ตามลำดับ ใช้ระยะเวลาการย่อย 10-120 นาที พบว่าการย่อยโปรตีนโดยใช้ Alcalase®, Neutrase® และ papain จะได้ protein recovery สูงกว่าการย่อยโปรตีนโดยปฏิกิริยา autolysis การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทางการค้าได้ protein recovery 51.6 – 70.6% ส่วนการย่อยโปรตีนโดยปฏิกิริยา autolysis ได้ protein recovery 22.9% และเมื่อเปรียบเทียบการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทางการค้าแต่ละชนิดพบว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® จะได้ protein recovery สูงกว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Neutrase® และเอนไซม์ papain นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® จะพบว่าเอนไซม์ Alcalase® มีระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าเอนไซม์ Neutrase®

2.4.1.2 ปริมาณเอนไซม์

การใช้เอนไซม์ในปริมาณมากจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง จากนั้นระดับการย่อยโปรตีนจะคงที่

ปราณิศา เชื้อโพธิ์หัก และนงนุช รักสกุลไทย (2534) เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ papain และเอนไซม์ bromelain ในการย่อยโปรตีนและศึกษาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการเตรียมน้ำหอยนางรมสกัดเพื่อทำซอสหอยนางรม โดยใช้เอนไซม์ papain และเอนไซม์ bromelain ในปริมาณ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7% ของน้ำหนักหอย ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 20 วัน พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ papain เข้มข้น 0.7% หรือเอนไซม์ bromelain เข้มข้น 0.3% จะทำให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำหอยนางรมสกัดสูงที่สุด และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ papain จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสูงกว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ bromelain

Guerard และคณะ (2002) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทูน่าที่เหลือจากอุตสาหกรรมผลิตปลาทูน่ากระป๋องด้วยเอนไซม์ Umamizyme โดยใช้สัดส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนในช่วง 0.1-1.5% (w/w) ย่อยที่ pH 7 อุณหภูมิ 45°C ใช้ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง พบว่าเมื่ออัตราส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีนเพิ่มขึ้นจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น โดยสัดส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีน 1.5% (w/w) จะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงที่สุด คือ 22.5% ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณไนโตรเจนที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าที่สัดส่วนเอนไซม์ต่อโปรตีน 1.0% และ 1.5%(w/w) มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดต่างกันเพียงเล็กน้อย ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จนถึงระดับหนึ่งแล้วระดับการย่อยโปรตีนจะคงที่




**รูปที่** 2.4 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาโดยใช้เอนไซม์

ที่มา: Gildberg (1993)

2.4.1.3 ภาวะการย่อย (Adler-Nissen, 1986)

เอนไซม์โดยทั่วไปจะมีประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันที่ระดับความเป็นกรดเบส (pH) ต่างกัน แต่จะมีช่วงความเป็นกรดเบสหนึ่งที่เอนไซม์จะสามารถทำงานได้ดีที่สุด ดังนั้นในการนำเอนไซม์มาใช้งานจึงต้องมีการควบคุมความเป็นกรดเบสให้เหมาะสม และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง อุณหภูมิในการย่อยโปรตีนจึงมีบทบาทสำคัญ เมื่อใช้อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาสูงเกินไป จะทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เสียสภาพ ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์แต่ละชนิดควรคำนึงถึงความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ นอกจากนี้ระยะเวลาการย่อยก็มีผลต่อ

การย่อยโปรตีนเช่นกัน โดยในช่วงแรกของการย่อยโปรตีน เอนไซม์จะเข้าจับกับโปรตีนอย่างรวดเร็วเกิดการย่อยโปรตีนจนทำให้เกิดเพปไทด์ขึ้น จากนั้นเมื่อใช้เวลาในการย่อยมากขึ้นความเร็วในการเกิดปฏิกิริยาจะเริ่มคงที่

Benjakul และ Morrissey (1997) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก Pacific whiting solid wastes (PWSW) โดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® ในขั้นแรกศึกษา pH ที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีน โดยย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.5-11.5 และเอนไซม์ Neutrase® ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 50°C pH 4.5-10.5 ใช้ระยะเวลาการย่อย 10 นาที พบว่าเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® จะย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดที่ pH 9.5 และ 7.0 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีน โดยย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® ที่ pH ที่ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดที่วิเคราะห์ได้ในขั้นแรก โดยใช้อุณหภูมิ 20-80 °C ใช้ระยะเวลาการย่อย 10 นาที พบว่าเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® จะย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60°C และ 55°C ตามลำดับ ดังนั้นภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ Alcalase® คือ อุณหภูมิ 60°C pH 9.5 ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนของเอนไซม์ Neutrase® คือ อุณหภูมิ 55°C pH 7.0 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของ ปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยโปรตีน โดยย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ pH 9.5 อุณหภูมิ 60°C และเอนไซม์ Neutrase® ที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 55°C ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0-120 AU/kg ใช้ระยะเวลาการย่อย 30 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์จะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจนเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ถึง 57 AU/kg จากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้นระดับการย่อยโปรตีนจะเริ่มคงที่ โดยการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Neutrase® จะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 60% และ 30% ตามลำดับ

Nilsang และคณะ (2005) ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากปลาด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และเอนไซม์ Kojizyme® โดยย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 50 LAPU/g protein (LAPU: Leucine Aminopeptidase Unit) และเอนไซม์ Kojizyme® 40 LAPU/g protein ที่ pH 6.0 อุณหภูมิ 45, 50, 55, และ 60°C ความเข้มข้นเอนไซม์ 1, 2, 3, 4 และ 5%(w/w) ระยะเวลาการย่อย 1 - 6 ชั่วโมง พบว่าภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® คือ ใช้เอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 5%(w/w) ที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 62% และภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Kojizyme® คือ ใช้เอนไซม์ Kojizyme® เข้มข้น 5%(w/w) ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 68% นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อย

โปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® จะมีปริมาณ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสขมอยู่น้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Kojizyme® ดังนั้นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® จะทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตปริมาณมากกว่าการใช้เอนไซม์ Kojizyme® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไม่มีรสขม

ดวงใจ ลาภยืนยง (2548) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linnaeus โดยใช้ Flavourzyme® เข้มข้น 1% ของน้ำหนักตัวอย่าง โดยแปรอุณหภูมิ 40°C, 50°C และ 60°C และแปร pH 5-7 ระยะเวลาการย่อย 1 ชั่วโมง พบว่าภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเนื้อและเครื่องในหอยเป๋าฮื้อคือ ใช้อุณหภูมิ 60°C pH 6 มีระดับการย่อยโปรตีน 41.41% และ 44.48% ตามลำดับ จากนั้นย่อยเนื้อและเครื่องในหอยเป๋าฮื้อที่ภาวะเหมาะสมโดแปรระยะเวลาการย่อยเป็น 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที พบว่าที่ระยะเวลาการย่อย 180 นาที มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือ 47.77% และ 52.89% ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากเนื้อและเครื่องในมีคะแนนด้านกลิ่นรสสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 90 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ

## 2.5 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน หมายถึง สมบัติทางกายภาพและทางเคมีที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนในอาหารระหว่างการแปรรูป การเก็บรักษา การเตรียมอาหาร และการบริโภค สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น

### 2.5.1 สมบัติการละลาย (Solubility)

ความสามารถในการละลายเป็นสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญที่สุดของโปรตีนไฮโดรไลเสต เนื่องจากความสามารถในการละลายนั้นจะส่งผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่อื่น ๆ เช่น การเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และการเกิดโฟม เป็นต้น ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตนั้นสามารถรายงานในรูป nitrogen solubility index (NSI) นอกจากนี้ปริมาณไขมันที่มีอยู่ในโปรตีนไฮโดรไลเสตก็มีผลต่อความสามารถในการละลายเช่นกัน โดยถ้ามีปริมาณไขมันอยู่มากจะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง (Kristinsson and Rasco, 2000)

### 2.5.2 สมบัติการอุ้มน้ำ (Water-Holding Capacity)

สมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน คือ ความสามารถของโปรตีนในการเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำและยึดเหนี่ยวโมเลกุลน้ำไว้ในโครงสร้าง การย่อยโปรตีนจะทำให้จำนวนหมู่ที่มีขั้วใน

ระบบ เช่น หมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนมีปริมาณมากขึ้น ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนกับโมเลกุลน้ำและยึดเหนี่ยวโมเลกุลน้ำไว้ได้ดีขึ้น (Kristinsson and Rasco, 2000)

2.5.3 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifying Properties)

อิมัลชัน หมายถึง ระบบของเหลวตั้งแต่สองชนิดขึ้นไปที่ไม่ละลายซึ่งกันและกัน โดยมีของเหลวชนิดหนึ่งกระจายตัวในลักษณะหยดกลมเล็ก ๆ อยู่ในของเหลวอีกชนิดหนึ่ง ระบบของอิมัลชันจะแบ่งตามลักษณะการกระจายตัว ถ้าระบบเป็นหยดน้ำมันกระจายอยู่ในน้ำ เรียกว่า อิมัลชันระบบน้ำมันในน้ำ (oil-in-water, O/W) ถ้าระบบเป็นหยดน้ำกระจายในน้ำมัน เรียกว่า อิมัลชันระบบน้ำในน้ำมัน (water-in-oil, W/O) โปรตีนทำหน้าที่เป็นอิมัลซิไฟเออร์ของระบบโดยมีการจัดเรียงส่วนที่เป็น hydrophobic ของโมเลกุลโปรตีนที่ผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมัน (McClement, 1999) เมื่อโปรตีนถูกย่อยเกิดเป็นเพปไทด์ที่มีโมเลกุลสายสั้นลงทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว และเคลื่อนที่ไปยังบริเวณพื้นผิวเม็ดน้ำมัน โดยหันส่วนที่ไม่มีขั้วเข้าหาเม็ดน้ำมันและหันส่วนที่มีขั้วเข้าหาวัฏภาคน้ำหรือวัฏภาคที่มีขั้วทำให้เกิดสภาพอิมัลชันขึ้น ความสามารถในการเกิดอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจะขึ้นอยู่กับระดับการย่อยโปรตีน ความเป็นกรดเบส เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยโปรตีน และ surface hydrophobicity ($S_0$) เป็นต้น โดยความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะมีค่าต่ำ ณ จุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) (Kristinsson and Rasco, 2000) สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนจะพิจารณาจากค่า emulsifying activity index (EAI) ดังสมการ (4) ซึ่งจะใช้ประมาณความสามารถของโปรตีนในการช่วยให้เกิดอิมัลชันและทำให้อิมัลชันเสถียร โดยอาศัยหน่วยของพื้นที่ผิวสัมผัสต่อหน่วยน้ำหนักโปรตีน ซึ่งตรวจวัดด้วยความขุ่นของอิมัลชันที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร และคำนวณความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจากค่า emulsion stability index (ESI) ดังสมการ (5) (Pearce and Kinsella, 1978)

$$EAI\ (m^2/g) = \frac{2\tau}{\phi C} \qquad \text{.....(4)}$$

$$\tau\ (\text{ค่าความขุ่น}) = \frac{2.303 \times A_{500} \times F}{l}$$

$A_{500}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

F = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชัน

l = light path length (เมตร)

$\phi$ = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชัน

C = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

$$\text{ESI (นาที)} = \frac{\tau \times \Delta t}{\Delta \tau} \quad \text{.....(5)}$$

$\Delta t$ = ระยะเวลาที่ผ่านไป (นาที)

$\Delta \tau$ = ค่าความขุ่นที่เปลี่ยนไป

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดอิมัลชัน ได้แก่ น้ำสลัด มายองเนส ไส้กรอก ซุป และเค้ก เป็นต้น

2.5.4 สมบัติการเกิดโฟม (Foaming Properties)

สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีน หมายถึง ความสามารถของโปรตีนที่ทำให้เกิดพื้นที่ผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว และรักษาความคงตัวให้กับฟิล์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากแรงกระทำจากภายนอก ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการสมบัติการเกิดโฟม ได้แก่ ไอศกรีม เค้ก และเมอร์แรงจ์ เป็นต้น สมบัติการเกิดโฟมจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับโครงสร้างของโปรตีน surface hydrophobicity ประจุ และค่า pI ของโปรตีน เช่น globular protein จะเพิ่ม foaming stability ในขณะที่ fibrous protein จะช่วยให้เกิด interfacial ของโปรตีนระหว่างอากาศกับของเหลวอย่างรวดเร็วทำให้ foaming activity สูง (Damodaran and Paraf, 1997) สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนจะพิจารณาจาก foamability หรือ foam capacity ของโปรตีน ซึ่งจะรายงานในรูป foaming power (FP) หรือ foam expansion (FE) ดังสมการ (6)

$$\text{FP} = \frac{\text{ปริมาตรของก๊าซทั้งหมดในโฟม}}{\text{ปริมาตรของของเหลว}} \times 100 \quad \text{.....(6)}$$

FP จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนมากขึ้น แต่ FP จะมีค่าเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้มากขึ้น FP จะเริ่มมีค่าคงที่ นอกจากนี้ FP ยังขึ้นอยู่กับวิธีทำให้เกิดโฟมด้วย สำหรับความคงตัวของโฟม (foam stability) จะพิจารณาจากระยะเวลาที่ใช้ในการทำให้ปริมาตรของโฟมลดลง 50% หรือมีของเหลวเพิ่มขึ้น 50% ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม ได้แก่ pH ไขมัน และปริมาณโปรตีน (Kristinsson and Rasco, 2000)

2.5.5 สมบัติทางประสาทสัมผัส (Sensory Properties)

การย่อยโปรตีนจะทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระหรือเพปไทด์สายสั้น ๆ ขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนบางชนิดสามารถให้รสหวานได้ เช่น alanine และ glycine ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ isoleucine, leucine, phynylalanine, tryptophan, tyrosine, valine และเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบอยู่จะให้รสขม โดยรสขมของเพปไทด์เกิดจาก side chain ของกรดอะมิโน

ที่ไม่ละลายน้ำ (Matoba and Hata, 1972) ตัวอย่างของเพปไทด์ที่ให้รสขม ได้แก่ Gly-Leu, Leu-Phe, Leu-Lys และ Arg-Leu เป็นต้น นอกจากนี้การจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในเพปไทด์ที่ให้รสขมจะมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของรสขม เช่น Phe-Pro จะมีรสขมมากกว่า Pro-Phe และ Gly-Phe-Pro จะมีรสขมมากกว่า Phe-Pro-Gly (Kirimura และคณะ, 1969)

Vieira และคณะ (1995) ศึกษาการย่อยโปรตีนของ Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) ด้วยเอนไซม์ papain, pepsin และ fungal protease โดยย่อยที่ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด คือ pH 7.5, 2.0 และ 7.5 ตามลำดับ อุณหภูมิ 37°C ใช้ระยะเวลาการย่อย 5 ชั่วโมง ใช้ปริมาณเอนไซม์ 2, 4 และ 5 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง โดยพิจารณาระดับการย่อยโปรตีนจากปริมาณ tyrosine ที่เพิ่มขึ้น พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น โดยในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดที่ภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 5 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง จากนั้นทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิดที่ภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดดังกล่าว ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการละลาย พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ fungal protease มีสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ papain และเอนไซม์ pepsin โดยมีค่า emulsification capacity 18, 16 และ 5 มิลลิลิตรน้ำมันต่อ 0.5 กรัมโปรตีน ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ pepsin จะมีสมบัติการละลายดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ papain และเอนไซม์ fungal protease และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสามชนิดจะละลายได้ดีที่สุดที่ pH 2 และ 9 และละลายได้น้อยที่สุดที่ pH 5 ซึ่งเป็น isoelectric point ของโปรตีน

Liceaga-Gesualdo และ Li-Chan (1999) ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา herring (*Clupea harengus*) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® เข้มข้น 0.5% (w/w) ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่าง ที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 50°C ใช้ระยะเวลาการย่อย 5, 10, 20, 30, 45 และ 60 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น โดยภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงที่สุดคือที่ระยะเวลาการย่อย 60 นาที มีระดับการย่อยโปรตีน 35% จากนั้นทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดดังกล่าวด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์และอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรมากกว่า โดยโปรตีน

ไฮโดรไลเสตที่ได้และตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์จะมีค่า EAI 12.6 และ 10.00 ตารางเมตรต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ค่า EAI จะลดลงเป็น 8.25 และ 1.00 ตารางเมตรต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟม พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์แต่โฟมที่เกิดขึ้นจะไม่คงตัว ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์จะเกิดโฟมได้ไม่ดีแต่โฟมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมากกว่า โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และตัวอย่างที่ไม่ได้ย่อยด้วยเอนไซม์จะมีค่า FE 140% และ 110% ตามลำดับ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ค่า FE จะลดลงเป็น 1% และ 100% ตามลำดับ

Sathivel และคณะ (2003) ศึกษาสมบัติทางชีวเคมีและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา herring (*Clupea harengus*) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® เข้มข้น 0.5%(w/w) อัตราส่วนน้ำต่อตัวอย่างเป็น 1:1 ย่อยที่pH 8 อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 0, 15, 30, 45, 60 และ75 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น โดยภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือที่ระยะเวลาการย่อย 75 นาที มีระดับการย่อยโปรตีน 18.3% จากนั้นทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดดังกล่าวด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติการละลาย และสมบัติการเกิดอิมัลชัน โดยใช้อัลบูมินเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับอัลบูมิน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และอัลบูมินมีค่า nitrogen solubility 85.1% และ 89.8% ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ต่ำกว่าอัลบูมินและอิมัลชันที่เกิดขึ้นมีความเสถียรน้อยกว่า โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และอัลบูมินมีค่า emulsification capacity 20.6 และ 327.7 มิลลิลิตรน้ำมันต่อ 200 มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และมีค่า emulsification stability 48.6% และ 72.3% ตามลำดับ

ดวงใจ ลาภยืนยง (2548) ศึกษาสมบัติทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อและเครื่องในของหอยเป๋าฮื้อ โดยใช้ Flavourzyme® เข้มข้น 1.00% ย่อยที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 ระยะเวลาการย่อย 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากเนื้อและเครื่องในมีคะแนนด้านกลิ่นรสสูงสุดเมื่อใช้ระยะเวลาการย่อย 90 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยให้สูงขึ้นจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีรสขม

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยโปรตีนและชนิดของเอนไซม์ที่มีต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Flavourzyme® เข้มข้น 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50 และ 10.00%(w/w) อัตราส่วนน้ำต่อตัวอย่างเป็น 4:1 ย่อยที่ pH 8.5 อุณหภูมิ

60°C สำหรับเอนไซม์ Alcalase® และย่อยที่ pH 7.0 อุณหภูมิ 50°C สำหรับเอนไซม์ Flavourzyme® ใช้ระยะเวลาการย่อย 20 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นระดับการย่อยโปรตีนจะเริ่มคงที่ และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® จะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 43% ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 25% จากนั้นศึกษาผลของระดับการย่อยโปรตีนต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยคำนวณหาภาวะการย่อยโปรตีนที่ทำให้ได้ระดับการย่อยโปรตีน 5, 15 และ 25% จากผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนที่ได้ในขั้นแรก แล้วย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะดังกล่าว จากนั้นทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติการละลาย สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ และสมบัติการเกิดโฟม พบว่าเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจะทำให้ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สูงขึ้น และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® จะมีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® โดยที่ภาวะที่มีความสามารถในการละลายสูงสุดมีค่า %solubility มากกว่า 90% และจากการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ พบว่าเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจะทำให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ลดลงและความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นลดลง และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® จะมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® แต่ความเสถียรของอิมัลชันจะต่ำกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Flavourzyme® จะมีค่า EAI และค่า ESI ต่ำสุดที่ pH 4.0 และเมื่อวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟม พบว่าเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นจะทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ลดลงและความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นลดลง และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® จะมีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโฟมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® และเอนไซม์ Flavourzyme® จะมีค่า foaming capacity และค่า foam stability ต่ำสุดที่ pH 4.0

## 2.6 การนำโปรตีนไฮโดรไลเสตมาใช้ประโยชน์

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตขึ้นในระยะแรกนั้นเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา ผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ต่อมามีการศึกษาเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนจึงนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ด้วย โดยสามารถนำโปรตีนไปใช้ประโยชน์ได้ ดังนี้

### 2.6.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยที่ระดับการย่อยโปรตีนสูงจะประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมาก เป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีและเหมาะแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงสามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Mackie,1982)

### 2.6.2 อาหารสัตว์

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลามีคุณค่าทางโภชนาการที่ดี ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน จึงมีการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ที่อยู่ในระยะแรกเกิดและระยะเจริญเติบโต เช่น ลูกแกะ ลูกวัว และลูกหมู เป็นต้น โดยนำมาใช้ทดแทนโปรตีนนมในอาหารสัตว์ (Mackie,1982) Orskov และคณะ (1982) ศึกษาการใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาทดแทนโปรตีนนมในอาหารเลี้ยงแกะ โดยใช้เวลาการเลี้ยง 5 สัปดาห์ พบว่าแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลามีอัตราการเจริญเติบโตช้ากว่าแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้เคซีนเล็กน้อยในสองสัปดาห์แรก แต่หลังจากสัปดาห์ที่สามอัตราการเจริญเติบโตของแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาจะสูงกว่าแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้เคซีน และเมื่อพิจารณาจากอัตราการเจริญเติบโตของแกะโดยรวมแล้วพบว่าอัตราการเจริญเติบโตของแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาและแกะที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ใช้เคซีนมีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน

### 2.6.3 อาหารมนุษย์

ปัจจุบันได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีและเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ เช่น ขนมอบ เป็นต้น และสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น ซุป ซอส และไส้กรอก เป็นต้น (Mackie,1982)

# บทที่ 3

# อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

## วัตถุดิบ

หอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* ขนาดเล็กซึ่งเลี้ยงไม่โต ไม่ได้ขนาดตามต้องการที่จะนำไปบริโภคเป็นหอยสดหรือนำไปแปรรูปในลักษณะอื่น มีขนาดประมาณ 10-20 กรัมต่อตัว จากฟาร์มเป๋าฮื้ออันดามัน จังหวัดตรัง โดยเก็บตัวอย่างในเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม ปี 2548

## เอนไซม์

Flavourzyme® (Novozymes, Denmark) เป็น protease/ peptidase complex สามารถทำหน้าที่เป็นได้ทั้ง endoprotease และ exoprotease เป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Aspergillus oryzae* มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 5.0-7.0 อุณหภูมิ 40-60°C มี activity 500 LAPU/g (Leucine Amino Peptidase Units per gram)

Alcalase® (Novozymes, Denmark) เป็น endoprotease ที่ได้จากจุลินทรีย์ชนิด *Bacillus lincheniformis* มีภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง pH 6.5-8.5 อุณหภูมิ 55-70°C มี activity 2.4 AU/g (Anson Units per gram)

## สารเคมี

| | | |
|---|---|---|
| Boric acid | Univa | A.R. grade |
| Bovine serum albumin (98%) | Sigma | A.R. grade |
| Bromocresol green | Carlo Erba | A.R. grade |
| Copper sulphate | Carlo Erba | A.R. grade |
| di-Sodiumhydrogen phosphate | Univa | A.R. grade |
| Folin-Ciocalteu phenol reagent | Carlo Erba | A.R. grade |
| Hydrochloric acid | J.T. Baker | A.R. grade |
| Methyl red | Merck | A.R. grade |
| mono-Sodiumhydrogen phosphate | Univa | A.R. grade |
| Petroleum ether | Carlo Erba | A.R. grade |
| Potassium hydrogen phathalate | Carlo Erba | A.R. grade |
| Selenium reagent mixer | Merck | A.R. grade |

| | | |
|---|---|---|
| Sodium carbonate | Univa | A.R. grade |
| Sodium chloride | Univa | A.R. grade |
| Sodium citrate | Univa | A.R. grade |
| Sodium hydroxide | Univa | A.R. grade |
| Sulfuric acid | J.T. Baker | A.R. grade |
| Trichloroacetic acid | Merck | A.R. grade |

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กรดอะมิโน

| | | |
|---|---|---|
| Acetonitrile | Fisher Scientific | HPLC grade |

Waters AccQ. fluor reagent kit ประกอบด้วย

- Waters AccQ. fluor borate buffer (Waters, Milford, Massachusetts)
- Waters AccQ. fluor reagent powder (2A) (Waters, Milford, Massachusetts)
- Waters AccQ. fluor reagent diluent (2B) (Waters, Milford, Massachusetts)

Waters AccQ-Tag eluent A concentrate (gradient mobile phase) (Waters, Milford, Massachusetts)

Waters amino acid hydrolysate standard ampoules (Pierce, Rockford, USA)

อุปกรณ์

Freeze dryer (Heto รุ่น DW8-85, Denmark)

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (Waters, Milford, Massachusetts) ประกอบด้วย

- ระบบฉีดตัวอย่าง (Waters รุ่น 717, Milford, Massachusetts)
- คอลัมน์ Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด UV/VIS (Waters รุ่น 2487, USA)

pH meter (HORIBA รุ่น F-21, Japan)

Spectrofluorometer (JASCO รุ่น FP-6200, Japan)

UV/VIS spectrometer (Perkin Elmer รุ่น Lambda 25, Shelton, USA)

Waring Blender (Waring Commercial รุ่น HGB2WT, Torrington, USA)

ชุดวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Buchi รุ่น B-324, Switzerland)

ชุดวิเคราะห์ไขมัน (Soxhlet Apparatus) (Gerhardt รุ่น EV-16, Germany)

เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด (Sartorius รุ่น BP210S, Germany)

ตู้อบลมร้อน (Memmert รุ่น 600, USA)

เตาเผา (Carbolite รุ่น CWF1200, UK)

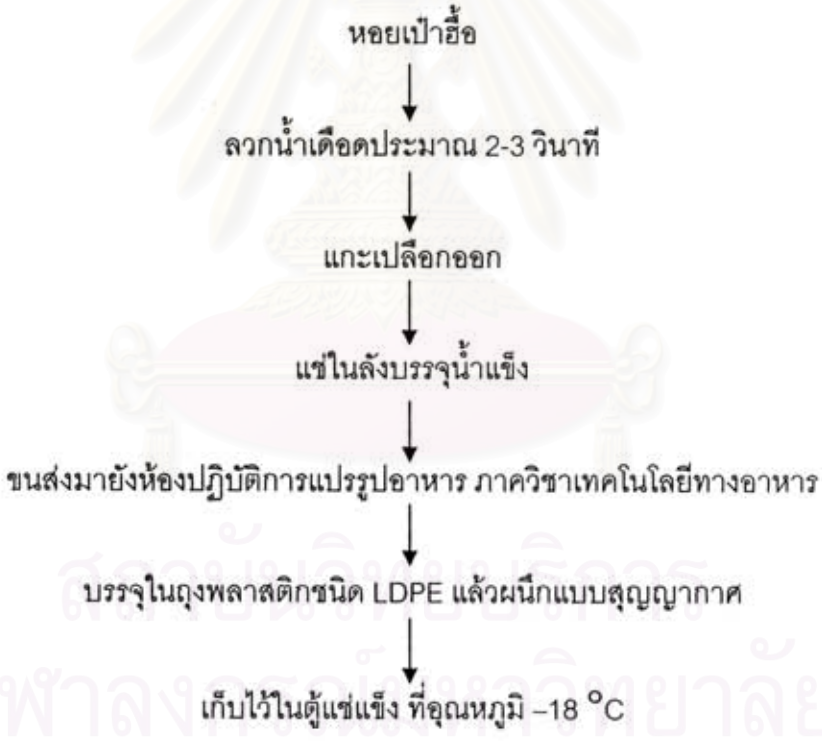
เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Thermo IEC รุ่น multi-RF, USA)

ตู้แช่แข็งชนิดควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Sanyo รุ่น SF-C95, Japan)

**ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย**

**3.1 องค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อ**

ใช้หอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* ขนาดเล็กซึ่งเป็นหอยเป๋าฮื้อที่โตช้าหรือโตไม่ได้ขนาดไม่สามารถส่งขายได้ โดยหอยเป๋าฮื้อมีขนาดน้ำหนักประมาณ 10-20 กรัมต่อตัว เตรียมตัวอย่างดังรูปที่ 3.1 เมื่อจะวิเคราะห์จึงนำหอยเป๋าฮื้อแช่แข็งมาละลายน้ำแข็ง ใช้ทั้งส่วนเนื้อและส่วนเครื่องใน จากนั้นสับให้ละเอียดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป




**รูปที่ 3.1** การเตรียมหอยเป๋าฮื้อ

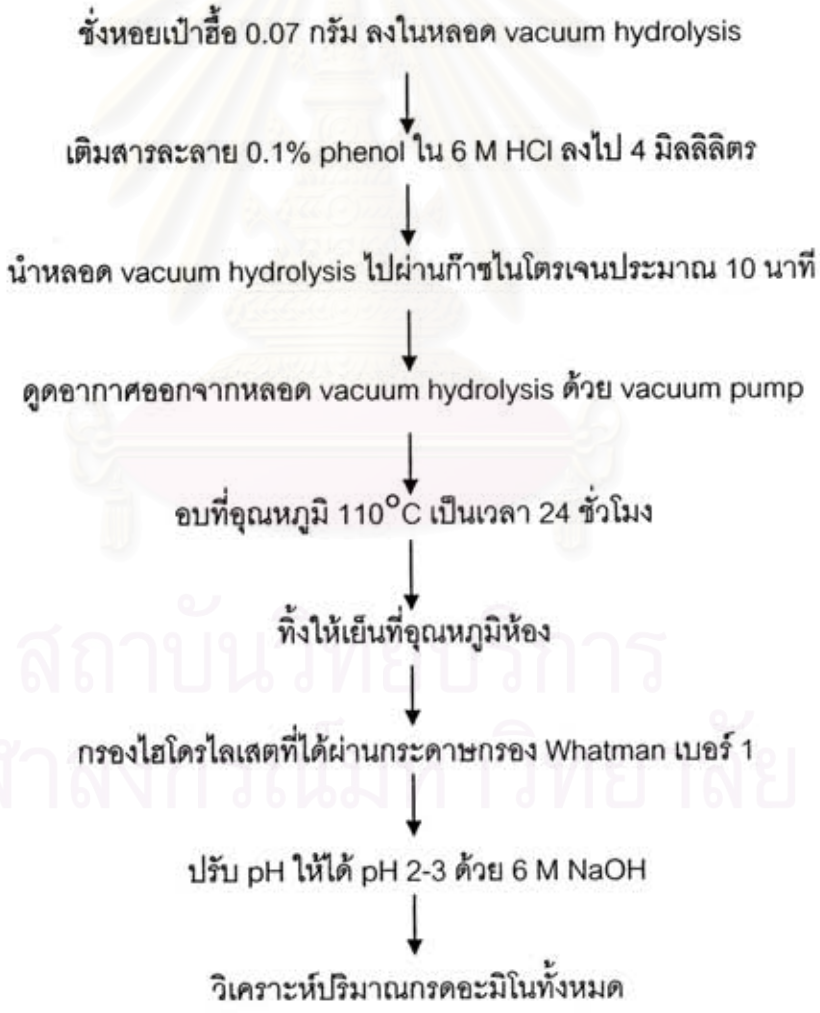
3.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อทั้งตัว

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (ภาคผนวก ก.1) ปริมาณโปรตีน (ภาคผนวก ก.2) ปริมาณไขมัน (ภาคผนวก ก.3) และปริมาณเถ้า (ภาคผนวก ก.4) ของหอยเป๋าฮื้อทั้งตัวตามวิธีการใน A.O.A.C. (1995) โดยแยกวิเคราะห์ในหอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม และ 20 กรัมต่อตัว

3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อ

เตรียมสารสกัดจากหอยเป๋าฮื้อเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ดังรูปที่ 3.2 จากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดด้วยวิธี HPLC (AccQ. Taq method; Waters, USA) (ภาคผนวก ข.1) โดยใช้คอลัมน์ Waters AccQ-Tag amino acid analysis column ขนาด 3.9 มิลลิเมตร x 150 มิลลิเมตร เฟสเคลื่อนที่ คือ 60% acetonitrile และ AccQ. Tag Eluent A Concentrate ใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

| | | |
|---|---|---|
| ปริมาณตัวอย่าง | 10 | ไมโครลิตร |
| อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ | 1.0 | มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิในการวิเคราะห์ | 37°C | |
| เวลาในการวิเคราะห์ | 50 | นาทีต่อตัวอย่าง |




**รูปที่** 3.2 การเตรียมสารสกัดจากหอยเป๋าฮื้อเพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด

## 3.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

3.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

นำหอยเป๋าฮื้อที่ได้จากข้อ 3.1 ที่ผ่านการละลายน้ำแข็งและสับละเอียดแล้วประมาณ 15 กรัม ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.0 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์ 5 ระดับ คือ 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50 % ของน้ำหนักตัวอย่าง ภาวะการย่อยที่ pH 6.0 และอุณหภูมิ 60°C แปรระยะเวลาการย่อย 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เมื่อย่อยครบตามเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสซึ่งคือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ surface hydrophobicity

3.2.1.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อ

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งหมดและปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ โดยคำนวณหาระดับการย่อยโปรตีน (%DH) จาก

$$\%DH = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอนด้วย 10\% TCA}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100$$

โดยปริมาณโปรตีนทั้งหมดคำนวณได้จากการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Kjeldhal (conversion factor = 6.25) (A.O.A.C.,1995) (ภาคผนวก ก.2) และปริมาณโปรตีนหลังตกตะกอนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ด้วยสารละลาย trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 10% คำนวณได้จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในส่วนของเหลวด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) (ภาคผนวก ก.5) ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูง โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ anaysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

3.2.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์ Flavourzyme® และปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ด้วยวิธี HPLC (AccQ. Taq method; Waters, USA) (ภาคผนวก ข.1) จากนั้นคำนวณปริมาณกรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสที่ดีและรสขม ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณกรดอะมิโนที่ให้รสขมในปริมาณต่ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

3.2.1.3 ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

เตรียมสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 0.010-0.035% (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นเติม ANS (1-anilino-8-naphthalene sulfonate) เข้มข้น 0.01%(w/v) 10 ไมโครลิตร นำไปวัดค่า fluorescence intensity โดยตั้งค่า excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 390 และ 470 นาโนเมตร ตามลำดับ (Wagner and Anon, 1990) (ภาคผนวก ก.6) จากนั้นพลอตกราฟระหว่าง fluorescence intensity กับปริมาณโปรตีน ความชันของกราฟที่ได้คือค่า surface hydrophobicity index ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตกับระดับการย่อยโปรตีน

เลือกภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 2 ภาวะ โดยพิจารณาจากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงและมีปริมาณกรดอะมิโนที่ให้รสขมในปริมาณน้อย

3.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase®

หอยเป๋าฮื้อที่ได้จากข้อ 3.1 ที่ผ่านการละลายน้ำแข็งและสับละเอียดแล้วประมาณ 15 กรัม ผสมกับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 8.0 ปริมาตร 60 มิลลิลิตร ย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® โดยแปรความเข้มข้นเอนไซม์ 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 % ของน้ำหนักตัวอย่าง ย่อยที่ pH 8.0 อุณหภูมิ 60°C แปรระยะเวลาการย่อย 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เมื่อย่อยครบตามเวลาแล้วหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85°C จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที

นำส่วนใสไปวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ surface hydrophobicity

3.2.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.1 ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูง โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

3.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์ Alcalase® และปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.2 ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อเลือกภาวะการย่อยโปรตีนที่ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณกรดอะมิโนที่ให้รสขมในปริมาณน้อย โดยวางแผนการทดลองแบบ symmetric factorial design ขนาด 5x5 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

3.2.2.3 ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.2.1.3 ทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตกับระดับการย่อยโปรตีน

เลือกภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® 2 ภาวะ โดยพิจารณาจากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงและมีปริมาณกรดอะมิโนที่ให้กลิ่นรสขมในปริมาณน้อย จากนั้นเปรียบเทียบระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อและปริมาณกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® (ข้อ 3.2.1) และ Alcalase® (ข้อ 3.2.2)

**3.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ในภาวะที่เหมาะสม**

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 อย่างละ 2 ภาวะ มาทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่ความดัน 0.05 hPa vacuum อุณหภูมิ -60°C จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ได้ในภาชนะปิดสนิทที่อุณหภูมิ 4°C แล้วนำไปวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

3.3.1 สมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

วิเคราะห์ความสามารถในการละลายของผงโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะที่เหมาะสมทั้งสี่ภาวะที่เลือกได้ในข้อ 3.2.1 และข้อ 3.2.2 เตรียมสารละลายตัวอย่างความเข้มข้น 1% (w/v) ทำการทดลองที่ pH 2-10 (ภาคผนวก ค.1) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) (ภาคผนวก ก.5) และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดด้วยวิธี Kjeldhal (A.O.A.C.,1995) จากนั้นคำนวณความสามารถในการละลายจาก

$$\% \text{ Solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100$$

ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ pH ที่มีต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

เปรียบเทียบความสามารถในการละลายระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

3.3.2 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

วิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสต เข้มข้น 2% (w/v) แปรปริมาณเกลือ 2 ระดับ คือ 0 และ 0.1 M และแปร pH 4 ระดับ คือ 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 วัดปริมาตรโฟมที่เพิ่มขึ้นและของเหลวที่ลดลงที่ตลอดระยะเวลา 60 นาที (ภาคผนวก ค.2) จากนั้นคำนวณความสามารถในการเกิดโฟมจาก

$$\text{Foam expansion (FE\%)} = \frac{\text{ปริมาตรโฟมที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาตรของเหลวเริ่มต้น}} \times 100$$

ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของ pH และ ปริมาณเกลือต่อความสามารถในการเกิดโฟมและความเสถียรของโฟมที่เกิดขึ้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ factorial design ขนาด 2x4 วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

เปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® และเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้กับความสามารถในการเกิดโฟมของ bovine serum albumin (BSA)

3.3.3 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

วิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน (1, 2 และ 3%) แปรปริมาณเกลือ 2 ระดับ คือ 0 และ 0.1 M โดยใช้น้ำมันข้าวโพด 10 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสต 30 มิลลิลิตร ด้วย homogenizer ที่ความเร็ว 22,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เจือจางอิมัลชันที่ได้ด้วย 0.1% SDS จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (Pearce and Kinsella, 1978) (ภาคผนวก ค.3) คำนวณความสามารถในการเกิดอิมัลชันจากค่า emulsification activity index (EAI)

$$\text{EAI } (m^2/g) = \frac{2\tau}{\phi C}$$

$$\tau \text{ (ค่าความขุ่น)} = \frac{2.303 \times A_{500} \times F}{l}$$

$A_{500}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

F = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชันเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้

l = light path length (เมตร)

$\phi$ = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชัน

C = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

และคำนวณความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจากค่า emulsion stability index (ESI)

$$\text{ESI (นาที)} = \frac{\tau \times \Delta t}{\Delta \tau}$$

$\Delta t$ = ระยะเวลาที่ผ่านไป (นาที)

$\Delta \tau$ = ค่าความขุ่นที่เปลี่ยนไป

ทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาผลของปริมาณเกลือที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีนต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1992)

เปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® และเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้กับความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 4

# ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

## 4.1 องค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อ

4.1.1 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อทั้งตัว

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อโดยทั่วไปจะวิเคราะห์ส่วนเนื้อหอยเป๋าฮื้อและส่วนเครื่องในแยกกัน แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ใช้ประโยชน์จากหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กทั้งตัวขนาดน้ำหนักประมาณ 10-20 กรัม ดังนั้นจึงวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อทั้งส่วนเนื้อและเครื่องในรวมกัน โดยสับหอยเป๋าฮื้อให้ละเอียด จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า โดยใช้วิธีของ A.O.A.C. (1995) ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.1

**ตารางที่ 4.1** องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

| น้ำหนักหอยเป๋าฮื้อต่อตัว | ปริมาณความชื้น[ns] (% wet basis) | ปริมาณโปรตีน[ns] (% wet basis) | ปริมาณไขมัน[ns] (% wet basis) | ปริมาณเถ้า[ns] (% wet basis) |
|---|---|---|---|---|
| 10 กรัม | 82.26 ± 0.24 | 14.85 ± 0.16 | 0.24 ± 0.05 | 1.04 ± 0.16 |
| 20 กรัม | 82.93 ± 0.26 | 14.69 ± 0.12 | 0.35 ± 0.09 | 1.87 ± 0.33 |

ns แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* ในตารางที่ 4.1 พบว่าปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ของหอยเป๋าฮื้อขนาด 10 และ 20 กรัมต่อตัว มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$) (ตารางที่ ง.1) และมีค่าใกล้เคียงกับผลการวิเคราะห์ของ ดวงใจ ลาภยืนยง (2548) ซึ่งพบว่าในส่วนเนื้อของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ขนาด 10 กรัม มีปริมาณความชื้น 83.78% โปรตีน 14.90% ไขมัน 0.28% และเถ้า 1.02% และผลการวิเคราะห์ของ วิชชญา นะราแก้ว (2548) ซึ่งพบว่าในส่วนเนื้อของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ขนาด 20 กรัม มีปริมาณความชื้น 82.10% โปรตีน 14.70% ไขมัน 0.30% และเถ้า 1.20% นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อที่วิเคราะห์ได้มีค่าแตกต่างกับหอยเป๋าฮื้อชนิดอื่น ๆ เล็กน้อย เช่น หอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ที่พบในญี่ปุ่นชนิด *H. gigantea* (Gmelin) มีความชื้น 75% โปรตีน 22.5% ไขมัน 0.45% และเถ้า 1.3% (Simidu et al., 1953) ชนิด *H. discus*

*hannai* มีความชื้น 72-78% โปรตีน 12.5%-19.0% ไขมัน 1.0-1.5% และเถ้า 1.2-2.5% (Tanikawa and Yamashita, 1961) ชนิด *H. gigantea discus* มีความชื้น 78-90% และโปรตีน 9.4-17.5% และชนิด *H. giantea sieboldii* มีความชื้น 78-83% และโปรตีน 12.5-17% (Takayama et al., 1970) หอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ที่พบในสหรัฐอเมริกาชนิด *H. cracheroidii* มีความชื้น 68-72% โปรตีน 18-23% และไขมัน 0.75-3.0% (Webber, 1970) หอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ที่พบในออสเตรเลียชนิด *H. rubber* มีความชื้น 74-78% และโปรตีน 16-19.5% (Olley and Thrower, 1977) และหอยเป๋าฮื้อสายพันธุ์ที่พบในเกาหลีชนิด *H. gigantea nordatis* มีความชื้น 76% โปรตีน 20% ไขมัน 0.4% และเถ้า 2.8% เป็นต้น จากการศึกษาของ Hatae และคณะ (1995) พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. discus* ที่จับได้ในแต่ช่วงของปีจะมีความแตกต่างกัน คือ ในช่วงฤดูร้อนหอยเป๋าฮื้อจะมีปริมาณความชื้นต่ำแต่ปริมาณโปรตีนสูง โดยในช่วงเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ หอยเป๋าฮื้อมีความชื้น 81.2-82.1% โปรตีน 14.2-15.2% ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม หอยเป๋าฮื้อมีความชื้น 72.4-79.0% โปรตีน 16.3-18.4% ซึ่งหอยเป๋าฮื้อที่มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันจะส่งผลให้กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และลักษณะปรากฏแตกต่างกัน การที่หอยเป๋าฮื้อมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ชนิด ขนาด อายุ เพศ แหล่งที่อยู่ อาหาร สภาพภูมิอากาศ ฤดูกาล และสภาวะการวางไข่ เป็นต้น (Pigott and Tucker, 1990) แต่จะไม่พบความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มในแต่ละช่วงของปี เนื่องจากมีการควบคุมสภาวะแวดล้อมและอาหารในการเพาะเลี้ยง จึงทำให้องค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อมีค่าค่อนข้างจะคงที่

4.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อ

จากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* ขนาด 10 กรัม และ 20 กรัม (ตารางที่ 4.2) พบว่าหอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (2673.29 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) ต่ำกว่าหอยเป๋าฮื้อขนาด 20 กรัม (3061.98 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) และเมื่อพิจารณาปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้พบว่ากรดอะมิโนที่มีปริมาณมากที่สุดในหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* ขนาด 10 กรัม และ 20 กรัม ได้แก่ glutamic acid (418.06 และ 437.52 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) รองลงมาคือ glycine (315.53 และ 370.54 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) และ arginine (310.21 และ 351.83 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) ซึ่งกรดอะมิโนชนิด glutamic acid และ glycine เป็นกรดอะมิโนที่สำคัญต่อกลิ่นรสของหอยเป๋าฮื้อโดย glutamic acid เป็นกรดอะมิโนที่ทำให้เกิดรส umami ส่วน glycine เป็นกรดอะมิโนที่ให้รสหวาน (Konosu, 1979) ในขณะที่

กรดอะมิโนชนิดที่ให้รสขม ได้แก่ valine (62.24 และ 168.69 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) isoleucine (92.24 และ 168.90 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) leucine (172.31 และ 234.80 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) และ phenylalanine (93.67 และ 165.34 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) มีอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่า แต่ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. asinina* ที่ได้แตกต่างกับผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อชนิดอื่น ๆ โดย Hwang และคณะ (1997) วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. diversicolor* ที่มาจากเมือง Taipei, Kaohsiung และ Pingtung พบว่ามีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 3,268 3,462 และ 3,595 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และพบว่าในหอยเป๋าฮื้อชนิด *H. diversicolor* จะมีกรดอะมิโนชนิด taurine, arginine, glycine, glutamic acid และ alanine อยู่ปริมาณมาก ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะขึ้นอยู่กับฤดูกาลและแหล่งที่อยู่ของหอยเป๋าฮื้อ (Hwang et al.,1997)

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการวิจัยต้องการใช้ประโยชน์จากหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กซึ่งเลี้ยงไม่โตไม่ได้ขนาดตามต้องการ ซึ่งมีขนาดประมาณ 10 – 20 กรัม และจากการวิเคราะห์องค์ประกอบของหอยเป๋าฮื้อ พบว่าหอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม มีปริมาณโปรตีนใกล้เคียงกับหอยเป๋าฮื้อขนาด 20 กรัม ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้หอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม และ 20 กรัม รวมกัน แม้ว่าหอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม จะมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดน้อยกว่าก็ตาม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่** 4.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในหอยเป๋าฮื้อ

| ชนิดกรดอะมิโน | ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง*) | |
|---|---|---|
| | หอยเป๋าฮื้อขนาด 10 กรัม | หอยเป๋าฮื้อขนาด 20 กรัม |
| Aspartic acid | 313.74 ± 13.40 | 286.36 ± 1.32 |
| Serine | 104.16 ± 4.27 | 116.87 ± 0.51 |
| Glutamic acid | 418.06 ± 17.79 | 437.52 ± 2.14 |
| Glycine | 315.53 ± 13.34 | 370.54 ± 2.08 |
| Histidine | 34.08 ± 1.35 | 55.91 ± 0.08 |
| Arginine | 310.21 ± 14.01 | 351.83 ± 0.35 |
| Threonine | 179.77 ± 7.67 | 158.92 ± 1.14 |
| Alanine | 114.38 ± 6.34 | 98.51 ± 0.50 |
| Proline | 165.28 ± 7.33 | 219.26 ± 3.56 |
| Cysteine | 28.47 ± 1.56 | 0.000 |
| Tyrosine | 137.22 ± 6.02 | 130.50 ± 0.43 |
| Valine | 62.24 ± 2.65 | 168.69 ± 0.58 |
| Methionine | 17.57 ± 0.70 | 69.16 ± 0.11 |
| Lysine | 114.36 ± 4.75 | 28.88 ± 0.07 |
| Isoleucine | 92.24 ± 4.67 | 168.90 ± 0.30 |
| Leucine | 172.31 ± 8.44 | 234.80 ± 37.09 |
| Phenylalanine | 93.67 ± 4.30 | 165.34 ± 48.43 |
| Total | 2673.29 ± 118.59 | 3061.98 ± 91.45 |

* wet basis

## 4.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

ในการทดลองนี้เป็นการวิเคราะห์หาภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อโดยพิจารณาจากระดับการย่อยโปรตีน (Degree of Hydrolysis ; %DH) และปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ซึ่งจะเลือกภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนจากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงและมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมอยู่น้อย

4.2.1 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

4.2.1.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อ

จากการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ โดยแปรปริมาณเอนไซม์ 5 ระดับ คือ 0, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.50 %(w/w) ของน้ำหนักตัวอย่าง และแปรระยะเวลาการย่อย 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.3

**ตารางที่ 4.3** ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ (%w/w) | %DH ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | $0.62^{a} \pm 0.09$ | $9.52^{c} \pm 0.29$ | $10.03^{c} \pm 0.71$ | $12.16^{d} \pm 0.39$ | $13.13^{d} \pm 0.72$ |
| 0.50 | $2.31^{ab} \pm 0.18$ | $19.69^{e} \pm 0.03$ | $23.31^{f} \pm 0.98$ | $25.80^{g} \pm 0.90$ | $28.28^{h} \pm 2.46$ |
| 0.75 | $2.21^{ab} \pm 0.11$ | $38.67^{i} \pm 0.46$ | $39.95^{i} \pm 0.96$ | $44.42^{j} \pm 1.89$ | $47.36^{l} \pm 1.31$ |
| 1.00 | $2.84^{b} \pm 0.02$ | $39.09^{i} \pm 1.90$ | $40.31^{i} \pm 2.41$ | $44.65^{jk} \pm 2.60$ | $47.75^{l} \pm 1.04$ |
| 1.50 | $2.06^{ab} \pm 0.01$ | $40.84^{i} \pm 1.70$ | $43.57^{j} \pm 0.53$ | $45.14^{jk} \pm 0.16$ | $46.62^{kl} \pm 0.75$ |

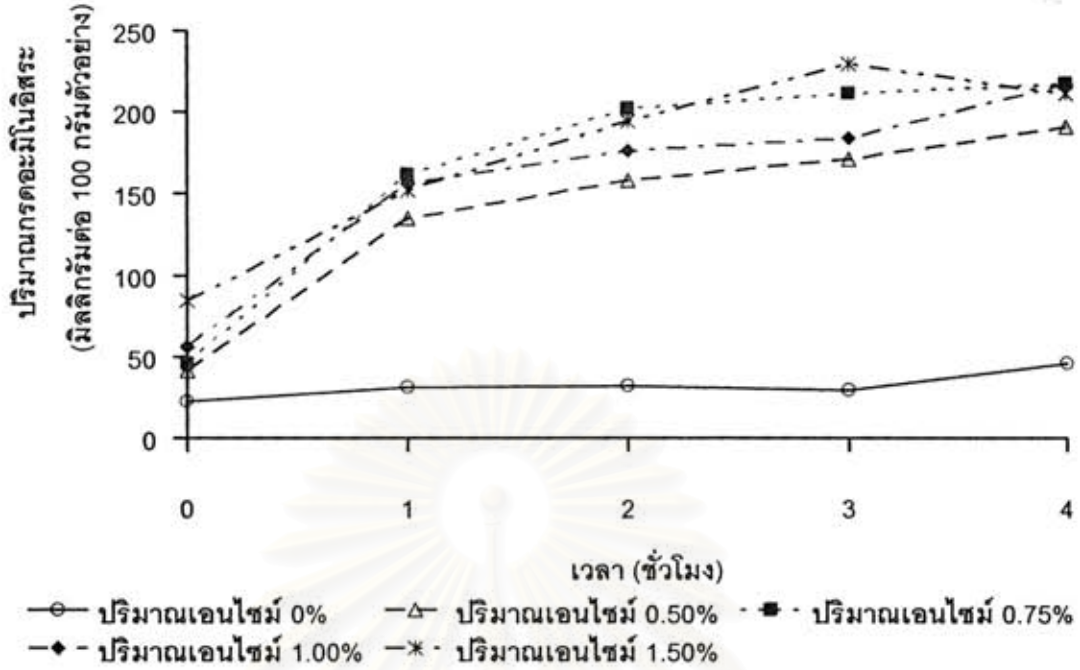
a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.2) โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือ ภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 47.36% และภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 47.75% ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nilsang และคณะ (2005) ที่ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจาก fish soluble concentrate ด้วย Flavourzyme® (50 LAPU/g) และ Kojizyme® (40 LAPU/g) โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1-5%(w/w) ย่อยที่อุณหภูมิ 45-60°C pH 6 ใช้ระยะเวลาการย่อย 1–6 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยอาจมีเพปไทด์และกรดอะมิโนที่ให้รสขม ได้แก่ Gly-Leu, Leu-Phe, Leu-Lys, Arg-Leu, phynylalanine, tyrosine, tryptophan, valine, leucine และ isoleucine เป็นต้น รวมอยู่ด้วยทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีรสขม (Matoba และ Hata, 1972) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้เพื่อนำไปประกอบการพิจารณาในการเลือกภาวะที่เหมาะสมต่อไป

4.2.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ ดังข้อ 4.2.1.1 (ตารางที่ ฉ.1) แสดงดังรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนในข้อ 4.2.1.1 เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น โปรตีนจะถูกย่อยเป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนได้มากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น และจากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.3) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะการย่อยโปรตีนที่ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงสุด คือ ภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 1.50% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 229.16 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง รองลงมาคือภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 0.75% และ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 217.269 และ 217.581 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์ Flavourzyme® พบว่า Flavourzyme® เข้มข้น 1.00% มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 1.697 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ดังนั้นปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์จึงไม่มีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้




**รูปที่** 4.1 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0

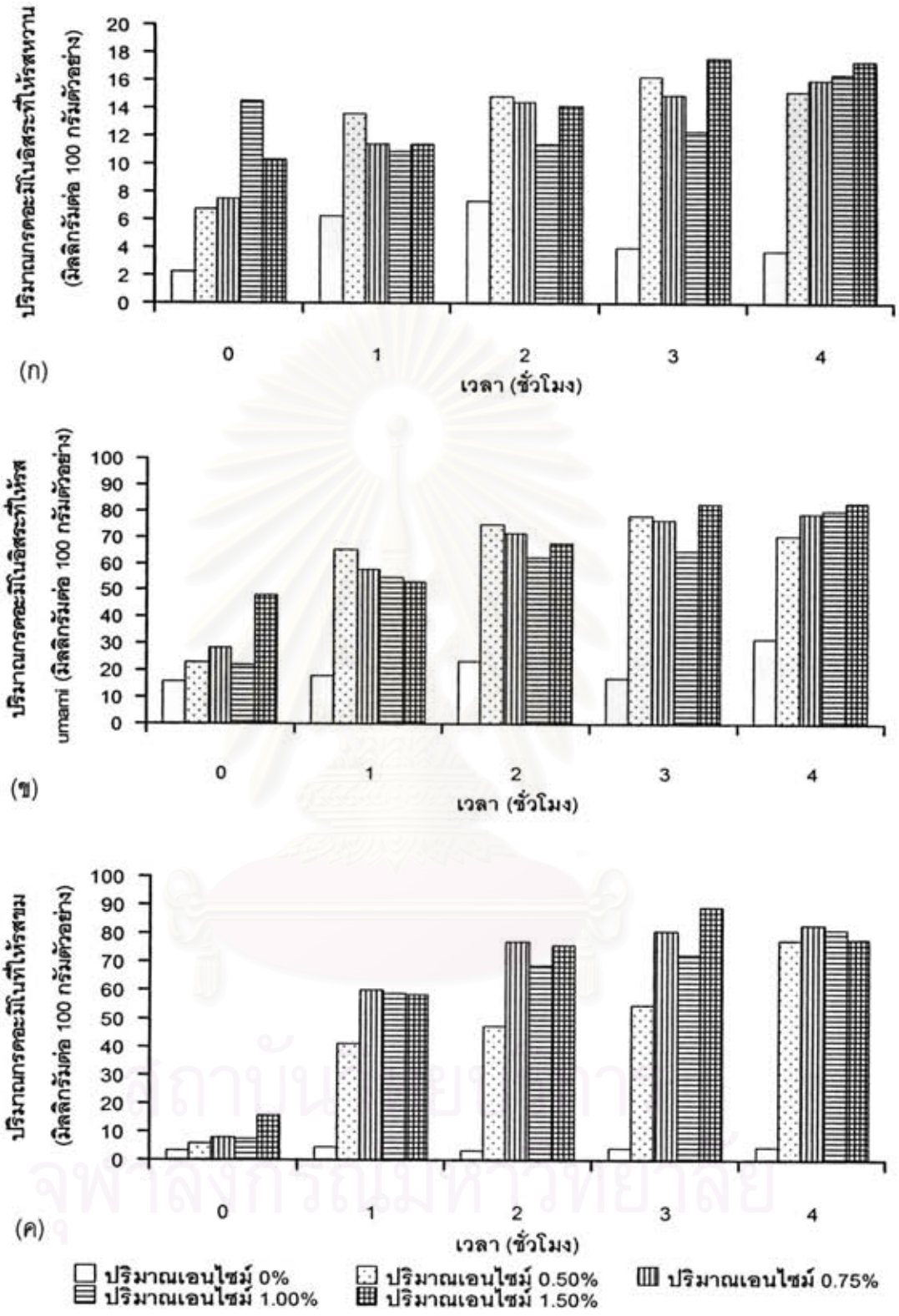
ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่วิเคราะห์ได้เป็นปริมาณของกรดอะมิโน 17 ชนิด ได้แก่ aspartic acid, serine, glutamic acid, glycine, histidine, argenine, threonine, alanine, proline, cysteine, tyrosine, valine, methionine, lysine, isoleucine, leucine และ phenylalanine ซึ่งสามารถแบ่งกรดอะมิโนเหล่านี้ได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน กรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami และกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม โดยกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน ได้แก่ glycine, alanine และ proline กรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami ได้แก่ serine, glutamic acid, glycine, arginine และ alanine ส่วนกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม ได้แก่ tyrosine, valine, isoleucine, leucine และ phenylalanine (Matoba and Hata, 1972) ผลที่ได้จากการแบ่งกลุ่มของกรดอะมิโนแสดงดังรูปที่ 4.2 พบว่าผลที่ได้จากภาวะที่ใช้ระยะเวลาการย่อย 1-3 ชั่วโมง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน คือภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน เมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวานจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami และกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม สำหรับภาวะที่ใช้ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน กรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami และกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมมีปริมาณค่อนข้างคงที่ จากผลที่ได้จะเห็นว่าในภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยสูงขึ้น ซึ่งเป็นภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงจะมีปริมาณ

กรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน กรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami และกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมอยู่ใกล้เคียงกัน และเมื่อคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด (รูปที่ 4.3) พบว่าภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.50% เมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 0.75% ไม่ว่าจะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ให้สูงขึ้น ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดจะค่อนข้างคงที่ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Flavourzyme® จะปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมค่อนข้างคงที่เมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nilsang และคณะ (2005) ที่พบว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลาด้วย Flavourzyme® เข้มข้น 5% ย่อยที่อุณหภูมิ 45°C pH 6 จะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมค่อนข้างคงที่เมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น

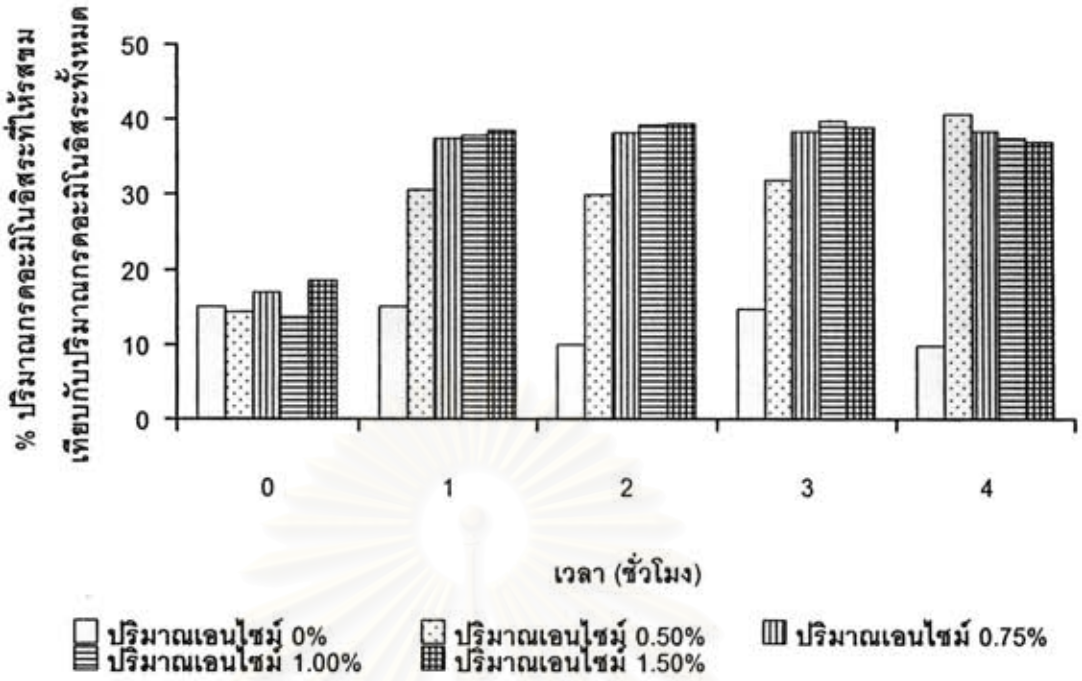
4.2.1.3 ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

ผลจากการวิเคราะห์ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ ดังข้อ 4.2.1.1 แสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจะทำให้ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ลดลง แต่เมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยค่า surface hydrophobicity จะสัมพันธ์กับปริมาณของหมู่ที่ไม่มีขั้วที่อยู่ที่ผิวของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งสายเพปไทด์หรือกรดอะมิโนที่มีหมู่ที่ไม่มีขั้วเป็นองค์ประกอบอยู่ในโมเลกุลอาจทำให้เกิดรสขมได้ (Sikorski, 2001) ดังนั้นการที่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีค่า surface hydrophobicity เพิ่มขึ้นน่าจะทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีรสขมมากขึ้นด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 4.2 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0 (ก) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน (ข) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami (ค) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม




**รูปที่** 4.3 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0

**ตารางที่** 4.4 surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ (%w/w) | ANS hydrophobicity index ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 22.38 ± 1.22 | 89.74 ± 11.60 | 107.16 ± 6.29 | 97.23 ± 6.26 | 68.71 ± 7.39 |
| 0.50 | 4.81 ± 1.27 | 24.98 ± 3.42 | 18.96 ± 8.68 | 4.79 ± 3.27 | 24.86 ± 4.32 |
| 0.75 | 12.44 ± 9.39 | 27.20 ± 10.32 | 6.48 ± 3.14 | 4.13 ± 0.18 | 12.67 ± 5.07 |
| 1.00 | 13.18 ± 1.16 | 8.99 ± 1.01 | 4.01 ± 1.29 | 11.80 ± 0.00 | 6.47 ± 3.29 |
| 1.50 | 11.05 ± 6.64 | 5.34 ± 1.30 | 17.35 ± 5.00 | 11.73 ± 7.90 | 23.21 ± 1.28 |

* ANS hydrophobicity index ของ BSA มีค่าเท่ากับ 1217.6

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนของหอยเป๋าฮื้อในข้อ 4.2.1.1 พบว่าภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด คือ ภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 47.36% และภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 47.75% และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในข้อ 4.2.1.2 พบว่าภาวะทั้งสองมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดและกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมอยู่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วย Flavourzyme® จากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 2 ภาวะ เพื่อนำไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป

4.2.2 ภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase®

4.2.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อ

จากการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ โดยแปรปริมาณเอนไซม์ 5 ระดับ คือ 0, 0.05, 0.10, 0.15 และ 0.20 % (w/w) ของน้ำหนักตัวอย่าง และแปรระยะเวลาการย่อย 5 ระดับ คือ 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 ผลที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อโดยใช้เอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ | %DH ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (%w/w) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | $0.62^{a} \pm 0.09$ | $9.52^{c} \pm 0.29$ | $10.03^{c} \pm 0.71$ | $12.16^{d} \pm 0.39$ | $13.13^{d} \pm 0.72$ |
| 0.05 | $2.41^{ab} \pm 0.64$ | $65.86^{gh} \pm 1.15$ | $68.91^{i} \pm 1.48$ | $76.79^{l} \pm 1.75$ | $71.70^{l} \pm 1.69$ |
| 0.10 | $1.86^{ab} \pm 0.17$ | $67.59^{hi} \pm 1.25$ | $76.90^{l} \pm 2.61$ | $73.99^{k} \pm 1.39$ | $73.84^{k} \pm 0.47$ |
| 0.15 | $2.96^{b} \pm 0.24$ | $55.18^{e} \pm 0.52$ | $61.99^{f} \pm 2.62$ | $67.79^{hi} \pm 1.30$ | $64.64^{g} \pm 0.80$ |
| 0.20 | $3.57^{b} \pm 0.16$ | $68.35^{i} \pm 0.98$ | $67.80^{hi} \pm 1.80$ | $67.61^{hi} \pm 1.24$ | $65.92^{gh} \pm 1.20$ |

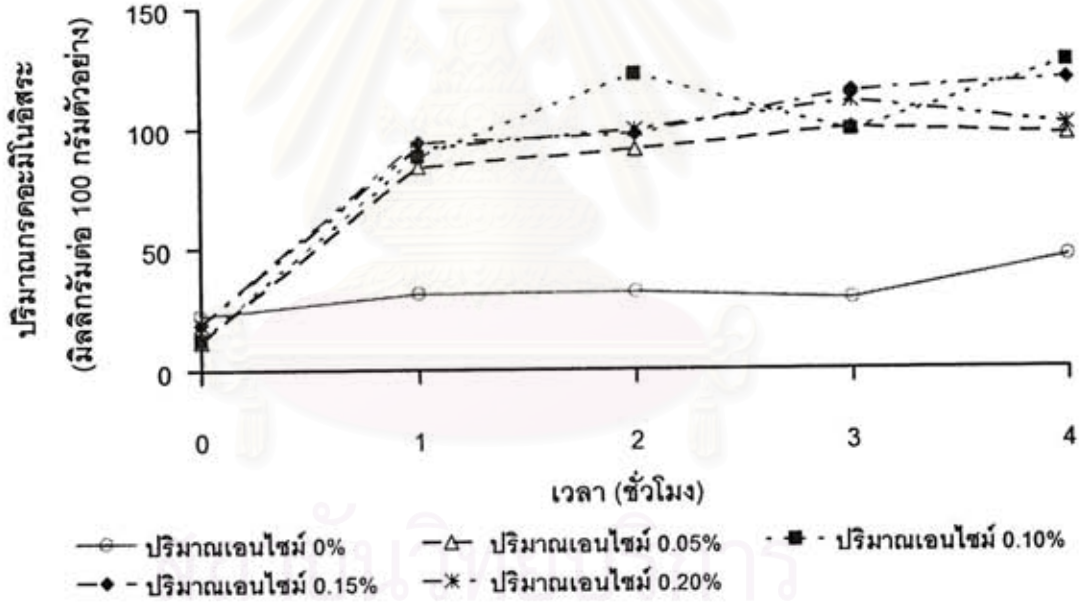
a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.4) โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น แต่ระดับการย่อยโปรตีนจะสูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นจะมีแนวโน้มลดลง และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือ ภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 76.79% และภาวะที่ย่อยด้วย Alcalase® 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 76.90% ซึ่งผลการวิเคราะห์ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Guerard และคณะ (2001) ที่ศึกษาการย่อยโปรตีนในเศษเหลือของปลา yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) ด้วย Alcalase® โดยแปรปริมาณเอนไซม์ตั้งแต่ 0.2-3.0% (w/w) ย่อยที่อุณหภูมิ 50°C pH 8 ใช้ระยะเวลาการย่อย 0-8 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยระดับการย่อยโปรตีนจะสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อยจนถึง 5.5 ชั่วโมง ระดับการย่อยโปรตีนจะลดลงเล็กน้อย โดยภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดคือภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 3% ระยะเวลาการย่อย 5.5 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 23%

4.2.2.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ ดังข้อ 4.2.2.1 (ตารางที่ ฉ.2) แสดงดังรูปที่ 4.4 พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้น และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสต อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.5) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง และภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง ซึ่งเป็นภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระ 100.09 และ 122.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ และจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์ Alcalase® พบว่า Alcalase® เข้มข้น 1.00% มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด 0.090 มิลลิกรัม ซึ่งเป็นปริมาณที่น้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ ดังนั้นปริมาณ

กรดอะมิโนอิสระในเอนไซม์จึงไม่มีผลต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ และเมื่อแบ่งกรดอะมิโนอิสระที่วิเคราะห์ได้เป็น กรดอะมิโนที่ให้รสหวาน กรดอะมิโนที่ให้รส umami และกรดอะมิโนที่ให้รสขม เช่นเดียวกับในข้อ 4.2.1.2 (รูปที่ 4.5) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวานและกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami จะมีแนวโน้มลดลงจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นจะมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ ในขณะที่กรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นจะมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ และเมื่อคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด (รูปที่ 4.6) พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งจากนั้นจะมีแนวโน้มค่อนข้างคงที่ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Alcalase® จะปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมค่อนข้างคงที่เมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น



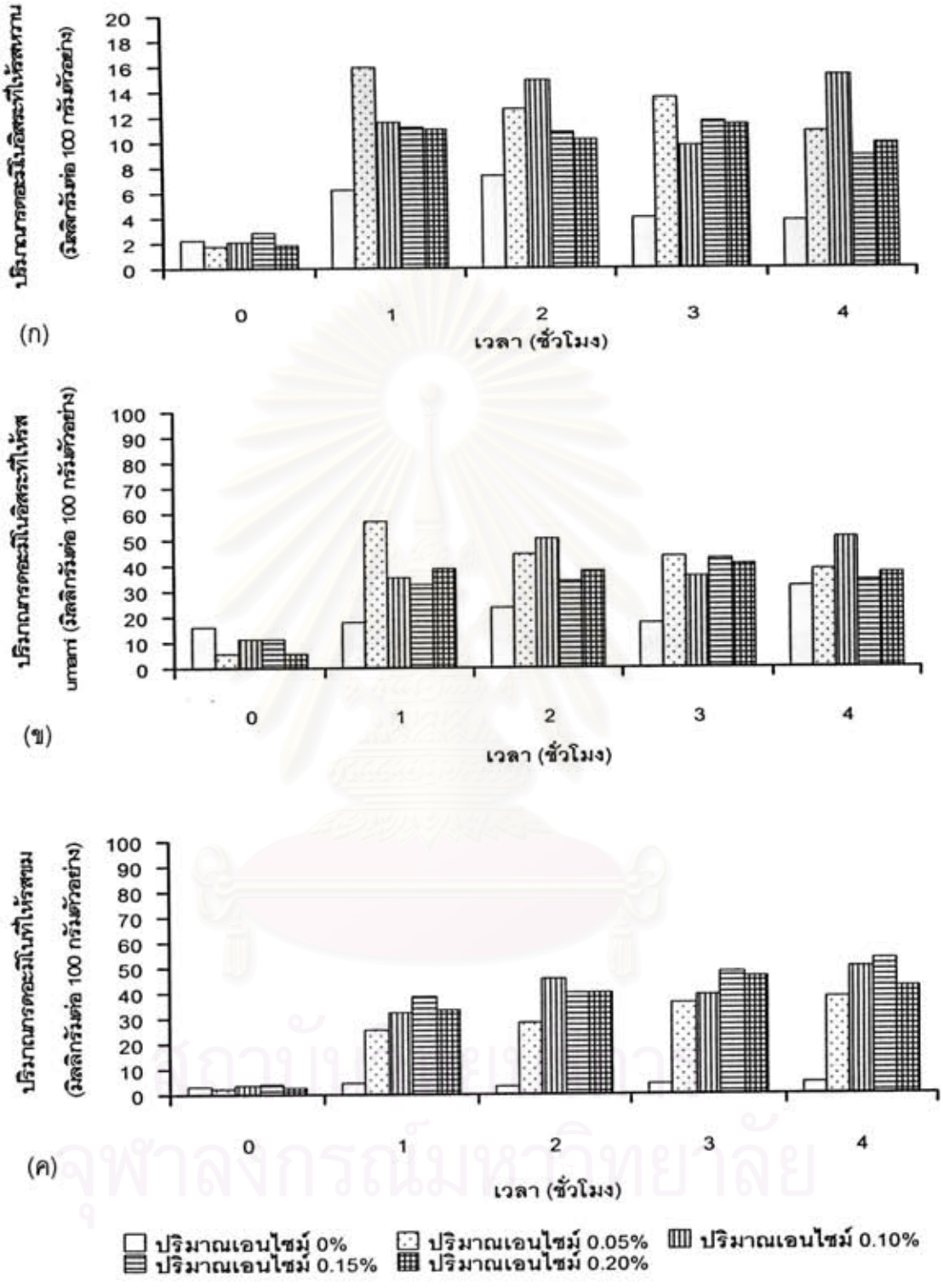

**รูปที่ 4.4** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0

4.2.2.3 ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

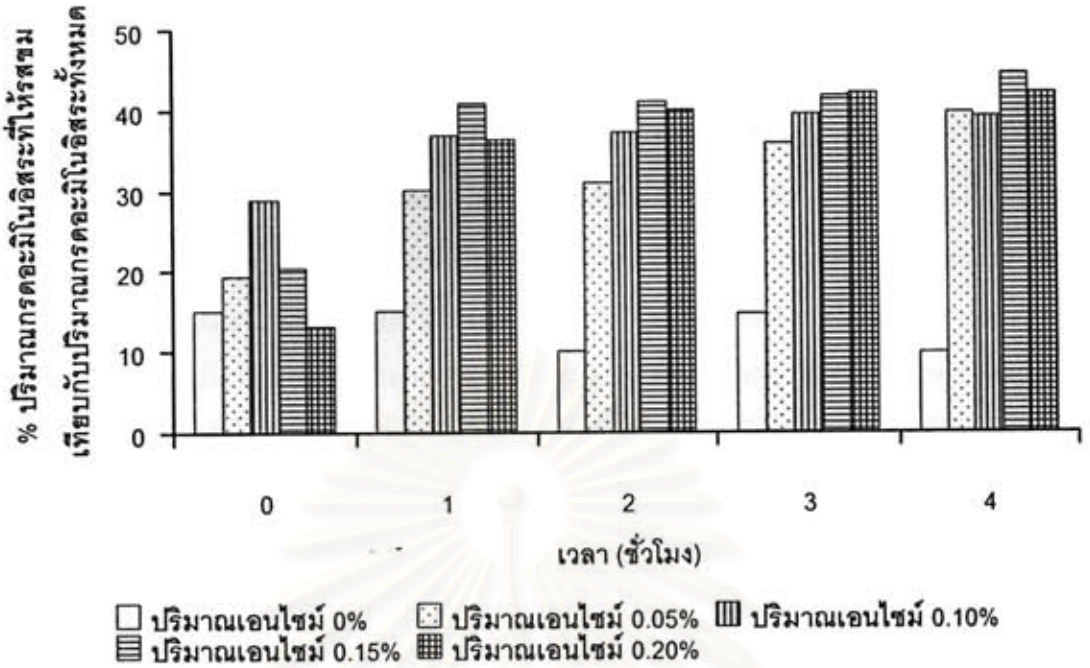
ผลการวิเคราะห์ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ แสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่าเมื่อใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจะทำให้ค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ลดลง แต่เมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นค่า surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Quagly และ Orban (1990) ซึ่งพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา sardine (*Sardina pilchardus*) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® จะมีค่า surface hydrophobicity สูงขึ้นเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น และด้วยเหตุผลเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณ surface hydrophobicity ในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ในข้อ 4.2.1.3 โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงจึงน่าจะมีรสขมมากขึ้น

จากผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อในข้อ 4.2.2.1 พบว่าภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด คือ ภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® เข้มข้น 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 76.79% และภาวะที่ย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® เข้มข้น 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง มีระดับการย่อยโปรตีน 76.90% และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ กรดอะมิโนอิสระในข้อ 4.2.2.2 พบว่าภาวะทั้งสองมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระต่างกันเล็กน้อย (100.09 และ 122.18 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ) แต่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมอยู่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงพิจารณาเลือกภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ Alcalase® จากภาวะที่มีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 2 ภาวะเพื่อนำไปวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 4.5 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0 (ก) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน (ข) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami (ค) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม




**รูปที่ 4.6** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0

**ตารางที่ 4.6** surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ | ANS hydrophobicity index ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| (%w/w) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0 | 22.38 ± 1.22 | 89.74 ± 11.60 | 107.16 ± 6.29 | 97.23 ± 6.26 | 68.71 ± 7.39 |
| 0.05 | 22.38 ± 1.22 | 19.07 ± 6.93 | 20.54 ± 0.76 | 8.89 ± 2.37 | 15.59 ± 6.07 |
| 0.10 | 32.25 ± 9.26 | 17.50 ± 2.83 | 27.06 ± 5.42 | 12.12 ± 2.86 | 39.10 ± 2.55 |
| 0.15 | 4.79 ± 0.72 | 7.49 ± 3.45 | 17.59 ± 2.42 | 32.00 ± 8.49 | 18.46 ± 4.51 |
| 0.20 | 16.51 ± 3.41 | 20.96 ± 0.76 | 17.74 ± 1.74 | 39.05 ± 3.61 | 45.00 ± 10.33 |

* ANS hydrophobicity index ของ BSA มีค่าเท่ากับ 1217.6

เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ระดับการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อระหว่าง Flavourzyme® และ Alcalase® ในข้อ 4.2.1.1 และ 4.2.1.2 พบว่าการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Alcalase® มีระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าการใช้ Flavourzyme® แม้ว่าจะใช้ปริมาณเอนไซม์น้อยกว่า แสดงให้เห็นว่า Alcalase® มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อดีกว่า Flavourzyme® ดังนั้นหากทำการทดลองโดยใช้ Alcalase® ในปริมาณที่เท่ากับ Flavourzyme® จะเป็นการใช้เอนไซม์มากเกินพอทำให้ไม่สามารถเห็นความเปลี่ยนแปลงของระดับการย่อยโปรตีนเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ที่ศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยโปรตีนและชนิดของเอนไซม์ที่มีต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) โดยใช้ Alcalase® และ Flavourzyme® ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้คือ 0.25, 0.50, 1.00, 2.50, 5.00, 7.50 และ 10.00% (w/w) ย่อยที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.5 สำหรับ Alcalase® และย่อยที่อุณหภูมิ 50°C pH 7.0 สำหรับ Flavourzyme® ใช้ระยะเวลาการย่อย 20 นาที พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนจะสูงขึ้น และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® จะมีระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่าโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® โดยมีระดับการย่อยโปรตีนสูงสุด 43% และ 25% ตามลำดับ แต่ผลการวิเคราะห์ที่ได้ขัดแย้งกับงานวิจัยของ Kristinsson และ Rasco (2000) ที่ศึกษากลไกการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีนเนื้อปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่าการใช้ Alcalase® ในการย่อยโปรตีนมีระดับการย่อยโปรตีนต่ำกว่าการใช้ Flavourzyme® ในทุกภาวะการย่อย โดยที่ภาวะการย่อยสูงสุดในการทดลอง คือใช้ระยะเวลาการย่อยเวลา 3 ชั่วโมง ระดับการย่อยโปรตีนของ Alcalase® และ Flavourzyme® มีค่าเท่ากับ 5.59% และ 7.45% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า Alcalase® และ Flavourzyme® มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนต่างกันเมื่อใช้วัตถุดิบต่างชนิดกัน ซึ่งอาจเป็นเพราะเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีกลไกการทำงานและความจำเพาะในการตัดพันธะที่ต่างกัน เมื่อย่อยวัตถุดิบต่างชนิดกันซึ่งมีโครงสร้างของโปรตีนไม่เหมือนกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเปลี่ยนไป

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ซึ่งอาจเป็นเพราะ Flavourzyme® ทำหน้าที่เป็นทั้งเอนโดเพปติเดสและเอกโซเพปติเดส ในขณะที่ Alcalase® ทำหน้าที่เป็นเอนโดเพปติเดสเพียง

อย่างเดียว โดยโมเลกุลโปรตีนที่เกิดจากการย่อยโปรตีนด้วยเอกโซเพปติเดสจะมีขนาดเล็กกว่าการย่อยโปรตีนด้วยเอนโดเพปติเดส (Kristinsson and Rasco, 2000) จึงทำให้มีกรดอะมิโนอิสระเกิดขึ้นมากกว่า ส่งผลให้ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสหวาน กรดอะมิโนอิสระที่ให้รส umami และกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมสูงกว่า แต่เมื่อคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ พบว่าปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขมต่อปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่าใกล้เคียงกัน และจากการวิเคราะห์ค่า surface hydrophobicity พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีค่า surface hydrophobicity ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ซึ่งสนับสนุนกับผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ โดยแสดงให้เห็นว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีหมู่ที่ไม่มีขั้วที่ผิวของโมเลกุลโปรตีนน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ซึ่งหมู่ที่ไม่มีขั้วนี้จะสัมพันธ์กับการเกิดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสต ดังนั้นจากผลการวิเคราะห์ที่ได้จะพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® น่าจะมีรสขมน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase®

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Flavourzyme® ด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.1 ทั้งสองภาวะมีระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระใกล้เคียงกัน แต่จะมีค่า surface hydrophobicity ต่างกัน โดยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง จะมีค่า surface hydrophobicity สูงกว่า ภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง เล็กน้อย (ตารางที่ 4.7) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.2 ทั้งสองภาวะมีระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณกรดอะมิโนอิสระและค่า surface hydrophobicity จะแตกต่างกัน โดยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง จะมีปริมาณกรดอะมิโนอิสระและค่า surface hydrophobicity ต่ำกว่า ภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) เมื่อระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกันจะมีความสามารถในการตัดพันธะใกล้เคียงกัน แต่การใช้ปริมาณเอนไซม์มากขึ้นอาจทำให้โมเลกุลโปรตีนที่เกิดจากการตัดพันธะมีขนาดเล็กลงปริมาณกรดอะมิโนอิสระจึงสูงขึ้น นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้มีระดับการย่อยโปรตีนและค่า surface hydrophobicity ต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ต่างกันด้วย (Kristinsson and Rasco, 2000) ดังนั้นในการทดลอง

ต่อไปจึงศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

**ตารางที่ 4.7** ระดับการย่อยโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ surface hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสม

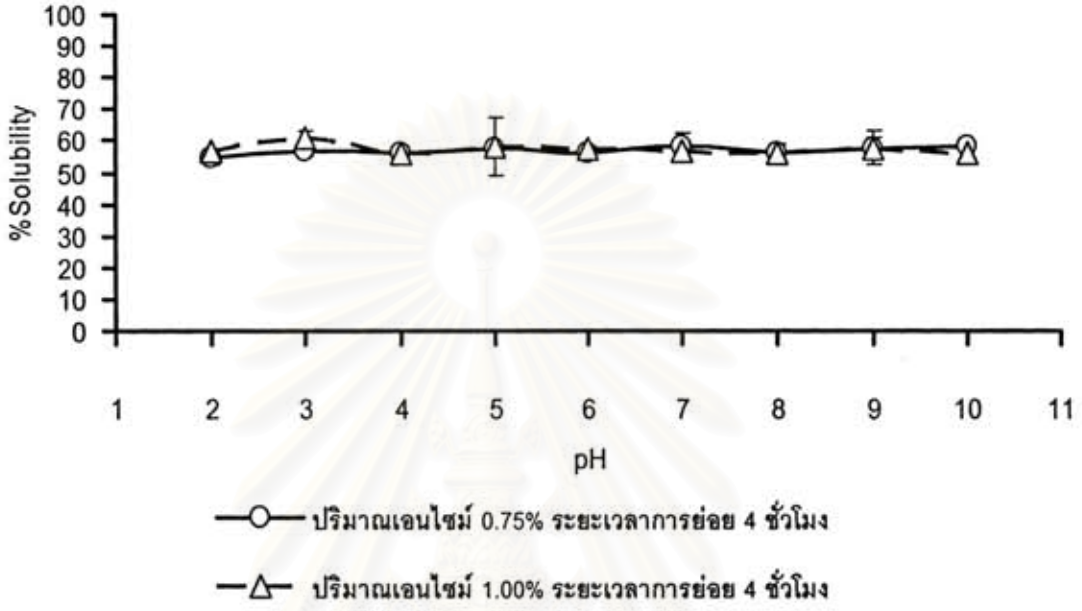
| | ภาวะการย่อยด้วย Flavourzyme® | | ภาวะการย่อยด้วย Alcalase® | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.75%, 4 ชั่วโมง | 1.00%, 4 ชั่วโมง | 0.05%, 3 ชั่วโมง | 0.10%, 2 ชั่วโมง |
| ระดับการย่อยโปรตีน | 47.36% | 47.75% | 76.79% | 76.90% |
| ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ (มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง) | 217.269 | 217.581 | 100.09 | 122.18 |
| ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ให้รสขม (% ของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมด) | 38.25 | 37.39 | 35.80 | 37.28 |
| surface hydrophobicity | 24.86 | 12.67 | 8.89 | 27.06 |

## 4.3 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase® ในภาวะที่เหมาะสม

### 4.3.1 สมบัติการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.1 (ตารางที่ ฉ.3) โดยใช้โปรตีนไฮโดรไลเสตเข้มข้น 1.00% (w/v) ทำการทดลองที่ pH 2-10 แสดงดังรูปที่ 4.7 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะมีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกันในช่วง pH 2-10 โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีค่า % solubility 54.90-55.86% และภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีค่า % solubility 58.46-60.84% และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ ง.6) ซึ่งอาจเป็นเพราะโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนทั้งสองภาวะมีระดับการย่อยโปรตีนสูง โดยเมื่อระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้นความสามารถในการละลาย

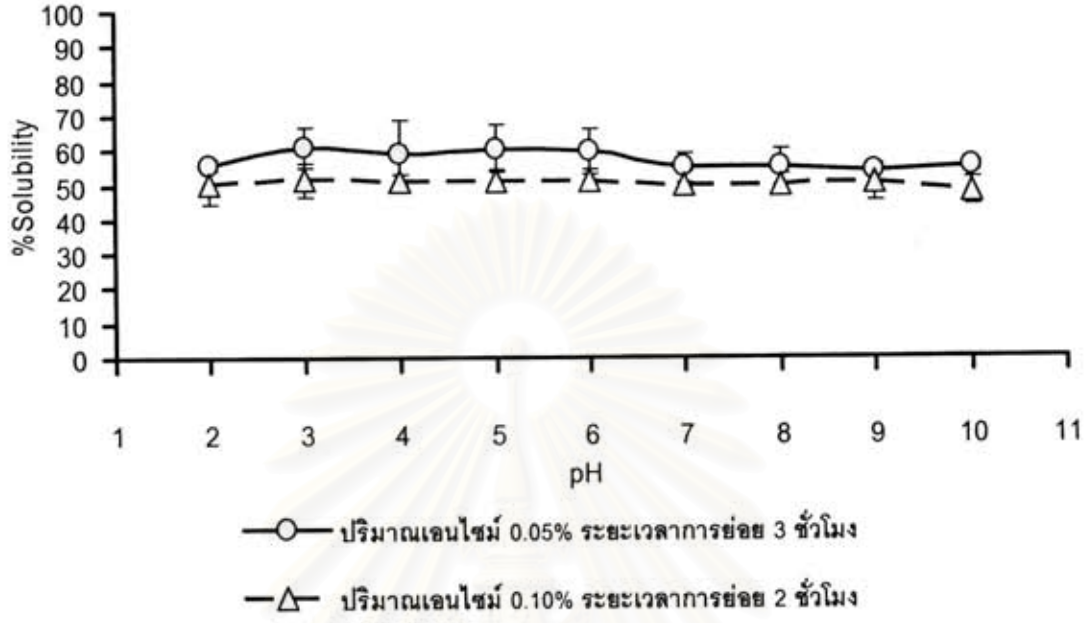
ของโปรตีนไฮโดรเสตที่จุด isoelectric point ของโปรตีนจะสูงขึ้น เนื่องจากโปรตีนถูกย่อยเป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระได้มาก ทำให้โมเลกุลโปรตีนมีขนาดเล็กสามารถกระจายตัวอยู่ในน้ำได้ดี และมีปริมาณหมู่ที่มีขั้วเพิ่มขึ้น (Adler-Nissen and Olsen, 1979) ดังนั้น pH จึงไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้




**รูปที่** 4.7 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0

ส่วนผลการวิเคราะห์ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.2 (ตารางที่ ฉ.4) แสดงดังรูปที่ 4.8 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Alcalase® มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกันในช่วง pH 2-10 และโปรตีน ไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีความสามารถในการละลายดีกว่าภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง เล็กน้อย โดยมีค่า % solubility 53.66-60.98% และ 47.46-51.51% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ปริมาณ surface hydrophobicity พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีค่า surface hydrophobicity ต่ำกว่าภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง จึงมีหมู่ที่ไม่มีขั้วอยู่ที่ผิวโมเลกุลโปรตีนน้อยกว่า ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดีกว่า และจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่า pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของ

โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ทั้งสองภาวะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ตารางที่ ง.7)

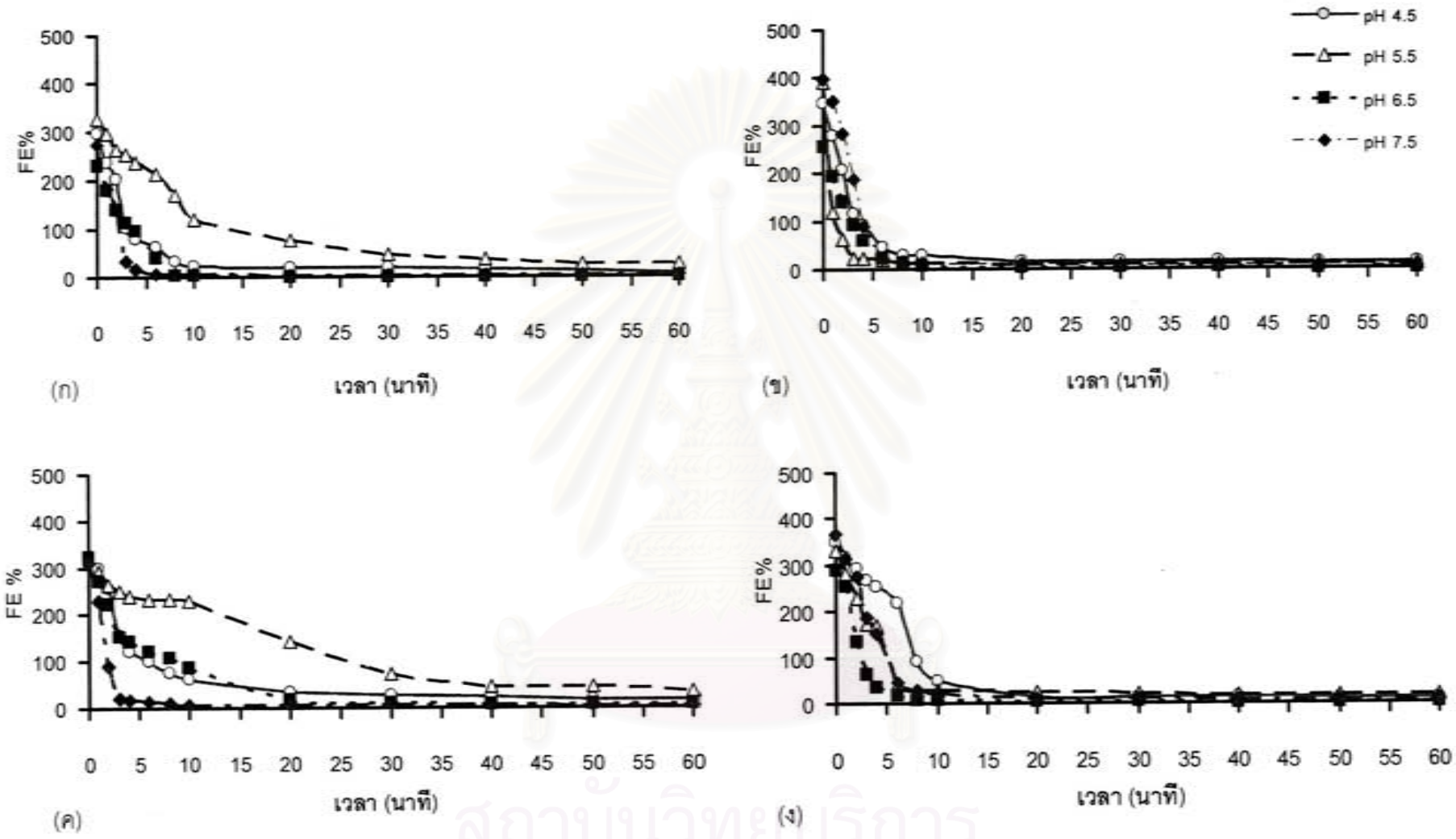



**รูปที่** 4.8 ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกัน โดยมีค่า % solubility ในช่วง 55-61% และ 50-61% ตามลำดับ ซึ่ง Klompong และ คณะ (2007) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) ด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกันในช่วง pH 2-12 โดยมีค่า % solubility ตั้งแต่ 85% ขึ้นไป จึงอาจสรุปได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และมีปริมาณหมู่ที่มีขั้วอยู่มาก ทำให้สามารถละลายน้ำได้ดี(Sorgentini and Wagner, 2002) อย่างไรก็ตามความสามารถในการละลายจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ด้วยเช่นกัน โดยจากงานวิจัยของ Shahidi และคณะ (1995) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา capelin (*Mallotus villosus*) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® มีความสามารถในการละลายสูงกว่าการย่อยโปรตีนด้วย Neutrase ® ในช่วง pH 2-11 ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่แตกต่างกัน

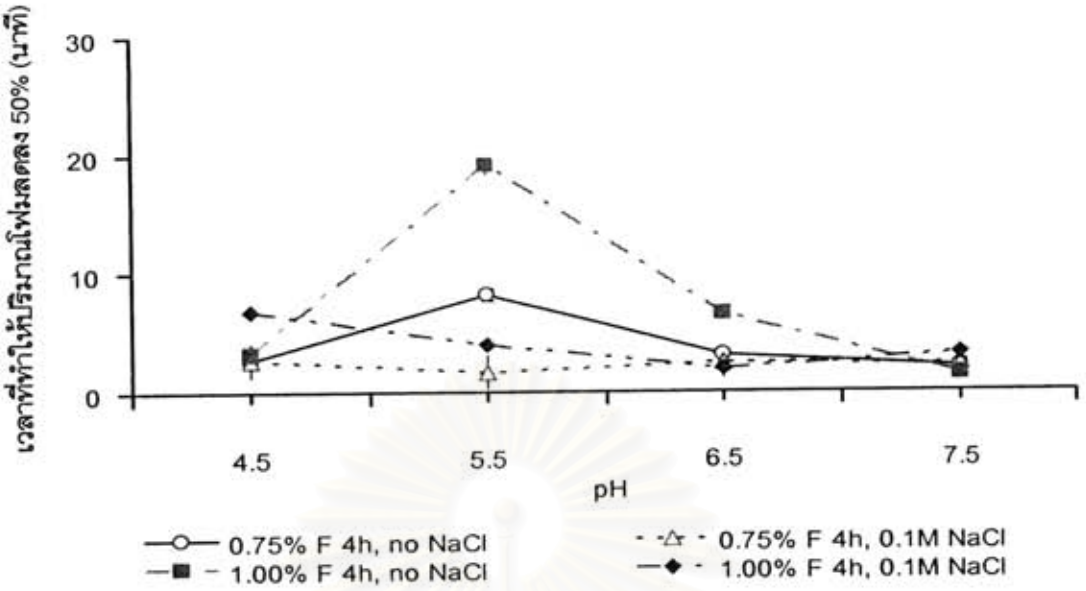
4.3.2 สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

ผลการวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.1 โดยใช้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต 2% (w/v) ทำการทดลองที่ pH 4.5, 5.5, 6.5 และ 7.5 ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M และภาวะที่ไม่ได้เติมเกลือ (ตารางที่ ฉ.5 และ ตารางที่ ฉ.6) ซึ่งความสามารถในการเกิดโฟมแสดงด้วยค่า foam expansion (%FE) (รูปที่ 4.9) และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นคำนวณจากระยะเวลาที่ทำให้ปริมาตรของโฟมลดลง 50% (รูปที่4.10) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมที่ pH ต่าง ๆ ไม่เท่ากัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนทั้งสองภาวะมีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำสุดที่ pH 6.5 ความคงตัวของโฟมที่ pH ต่าง ๆ ไม่เท่ากัน โดยภาวะที่ไม่เติมเกลือโฟมจะมีความคงตัวมากที่สุดที่ pH 5.5 และภาวะที่เติมเกลือโฟมจะมีความคงตัวมากที่สุดที่ pH 4.5 และพบว่าในภาวะที่เติมเกลือความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะสูงขึ้น แต่ความคงตัวของโฟมจะลดลง เนื่องจาก pH และเกลืออาจมีผลต่อการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีน ซึ่งส่งผลต่อความสามารถของโปรตีนในการยึดเกาะพื้นผิวสัมผัสระหว่างอากาศกับของเหลว ทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมเปลี่ยนแปลงไป (Zayas, 1997) และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า pH และปริมาณเกลือมีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่าง pH และปริมาณเกลือมีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.8 และ ตารางที่ ง.9) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมใกล้เคียงกัน อาจเป็นผลจากการที่ทั้งสองภาวะมีระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกัน การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ชนิดเดียวกันที่ระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกัน โปรตีนที่ได้ย่อมมีโครงสร้างของโมเลกุลใกล้เคียงกัน จึงส่งผลให้มีสมบัติการเกิดโฟมใกล้เคียงกัน (Damodaran and Paraf, 1997)




**รูปที่ 4.9** ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0
(ก) 0.75% F 4 h, no NaCl (ข) 0.75% F 4 h, 0.1M NaCl (ค) 1.00% F 4h, no NaCl (ง) 1.00% F 4h, 0.1M NaCl

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

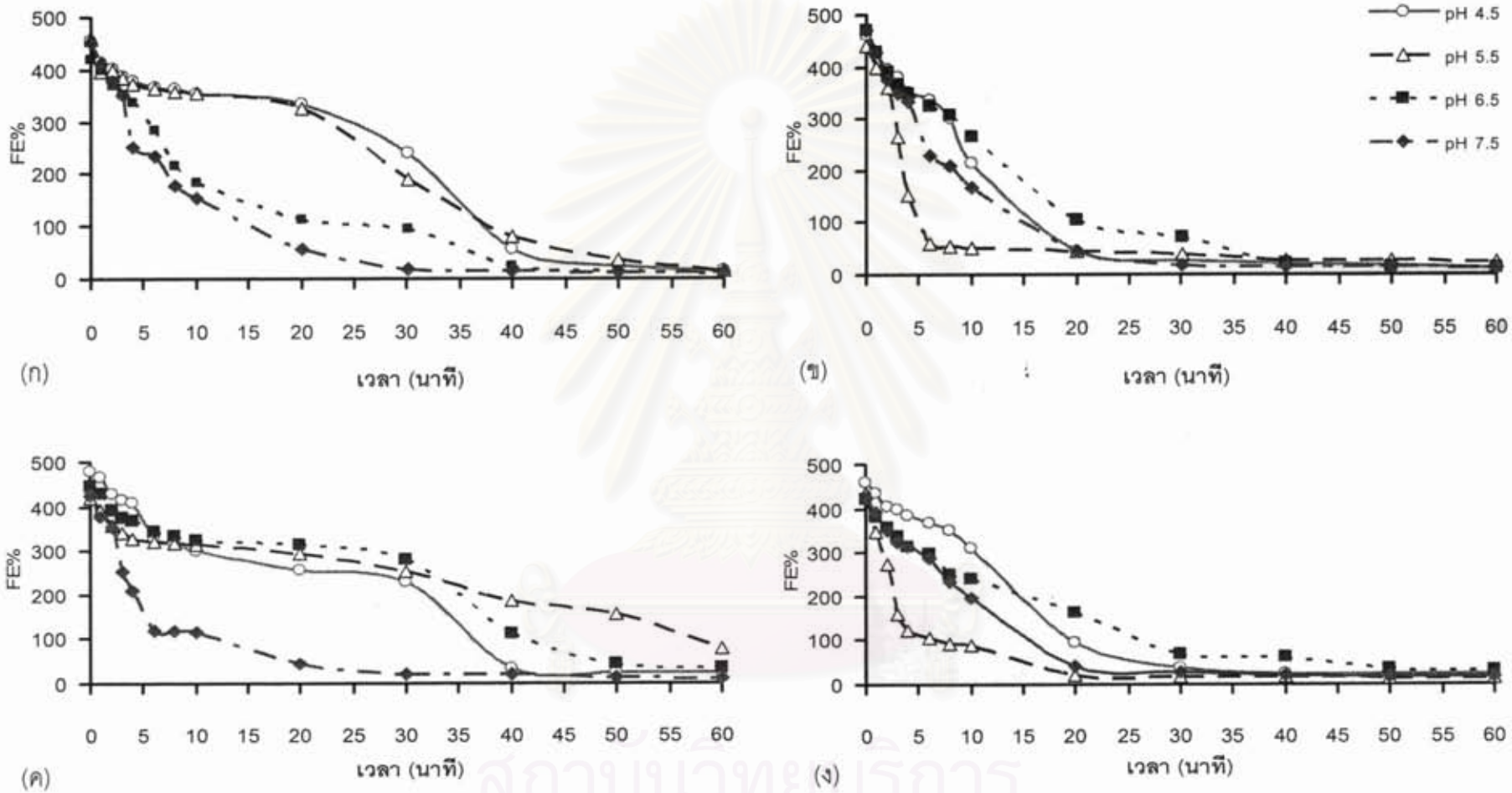



**รูปที่ 4.10** ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6.0

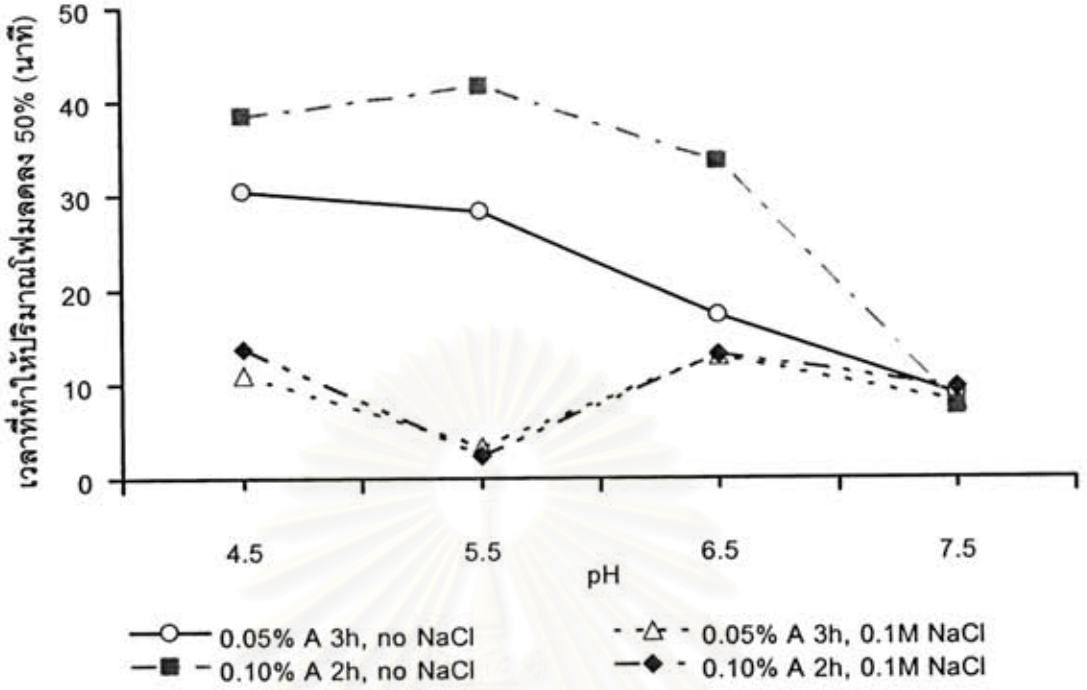
จากการวิเคราะห์ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.2 (ตารางที่ ฉ.7 และ ตารางที่ ฉ.8) แสดงดังรูปที่ 4.11 และ 4.12 ให้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองที่ได้จากการวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® คือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะมีความสามารถในการเกิดโฟมต่างกันที่ pH ต่าง ๆ กัน โดยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง และภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำสุดที่ pH 6.5 และ 5.5 ตามลำดับ และความคงตัวของโฟมที่ pH ต่าง ๆ กันจะต่างกัน โดยภาวะที่ไม่เติมเกลือความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนทั้งสองภาวะจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อ pH สูงขึ้น ส่วนในภาวะที่เติมเกลือความคงตัวของโฟมจะต่ำสุดที่ pH 5.5 เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตจะมีสมบัติการเกิดโฟมต่ำสุดที่ isoelectric point (pI) (Pearson, 1983) ดังนั้น pH 5.5 อาจเป็น pI ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® เข้มข้น 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง และจากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า pH และปริมาณเกลือมีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่าง pH และปริมาณเกลือมีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน (ตารางที่ ง.10 และ ง.11) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่

ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ทั้งสองภาวะ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเกิดโฟมและความความคงตัวของโฟมใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ทั้งสองภาวะมีระดับการย่อยโปรตีนใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะ

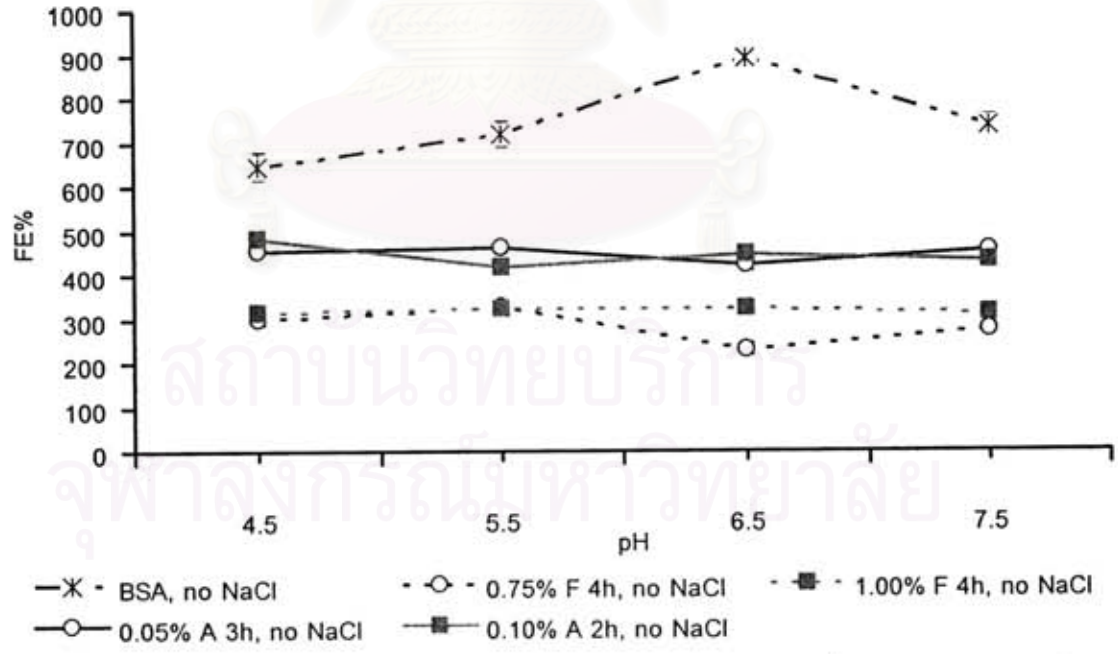
เมื่อเปรียบเทียบสมบัติการเกิดโฟมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าที่ภาวะการทดลองเดียวกันโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ทั้งสองภาวะมีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะ และโฟมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวสูงกว่า เนื่องจากความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมจะขึ้นอยู่กับระดับการย่อยโปรตีนของเอนไซม์แต่ละชนิด โดยเอนไซม์ต่างชนิดกันจะมีระดับการย่อยโปรตีนที่ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีโครงสร้างของโมเลกุลเหมาะสมกับการเกิดโฟมและทำให้โฟมมีความคงตัวแตกต่างกัน (Damodaran and Paraf, 1997) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® ทั้งสองภาวะอาจมีระดับการย่อยโปรตีนที่ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีโครงสร้างของโมเลกุลที่เหมาะกับการเกิดโฟมและทำให้โฟมคงตัวมากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® จึงมีความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ที่ศึกษาสมบัติการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® มีความสามารถในการเกิดโฟมสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดกับความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA (รูปที่ 4.13 และ 4.14) พบว่า BSA มีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทั้งในภาวะที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ และในภาวะที่ไม่เติมเกลือโฟมของ BSA จะมีความคงตัวต่ำกว่าโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิด ส่วนภาวะที่เติมเกลือความคงตัวของโฟมของ BSA จะต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Alcalase® แต่จะมีค่าใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Flavourzyme® (รูปที่ 4.15 และ 4.16)




**รูปที่** 4.11 ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0
(ก) 0.05% A 3h, no NaCl (ข) 0.05% A 3h, 0.10M NaCl (ค) 0.10% A 2h, no NaCl (ง) 0.10% A 2h, 0.10M NaCl

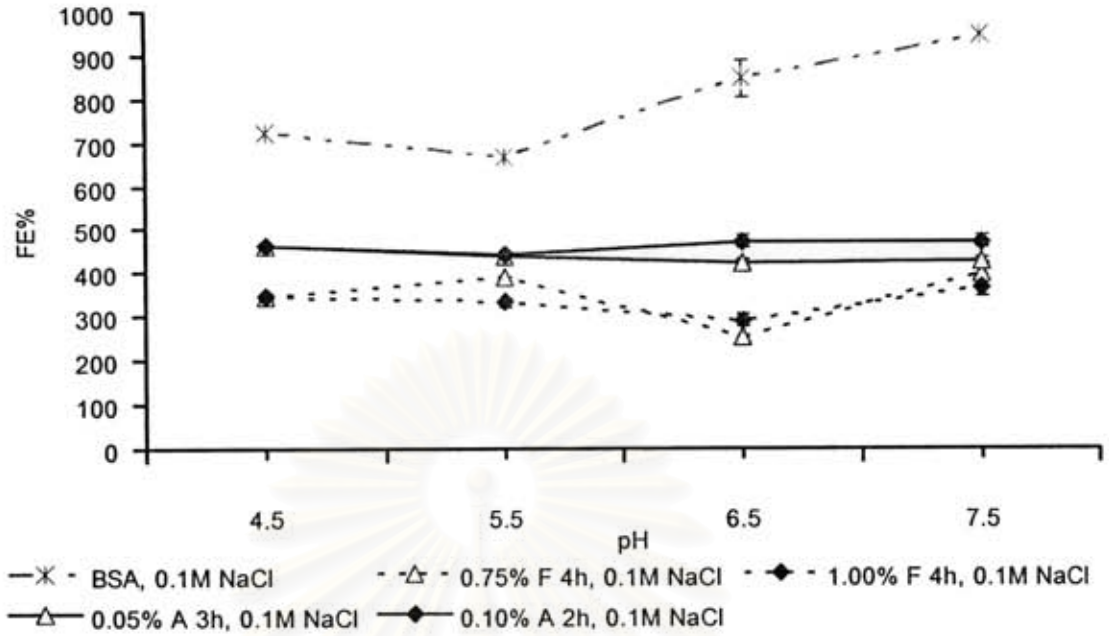



**รูปที่** 4.12 ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่อุณหภูมิ 60°C pH 8.0

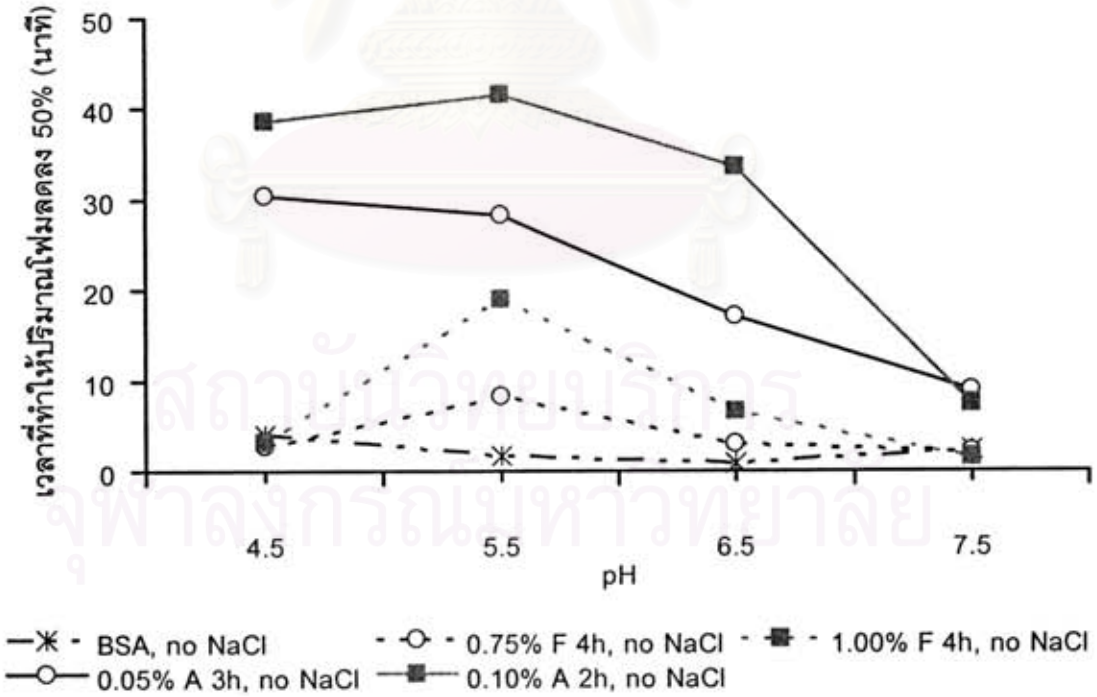



**รูปที่** 4.13 ความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่ไม่เติมเกลือ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

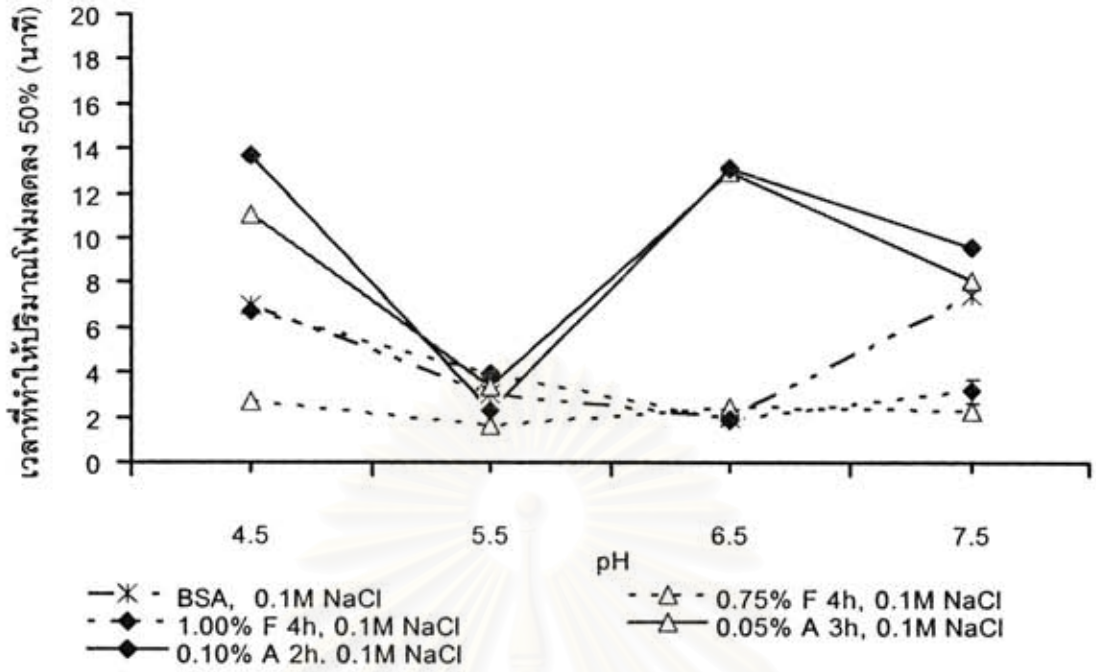



**รูปที่** 4.14 ความสามารถในการเกิดโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M




**รูปที่** 4.15 ความคงตัวของโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่ไม่เติมเกลือ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย




**รูปที่** 4.16 ความคงตัวของโฟมของ BSA, โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M

4.3.3 สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® และ Alcalase®

ผลการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.1 โดยใช้ปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสต 1, 2 และ 3% (w/v) ทำการทดลองในภาวะที่ไม่เติมเกลือและภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ซึ่งความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์แสดงด้วยค่า emulsifying activity index (EAI) และความเสถียรของอิมัลชันแสดงด้วยค่า emulsion stability index (ESI) (ตารางที่ 4.8 และ 4.9) พบว่าเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้จะทำให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ดีขึ้น แต่ความเสถียรของอิมัลชันจะลดลง เนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตจะทำให้ในระบบมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น อัตราส่วนของโปรตีนบริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงสูงขึ้น ทำให้เกิดอิมัลชันได้ดีขึ้น แต่อัตราการคลายตัวของโปรตีนเพื่อห่อหุ้มหยดน้ำมันไม่ได้สูงตามไปด้วย ดังนั้นความเสถียรของอิมัลชันจึงลดลง (Damodaran และ Paraf, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะที่ใช้ปริมาณโปรตีนเท่ากัน เมื่อเติมเกลือความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะดีขึ้น ($p \leq 0.05$) แต่ความเสถียรของอิมัลชันที่

เกิดขึ้นจะลดลง ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ ง.12 และ ตารางที่ ง.13) เนื่องจากเกลือมีผลทำให้การการจัดเรียงตัวของสายเพปไทด์เปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจทำให้มีหมู่ไม่มีขั้วที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันลดลง ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจึงลดลง แต่ปริมาณเกลือในระดับความเข้มข้น 0.01-0.10M จะไม่มีผลต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA (Zayas, 1997) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® ทั้งสองภาวะ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชันสูงกว่าภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง มีปริมาณ surface hydrophobicity สูงกว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง (24.86 และ 12.67 ตามลำดับ) ทำให้มีหมู่ที่ไม่มีขั้วอยู่ที่บริเวณผิวของโมเลกุลโปรตีนมากกว่า ส่งผลให้สามารถห่อหุ้มหยดน้ำมันได้ดี จึงมีสมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ที่ดี (Zayas, 1997) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่า BSA แต่ความเสถียรของอิมัลชันจะต่ำกว่า ทั้งในภาวะที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ (ตารางที่ 4.8 และ 4.9)

**ตารางที่ 4.8** ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ

| | ปริมาณโปรตีน | EAI ($m^2/g$) | |
|---|---|---|---|
| | (%w/v) | no NaCl | 0.1M NaCl |
| BSA | 1 | $12.27^{a}$±0.16 | $13.08^{b}$±0.26 |
| | 2 | $13.63^{a}$±0.21 | $14.19^{b}$±0.05 |
| | 3 | $13.60^{a}$±0.05 | $14.96^{b}$±0.31 |
| 0.75% F, 4h | 1 | $17.99^{a}$±0.23 | $20.09^{b}$±0.62 |
| | 2 | $19.87^{a}$±0.26 | $21.08^{b}$±0.17 |
| | 3 | $20.59^{a}$±0.08 | $21.84^{b}$±0.28 |
| 1.00% F, 4h | 1 | $16.88^{a}$±0.02 | $20.68^{b}$±0.15 |
| | 2 | $17.27^{a}$±0.26 | $20.93^{b}$±0.05 |
| | 3 | $19.46^{a}$±0.09 | $20.52^{b}$±0.05 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 4.9** ความเสถียรของอิมัลชันของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ

| | ปริมาณโปรตีน | ESI (min.) | |
|---|---|---|---|
| | (%w/v) | no NaCl | 0.1M NaCl |
| BSA | 1 | $78.27^{a}$±1.36 | $107.94^{b}$±1.25 |
| | 2 | $74.92^{a}$±0.62 | $114.12^{b}$±3.60 |
| | 3 | $35.46^{a}$±0.84 | $119.77^{b}$±1.90 |
| 0.75% F, 4h | 1 | $79.06^{b}$±1.41 | $44.37^{a}$±0.71 |
| | 2 | $58.82^{b}$±2.82 | $35.36^{a}$±0.56 |
| | 3 | $34.23^{b}$±0.77 | $31.25^{a}$±0.38 |
| 1.00% F, 4h | 1 | $60.72^{b}$±0.37 | $56.34^{a}$±2.18 |
| | 2 | $58.23^{b}$±0.98 | $33.35^{a}$±0.04 |
| | 3 | $37.47^{b}$±0.46 | $25.22^{a}$±0.33 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ผลการวิเคราะห์โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่เหมาะสมที่เลือกได้ในข้อ 4.2.2 พบว่าปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้และปริมาณเกลือมีผลต่อความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชันที่ได้ โดยเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ใช้จะทำให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ดีขึ้น แต่ความเสถียรของอิมัลชันจะลดลง และเมื่อเติมเกลือจะทำให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ดีขึ้น ($p \leq 0.05$) แต่ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจะลดลง ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ ง.14 และ ตารางที่ ง.15)เช่นเดียวกับผลการวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนทั้งสองภาวะ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์และความเสถียรของอิมัลชันสูงกว่าภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง อาจเป็นเพราะโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระมากกว่า จึงมีโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอยู่มาก ซึ่งอาจมีสมบัติเป็น amphiphilic ไม่พอที่จะทำให้เกิดอิมัลชันที่ดีได้ (Chobert et al., 1988) และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้กับ

BSA พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่า ส่วนความเสถียรของอิมัลชันจะใกล้เคียงกัน แต่ในภาวะที่เติมเกลือความเสถียรของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะต่ำกว่า (ตารางที่ 4.10 และ 4.11)

**ตารางที่ 4.10** ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ

| | ปริมาณโปรตีน | EAI ($m^2/g$) | |
|---|---|---|---|
| | (%w/v) | no NaCl | 0.1M NaCl |
| BSA | 1 | $12.27^{a}$±0.16 | $13.08^{b}$±0.26 |
| | 2 | $13.63^{a}$±0.21 | $14.19^{b}$±0.05 |
| | 3 | $13.60^{a}$±0.05 | $14.96^{b}$±0.31 |
| 0.05% A, 3h | 1 | $16.61^{b}$±0.06 | $15.71^{a}$±0.24 |
| | 2 | $18.45^{a}$±0.39 | $18.91^{b}$±0.13 |
| | 3 | $18.88^{a}$±0.23 | $22.68^{b}$±0.13 |
| 0.10% A, 2h | 1 | $16.00^{b}$±0.04 | $15.72^{a}$±0.16 |
| | 2 | $16.73^{a}$±0.17 | $17.56^{b}$±0.04 |
| | 3 | $17.38^{a}$±0.14 | $18.44^{b}$±0.12 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ 4.11** ความเสถียรของอิมัลชันของ BSA และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ

| | ปริมาณโปรตีน | ESI (min.) | |
|---|---|---|---|
| | (%w/v) | no NaCl | 0.1M NaCl |
| BSA | 1 | $78.27^{a}$±1.36 | $107.94^{b}$±1.25 |
| | 2 | $74.92^{a}$±0.62 | $114.12^{b}$±3.60 |
| | 3 | $35.46^{a}$±0.84 | $119.77^{b}$±1.90 |
| 0.05% A, 3h | 1 | $78.97^{a}$±11.40 | $79.46^{b}$±5.77 |
| | 2 | $59.22^{b}$±2.06 | $44.09^{a}$±1.58 |
| | 3 | $63.11^{b}$±2.35 | $23.04^{a}$±0.46 |
| 0.10% A, 2h | 1 | $77.78^{b}$±0.12 | $38.20^{a}$±0.67 |
| | 2 | $35.73^{b}$±0.40 | $32.42^{a}$±0.00 |
| | 3 | $29.76^{b}$±0.17 | $25.46^{a}$±0.28 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันตามแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® แต่ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจะมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® มีระดับการย่อยโปรตีนสูงกว่า โปรตีนที่ได้จึงมีขนาดเล็ก ทำให้สัดส่วนของหมู่ที่ไม่มีขั้วในโมเลกุลโปรตีนลดลง ความสามารถในการลดแรงตึงผิวที่บริเวณผิวสัมผัสระหว่างน้ำกับน้ำมันจึงลดลง ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์จึงต่ำกว่า (Wasswa et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนปลา yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) ด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วย Alcalase® และเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดโฟมระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดกับความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA (ตารางที่ 4.8 และ 4.10) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่า BSA ทั้งในภาวะที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ ($p \leq 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าในภาวะที่ไม่

เติมเกลือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดและ BSA มีความเสถียรของอิมัลชันใกล้เคียงกัน แต่ในภาวะที่เติมเกลือโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีความเสถียรของอิมัลชันต่ำกว่า ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 4.9 และ 4.11)

จากผลการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ที่ได้ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการละลายใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® และมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์สูงกว่า แต่มีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำกว่า ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® จึงน่าจะเหมาะสมกับการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการการเกิดอิมัลชัน เช่น น้ำสลัด และ ไส้กรอก เป็นต้น ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® เหมาะสมกับการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องการการเกิดโฟม เช่น ขนมอบกรอบ เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# บทที่ 5

# สรุปผลการทดลอง

## 5.1 สรุปผลการทดลอง

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อทั้งตัวขนาด 10-20 กรัม โดยใช้ Flavourzyme® และ Alcalase® พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีระดับการย่อยโปรตีนต่ำกว่าการใช้ Alcalase® แต่มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดสูงกว่า ปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และอิทธิพลร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยก็มีผลต่อระดับการย่อยโปรตีนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เช่นเดียวกัน โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยจะทำให้ระดับการย่อยโปรตีนสูงขึ้น และภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Flavourzyme® คือภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง และภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ส่วนภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วย Alcalase® คือภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง และภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง จากนั้นทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยภาวะทั้งสี่ภาวะและวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่

จากการวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการละลายในช่วง pH 2-10 ใกล้เคียงกับโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® มีค่า % solubility ในช่วง 55-61% และ 50-61% ตามลำดับ และ pH ไม่มีผลต่อความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® มีความสามารถในการเกิดโฟมดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และโฟมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมากกว่า pH และปริมาณเกลือมีผลต่อการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จะมีความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมที่เกิดขึ้นที่ pH ต่าง ๆ ไม่เท่ากัน และเมื่อเติมเกลือจะทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมสูงขึ้นแต่ความคงตัวของโฟมลดลง และโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความสามารถในการเกิดโฟมต่ำกว่า BSA แต่โฟมที่เกิดขึ้นมีความคงตัวมากกว่า เมื่อพิจารณา

สมบัติด้านอิมัลซิไฟเออร์ โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® แต่ความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นจะมีค่าใกล้เคียงกัน และปริมาณเกลือมีผลต่อการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้และความเสถียรของอิมัลชันที่เกิดขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ที่ทุกระดับความเข้มข้นโปรตีน (1, 2 และ 3%) ที่ใช้ โดยเมื่อเติมเกลือจะทำให้ความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้ดีขึ้นแต่ความเสถียรของอิมัลชันลดลง โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® และ Alcalase® มีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีกว่า BSA แต่ความเสถียรของอิมัลชันมีค่าใกล้เคียงกัน

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันมีการส่งเสริมให้เพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อกันอย่างแพร่หลายมาขึ้นในประเทศไทย และมีการศึกษาเทคโนโลยีการแปรรูปหอยเป๋าฮื้อ เช่น หอยเป๋าฮื้อกระป๋อง และหอยเป๋าฮื้อแปรรูปในลักษณะต่าง ๆ โดยในการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อจะมีหอยเป๋าฮื้อที่เลี้ยงไม่โต ไม่ได้ขนาดตามต้องการที่จะบริโภคเป็นหอยสด หรือนำมาแปรรูปในลักษณะต่าง ๆ ได้ และในกระบวนการแปรรูปจะมีวัสดุเศษเหลือที่ไม่ต้องการอยู่ด้วย ซึ่งการนำหอยเป๋าฮื้อในส่วนนี้มาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตจะเป็นการใช้ประโยชน์จากหอยเป๋าฮื้อได้อย่างคุ้มค่าและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ให้สูงขึ้น ในการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้ประโยชน์จะต้องคำนึงถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งสมบัติทางประสาทสัมผัสก็เป็นสมบัติหนึ่งที่มีความสำคัญ และมีงานวิจัยที่ศึกษาสมบัติทางด้านกลิ่นรสของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme® แล้ว ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาการยอมรับทางด้านกลิ่นรสของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase® และศึกษาการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปประยุกต์ในใช้ผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ เช่น ซุป หรือ ซอสปรุงรส เป็นต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# รายการอ้างอิง


**ภาษาไทย**

ดวงใจ ลาภยืนยง. 2548. การใช้โปรติเอสในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linnaeus. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. เคมีอาหาร. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ปราณิศา เชื้อโพธิ์หัก และนงนุช รักสกุลไทย. 2534. การใช้เอนไซม์ปาเปนและบรอมเมลินในการทำซอสหอยนางรม. วิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 25: 65-74.

พายัพ ยังปักษี. 2541. หอยเป๋าฮื้อ. สัตว์น้ำ. 10: 169-174.

ลิลา เรืองแป้น. 2543. การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ. สัตว์น้ำ. 12: 126-136.

วิชชญา นะราแก้ว. 2548. การยืดอายุการเก็บหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linnaeus โดยการปรับสภาพบรรยากาศภายในภาชนะบรรจุ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

**ภาษาอังกฤษ**

A.O.A.C. 1995. Official Methods of Analysis. 16th ed. Washington: The Association of Official Analytical Chemists. pp.39-1-39-23.

Anonymous. 2000. Novozymes. [Online]. Available from: http://www.novozymes.com/cgibin/bvisapi.dll/solutions/solutions.jsp?id=20084&lang=en[2005,March 31]

Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 27(6): 1256-1262.

Adler-Nissen, J. and Olsen, H.S. 1979. The influence of peptide chain length of taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In Functionality and protein structure. Washington: American Chemical Society. pp. 125–147.

Adler-Nissen, J. 1986. A review of food hydrolysis -specific areas. In Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers. pp.57-109.

Baldwin, J., Wells, R. M. G., Low, M., and Ryder, J.M. 1992. Tauropine and D-lactate as metabolic stress indicators during transport and storage of live Paua, (New Zealand Abalone) (*Haliotis iris*). Journal of Food Science. 57(2): 280-282.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 3423-3430.

Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C. and Nicolus, M.G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 36: 883-892.

Church, F.C., Porter, D.H., Catignani, G.L., and Swaisgood, H.E. 1985. An *o*-phthaldehyde spectrophotometric assay for proteinases. Analytical Biochemistry. 146: 343-348.

Cochran, W.C. and Cox, G.M. 1992. Experimental Design. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons.

Damodaran, S. and Paraf, A. 1997. Food Proteins and Their Application. New York: Marcel Dekker,Inc.

Gildberg, A. 1993. Review: Enzymic Processing of Marine Raw Materials. Process Biochemistry. 28: 1-15.

Guerard, F., Guimas L., and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzyme. 19-20: 489-498.

Hatae, K., Nakai, H., Shimada, A., Murakami, T., Takada, K., Shirojo, Y., and Watanabe, S. 1995. Abalone (*Haliotis discus*) seasonal variations in chemical composition and textural properties. Journal of Food Science. 60(1): 32-39.

Hwang, D.F., Liang, W. P., Shiau, C. Y., Chiou, T.K., and Jeng, S. S. 1997. Seasonal variations of freeamino acid in muscle and viscera of small abalone *Haliotis diversicolor*. Fisheries Science. 63(4): 625-629.

Kirimura, J., Shimizu, A., Kimizuka, A., Ninomiya, T., and Katsuya, N. 1969. The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 17(4): 689-695.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry. 102: 1317-1327.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysate: production, biochemical, and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40(1): 43-81.

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. Process Biochemistry. 36: 131-139.

Konosu, S. 1979. The taste of fish and shellfish. ACS Symposium Series. 115: 185-203.

Konosu, S. and Yamaguchi, K. 1982. The flavor components in fish and shellfish. In R.E. Martin, G.J. Fick, C.E. Hebard. and D.R. Ward (eds.). Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products, pp. 367-385. Westport: AVI Publishing.

Liceaga-Gesualdo, A.M. and Li-Chan, E.C.Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 64(6): 1000-1004.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 193: 265-275.

Mackie, I.M. 1982. Fish protein hydrolysates. Process Biochemistry. Jan/Feb: 26-31.

Matoba, T. and Hata, T. 1972. Relationship between Bitterness of Peptides and their Chemical Structures. Agricultural and Biological Chemistry. 36(8): 1423-1431.

McClements, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques. New York: CRC Press.

Moore, S. and Stein, W.H. 1948. Photometric ninhydrin method for use in chromatography of amino acids. Journal of Biological Chemistry. 176: 367-388.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. 70(4): 571-578.

Olley, J. and Thrower, S. J. 1977. Abalone – an esoteric food. Advances in Food Research. 23(1): 143-185.

Orskov, E.R., Soliman, H.S., and Clark, C.F.S. 1982. Use of protein hydrolysate in milk replacers. Animal Feed Science and Technology. 7: 135-140.

Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26(3): 716-723.

Pearson, A.M. 1983. Soy proteins. In Developments in Food Proteins-2. England: Applied Science Publishers. pp. 67-108.

Pigott, G. M. and Tucker, B. W. 1990. Seafood: Effects of Technology on Nutrition. New York: Marcel Dekker, Inc.

Quagly, G.G. and Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sadine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates. Journal of Food Science. 55: 1571-1573, 1619.

Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D., and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysate. Food Chemistry and Toxicology. 68(7): 2196-2200.

Silvestre, M.P.C. 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysate. Food Chemistry. 60(2): 263-271.

Simidu, W., Hibiki, S., Sibata, S., and Takeda, K. 1953. Studies on muscle of aquatic animals. XVI. Distribution of extractive nitrogen in muscles of several kinds of gastropod. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 19: 871.

Shahidi, F. 1994. Seafood proteins and preparation of protein concentrates. In F.Shahidi, and J.R. Bottta(eds.). Seafoods: chemistry, processing technology and quality. pp. 3-9. Glaslow: Blackie Academic and Professional.

Shahidi, F., Han, X.Q., and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villous*). Food Chemistry. 53: 285-293.

Sorgentini, D.A. and Wagner, J.R. 2002. Comparative study of foaming properties of whey and isolate soy bean proteins. Food Research International. 35: 721-729.

Takayama, N., Yamamoto, Y., Kadowaki, Y., and Endo, K.1970. Chemical components of abalone meat. Kaseikaku Zasshi. 21(1): 239-245.

Tanikawa, E. and Yamashita, J. 1961. Chemical studies on the meat of abalone (*Haliotis discus hannai* INO). Bulletin of the Faculty of Fisheries Hokkaido University. 12: 210-238.

Vieira, G.H.F., Martin, A.M., Saker-Sampaiao, S., Omar, S., and Goncalves, R.C.F. 1995. Studies on the Enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp) processing wastes. Journal of the Science of Food and Agriculture. 69: 61-65.

Wagner, J.R. and Anon, M.C. 1990. Influence of denaturation, hydrophobicity and sulfhydryl content on solubility and water absorbing capacity of soy protein isolates. Journal of Food Science. 55(3): 765-770.

Wassawa, J., Tang, J., Gu, X. and Yuan, X. 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry. 104: 1698-1704.

Webber, H. H. 1970. Changes in metabolite composition during the reproductive cycle of the abalone *Haliotis cracheroidii* (Gastropoda: Prosobranchiata). Physiological Zoology. 43(1): 213-217.

Whitaker, J.R. 1994. The proteolytic enzyme. In Principles of Enzymology for The Food Sciences. New York: Marcel Dekker Inc. pp. 469-498.

Zayas, J.F. 1997. Functionality of Proteins in Food. New York: Springer-Verlag Berlin Heidlberg.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ก

## วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

### ก.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

**วิธีการทดลอง**

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ภาชนะอะลูมิเนียมซึ่งอบแห้ง และชั่งน้ำหนักไว้แล้ว
2. นำตัวอย่างเข้าอบแห้งในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง
3. นำตัวอย่างออกจากตู้อบ ทิ้งให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก
4. ทำซ้ำข้อ 2 และ 3 จนน้ำหนักคงที่
5. คำนวณปริมาณความชื้นโดยใช้สูตร

$$\text{ความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{[\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลังอบแห้ง (กรัม)}] \times 100}{\text{น้ำหนักก่อนอบแห้ง (กรัม)}}$$

### ก.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

**วิธีการทดลอง**

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ลงในหลอดย่อยโปรตีน (หลอดที่เป็น blank ใส่น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง)
2. เติม selenium reagent mixture ซึ่งใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาประมาณ 5 กรัม และสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
3. ย่อยตัวอย่างด้วยเครื่อง BUCHI digestion unit โดยใช้ความร้อนเบอร์ 8 และปิดฝาด้านบนต่อเข้ากับเครื่องดูดไอกรด จนกระทั่งได้สารละลายใส แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
4. หยดสารละลายอิดิเคเตอร์ 2-3 หยดลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ต่อเข้ากับปลาย condenser ของเครื่องกลั่น (distillation unit)
5. กลั่นตัวอย่างที่ย่อยได้ด้วยเครื่อง BUCHI distillation unit โดยต่อหลอดตัวอย่างที่ผ่านการย่อยแล้วเข้ากับเครื่องกลั่น กลั่นให้ได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร
6. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้ใน flask ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 N จนถึงจุดยุติ (สารละลายเป็นสีม่วงแดง)

7. คำนวณหาปริมาณโปรตีน โดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(Va - Vb) \times N \times 1.4 \times CF}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

Va = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรตตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

Vb = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรต blank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ไตเตรต มีหน่วยเป็น Normal

CF = Conversion Factor (ในการทดลองใช้ 6.25)

## ก.3 การวิเคราะห์ไขมัน

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

**วิธีการทดลอง**

1. ชั่งตัวอย่างแล้วนำไปอบแห้งให้ได้น้ำหนักประมาณ 5 กรัม ห่อด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1
2. ใส่ตัวอย่างใน Thimble ซึ่งบรรจุในขวดสกัดที่แห้งสนิทและทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว
3. เติม petroleum ether ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ลงในขวดสกัด แล้วต่อเข้ากับชุดสกัดใช้เวลาในการสกัดไขมันนาน 3-4 ชั่วโมง
4. ระเหย petroleum ether ออกจากไขมันที่สกัดได้ โดยใช้ rotary evaporator
5. นำไขมันที่ได้หรือน้ำมันที่ได้ในขวดสกัดไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C ประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิคเคเตอร์
6. ทำซ้ำข้อ 5 จนน้ำหนักคงที่
7. คำนวณปริมาณไขมันโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{(A - B) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

A = น้ำหนักที่แน่นอนของขวดก้นกลมและไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

B = น้ำหนักที่แน่นอนของขวดก้นกลม (กรัม)

## ก.4 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า

ตามวิธีของ A.O.A.C. (1995)

**วิธีการทดลอง**

1. ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ใส่ในครูซิเบิลที่เผาและทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. เผาตัวอย่างบน hot plate จนกระทั่งตัวอย่างหมดควัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. นำตัวอย่างไปเผาต่อในเตาเผาที่ 500-550 °C จนกระทั่งได้เถ้าสีขาว
4. ทิ้งให้เย็นในเดซิคเคเตอร์ แล้วชั่งน้ำหนัก
5. คำนวณปริมาณเถ้าโดยใช้สูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณเถ้า (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

**ก.5 การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Lowry**

**วิธีการเตรียมสารเคมี**

1. สารละลาย A

ชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และ โซเดียมซิเตรต 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2. สารละลาย B

ชั่งโซเดียมคาร์บอเนต 20 กรัม และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

3. สารละลาย C

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B อัตราส่วน 1:50

4. สารละลาย D

ผสม Folin-Ciocalteu phenol reagent กับน้ำกลั่น อัตราส่วน 1:1

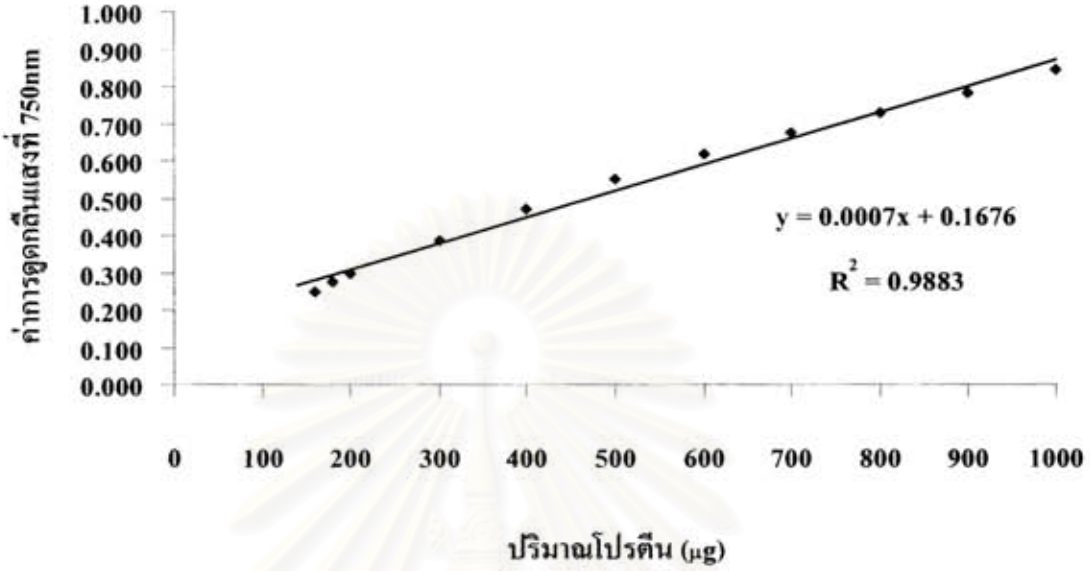
**วิธีการทดลอง**

1. ปิเปตตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วเติมน้ำกลั่น 450 ไมโครลิตร (สำหรับ blank ให้ใส่น้ำกลั่น แทนตัวอย่าง)
2. เติมสารละลาย C 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที
3. เติมสารละลาย D 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

**วิธีทำกราฟมาตรฐาน**

1. นำหลอดทดลองมา 12 หลอด
2. ใส่ BSA เข้มข้น 0.1% ปริมาตร 80 90 100 150 200 250 300 350 400 450 และ 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ปรับปริมาตรแต่ละหลอดให้เป็น 500 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ blank ให้ใส่น้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร)
3. เติมสารละลาย C 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5-10 นาที
4. เติมสารละลาย D 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 20-30 นาที

5. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ได้กราฟมาตรฐานดังรูปที่ ก.1




**รูปที่ ก.1** กราฟมาตรฐานของการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry

## ก.6 การวิเคราะห์ surface hydrophobicity

ตามวิธีของ Wagner และ Anon (1990)

**วิธีการทดลอง**

1. เตรียมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณโปรตีน 0.010% 0.015% 0.020% 0.025% 0.030% และ 0.035% (w/v) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0
2. เติม ANS ความเข้มข้น 0.01%(w/v) ลงไป 10 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. วัดค่า fluorescence intensity (FI) ทันที โดยใช้เครื่อง spectrofluorometer ตั้งค่า excitation และ emission ที่ความยาวคลื่น 390 และ 470 นาโนเมตร ตามลำดับ
4. พลอตกราฟระหว่างค่า FI กับปริมาณโปรตีน (%) ความชันของกราฟ คือ ค่า hydrophobicity

# ภาคผนวก ข

## วิธีวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ

### ข.1 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนด้วยวิธี HPLC

ตามวิธี AccQ. Taq (Waters, USA)

**วิธีการเตรียมสารเคมี**

1. การเตรียม Waters AccQ. reagent เพื่อทำอนุพันธ์

นำ Water AccQ. fluor reagent (2B) 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน Water AccQ. fluor reagent (2A) ปิดฝาเขย่า 10 วินาที ให้ความร้อน 55 °C จนสารใน (2A) ละลายหมด ระวังอย่าให้ความร้อนนานเกิน 10 นาที เมื่อเตรียมเสร็จสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 1 สัปดาห์

2. การเตรียมสารมาตรฐาน

เติม amino acid hydrolysate standard 40 ไมโครลิตร ลงในน้ำ Milli-Q 960 ไมโครลิตร เก็บที่อุณหภูมิ –20 °C ได้นาน 1 เดือน) สารมาตรฐานที่เตรียมได้จะประกอบด้วย 100 พิโคโมลต่อไมโครลิตรของกรดอะมิโนแต่ละชนิด และ 50 พิโคโมลต่อไมโครลิตรของ Cystine

**วิธีการทดลอง**

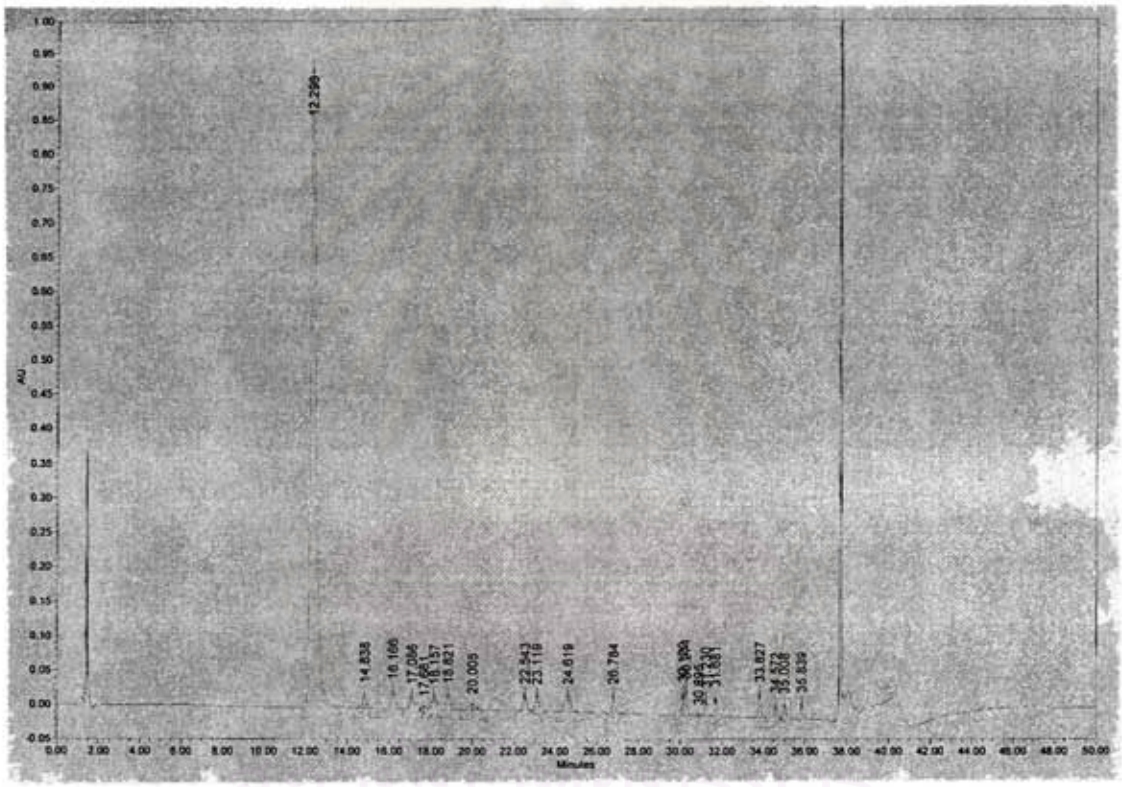
1. ปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 6 x 50 มิลลิเมตร
2. เติม Waters AccQ. fluor borate buffer 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติม ACQ. reagent 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ ดังนี้

| | |
|---|---|
| ปริมาณตัวอย่าง | 10 ไมโครลิตร |
| สารละลายเฟสเคลื่อนที่ | Eluent A (AccQ. Tag Eluent A Concentrate : น้ำ Milli-Q ; 1:10) |
| | Eluent B (60% acetonitrile) |
| คอลัมน์ | AccQ. Tag Amino Acid Analysis Column |
| เครื่องตรวจวัด | Water 2487 Dual Absorbance Detector |
| อัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ | 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที |
| อุณหภูมิในการวิเคราะห์ | 37°C |
| เวลาในการวิเคราะห์ | 50 นาทีต่อตัวอย่าง |

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**วิธีการทำกราฟมาตรฐาน**

1. ปิเปตสารมาตรฐาน 10 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 6 x 50 มิลลิเมตร
2. เติม Waters AccQ. fluor borate buffer 70 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
3. เติม ACQ. reagent 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
4. วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC
6. พลอตกราฟระหว่างพื้นที่ใต้กราฟของโครมาโตแกรม (รูปที่ ข.2) กับปริมาณกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่แต่ละความเข้มข้นของสารมาตรฐาน




**รูปที่ ข.1** โครมาโตแกรมของสารมาตรฐานกรดอะมิโน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ค

## วิธีวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

### ค.1 วิธีวิเคราะห์สมบัติการละลาย

ตามวิธีของ Chobert และคณะ (1988)

**วิธีการทดลอง**

1. เตรียมสารละลายไฮโดรไลเสตเข้มข้น 0.1% (w/v) โดยชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต ลงในหลอดทดลอง 9 หลอด หลอดละ 0.20 กรัม เติมน้ำกลั่นซึ่งปรับ pH ด้วย 0.1% HCl และ 0.1% NaOH จนได้ pH 2-10 ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน แล้วทิ้งไว้ 30 นาที
2. นำสารละลายที่ได้ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 5500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที
3. แยกส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้
4. คำนวณหาความสามารถในการละลายจาก

$$\% \text{ solubility} = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100$$

### ค.2 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเกิดโฟม

**วิธีการทดลอง**

1. นำบีกเกอร์มา 8 ใบ
2. ชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต 1 กรัม ลงในบีกเกอร์ที่ 1- 4 เติมน้ำกลั่นประมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เป็น 4.5 5.5 6.5 และ 7.5 ตามลำดับ ด้วย 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH
3. ชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต 1 กรัม และโซเดียมคลอไรด์ 0.29 กรัม (0.1 M) ลงในบีกเกอร์ที่ 5-8 เติมน้ำกลั่นประมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เป็น 4.5 5.5 6.5 และ 7.5 ตามลำดับ ด้วย 0.1 M HCl และ 0.1 M NaOH
4. เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ทั้ง 8 หลอดจนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร
5. ตีสารละลายที่ได้ด้วยเครื่องตีไข่ ความเร็ว1,100 รอบต่อนาที (ระดับ 4) เป็นเวลา 1 นาที
6. เทสารละลายลงในกระบอกตวง แล้ววัดปริมาตรโฟมที่เกิดขึ้น
7. บันทึกปริมาตรโฟมที่ลดลง และปริมาตรของเหลวที่เพิ่มขึ้นที่เวลา 0 1 2 3 4 6 8 10 20 30 40 50 และ 60 นาที
8. คำนวณความสามารถในการเกิดโฟมจาก

$$\text{foam expansion (FE\%)} = \frac{\text{ปริมาณโฟมที่เกิดขึ้น}}{\text{ปริมาณของเหลวเริ่มต้น}} \times 100$$

## ค.3 วิธีวิเคราะห์สมบัติการเป็นอิมัลซิไฟเออร์

ตามวิธีของ Pearce และ Kinsella (1978)

**วิธีการทดลอง**

1. นำกระบอกตวงมา 6 อัน
2. ชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต 0.3 0.6 และ 0.9 กรัม ลงในกระบอกตวงที่ 1- 3 ตามลำดับ เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 30 มิลลิลิตร
3. ชั่งโปรตีนไฮโดรไลเสต 0.3 0.6 และ 0.9 กรัม ลงในกระบอกตวงที่ 4- 6 ตามลำดับ แล้วชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.17 กรัม ลงในกระบอกตวงแต่ละอัน เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 30 มิลลิลิตร
4. เติมน้ำมันข้าวโพด 10 มิลลิลิตร ลงในกระบอกตวงทั้ง 6 อัน
5. ผสมสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสตกับน้ำมันข้าวโพดด้วย homogenizer ที่ความเร็ว 22,000 รอบ ต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที
6. ปิเปตสารละลายอิมัลชัน 1 มิลลิลิตร มาเจือจาง 400 เท่า ด้วย SDS ความเข้มข้น 0.1%
7. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร
8. คำนวณความสามารถในการเกิดอิมัลชันจาก

$$\text{EAI } (m^2/g) = \frac{2\tau}{\phi C}$$

$$\tau \text{ (ค่าความขุ่น)} = \frac{2.303 \times A_{500} \times F}{l}$$

$A_{500}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร

F = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชัน

l = light path length หน่วยเป็น เมตร

$\phi$ = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชัน

C = ปริมาณโปรตีน หน่วยเป็น กรัม ต่อ ลูกบาศก์เมตร

9. ตั้งกระบอกตวงสารละลายอิมัลชันที่ได้จากข้อ 5 ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วทำการทอดลองซ้ำในข้อ 6 และ 7
10. คำนวณความเสถียรของอิมัลชันจาก

$$\text{ESI (min.)} = \frac{\tau \times \Delta t}{\Delta \tau}$$

$\Delta t$ = ระยะเวลาที่ผ่านไป หน่วยเป็น นาที

$\Delta \tau$ = ค่าความชุ่นที่เปลี่ยนไป



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก ง

## ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน

**ตารางที่ ง.1** การวิเคราะห์ความแปรปรวนขององค์ประกอบทางเคมีของหอยเป๋าฮื้อทั้งตัวขนาด 10 กรัม และ 20 กรัม

| SOV | | df | MS |
|---|---|---|---|
| ปริมาณความชื้น | trt | 1 | 0.442 |
| | error | 2 | 0.063 |
| ปริมาณโปรตีน | trt | 1 | 0.009 |
| | error | 2 | 0.019 |
| ปริมาณไขมัน | trt | 1 | 0.042 |
| | error | 2 | 0.018 |
| ปริมาณเถ้า | trt | 1 | 0.681 |
| | error | 2 | 0.067 |

**ตารางที่ ง.2** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย

| SOV | df | MS |
|---|---|---|
| ปริมาณเอนไซม์ (A) | 4 | 2120.343* |
| ระยะเวลาการย่อย (B) | 4 | 2995.092* |
| AB | 16 | 121.561* |
| Error | 50 | 1.466 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ง.3** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย

| SOV | df | MS |
|---|---|---|
| ปริมาณเอนไซม์ (A) | 4 | 34272.237* |
| ระยะเวลาการย่อย (B) | 4 | 25608.151* |
| AB | 16 | 1451.433* |
| Error | 25 | 405.159 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.4** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย

| SOV | df | MS |
|---|---|---|
| ปริมาณเอนไซม์ (A) | 4 | 6547.831* |
| ระยะเวลาการย่อย (B) | 4 | 9057.925* |
| AB | 16 | 395.992* |
| Error | 50 | 1.536 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.5** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณกรดอะมิโนอิสระทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาการย่อย

| SOV | df | MS |
|---|---|---|
| ปริมาณเอนไซม์ (A) | 4 | 5852.887* |
| ระยะเวลาการย่อย (B) | 4 | 10825.831* |
| AB | 16 | 583.639* |
| Error | 25 | 129.667 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ง.6** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ pH 2-10

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| pH | 8 | 3.042 | 4.710 |
| Error | 9 | 6.003 | 15.033 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

**ตารางที่ ง.7** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ pH 2-10

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| pH | 8 | 16.401 | 2.566 |
| Error | 9 | 29.553 | 15.713 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง

**ตารางที่ ง.8** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปร pH

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| ปริมาณเกลือ (A) | 1 | 641.287* | 1424.500* |
| pH (B) | 3 | 13823.653* | 1089.959* |
| AB | 3 | 21580.478* | 2212.486* |
| Error | 16 | 80.838 | 68.653 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

**ตารางที่ ง.9** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| ปริมาณเกลือ (A) | 1 | 17.613* | 78.048* |
| pH (B) | 3 | 8.336* | 95.646* |
| AB | 3 | 15.797* | 106.429* |
| Error | 16 | 0.296 | 4.326 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.75% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 1.00% ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง

**ตารางที่ ง.10** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| ปริมาณเกลือ (A) | 1 | 1095.121* | 245.888* |
| pH (B) | 3 | 352.401* | 2533.465* |
| AB | 3 | 1251.032* | 566.196* |
| Error | 16 | 46.654 | 29.821 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ง.11** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® เมื่อแปรปริมาณเกลือและ pH

| SOV | df | MS | |
|---|---|---|---|
| | | trt1 | trt2 |
| ปริมาณเกลือ (A) | 1 | 910.818* | 1569.946* |
| pH (B) | 3 | 153.789* | 269.337* |
| AB | 3 | 204.732* | 485.607* |
| Error | 16 | 46.682 | 47.016 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

trt1 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.05% ระยะเวลาการย่อย 3 ชั่วโมง

trt2 แทนภาวะการย่อยที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.10% ระยะเวลาการย่อย 2 ชั่วโมง

**ตารางที่ ง.12** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.75% F, 4h | | | 1.00% F, 4h | | |
| | | 1% | 2% | 3% | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 4.389* | 0.240* | 3.861* | 14.402* | 13.469* | 1.177* |
| error | 2 | 0.221 | 0.047 | 0.042 | 0.017 | 0.001 | 0.005 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.13** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.75% F, 4h | | | 1.00% F, 4h | | |
| | | 1% | 2% | 3% | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 1203.396* | 550.372* | 8.940* | 19.141* | 619.017* | 154.629* |
| error | 2 | 1.250 | 4.120 | 0.367 | 2.442 | 0.477 | 0.078 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.14** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.05% A, 3h | | | 0.10% A, 2h | | |
| | | 1% | 2% | 3% | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 0.810* | 0.216* | 14.478* | 0.081* | 0.681* | 1.124* |
| error | 2 | 0.033 | 0.080 | 0.035 | 0.013 | 0.015 | 0.016 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.15** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่แต่ละระดับความเข้มข้นโปรตีน เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0.05% A, 3h | | | 0.10% A, 2h | | |
| | | 1% | 2% | 3% | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 0.240* | 228.766* | 1605.605* | 1565.785* | 10.890* | 18.490* |
| error | 2 | 81.610 | 3.375 | 2.864 | 0.233 | 0.081 | 0.054 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.16** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ของ BSA ที่แต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 0.664* | 0.303* | 1.863* |
| error | 2 | 0.046 | 0.022 | 0.050 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ง.17** การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเสถียรของอิมัลชันของ BSA ที่แต่ละระดับความเข้มข้น เมื่อแปรปริมาณเกลือ

| SOV | df | MS | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1% | 2% | 3% |
| ปริมาณเกลือ | 1 | 880.309* | 1537.032* | 7107.333* |
| error | 2 | 1.696 | 6.671 | 2.169 |

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# ภาคผนวก จ

# เอกสารประกอบเอนไซม์

## จ.1 เอกสารประกอบเอนไซม์ Flavourzyme®



**Product** Sheet



novozymes

# Flavourzyme®

### Description

Flavourzyme is a fungal protease/peptidase complex produced by submerged fermentation of a selected strain of *Aspergillus oryzae* which has not been genetically modified, and it contains both endoprotease and exopeptidase activities.

The optimal pH for the enzyme complex is in the range of 5.0-7.0. The optimal pH for the exopeptidase is approx. 7.0, as determined by application trials. The optimal pH for debittering is also approx. 7.0.

The optimal temperature for the enzyme complex as well as for the exopeptidase is around 50°C (122°F).

### Product Properties

**Product Type**

Flavourzyme is available as Flavourzyme 500 L, a liquid product, and Flavourzyme 500 MG, a brown, free-flowing, non-dusting microgranulate granulated on NaCl. The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength.

**Activity**

Flavourzyme is standardized in Leucine Amino Peptidase Units per gram (LAPU/g).

Flavourzyme 500 MG.....Declared activity: 500 LAPU/g
Flavourzyme 500 L.....Declared activity: 500 LAPU/g

One LAPU is the amount of enzyme which hydrolyzes 1 µmol of L-leucine-p-nitroanilide per minute. See the Analytical Method for further information.

**Solubility**

Flavourzyme 500 MG and Flavourzyme 500 L are both readily soluble in water.

**Food-grade status**

The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes issued by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC).

**Packaging**

See the standard Packaging List for more packaging information.

## Application

Flavourzyme is a fungal protease/peptidase complex for the hydrolysis of proteins under neutral or slightly acidic conditions.

Flavourzyme can be used for debittering bitter protein hydrolysates at low degrees of hydrolysis and for extensive hydrolysis of proteins resulting in flavour development.

For debittering, Flavourzyme can be used at dosages of 5-10 LAPU/g protein. For extensive hydrolysis, dosages of 10-50 LAPU/g protein are recommended.

## Reaction Parameters

The activity of Flavourzyme varies with pH and temperature as can be seen in Figures 1 and 2.

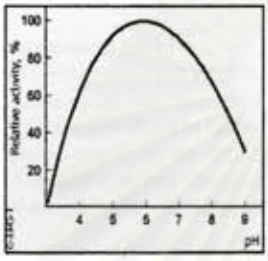



**Fig. 1. Influence of pH on the activity of Flavourzyme.**

| | |
|---|---|
| Substrate: | 8% soy protein isolate |
| Enzyme conc.: | 33 LAPU/g protein |
| Temperature: | 50°C (122°F) |
| Method: | TNBS |

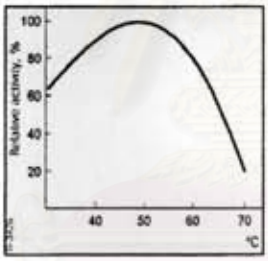



**Fig. 2. Influence of temperature on the activity of Flavourzyme.**

| | |
|---|---|
| Substrate: | 8% soy protein isolate |
| Enzyme conc.: | 33 LAPU/g protein |
| pH: | 7.0 |
| Method: | TNBS |

### Inactivation

Flavourzyme can be inactivated in 10 minutes at 75°C (167°F) or higher. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of Flavourzyme must be based on actual analysis for the detection of residual activity.

See the Method for the detection of residual protease activity in protein hydrolysate for further information.



novozymes

## Safety

Enzymes are proteins. Inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

**Flavorzyme 500 MG**

The product has been developed to resist some mechanical effects. However, excessive mechanical wear and tear or crushing may create dust.
All spills, however minor, should be removed immediately. Use respiratory protection. Major spills should be carefully shovelled into plastic-lined containers. Minor spills and the remains of major spills should be removed by vacuum cleaning or flushing with water (avoid splashing). Vacuum cleaners and central vacuum systems should be equipped with HEPA filters.

**Flavourzyme 500 L**

The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred.
Spilled product may dry out and create dust.
Spilled material should be flushed away with water. Avoid splashing. Left-over material may dry out and create dust.
A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

## Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature and humidity. Cool and dry conditions are recommended.
When stored in closed containers at 5°C (41°F), the product will maintain its declared activity for at least 3 months.
Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures or high humidity, may lead to a higher dosage requirement.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



novozymes®

*Novozymes A/S*
*Krogshoejvej 36*
*2880 Bagsvaerd*
*Denmark*

*Tel. +45 8824 9999*
*Fax +45 8824 9998*
*info@novozymes.com*
*www.novozymes.com*

*Laws, regulations and third party rights may prevent customers from ingesting, processing, applying and/or selling certain products in a given manner. It is the responsibility of the customers that their specific use of products from Novozymes does not infringe relevant laws and regulations and, furthermore, does not infringe patents or other third party rights.*
*The contents of this document are subject to change without further notice.*

*2001-08282-05 May 2003 © Novozymes A/S*

## จ.2 เอกสารประกอบเอนไซม์ Alcalase®

Special Food / 2001-08281-03.pdf

**Product** Sheet

Page 1:5

novozymes

# Alcalase® Food Grade

### Description

Alcalase is a proteolytic enzyme produced by submerged fermentation of a selected strain of *Bacillus licheniformis*. The main enzyme component, Subtilisin A (= Subtilisin Carlsberg), is an endoproteinase extensively described in the literature. Table 1 summarizes some of the biochemical properties of the proteinase in Alcalase. The optimal conditions for Alcalase are temperatures between 55°C (131°F) and 70°C (158°F), depending on the type of substrate, and pH values between 6.5 and 8.5.

| | Alcalase |
|---|---|
| Generic name | Subtilisin Carlsberg |
| Type of action | Endopeptidase |
| Nature of catalytic site | Serine |
| Inhibition by: | |
| DFP & PMSF1) | + |
| EDTA2) & phosphate | 0 |
| Soya bean trypsin inhibitor | 0 |
| Bonds attacked in the oxidized B-chain of insulin3) | 4-5, 9-10, 11-12, 15-16, 26-27 |
| Molecular weight (approx.) | 27,300 |

1): DFP = Di-isopropyl fluorophosphate, PMSF = Phenylmethylsulphonylfluoride

2): EDTA = Ethylenediamine tetra-acetic acid

NH2-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-CySO3H-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-

1 5 10 15

Tyr-Leu-Val-CySO3H-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Ala

17 20 25 30

(from Johansen, J.T. et al., C.R. Trav. Lab. Carlsberg 36, 365-384,1968)

**Biochemical properties of Alcalase.**

## Product Properties

**Product Type**
Alcalase 2.4 L is a brown liquid and is readily soluble in water at all concentrations. The colour may vary from batch to batch and colour intensity is not an indication of product strength.

**Activity**
Alcalase Food Grade is standardized in Anson Units per g (AU/g).

Alcalase 2.4 L.....Declared activity: 2.4 AU/g

The proteolytic activity is determined according to an analytical standard using the DMC method. See the Analytical Method for further information.

**Food-grade status**
The product complies with the recommended purity specifications for food-grade enzymes issued by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) and the Food Chemicals Codex (FCC).

**Packaging**
See the standard Packaging List for more packaging information.

## Application

Alcalase Food Grade is a highly efficient bacterial protease developed for the hydrolysis of all kinds of proteins. More detailed recommendations with respect to the various applications are given in separate leaflets, which are available on request.

## Reaction Parameters

**Activity**
By analyzing Alcalase at various pH values using a modified Anson/haemoglobin method, its optimum activity has been found to be at a pH of between 6.5 and 8.5 (Figure 1). Similarly, under analytical conditions Alcalase has its temperature optimum around 60°C (140°F) (Figure 2).

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



novozymes

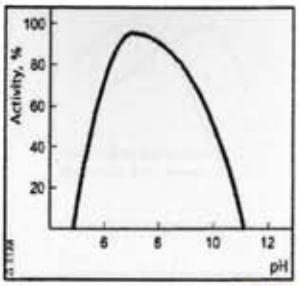



**Fig. 1. Influence of pH on the activity of Alcalase.**

| | |
|---|---|
| Enzyme concentration: | 0.06 AU/litre |
| Temperature: | 60°C (140°F) |
| Method: | Modified Anson/ hemoglobin analysis |
| Reaction time: | 10 minutes |

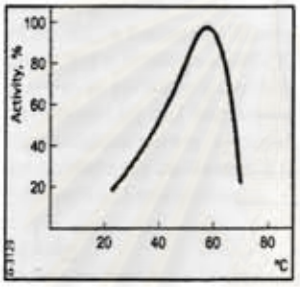



**Fig. 2. Influence of temperature on the activity of Alcalase.**

| | |
|---|---|
| Enzyme concentration: | 0.06 AU/litre |
| pH: | 8.0 |
| Method: | Modified Anson/ hemoglobin analysis |
| Reaction time: | 10 minutes |

Figure 3 illustrates the productivity of Alcalase at various temperatures on the substrates whey protein and soya protein, respectively. The productivity is depicted in relative values and measured as the % Degree of Hydrolysis (DH) obtained in 4 hours.
DH is defined as the percentage of peptide bonds cleaved.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



novozymes®

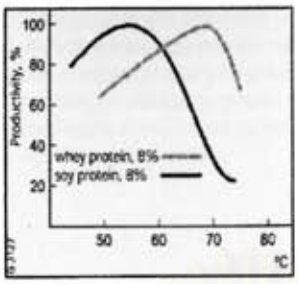



**Fig. 3. The productivity of Alcalase 2.4 L measured at various temperatures on whey and soy protein.**

| | |
|---|---|
| Protein %: | 8.0 |
| Enzyme dosage (on protein): | 0.51% |
| pH: | 8.0 |
| Reaction: | 4 hours |

### Inactivation

Alcalase can be inactivated in 30 minutes at 50°C (122°F) or higher when the pH is 4, and in 10 minutes at 85°C (185°F) or higher when the pH is 8. However, the inactivation is very much dependent on the substrate (substrate concentration, pH, etc.). Thus, the documentation for efficient elimination of Alcalase must be based on actual analysis for the detection of residual activity. See the Method for the detection of residual protease activity in protein hydrolysate for further information.

## Safety

Enzymes are proteins and inhalation of dust or aerosols may induce sensitization and may cause allergic reactions in sensitized individuals. Some enzymes may irritate the skin, eyes and mucous membranes upon prolonged contact.

The product may create easily inhaled aerosols if splashed or vigorously stirred.

Spilled product may dry out and create dust.

Spilled material should be flushed away with water (avoid splashing). Left-over material may dry out and create dust.

A Material Safety Data Sheet is supplied with all products. See the Safety Manual for further information regarding how to handle the product safely.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



novozymes

## Storage

Enzymes gradually lose activity over time depending on storage temperature. Cool conditions are recommended. When stored at 5°C (41°F), the product will maintain its declared activity for at least 1 year. When stored at 25°C (77°F), the product will maintain its declared activity for at least 3 months. Extended storage and/or adverse conditions, including higher temperatures, may lead to a higher dosage requirement.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



novozymes®

*Novozymes A/S*
*Krogshoejvej 36*
*2880 Bagsvaerd*
*Denmark*

*Tel. +45 8824 9999*
*Fax +45 8824 9998*
*info@novozymes.com*
*www.novozymes.com*

*Laws, regulations and third party rights may prevent customers from exploring, processing, applying and/or reselling certain products in a given manner. It is the responsibility of the customer that their specific use of products from Novozymes does not infringe relevant laws and regulations and, furthermore, does not infringe patents or other third party rights.*
*The contents of this document are subject to change without further notice.*

*2001-08781-02 05.10.2002 © Novozymes A/S*

# ภาคผนวก ฉ

## ข้อมูลการทดลอง

**ตารางที่ ฉ.1** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ (%w/w) | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0% | 22.42$^{a}$±0.00 | 31.24$^{a}$±0.00 | 31.92$^{a}$±2.07 | 29.18$^{a}$±0.00 | 45.93$^{ab}$±2.38 |
| 0.50% | 40.90$^{ab}$±0.61 | 135.07$^{c}$±6.77 | 158.44$^{cde}$±1.36 | 171.32$^{cdef}$±21.22 | 190.90$^{defg}$±64.95 |
| 0.75% | 45.71$^{ab}$±0.42 | 161.32$^{cde}$±19.96 | 201.89$^{efg}$±0.89 | 211.04$^{fg}$±6.96 | 217.27$^{fg}$±8.19 |
| 1.00% | 56.00$^{ab}$±0.32 | 156.25$^{cde}$±17.01 | 176.38$^{cdef}$±10.97 | 183.83$^{defg}$±19.02 | 217.58$^{fg}$±17.61 |
| 1.50% | 84.18$^{b}$±8.19 | 152.08$^{cd}$±38.17 | 193.75$^{defg}$±42.15 | 229.16$^{g}$±13.91 | 211.46$^{fg}$±17.65 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.2** ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase® ที่ภาวะต่าง ๆ

| ปริมาณเอนไซม์ (%w/w) | ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 0% | 22.42$^{ab}$±0.00 | 31.24$^{ab}$±0.00 | 31.92$^{ab}$±2.07 | 29.18$^{ab}$±0.00 | 45.93$^{b}$±2.38 |
| 0.05% | 11.90$^{a}$±0.09 | 83.90$^{c}$±7.79 | 90.76$^{cd}$±4.34 | 100.09$^{cdef}$±0.52 | 96.57$^{cdef}$±7.17 |
| 0.10% | 12.62$^{a}$±1.13 | 87.78$^{cd}$±19.81 | 122.18$^{fg}$±17.76 | 98.88$^{cdef}$±3.16 | 127.18$^{g}$±10.06 |
| 0.15% | 19.00$^{a}$±3.67 | 94.10$^{cde}$±23.84 | 97.52$^{cdef}$±20.50 | 114.93$^{defg}$±11.78 | 120.12$^{efg}$±12.98 |
| 0.20% | 19.08$^{a}$±1.84 | 91.45$^{cd}$±2.78 | 99.44$^{cdef}$±0.17 | 110.81$^{cdefg}$±24.91 | 100.72$^{cdef}$±18.42 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.3** ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

| pH | % solubility | |
|---|---|---|
| | 0.75% F, 4h ns | 1.00% F, 4h ns |
| 2 | 54.90 ± 2.34 | 56.84 ± 0.95 |
| 3 | 56.52 ± 1.30 | 60.84 ± 2.28 |
| 4 | 55.72 ± 2.58 | 55.86 ± 1.58 |
| 5 | 57.65 ± 0.67 | 58.34 ± 9.06 |
| 6 | 56.30 ± 2.17 | 57.38 ± 0.91 |
| 7 | 58.46 ± 3.68 | 56.69 ± 3.17 |
| 8 | 55.88 ± 2.89 | 56.04 ± 0.05 |
| 9 | 57.53 ± 3.59 | 57.63 ± 5.29 |
| 10 | 58.27 ± 0.49 | 56.35 ± 2.40 |

ns แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

**ตารางที่ ฉ.4** ความสามารถในการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนหอยเป๋าฮื้อด้วยเอนไซม์ Alcalase®

| pH | % solubility | |
|---|---|---|
| | 0.05% A, 3h ns | 0.10% A, 2h ns |
| 2 | 55.64 ± 1.59 | 50.17 ± 5.42 |
| 3 | 60.98 ± 5.88 | 51.51 ± 4.96 |
| 4 | 58.99 ± 9.57 | 50.74 ± 1.93 |
| 5 | 60.46 ± 6.97 | 50.85 ± 3.21 |
| 6 | 59.53 ± 4.31 | 50.75 ± 3.26 |
| 7 | 54.62 ± 4.31 | 50.00 ± 3.54 |
| 8 | 55.03 ± 5.33 | 49.99 ± 2.95 |
| 9 | 53.66 ± 0.27 | 50.16 ± 5.11 |
| 10 | 54.78 ± 1.49 | 47.46 ± 3.92 |

ns แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ฉ.5** ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

| pH | FE (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.75% F, 4h | | 1.00% F, 4h | |
| | no NaCl | 0.1M NaCl | no NaCl | 0.1M NaCl |
| 4.5 | $296.00^{c}$±11.31 | $346.36^{b}$± 9.00 | $316.00^{ns}$±11.31 | $347.27^{b}$± 2.57 |
| 5.5 | $328.00^{d}$± 0.00 | $390.00^{c}$± 0.00 | $324.00^{ns}$± 5.66 | $332.00^{b}$±11.31 |
| 6.5 | $230.00^{a}$±14.14 | $254.55^{a}$± 0.00 | $324.00^{ns}$± 5.66 | $290.00^{a}$±14.14 |
| 7.5 | $272.73^{b}$± 0.00 | $397.17^{c}$±18.50 | $310.00^{ns}$±14.14 | $366.36^{c}$±19.28 |

ns แตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.6** ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme®

| pH | เวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลง 50% (นาที) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.75% F, 4h | | 1.00% F, 4h | |
| | no NaCl | 0.1M NaCl | no NaCl | 0.1M NaCl |
| 4.5 | $2.72^{a}$±0.58 | $2.72^{ab}$± 0.03 | $3.18^{a}$±0.42 | $6.70^{d}$±0.01 |
| 5.5 | $8.13^{b}$±0.68 | $1.63^{a}$ ± 0.60 | $19.03^{b}$±4.18 | $3.93^{c}$±0.18 |
| 6.5 | $3.00^{a}$±0.58 | $2.43^{ab}$± 0.80 | $6.53^{a}$±4.09 | $1.91^{a}$±0.05 |
| 7.5 | $2.01^{a}$±0.05 | $2.30^{b}$ ± 0.32 | $1.40^{a}$±0.11 | $3.17^{b}$±0.52 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**ตารางที่ ฉ.7** ความสามารถในการเกิดโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase®

| pH | FE (%) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.05% A, 3h | | 0.10% A, 2h | |
| | no NaCl | 0.1M NaCl | no NaCl | 0.1M NaCl |
| 4.5 | 454.85$^{b}$±5.01 | 460.00$^{b}$± 3.85 | 480.00$^{c}$± 0.00 | 462.22$^{c}$±0.00 |
| 5.5 | 460.00$^{b}$±0.00 | 436.36$^{a}$± 0.00 | 418.18$^{a}$± 0.00 | 440.00$^{b}$±0.00 |
| 6.5 | 420.00$^{a}$±10.00 | 422.88$^{b}$±14.14 | 446.67$^{b}$±11.55 | 470.00$^{a}$±8.79 |
| 7.5 | 453.33$^{b}$±5.77 | 426.67$^{b}$±14.14 | 426.67$^{a}$± 5.77 | 470.00$^{a}$±5.77 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.8** ความคงตัวของโฟมของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Alcalase®

| pH | เวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลง 50% (นาที) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 0.05% A, 3h | | 0.10% A, 2h | |
| | no NaCl | 0.1M NaCl | no NaCl | 0.1M NaCl |
| 4.5 | 30.47$^{b}$± 1.28 | 11.03$^{b}$± 3.45 | 38.53$^{ab}$±13.20 | 13.71$^{c}$±0.23 |
| 5.5 | 28.23$^{b}$± 5.47 | 3.33$^{a}$ ± 0.36 | 41.52$^{c}$±11.52 | 2.28$^{a}$± 0.33 |
| 6.5 | 17.16$^{ab}$±16.7 | 12.91$^{b}$± 3.77 | 33.60$^{bc}$±1.93 | 13.12$^{c}$±0.74 |
| 7.5 | 8.77$^{a}$± 6.10 | 8.09$^{ab}$± 3.13 | 7.37$^{a}$±7.50 | 9.56$^{b}$± 2.96 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.9** ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมของ BSA

| pH | FE (%) | | เวลาที่ทำให้ปริมาตรโฟมลดลง 50% (นาที) | |
|---|---|---|---|---|
| | no NaCl | 0.1M NaCl | no NaCl | 0.1M NaCl |
| 4.5 | 646 ± 31.11 | 721 ± 12.73 | 4.00 ± 0.00 | 7.00 ± 1.41 |
| 5.5 | 720 ± 28.28 | 666 ± 14.14 | 1.63 ± 0.53 | 3.00 ± 1.41 |
| 6.5 | 890 ± 14.14 | 858 ± 42.43 | 0.92 ± 0.12 | 2.00 ± 0.00 |
| 7.5 | 735 ± 25.93 | 934 ± 19.80 | 2.34 ± 0.47 | 7.50 ± 0.71 |

a,b,c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

**ตารางที่ ฉ.10** ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่ไม่เติมเกลือของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme®

| เวลา | FE (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.75% F, 4h | | | | 1.00% F, 4h | | | |
| | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 |
| 0 | 296.00±11.31 | 328.00±0.00 | 230.00±14.14 | 273.73±0.00 | 316.00±11.31 | 324.00±5.66 | 324.00±5.66 | 310.00±14.14 |
| 1 | 236.00±62.23 | 296.00±5.66 | 180.00±14.14 | 183.64±2.57 | 300.00±28.28 | 290.00±14.14 | 270.00±42.43 | 230.00±42.43 |
| 2 | 204.00±62.23 | 264.00±0.00 | 140.00±28.28 | 140.00±7.71 | 258.00±8.49 | 264.00±5.66 | 222.00±2.83 | 92.00±39.60 |
| 3 | 104.00±79.20 | 254.00±11.31 | 115.00±26.87 | 31.82±32.14 | 155.00±35.36 | 249.00±7.07 | 154.00±87.68 | 20.00±0.00 |
| 4 | 79.00±74.95 | 236.00±5.66 | 97.00±18.38 | 18.18±15.43 | 122.00±19.80 | 240.00±0.00 | 142.00±98.99 | 17.00±1.41 |
| 6 | 65.00±55.15 | 212.00±5.66 | 40.00±42.43 | 5.45±2.57 | 99.00±18.38 | 233.00±7.07 | 123.00±114.55 | 14.00±2.83 |
| 8 | 35.00±12.73 | 171.00±35.36 | 5.00±1.41 | 5.45±2.57 | 77.00±15.56 | 232.00±5.66 | 106.00±132.94 | 10.00±2.83 |
| 10 | 22.00±16.97 | 121.00±49.50 | 2.50±0.71 | 5.45±2.57 | 61.00±24.04 | 230.00±8.49 | 87.00±114.55 | 8.00±0.00 |
| 20 | 21.00±18.38 | 78.00±19.80 | 1.50±0.71 | 2.73±1.29 | 36.00±16.97 | 144.00±73.54 | 19.00±24.04 | 7.00±141 |
| 30 | 21.00±18.38 | 47.00±4.24 | 1.50±0.71 | 2.73±1.29 | 28.00±14.14 | 74.00±2.83 | 12.00±16.97 | 6.00±2.83 |
| 40 | 16.00±11.31 | 36.00±11.31 | 1.50±0.71 | 2.73±1.29 | 23.00±7.07 | 46.00±14.14 | 8.00±11.31 | 6.00±2.83 |
| 50 | 15.00±12.73 | 26.00±2.83 | 1.00±0.00 | 1.82±0.00 | 19.00±7.07 | 44.00±16.97 | 8.00±11.31 | 5.00±1.41 |
| 60 | 7.00±1.41 | 26.00±2.83 | 0.50±0.71 | 1.82±0.00 | 19.00±7.07 | 34.00±2.83 | 6.00±8.49 | 3.00±1.41 |

**ตารางที่ ฉ.11** ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Flavourzyme®

| เวลา | FE (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.75% F, 4h | | | | 1.00% F, 4h | | | |
| | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 |
| 0 | 346.36±9.00 | 170.00±14.14 | 254.55±0.00 | 397.17±18.50 | 347.27±2.57 | 332.00±11.31 | 290.00±14.14 | 366.36±19.28 |
| 1 | 279.09±27.00 | 122.00±25.46 | 194.55±7.71 | 348.32±15.15 | 316.36±5.14 | 282.00±8.49 | 252.00±16.97 | 314.00±8.49 |
| 2 | 209.45±58.63 | 64.00±56.57 | 141.82±28.28 | 282.63±50.66 | 290.91±0.00 | 230.00±31.11 | 134.00±14.14 | 275.36±24.56 |
| 3 | 117.45±19.03 | 25.00±21.21 | 92.73±64.28 | 187.13±40.66 | 266.36±6.43 | 172.00±5.66 | 64.00±0.00 | 187.91±47.95 |
| 4 | 95.55±19.16 | 23.00±18.38 | 60.00±43.71 | 90.57±79.64 | 253.64±6.43 | 168.00±0.00 | 34.00±14.14 | 150.00±14.14 |
| 6 | 48.27±8.87 | 19.00±18.38 | 21.82±0.00 | 23.74±14.12 | 218.18±0.00 | 44.00±0.00 | 18.00±2.83 | 45.45±7.71 |
| 8 | 29.18±10.16 | 13.00±9.90 | 12.73±2.57 | 16.30±10.14 | 90.00±1.29 | 29.00±7.07 | 8.00±0.00 | 26.91±7.20 |
| 10 | 29.18±10.16 | 13.00±9.90 | 7.27±0.00 | 11.09±4.46 | 50.91±0.00 | 29.00±7.07 | 7.00±1.41 | 21.09±4.11 |
| 20 | 15.91±8.36 | 11.00±7.07 | 2.27±1.93 | 8.65±2.92 | 14.55±0.00 | 24.00±0.00 | 3.00±1.41 | 11.27±4.63 |
| 30 | 15.91±8.36 | 10.00±8.49 | 2.27±1.93 | 7.31±0.67 | 12.73±2.57 | 20.00±0.00 | 2.00±0.00 | 10.36±3.34 |
| 40 | 15.91±8.36 | 10.00±8.49 | 2.27±1.93 | 6.76±1.56 | 12.73±2.57 | 18.00±2.83 | 1.00±1.41 | 8.55±0.77 |
| 50 | 14.09±5.79 | 10.00±8.49 | 1.36±0.64 | 6.67±1.56 | 9.09±7.71 | 16.00±0.00 | 1.00±1.41 | 7.64±0.51 |
| 60 | 13.18±4.50 | 10.00±8.49 | 0.91±1.29 | 4.99±2.61 | 9.09±7.71 | 16.00±0.00 | 1.00±1.41 | 7.64±0.51 |

**ตารางที่ ฉ.12** ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่ไม่เติมเกลือของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase®

| เวลา | FE (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.05% A, 3h | | | | 0.10% A, 2h | | | |
| | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 |
| 0 | 454.55±5.01 | 460.00±0.00 | 420.00±10.00 | 453.33±5.77 | 480.00±0.00 | 418.18±0.00 | 446.67±11.55 | 426.67±5.77 |
| 1 | 429.09±11.31 | 420.00±0.00 | 400.67±17.93 | 412.00±8.00 | 465.00±7.07 | 392.73±5.14 | 430.00±18.00 | 377.33±16.17 |
| 2 | 403.64±14.14 | 394.00±14.14 | 369.33±12.86 | 380.00±17.44 | 430.00±8.49 | 358.18±7.71 | 392.00±12.00 | 354.67±16.65 |
| 3 | 396.36±2.83 | 374.00±8.49 | 352.67±18.38 | 353.33±10.07 | 416.00±5.66 | 342.73±3.86 | 374.00±15.62 | 252.00±106.06 |
| 4 | 385.45±2.83 | 362.00±2.83 | 338.00±23.07 | 252.00±169.75 | 409.00±1.41 | 329.09±2.57 | 368.00±13.86 | 209.33±124.86 |
| 6 | 370.91±2.83 | 352.00±0.00 | 282.67±40.18 | 234.67±175.56 | 330.00±104.65 | 321.82±2.57 | 343.33±19.01 | 117.33±192.85 |
| 8 | 363.64±2.83 | 349.00±1.41 | 216.00±146.04 | 177.33±156.27 | 316.00±113.14 | 316.36±2.57 | 334.67±15.14 | 116.67±193.41 |
| 10 | 349.05±2.83 | 346.00±2.83 | 324.00±140.04 | 153.33±155.55 | 302.00±127.28 | 312.73±5.14 | 324.00±21.17 | 115.33±94.57 |
| 20 | 341.82±0.00 | 302.00±36.77 | 112.00±180.13 | 56.67±75.69 | 258.00±183.85 | 292.73±23.14 | 313.33±9.24 | 43.33±69.87 |
| 30 | 214.55±2.83 | 145.00±177.38 | 94.00±150.69 | 17.33±12.86 | 230.00±200.82 | 254.55±61.71 | 280.00±30.20 | 20.67±30.62 |
| 40 | 36.36±5.66 | 68.00±56.57 | 24.00±31.18 | 13.33±6.11 | 35.00±9.90 | 187.27±105.48 | 110.67±64.04 | 19.33±28.31 |
| 50 | 14.55±1.41 | 32.00±16.97 | 13.00±12.70 | 12.00±4.00 | 24.00±0.00 | 155.45±127.28 | 45.33±18.90 | 12.67±16.77 |
| 60 | 7.27±2.83 | 16.00±0.00 | 10.00±8.72 | 11.33±4.00 | 22.00±2.83 | 79.09±65.57 | 33.33±15.14 | 11.33±14.47 |

**ตารางที่ ฉ.13** ความสามารถในการเกิดโฟมที่เวลา 0-60 นาที ในภาวะที่เติมเกลือ 0.1M ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วย Alcalase®

| เวลา | FE (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0.05% A, 3h | | | | 0.10% A, 2h | | | |
| | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 | pH 4.5 | pH 5.5 | pH 6.5 | pH 7.5 |
| 0 | 462.22±3.85 | 440.00±0.00 | 470.00±14.14 | 470.00±14.14 | 460.00±0.00 | 436.36±0.00 | 422.88±8.79 | 426.67±5.77 |
| 1 | 424.44±7.70 | 398.00±25.46 | 430.00±2.83 | 430.00±14.14 | 435.00±24.04 | 349.09±5.14 | 381.36±16.07 | 391.33±20.43 |
| 2 | 396.22±17.82 | 360.00±28.28 | 390.00±31.11 | 376.00±22.63 | 406.00±14.14 | 274.55±90.00 | 358.48±7.29 | 352.00±17.44 |
| 3 | 381.56±14.40 | 264.00±67.88 | 366.00±14.14 | 347.00±26.87 | 398.00±14.14 | 160.00±30.86 | 339.39±8.57 | 325.33±19.73 |
| 4 | 352.22±31.58 | 152.00±33.94 | 348.00±28.28 | 334.00±42.43 | 386.00±8.49 | 122.73±27.00 | 313.64±19.28 | 313.33±19.73 |
| 6 | 337.11±36.05 | 60.00±11.31 | 324.00±39.60 | 229.00±111.72 | 368.00±5.66 | 105.45±20.57 | 297.58±6.00 | 288.67±20.82 |
| 8 | 301.78±43.24 | 55.00±9.90 | 308.00±39.60 | 208.00±141.42 | 380.00±14.14 | 90.91±10.29 | 251.21±31.28 | 232.67±47.60 |
| 10 | 215.53±47.34 | 50.00±8.49 | 264.00±101.82 | 167.00±142.84 | 310.00±2.83 | 89.09±12.86 | 238.48±21.00 | 197.33±75.29 |
| 20 | 43.33±13.01 | 46.00±8.49 | 103.00±125.87 | 44.00±11.31 | 94.00±14.14 | 21.82±5.14 | 161.06±34.50 | 39.33±25.79 |
| 30 | 28.00±10.58 | 40.00±5.66 | 70.00±87.68 | 17.00±4.24 | 38.00±14.14 | 16.36±2.57 | 68.03±49.93 | 26.00±19.08 |
| 40 | 21.56±5.82 | 26.00±14.14 | 20.00±16.97 | 15.00±1.41 | 24.00±0.00 | 16.36±2.57 | 60.76±60.21 | 19.33±11.02 |
| 50 | 17.78±5.55 | 26.00±14.14 | 15.00±12.73 | 14.00±2.83 | 22.00±2.83 | 12.73±2.57 | 33.94±27.43 | 18.00±8.72 |
| 60 | 12.67±6.43 | 24.00±16.97 | 12.00±11.31 | 11.00±1.41 | 22.00±2.83 | 12.73±2.57 | 28.94±10.36 | 16.67±6.43 |

# ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวธันยพร จันท์แสนโรจน์ เกิดเมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม 2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเคมี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร เมื่อ พ.ศ. 2547 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภาคต้น ปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย