บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลา

จากรายงานของ Hudson (1982) พบว่า องค์ประกอบหลักของเนื้อปลา ได้แก่ น้ำ โปรตีน และไขมัน โดยทั่วไปไขมันในปลาเป็นไขมันประเภทไม่อิ่มตัวทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการแปรรูปปลามีกลิ่นเหม็นหืนเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น ไขมันในเนื้อปลาที่มีไขมันสูงจะมีปริมาณเปลี่ยนแปลงตามความอุดมสมบูรณ์ของอาหารปลาที่เลี้ยง เช่น ปลา Mackerel มีปริมาณไขมันสูงถึงร้อยละ 35 เมื่ออาหารอุดมสมบูรณ์ และลดต่ำถึงร้อยละ 1 เมื่ออาหารไม่อุดมสมบูรณ์ สำหรับปลาที่มีไขมันต่ำ ปริมาณไขมันจะเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล โดยทั่วไปปริมาณน้ำและไขมันในปลารวมกันประมาณร้อยละ 20

โปรตีนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อปลา โดยมีปริมาณมากเป็นอันดับสองรองจากน้ำ คือ มีอยู่ในช่วงร้อยละ 6-28 โดยทั่วไปแล้วมีประมาณโปรตีนร้อยละ 15-19 แต่มีสารเทียบเท่าโปรตีน (protein equivalent) ร้อยละ 10-15 ซึ่งสารเหล่านี้มาจากส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein source) เช่น กรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์ ไตรเมธิลลามีนออกไซด์ (trimethylamine oxide) แอมโมเนีย และเบสที่ระเหยได้ต่าง ๆ (volatile base)

โปรตีนในเนื้อปลามีคุณค่าทางโภชนาการสูง เทียบเท่ากับอาหารชนิดอื่น เช่น เนื้อวัว และเนื้อไก่ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในอาหาร (Hudson, 1982)

	ข้าวสาลี	ถั่วเหลือง	นมวัว	ไข่	เนื้อวัว	ไก่	ปลา	โมลุส
Ile	210	280	350	350	320	290	330	300
Leu	420	490	640	520	500	470	530	480
Lys	150	400	510	390	570	560	610	500
Met	100	80	180	200	170	150	180	170
Cys	160	100	60	110	80	80	70	100
Phe	280	310	340	320	280	280	260	260
Tyr	190	200	280	250	240	220	220	260
Thr	170	240	310	320	290	260	300	290
Trp	70	80	90	110	80	70	70	80
Val	280	300	460	470	330	300	360	390

โปรตีนในเนื้อปลานอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงดังองค์ประกอบกรดอะมิโนที่จำเป็นเปรียบเทียบกับแหล่งโปรตีนอื่น ๆ แล้ว โปรตีนปลาโดยทั่วไปประกอบด้วยโปรตีน 3 ประเภทดังนี้

2.1.1 ไมโอไฟบริลลาโปรตีน (Myofibrillar proteins)

ไมโอไฟบริลลาโปรตีนเป็นโปรตีนที่ทำให้กล้ามเนื้อมีลักษณะเป็นเส้น มีความเหนียว มีลักษณะเป็นเจล (gel) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) แอคติน (actin) ไมโอซิน (myosin) และแอคโตไมโอซิน (actomyosin) โปรตีนประเภทนี้มีประมาณร้อยละ 65 ของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา เสียสภาพธรรมชาติได้ง่ายด้วยความร้อนและยูเรีย ถูกย่อยได้ง่ายด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) นอกจากนี้ยังมีหมู่ไธออล (-SH) ที่อิสระและว่องไวต่อปฏิกิริยาทางเคมีมากกว่าโปรตีนจากสัตว์อื่น ๆ

2.1.2 ซาร์โคพลาสมิคโปรตีน (Sarcoplasmic proteins)

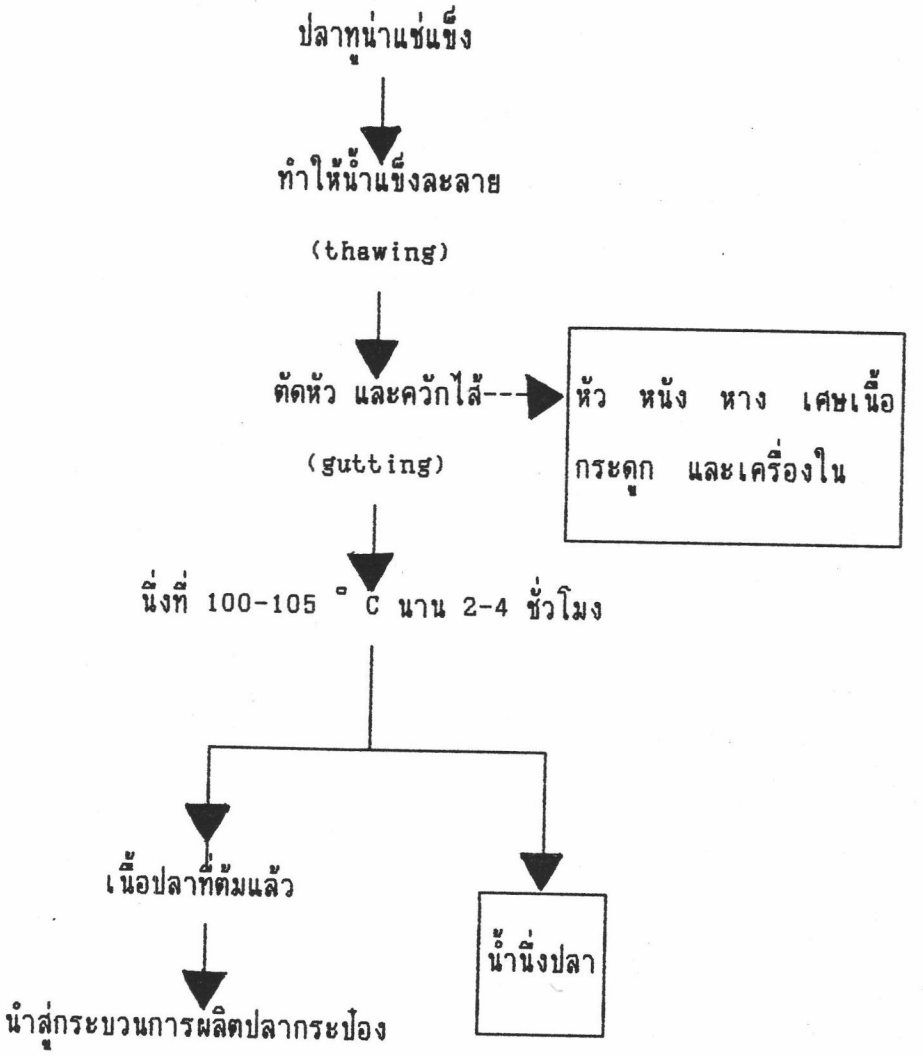
เป็นโปรตีนที่พบใน cytoplasma เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ในเมตาโบลิซึมของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยโกลบูลิน X (globulin X) ไมโอเจน (myogen) และไมโอโกลบิน (myoglobin) มีประมาณร้อยละ 26-30 ของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลา ซาร์โคพลาสมิคโปรตีนของปลาแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า และมีกรดอะมิโนชนิดฟีนิลอะลานีนเป็นองค์ประกอบสูงมาก

2.1.3 สโตรมาโปรตีน (Stroma protein)

สโตรมาโปรตีนหรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue proteins) หรือคอลลาเจน (collagen) มีประมาณร้อยละ 3 ของกล้ามเนื้อปลากระดูกแข็ง หรือประมาณร้อยละ 10 ในปลากระดูกอ่อน โปรตีนชนิดนี้มีลักษณะเหนียว ไม่ละลายในสารละลายเกลือที่มีฤทธิ์เป็นกลาง รวมทั้งกรดและด่างเจือจาง

2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสารสกัดจากปลา

วัตถุดิบที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจากปลาได้แก่ ปลาทุกชนิด แต่เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ วัตถุดิบที่ใช้ได้แก่ปลาที่มีขนาดเล็กเช่น ปลาเป็ด ปลาหลังเขียว หรือของเหลือทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการผลิตปลากระป๋อง ดังแสดงตามแผนภูมิรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ของเหลือทิ้งได้แก่ น้ำนึ่งปลา ส่วนเศษเนื้อ หนัง หาง หัว และกระดูกที่ได้จากขั้นตอนการผลิตปลากระป๋อง (Sakai, 1989)

จากแผนภูมิรูปที่ 2.1 จะเห็นว่าของเหลือทิ้งที่ได้จากขั้นตอนการผลิตปลากระป๋องมี 2 ประเภทคือ ส่วนที่เป็นของแข็งได้แก่ หัว หนัง หาง เศษเนื้อ กระดูก และเครื่องใน โดยทั่วไปของเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งและปลาขนาดเล็กเหล่านี้ สามารถนำมาผลิตเป็นปลาป่นสำหรับเป็นอาหารสัตว์ หรือผลิตโปรตีนเข้มข้นจากปลา (fish protein concentrate) ซึ่งได้จากการสกัดโปรตีนด้วยตัวทำละลายร้อน ของเหลือทิ้งดังกล่าวนี้ขาดคุณสมบัติการละลาย การกระจาย

ตัว (dispersibility) การทำให้เปียก (wetting) การพองตัว (swelling) และการเกิดโฟม (foaming) ดังนั้นจึงได้มีผู้วิจัยหลายท่านได้นำของเหลือทิ้งเหล่านี้มาย่อยสลายโปรตีนเพื่อผลิตเป็นสารสกัดจากปลาเพื่อพัฒนาคุณสมบัติต่าง ๆ ให้ดีขึ้น รวมทั้งนำไปใช้ในลักษณะสารเพิ่มหรือแต่งกลิ่นรสเพื่อที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในอาหาร (Tannenbaum และคณะ, 1970; Archer และคณะ, 1973; Hale, 1974; Hevia และคณะ, 1976; Bhumiratana และคณะ, 1977 และ Ibrahim และ Nyns, 1979)

สำหรับของเหลือทิ้งที่ได้จากการผลิตปลากระป๋องส่วนที่เป็นของเหลวได้แก่ น้ำนึ่งปลา ซึ่งมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลัก สามารถนำมาย่อยสลายโปรตีนเพื่อผลิตเป็นสารสกัดจากปลา (Sakai, 1989) และนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารหรืออาหารเสริมโปรตีนได้เช่นกัน แต่อาจจะแตกต่างไปจากกรณีของส่วนเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งในด้านผลผลิตการย่อยสลายโปรตีน ตลอดทั้งลักษณะสมบัติต่าง ๆ ของสารสกัดที่ได้

2.3 <u>การย่อยสลายโปรตีน</u> (Hydrolysis of proteins)

โปรตีนทั่วไปประกอบด้วยกรดอะมิโนมากกว่า 20 ตัว ต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์เพื่อให้เกิดโครงสร้างแบบ 3 มิติ ลำดับของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันตามชนิดของโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 1200 ถึงหลาย ๆ ล้าน และเมื่อโปรตีนเหล่านี้ถูกย่อยสลาย พันธะเปปไทด์จะแตกออก สุดท้ายได้ผลผลิตหน่วยเล็กที่สุดถึงกรดอะมิโน ซึ่งเป็นโครงสร้างพื้นฐานของโปรตีนตามลำดับการย่อยสลายดังนี้ (Prendergast, 1974)

protein ---> primary proteoses ---> secondary proteoses ---> peptones ---> polypeptides ---> simple peptides ---> amino acids

กรรมวิธีการย่อยสลายโปรตีนในอุตสาหกรรมโดยทั่วไป แบ่งเป็น 3 วิธีคือ

2.3.1 <u>การย่อยสลายด้วยกรด</u> (Acid hydrolysis) (Foster, 1957)

กรดที่ใช้ในการย่อยโปรตีนโดยทั่วไปเป็นกรดแร่เช่น กรดเกลือ (hydrochloric acid) หรือกรดกำมะถัน (sulfuric acid) ความเข้มข้นร้อยละ 20 ในอัตราส่วน 3-5 ส่วน ต่อโปรตีน 1 ส่วน นาน 16-24 ชั่วโมง เวลาที่ใช้อาจทำให้น้อยลงได้โดยใช้กรดเกลือเข้มข้น ซึ่งใช้เวลาเพียง 8-10 ชั่วโมง หรืออาจเร่งโดยการเพิ่มอุณหภูมิการย่อยสลายเช่น 120 องศาเซลเซียส แต่กรดที่ใช้ควรเป็นกรดเจือจาง เมื่อกรดถูกใช้เป็นตัวเร่งการย่อยสลายโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโนที่จับกับกรดแร่จะเท่ากับกลุ่มอะมิโนที่ถูกปลดปล่อยออกมาระหว่างการย่อย กรดเกลือที่เหลือจะถูกระเหยออกภายใต้ความดันต่ำ ถ้าใช้กรดกำมะถันในการย่อยโปรตีน ความเข้มข้นที่ใช้คือ 6-8 นอร์มัล ในขั้นตอนสุดท้ายจะต้องทำเป็นกลางโดยการเติมแบเรียมไฮดรอกไซด์ (barium hydroxide) คาร์บอเนต (carbonate) หรือสารประกอบแคลเซียม (calcium) ซึ่งจะทำให้เกิดเกลือในปริมาณมาก ข้อเสียของการใช้กรดในการย่อยคือ กรดอะมิโนทริปโทฟาน (tryptophan) ส่วนใหญ่ หรือทั้งหมดจะถูกทำลาย รวมทั้งซีสเตอีน (cysteine) ซีรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) นอกจากนี้ในการย่อยด้วยกรดยังทำให้เกิดของแข็งสีดำขึ้นเรียกว่า ฮิวมิน (humin) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากการรวมตัวของทริปโทฟานกับอัลดีไฮด์ (aldehyde) ที่มาจากกลูโคส (glucose) หรือผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซีเป็นองค์ประกอบ (hydroxy amino acid) ซึ่งสามารถแยกออกโดยการเซนตริฟิวก์ (centrifuge) หรือการกรอง

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการย่อยสลายโปรตีนจากปลาด้วยกรด เช่น ในปี ค.ศ. 1979 Orlova, Nelichik และ Fleider ได้ทดลองย่อยสลายปลา 3 ชนิดด้วยกรดเพื่อผลิตเป็นสารสกัดจากปลา กระบวนการผลิตสารสกัดจากปลาประกอบด้วยขั้นตอนการย่อยสลายด้วยกรด การทำพีเอชให้เป็นกลาง (neutralization) การกรอง และการกำจัดกลิ่น (deodorization) ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีอ่อน กลิ่นรสดี สามารถนำมาใช้เป็นส่วนผสม

ในซุปอัดก้อน (dehydrated soup cubes) เป็นส่วนผสมในโปรตีนเข้มข้น (protein concentrates) และเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อทางจุลชีววิทยา เป็นต้น

2.3.2 <u>การย่อยสลายด้วยด่าง</u> (Alkaline hydrolysis) (Foster, 1957)

การย่อยด้วยด่างโดยทั่วไปจะใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์หรือแบเรียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 6 นอร์มัล นาน 6 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีกลิ่นรสที่ไม่น่าพึงพอใจอย่างมาก ถึงแม้ว่าข้อได้เปรียบของวิธีการนี้คือ กรดอะมิโนทริปโทฟานจะไม่สลายไปแต่อาร์จีนีน (argenine) และซีสตีน (cystine) จะถูกทำลายทั้งหมด นอกจากนี้ยังทำให้เกิดดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) ซึ่งเป็นผลมาจากการรวมตัวของซีสเตอีนและซีรีน ซึ่งดีไฮโดรอะลานีนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับ α-amino group ของซีรีนเกิดเป็นไลซิโนอะลานีน (lysinoalanine) ซึ่งมีความต้านทานต่อการย่อยมีผลทำให้คุณค่าทางโภชนาการลดลง นอกจากนี้การเพิ่มความเข้มข้นของด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาของการย่อยสลาย จะทำให้มีการทำลายกรดอะมิโน และการเกิดไลซิโนอะลานีนมากขึ้น

สำหรับตัวอย่างรายงานการย่อยสลายโปรตีนจากปลาด้วยด่าง มีดังนี้ เช่น ในปี ค.ศ. 1970 Tannenbaum, Ahern และ Bates ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลาด้วยด่างพบว่า ภาวะที่ทำให้ได้ผลผลิตสูงสุดคือ พีเอช 12.5 อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 20 นาที ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อนและมีกลิ่นรสแปลกปลอมเล็กน้อย นอกจากนี้พบว่าการย่อยสลายด้วยด่างทำให้เกิดกรดอะมิโนเปลี่ยนรูปแบบ (racemization) อย่างมาก

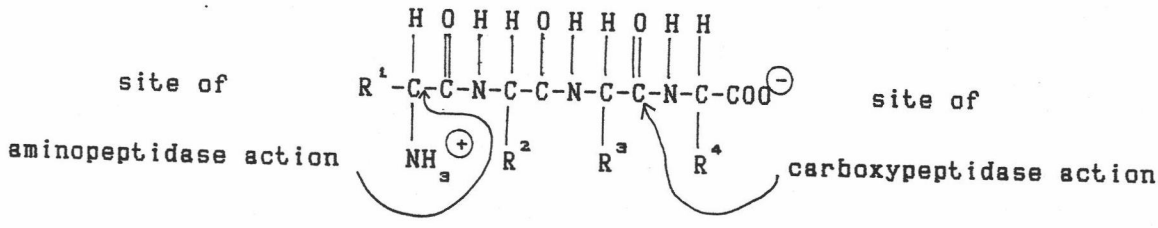
2.3.3 <u>การย่อยสลายด้วยเอนไซม์</u> (Enzyme hydrolysis)

2.3.3.1 <u>เอนไซม์ย่อยโปรตีน</u> (Proteolytic enzyme)

Boyer, Landy และ Myrback (1960) ได้แบ่งเอนไซม์ที่มีสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ ดังนี้

(1) เอกโซเปปทิเดส (Exopeptidase)

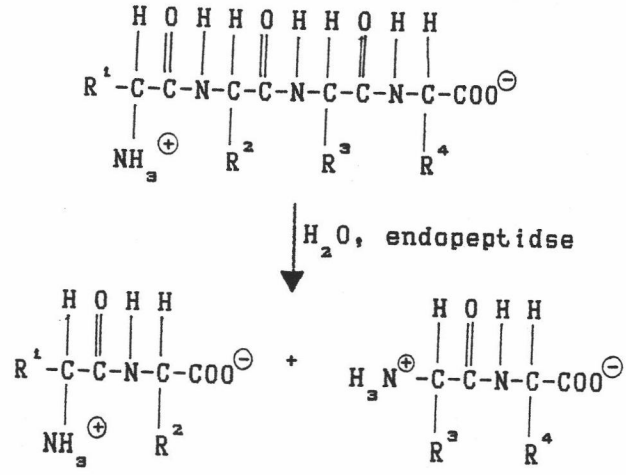
เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายแอลฟาอะมิโน (α-amino) หรือปลายแอลฟาคาร์บอกซิล (α-carboxyl) เท่านั้น แสดงดังรูปที่ 2.2 ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ อะมิโนเปปทิเดส (amino peptidase) คาร์บอกซิลเปปทิเดส (carboxyl peptidase) เป็นต้น



รูปที่ 2.2 การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอกโซเปปทิเดส

(2) เอนโดเปปทิเดส (Endopeptidase)

เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนได้หลายตำแหน่ง ไม่เฉพาะที่ปลายทั้งสองด้านเท่านั้น แสดงดังรูปที่ 2.3 ตัวอย่างของเอนไซม์กลุ่มนี้ได้แก่ เปปซิน (pepsin) ทริปซิน (trypsin) ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromelain) รวมทั้งโปรติเอสจากจุลินทรีย์บางชนิด เป็นต้น



รูปที่ 2.3 การย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนโดยเอนโดเปปทิเดส

นอกจากการแบ่งชนิดของโปรติเอสตามสมบัติในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีนแล้ว ตามรายงานของ Barett (1986) ได้แบ่งประเภทโปรติเอสเป็น 4 กลุ่มตามคุณสมบัติของบริเวณเร่ง (catalytic sites) ดังนี้

(1) ซีรีนโปรติเอส (Serine proteases)

เอนไซม์กลุ่มนี้มีกรดอะมิโนซีรีนอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ การเร่งปฏิกิริยาถูกยับยั้งโดยสาร diisopropyl fluorophosphate (DFP) และ phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) ไม่มีอะตอมของโลหะเป็นกลุ่ม prosthetic แต่แคลเซียมอิออนช่วยทำให้เอนไซม์เสถียร และ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ไม่ยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์นี้ พีเอชที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา (optimum pH) อยู่ระหว่าง 7.0-11.0 ดังนั้นซีรีนจะมีลักษณะการย่อยโปรตีนเป็นแบบตัดพันธะในสาย (endopeptidase) ตัวอย่างโปรติเอสในกลุ่มนี้ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) ทรอมบิน (thrombin) เป็นต้น

(2) นิวทรัลโปรติเอส (Neutral proteases)

เป็นเอนไซม์ที่มีอะตอมของโลหะ ซึ่งมักเป็นสังกะสี (Zn) ยึดจับกับเอนไซม์ค่อนข้างแน่นในลักษณะเป็นกลุ่ม prosthetic จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า metalloproteases อะตอมโลหะช่วยให้ความเสถียรแก่โครงสร้างของนิวทรัลโปรติเอส มีพีเอชที่

เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุดในการย่อยเคซีนอยู่ในช่วงพีเอช 7.0-8.0 แต่มีความเสถียรในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้างคือ 5.0-6.0 และเมื่อมีแคลเซียมอิออนจะมีความเสถียรเพิ่มขึ้น สารอีดีทีเอ ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวจับโลหะมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยเกาะกับอะตอมของสังกะสี ทำให้เอนไซม์ทำงานไม่ได้ สารยับยั้งชนิดอื่นได้แก่ 1,10-phenanthroline, α,α-bipyridine และ dipicolinic acid ตัวอย่างของโปรติเอสในกลุ่มนี้ได้แก่ thermolysin ผลิตโดยแบคทีเรีย *Bacillus thermoproteolyticus* ซึ่งต้องการอิออนของสังกะสี carboxypeptidase ต้องการโคบอลอิออน (Co^{++}) และนิเกิลอิออน (Ni^{++}) leucine aminopeptidase ต้องการแมกนีเซียมอิออน (Mg^{++}) หรือแมงกานีสอิออน (Mn^{++}) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนที่ตำแหน่งพันธะเปปไทด์ ซึ่งเกิดจากกรดอะมิโนที่มีหมู่ไม่มีขั้ว (non-polar group) คือ อะลานีน (alanine) วาลีน (valine) ลูซีน (leucine) ไอโซลูซีน (isoleucine) โพรลีน (proline) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโธฟาน (tryptophan) และเมไธโอนีน (methionine)

(3) แอสพาร์ติคโปรทีนเนส (Aspartic proteinases)

เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานได้ดีในช่วงพีเอช 1.0-3.0 จึงจัดเป็น acid proteases เอนไซม์จะไม่มีความเสถียร และเสียสภาพเมื่อพีเอชสูงกว่า 6.0 การเร่งปฏิกิริยาจะถูกยับยั้งโดย diazoketones และสารยับยั้งที่ได้จากจุลินทรีย์เช่น pepstatin ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เปปซิน และเรนนิน เป็นต้น

(4) ซีสเตอีนโปรติเอส (Cysteine proteases)

แอคติวิตีของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ขึ้นกับการมีซีสเตอีน (cysteine) อยู่ที่บริเวณเร่งของโมเลกุลของโปรตีนเอนไซม์ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้เช่น ปาเปน ไฟซิน (ficin) และโบรมิเลน (bromelain)

2.3.3.2 วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส

วิธีการวิเคราะห์แอคติวิตีของโปรติเอส แบ่งตามชนิดของสับสเตรท ได้ดังนี้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2532)

2.3.3.2.1 สับสเตรทโปรตีน

(1) ประเมินจากอัตราการละลายหลังจากปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเทียบการละลายใน TCA (trichloroacetic acid) เรียก TCA-soluble peptides โปรตีนที่ใช้ได้แก่ casein acid- หรือ urea-denaturehemoglobin วัด TCA-soluble peptides ที่ OD_{280} หรือโดยการวัดสีที่เกิดจากปริมาณไทโรซีน หรือพันธะเปปไทด์ใน soluble peptides ปริมาณ TCA-soluble peptides ที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามปริมาณเอนไซม์ และเวลาของปฏิกิริยา

(2) ประเมินจำนวนพันธะเปปไทด์ซึ่งวัดได้จากการทำปฏิกิริยากับ ninhydrin reagent ให้สีที่ OD_{570} ซึ่ง ninhydrin จะทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนอิสระได้สีม่วง วัด OD_{570} ได้ เทียบกับกราฟมาตรฐานลูซีน

2.3.3.2.2 สับสเตรทสังเคราะห์

ได้แก่ สับสเตรทที่มีพันธะ ester, amide และ peptide ตัวอย่างปฏิกิริยาได้แก่

(1) ใช้สับสเตรทเป็น nitrophenyl ester ซึ่งเป็น chromogenic substrate สามารถติดตามปฏิกิริยาได้โดยวัด OD_{400} ถ้าพีเอชมากกว่า 7.0 และวัด OD_{340} ถ้าพีเอชน้อยกว่า 7.0

(2) ใช้สับสเตรทเป็น ester หรือ amide ที่ให้ผลผลิตเป็น carboxylate group ที่สามารถติดตามปฏิกิริยาได้ที่ OD_{253}

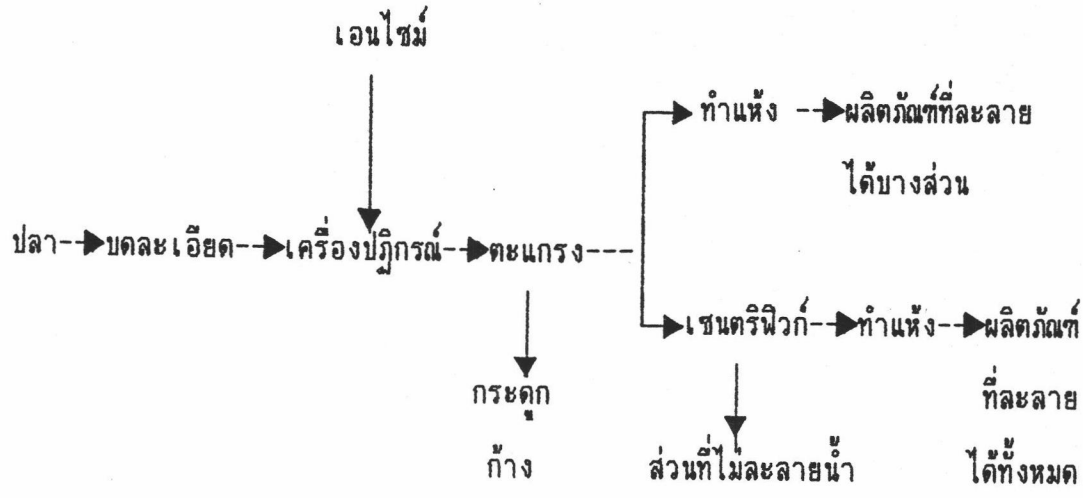
2.3.3.3 การย่อยสลายโปรตีนจากปลาด้วยเอนไซม์

เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา ควรเลือกเอนไซม์ที่มีภาวะที่หลีกเลี่ยงจากการเน่าเสียโดยแบคทีเรีย ได้แก่ ปาเปนจากยางมะละกอ และโบรมิเลนจากสับปะรดซึ่งมีค่าพีเอชที่เหมาะสมใกล้กับค่าพีเอชที่เป็นกลาง และอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งปลอดภัยจากการปนเปื้อนโดยแบคทีเรีย เอนไซม์ที่ใช้ควรเป็นเอนไซม์จากพืชหรือเอนไซม์จากจุลินทรีย์เนื่องจากมีความจำเพาะแบบกว้าง ๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างต่ำ (Mackie, 1982)

ได้มีผู้วิจัยหลายท่านได้ศึกษาการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนจากปลาในรูปแบบต่าง ๆ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

(1) การใช้เอนไซม์อิสระในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา

ขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา แสดงดังแผนภาพรูปที่ 2.4 เริ่มจากการบดปลาให้ละเอียด จากนั้นเติมเอนไซม์ลงในเครื่องปฏิกรณ์ (reactor) ซึ่งปรับพีเอชและอุณหภูมิให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ โดยทั่วไปพีเอชที่ใช้เป็นกลางถึงด่าง อุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส นานตั้งแต่ 30 นาที ถึงหลายชั่วโมง หลังจากที่กระดูกและก้างถูกกรองออกแล้วจะได้ส่วนผสมของเปปไทด์และกรดอะมิโน รวมทั้งอนุภาคที่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ หลังจากนั้นอาจจะทำแห้งผลิตภัณฑ์ทั้งหมดด้วยวิธีการพ่นฝอย (spray drying) ซึ่งในกรณีนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะละลายน้ำบางส่วน และยังมีไขมันซึ่งจะทำให้เกิดปัญหาอายุการเก็บสั้นได้ ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้เหมาะสมที่จะใช้เป็นสารทดแทนโปรตีนในนม หรืออาจจะนำไปเซนตริฟิวก์เอาส่วนที่ไม่ละลายออกก่อนทำแห้ง ส่วนที่ไม่ละลายนี้สามารถนำไปเป็นอาหารสัตว์ได้ ส่วนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากส่วนที่ละลายจะเหมาะสมเป็นผลิตภัณฑ์คุณภาพสูงสำหรับมนุษย์ (Mohr, 1977)



รูปที่ 2.4 แผนภาพขั้นตอนการย่อยสลายโปรตีนจากปลาโดยใช้เอนไซม์อิสระ (Mohr,1977)

ตัวอย่างงานวิจัยที่สำคัญเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์อิสระในการย่อยสลายโปรตีนจากปลาเพื่อใช้เป็นฐานข้อมูลสำหรับงานวิจัย พอจะรวบรวมได้ดังนี้

ในปี ค.ศ. 1969 Hale ได้เปรียบเทียบแอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ 23 ชนิด ในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์เป็นความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ทำให้การย่อยสลายเกิดขึ้นร้อยละ 60 ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า โปรเนสมีแอคติวิตีสูงที่สุด รองลงมาคือ นิวเตรส และ rhozyme-PF แต่เมื่อพิจารณาแอคติวิตีของเอนไซม์ต่อหน่วยราคาแล้วพบว่าเอนไซม์เปปซิน ปาเปน และแพนครีเอติน มีค่าสูงที่สุด

ในปี ค.ศ. 1973 Tarky, Agarwala และ Pigott ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนที่เป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปปลาด้วยเปปซิน ชนิดของปลาที่ใช้คือ English Sole (*Parophrys vetulus*) ภาวะที่ใช้คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 2.0 ผลการทดลองพบว่าการปรับพีเอชให้คงที่ตลอดการย่อยสลายโปรตีนและใช้วัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านการต้มฆ่าเชื้อจะทำให้ได้ผลิตผลที่ดี เวลาที่เหมาะสมคือ 4 ชั่วโมง ทั้งนี้พิจารณาจากปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วยคือ ผลผลิต ต้นทุนในการทำแห้ง และราคาของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำมาทำเป็นกลางด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดเกลือปริมาณมาก กำจัดออกโดยใช้เครื่องกรองแบบ

tubular ultrafiltration membrane ผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีโปรตีนร้อยละ 80 และเถ้าร้อยละ 22 มีลักษณะเป็นผงขาวครีมหลังการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย ไม่ดูดความชื้น มีรสเค็มและรสขมเล็กน้อย มีไขมันต่ำ จากการศึกษาค่า Protein Efficiency Ratio (PER) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้มีคุณค่าทางโภชนาการไม่ดี ทั้งนี้เนื่องจากมีกรดอะมิโนทริปโธฟานต่ำ หลังจากที่เสริมกรดอะมิโนชนิดนี้ลงในผลิตภัณฑ์พบว่า ค่า PER สูงขึ้นใกล้เคียงกับเคซีน และเมื่อผสมกับเคซีนในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้ได้ค่า PER ใกล้เคียงกับเคซีนบริสุทธิ์ คุณสมบัติของผลิตภัณฑ์นี้คือ ละลายน้ำได้ ไขมันต่ำ สามารถใช้เป็นโปรตีนเสริมโปรตีนราคาแพง ทำให้ช่วยลดค่าใช้จ่ายลงโดยไม่สูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ

ในปี ค.ศ. 1974 Hale ได้ศึกษาแอคติวิตีสัมพัทธ์ของโปรติเอส 23 ชนิด โดยใช้โปรตีนจากปลาเป็นสับสเตรท พบว่า แพนครีเอติน (pancreatine) เปปซิน และปาเปน มีแอคติวิตีต่อหน่วยราคาของเอนไซม์สูงที่สุด วัตถุดิบที่ใช้คือปลา red hake (*Urophycis chuss*) จากการวิเคราะห์กรดอะมิโน พบว่า ความเข้มข้นของกรดอะมิโนทริปโธฟาน และฮิสติดีน ในผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นค่าวิกฤตทางโภชนาการ (critical-nutrition) และแปรผันตามพีเอชของการย่อยสลายโปรตีน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายด้วยอัลคาเลส (Alcalase®) ที่พีเอช 8.5 มีค่า PER ใกล้เคียงกับเคซีน ประโยชน์ที่นำมาใช้ในทางอาหารมากที่สุดคือ ผลิตภัณฑ์ที่มีรสเนื้อ เนื่องจากเป็นโปรตีนที่ละลายน้ำได้ดี จึงสามารถนำมาใช้ผสมในเครื่องดื่มอัดลม (carbonated beverages) ซึ่งมีราคาสูง แต่กลิ่นรสที่ได้ยังมีปัญหาอยู่ อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและใช้เป็นอาหารเสริมได้ เช่น ทดแทนโปรตีนบางส่วนในนม

ในปี ค.ศ. 1974 Mackie ได้ทดลองใช้ปาเปน โบรมิเลน และเอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการย่อยสลายโปรตีนจากปลาราคาถูกและเศษปลาที่เหลือทิ้งจากโรงงาน เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีความจำเพาะแบบกว้าง ๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ขั้นตอนในการย่อยสลายโปรตีนเริ่มจากการบดปลาให้ละเอียด และเติมน้ำในปริมาตรที่เท่ากันผสมเอนไซม์อัตราส่วน 0.05 กรัม ต่อ ปลา 100 กรัม ปรับอุณหภูมิให้เป็น 60 องศาเซลเซียส ตั้ง

ทิ้งไว้ 30 นาที เมื่อถึงเวลาสารละลายของโปรตีนจะถูกรินออก และกรองผ่านตะแกรงขนาด 60 เมช เพื่อกรองเอาส่วนของกระดูกและหนังที่เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ออก นำสารละลายโปรตีนที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 10 นาที จากนั้นทำเป็นผงด้วยวิธีการพ่นฝอย หรือการทำแห้งแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

จากการวิเคราะห์สารสกัดจากปลาที่ได้พบว่าที่เวลา 30 นาที เป็นเวลาที่ทำให้เนื้อหลุดออกจากกระดูกได้อย่างสมบูรณ์ และพบว่า ร้อยละ 30-50 ของโปรตีนจะถูกเปลี่ยนเป็นองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ การย่อยจะเกิดได้รวดเร็วกับวัตถุดิบที่ยังสดมากกว่าวัตถุดิบที่ผ่านการทำให้สุกแล้ว เนื่องจากวัตถุดิบที่ยังสดมีเอนไซม์ธรรมชาติที่อยู่ในตัวปลาซึ่งทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในช่วงแรก ๆ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสขมซึ่งเป็นผลของเวลาและเอนไซม์ที่ใช้ คุณสมบัติที่ดี คือ ละลายน้ำได้ ไม่มีเนื้อสัมผัสที่กระด้างเหมือนปลาป่น หรือโปรตีนเข้มข้นจากปลาเมื่อนำมาทำแห้ง ถ้าวัตถุดิบมีเลือดและรงควัตถุอื่น ๆ ปนอยู่ จะทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีขาวคล้ำถึงน้ำตาลชีด เนื่องจากมีโปรตีนสูงและปริมาณเถ้าต่ำ ทำให้สามารถนำมาใช้ทดแทนเคซีนในอาหารเลี้ยงลูกวัว

ในปี ค.ศ. 1978 Pigott, Bucove และ Ostrander ได้ศึกษาสมบัติของสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากปลาด้วยเปปซิน ภาวะที่ใช้คือ พีเอช 2.0 อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส เวลา 2-7 ชั่วโมง ทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นผงสีขาว ละลายน้ำได้ จากนั้นเลือกทดสอบคุณสมบัติของโปรตีนคือการเกิดโฟมและการเกิดอิมัลชันในผลิตภัณฑ์เค้ก และมายองเนส (mayonnaise) ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสมบัติการเป็นอิมัลชันและการเกิดโฟมที่ดีเลิศ ความเสถียรของอิมัลชันดี แต่ขาดคุณสมบัติความเสถียรของการเกิดโฟม ความขมของผลิตภัณฑ์สามารถบดบังด้วยสารที่ประกอบด้วยกรด เช่น น้ำตาลทรายแดง (brown sugar) หรือน้ำมะนาว ผลิตภัณฑ์ที่ได้นี้สามารถใช้เป็นอาหารเสริมโปรตีนในผลิตภัณฑ์อาหารอื่น และสำหรับใช้เป็นอาหารเสริมคุณค่าโภชนาการที่มีราคาถูก แต่สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องผ่านการแปรรูปด้วยความร้อน จะต้องระวังการเกิด carbonylamine ซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีดำ และมีรสไหม้

ในปี ค.ศ. 1978 Lalasidis, Bostrom และ Sjoberg ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนจากเศษปลาคอดที่เหลือทิ้งจากการแล่เนื้อและกระดูกออกแล้ว (deboned cod filleting offal) โดยใช้อัลคาเลสตามด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยไนโตรเจนที่ละลายได้ร้อยละ 85-90 มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่สมดุล มีน้ำหนักโมเลกุลโดยเฉลี่ยน้อยกว่า 1,000 และมีกรดอะมิโนอิสระร้อยละ 15-45 จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่าการใช้อัลคาเลสตามด้วยแพนครีเอตินจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีรสขม

ในปี ค.ศ. 1979 Ibrahim และ Nyns ได้ทดลองใช้โปรเนส (pronase) เปปซิน (pepsin) และปาเปน ย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลาบอติ (Bouti fish protein concentrate) ซึ่งเตรียมโดยใช้เฮกเซน (hexane) หรือเอธานอล (ethanol) ในการสกัด จากผลการทดลองโปรเนสเป็นเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุด และถ้าใช้โปรเนส 1 กรัม ย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลา 571 กรัม นาน 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถย่อยโปรตีนได้ร้อยละ 60 ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ ร้อยละ 0.2 ปาเปนและเปปซินจะสามารถทำงานได้ดี ถ้าใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เติมลงในโปรตีนเข้มข้นที่พีเอช 10 อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ก่อนเติมเอนไซม์ สำหรับปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยด้วยโปรเนส ปาเปน และเปปซิน (สำหรับปาเปนและเปปซิน ใช้โปรตีนเข้มข้นที่เติมโซเดียมไฮดรอกไซม์ก่อนการย่อยเป็นสารตั้งต้น) ดังนี้ ร้อยละ 94.3, 67.7 และ 78.2 ตามลำดับ และความยาวเฉลี่ยของสายเปปไทด์ที่ได้ในผลผลิตคือ 2.9, 2.8 และ 2.4 ตามลำดับ

ในปี ค.ศ. 1979 Thankamma และคณะ ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนจากปลาโดยใช้ปาเปน อัตราส่วนของเอนไซม์ไนโตรเจนต่อไนโตรเจนของสารตั้งต้นคือ 1:20 ถึง 1:60 เวลา 15 ถึง 180 นาที อุณหภูมิ 40-70 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์กรดอะมิโนที่เวลา 30-180 นาที พบว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สุดคือ ใช้อัตราส่วนไนโตรเจนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น 1:30 นาน 30 นาที ที่ 55 องศาเซลเซียส

ในปี ค.ศ. 1979 Beddows และ Ardeshir ได้ทดลองผลิตสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากปลาโดยใช้โปรติเอสจากพืช ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาใช้ประโยชน์โดยการเติมลงในน้ำปลาที่ผ่านการหมักตามธรรมชาติเพื่อเพิ่มปริมาตร ทั้งนี้มีข้อได้เปรียบคือ ลดเวลาและค่าใช้จ่ายในการผลิตลง โดยไม่ทำให้คุณค่าทางโภชนาการเปลี่ยนแปลง เอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองคือ โบรมิเลน ปาเปน และไฟซิน ปลาที่ใช้คือ ปลา Ikanbilis (*Stolephorus sp.*) หรือปลากะตัก ซึ่งเป็นปลาขนาดเล็กที่ใช้ในการทำน้ำปลา ผลการทดลองพบว่า ภาวะที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์นี้คล้ายกับภาวะที่ใช้ในการหมักน้ำปลาตามธรรมชาติ จากการศึกษาอัตราการละลายที่ 1, 2, 4, 7, 14, 27, 28 และ 35 วัน ที่ 35 องศาเซลเซียส พบว่า การย่อยสลายโปรตีนจะเกิดอย่างสมบูรณ์ภายใน 18-21 วัน และโบรมิเลนมีแนวโน้มที่จะให้อัตราการละลายสูงกว่าเอนไซม์ตัวอื่นเล็กน้อยคือ สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ถึงร้อยละ 65 จากการวิเคราะห์สารประกอบไนโตรเจนในของเหลวที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์แต่ละชนิด หลังจากการย่อยนาน 21 วัน พบว่า แอมโมเนีย และไตรเมธิลเอมีน (trimethylamine) (TMA) มีปริมาณเท่า ๆ กัน สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีน้ำตาลเล็กน้อย มีโปรตีนสูง การกระจายของสารประกอบไนโตรเจนในผลิตภัณฑ์ใกล้เคียงกับในน้ำปลาธรรมชาติ

ในปี ค.ศ.1982 Pastoriza, Sampedro และ Lopez-Benito พบกรรมวิธีการลดความขมจากสารสกัดจากปลาโดยการใช้เปปซินที่พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.50 หรือ 1 นาน 5, 2 และ 0.5 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถใช้เติมในเครื่องดื่มน้ำส้มอัดลมโปรตีนสูง (protein-high orange carbonated beverage) เนื่องจากรสชาติของส้มจะช่วยในการบดบังความขมของสารสกัดจากปลาซึ่งมีอยู่เล็กน้อย

ในปี ค.ศ. 1982 Mackie ได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดจากปลาพบว่า ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 85-90 ไขมันร้อยละ 2-4 และเถ้าร้อยละ 6-7 อย่างไรก็ตามในระหว่างการย่อยอาจทำให้สูญเสียกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบเช่น ซีสเตอีน เมไธโอนีน และทริปโทฟาน จากการวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่า สารสกัด

จากปลาที่ได้มีคุณค่าทางโภชนาการเทียบได้กับโปรตีนจากแหล่งอื่นเช่น เนื้อ นม ไข่ และสามารถใช้ทดแทนโปรตีนในนมเพื่อใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เกิดใหม่ แต่สำหรับมนุษย์พบว่า ยังมีปัญหาด้านการยอมรับกลิ่น และรสชาติ เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีรสขม ทั้งนี้สัมพันธ์กับระดับการย่อยสลายโปรตีนและลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนของปลา ลำดับของกรดอะมิโนในโปรตีนเริ่มต้นมีผลต่อความขมผลิตภัณฑ์แต่ไม่รุนแรงเมื่อเปรียบเทียบกับ ความขมของสารที่ได้จากการย่อยสลายเคซีน ความขมของเปปไทด์สัมพันธ์กับระดับของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) และความยาวของสายเปปไทด์

ในปี ค.ศ. 1982 Ritchie และ Mackie ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนจากปลาที่มีไขมันสูงและปลาที่มีไขมันต่ำด้วยปาเปน ปลาที่มีไขมันสูงจะต้องเติมส่วนผสมของ ethoxyquin และ ethyl gallate ร้อยละ 0.01 ของน้ำหนักไขมัน เพื่อเป็นสารป้องกันการเกิดออกซิไดส์ก่อนย่อยสลาย ภาวะที่ใช้ในการทดลองคือ พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือ 0.05:100 หลังจากเติมเอนไซม์ลงไป ส่วนที่เป็นสารข้นหนืดจะเปลี่ยนเป็นของเหลวไหลได้สามารถปั๊มออกมาได้โดยง่าย วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยพิจารณาการปลดปล่อยกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติค (TCA) ความเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายใน TCA เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 25 เป็นร้อยละ 65 ภายในเวลา 2 ชั่วโมง และละลายน้ำได้มากกว่าร้อยละ 80 ซึ่งร้อยละ 15-20 ของส่วนที่ละลายในน้ำนี้ อยู่ในรูปของเปปไทด์ที่ไม่ถูกตกตะกอนด้วย TCA ของเหลวที่ได้จะถูกทำให้เข้มข้นถึงร้อยละ 35 จากนั้นจะถูกทำแห้งโดยวิธีการพ่นฝอย ใช้อุณหภูมิขาเข้า 185 องศาเซลเซียส และขาออก 85 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วยของแห้ง (dry matter) ร้อยละ 93 ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 82.19 ไขมันร้อยละ 1.72 และเถ้าร้อยละ 6.4 จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนก่อนและหลังการเติมเอนไซม์แล้ว 30 นาที พบว่า ความเข้มข้นของกรดอะมิโนทั้งหมดลดลงเล็กน้อย และจะลดลงมากในกรณีของกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสเตอีน และเมไธโอนีน เป็นต้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเกิดออกซิเดชั่นอย่างรุนแรง จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสพบว่า สารสกัดจากปลาที่ได้มีรสขม แต่ไม่รุนแรงเท่ากับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากนม

ในปี ค.ศ. 1983 Bhumibhamon ได้ทดลองใช้เอนไซม์ 9 ชนิดในการย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลา ผลิตภัณฑ์ที่ได้ประกอบด้วย crude protein น้อยกว่าร้อยละ 67 เอนไซม์และภาวะที่เหมาะสมคือ นิวเตรส อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้ทำเป็นผงด้วยวิธีการพ่นฝอย

ในปี ค.ศ. 1985 Ibrahim ได้ทดลองใช้โปรเนสความเข้มข้นร้อยละ 0-2 ย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลาบอลติ (Bouti fish protein concentrate) นาน 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ปริมาณของแข็ง และปริมาณไนโตรเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเพิ่มขึ้นมากที่เอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ส่วนเปปไทด์มีขนาดเล็กลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีกรดอะมิโนไลซีน ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน เมไธโอนีน และลิวซีน ในปริมาณสูงกว่าโปรตีนมาตรฐาน (FAO reference protein) แต่มีกรดอะมิโนทรีโอนีนและไอโซลิวซีนต่ำ สารสกัดจากปลาที่ได้นี้สามารถนำมาใช้เติมผลิตภัณฑ์ขนมอบเพื่อเพิ่มปริมาณไลซีน

ในปี ค.ศ. 1986 Quarglia และ Orban ได้ทดลองใช้อัลคาเลสป่าเปน และนิวเตรส ย่อยสลายโปรตีนจากปลาซาร์ดีน (*Sardina pilchardus*) โดยกรรมวิธีการผลิตที่ใช้เหมือนกับวิธีของ Mackie (1974) แต่ต่างกันที่ปลาซาร์ดีนที่ใช้จะถูกสกัดไขมันออกก่อนด้วยไอโซโพรพานอล (isopropanol) 3 ครั้ง ในอัตราส่วน1:1 ที่ 46 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากเติมเอนไซม์นาน 5 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที จากนั้นแยกส่วนที่ละลายได้โดยการนำไปเซนตริฟิวก์ที่ 2800xg นาน 7 นาที ส่วนใสที่ได้จะถูกทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอย อุณหภูมิอากาศขาเข้าและขาออก คือ 170 และ 85 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า เอนไซม์ที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนจากปลาคือ ป่าเปน และอัลคาเลส เนื่องจากระดับไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนสูงถึงร้อยละ 60-70 ส่วนสารสกัดจากปลาที่ได้จากนิวเตรสมีไนโตรเจนเพียงร้อยละ 30 เท่านั้น สำหรับอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่เหมาะสมคือร้อยละ 1-2 เวลาที่ใช้สำหรับป่าเปน และอัลคาเลส คือ 80 และ 120 นาที ตามลำดับ จากการศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนในสารสกัดจากปลา พบว่า องค์ประกอบของกรดอะมิโนในสารสกัดจากปลาที่ได้จาก

เอนไซม์ทั้งปาเปนและอัลคาเลสไม่แตกต่างกัน และมีคะแนนทางเคมี (chemical score) สูงถึง 60 และ 38 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนที่ซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบเป็นกรดอะมิโนที่มีจำกัด (limiting amino acid) เหมือนกัน

ในปี ค.ศ. 1987 Hindi และ Al-Douri ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนจาก Sting catfish (*Heteropneustes fossilis*) ด้วยเปปซิน (55 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ระดับการย่อยสลายโปรตีนเกิดมากที่สุดหลังจากการย่อยสลายนาน 6 ชั่วโมง เมื่อย่อยด้วยเปปซิน 0.025 กรัม ต่อปลา 50 กรัมที่ผสมน้ำ 100 มิลลิลิตร ภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายคือ พีเอช 2.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีพบว่า มีความชื้นร้อยละ 17.63 โปรตีนร้อยละ 68.25 ไขมันร้อยละ 0.76 และเถ้าร้อยละ 11.86 นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีน้ำตาลอ่อน ไม่มีกลิ่นของปลา ละลายน้ำได้ร้อยละ 90.31 เกิดอิมัลชันได้ดีเท่ากันกับซีรั่มอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin) มีอายุการเก็บนาน 45 วัน ที่ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ทางด้านกลิ่นและลักษณะทั่วไป ผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารมนุษย์หรืออาหารสัตว์

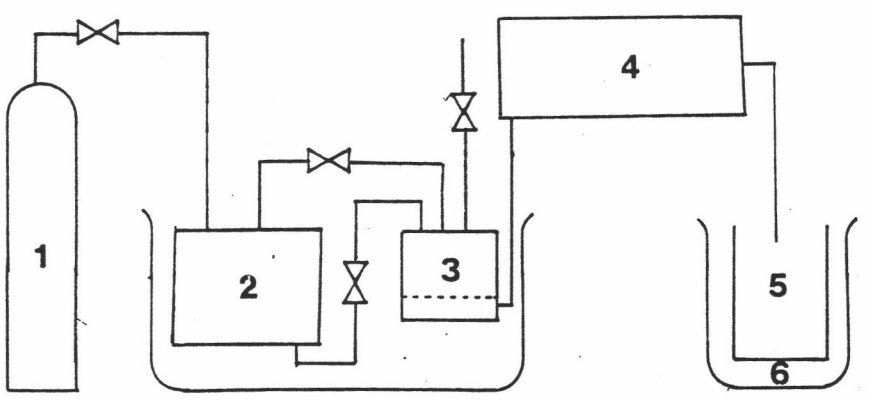
ในปี ค.ศ. 1987 Dong, Takahashi และ Morishita ได้ทดลองใช้เอนไซม์ 12 ชนิด ย่อยสลายปลา horse mackerel ขนาดเล็ก (ความยาว 13-16 เซนติเมตร) พบว่าเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดคือ แอคติเนส (actinase) และโปรติเอสเอ็ม (protease M) ภาวะที่ใช้ในการย่อยสลายปลาด้วยแอคติเนสคือ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง โดยไม่ต้องปรับพีเอช ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ถึงร้อยละ 89 มีสีน้ำตาลออกเหลือง มีกลิ่นรสอ่อน ๆ และมีรสขมเล็กน้อย จากการศึกษาด้วยเจลฟิลเตรชั่น (gel filtration) พบว่าสารประกอบไนโตรเจนในสารสกัดจากปลาที่ได้เกือบทั้งหมดเป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (จำนวนกรดอะมิโนเฉลี่ยมากกว่า 3 ตัว) เมื่อปลาถูกย่อยด้วยโปรติเอสเอ็มที่พีเอช 4.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ร้อยละ 84.3 มีสีน้ำตาลออกเหลืองซีด มีกลิ่นรสเล็กน้อย แต่ขมน้อยกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยแอคติเนส มีกรดอะมิโนและเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำในผลิตภัณฑ์

สูงถึงร้อยละ 80

(2) การใช้อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรนในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา

ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรนในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา เช่น

ในปี ค.ศ. 1977 Bhumiratana และ Hill ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลา ซึ่งเตรียมโดยการสกัดโปรตีนจากปลา hake ทั้งตัว ด้วย 2-โพรพานอลที่ร้อน ขนาดของโปรตีนเข้มข้นที่ได้เล็กกว่า 88 ไมครอน ประกอบด้วยไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 15.4 และเถ้า ร้อยละ 4.4 จากนั้นใช้เอนไซม์ทริปซินย่อยสลายโปรตีนในระบบไม่ต่อเนื่อง (batch) กึ่งไม่ต่อเนื่อง (semi-batch) และแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องปฏิกรณ์อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรน (continuous flow membrane reactors) ซึ่งเมมเบรนจะทำหน้าที่กักเอนไซม์ไม่ให้ผ่านออกไป แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสามารถผ่านออกไปได้ การศึกษาตัวแปรจะทำในระบบไม่ต่อเนื่อง เพื่อหาอิทธิพลของอุณหภูมิ พีเอช อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น ความเข้มข้นของสารตั้งต้นต่อจลนพลศาสตร์ของการย่อยสลายโปรตีน



1. ถังไนโตรเจน 3. เครื่องปฏิกรณ์เมมเบรน 5. ถังผลิตภัณฑ์
2. ถังวัตถุดิบ 4. สเปคโตรโฟโตมิเตอร์ 6. อ่างน้ำแข็ง

รูปที่ 2.5 แผนภาพของเครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนในระดับห้องทดลอง

เครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีนเข้มข้นจากปลา แสดงดังรูปที่ 2.5 ซึ่งใช้ในการศึกษาทั้งระบบไม่ต่อเนื่องและต่อเนื่อง โดยองค์ประกอบหลักของระบบนี้คือ ถังบรรจุวัตถุดิบ และเครื่องปฏิกรณ์ ซึ่งถูกรักษาอุณหภูมิในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ โดยเครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนเป็นส่วนที่ใส่เยื่อกรองอุลตร้ามีความจุ 4000 และ 400 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ เครื่องปฏิกรณ์ถูกออกแบบให้ใช้กับเยื่อกรองอุลตร้าแบบ flat membrane เส้นผ่านศูนย์กลาง 76 มิลลิเมตร ปริมาตรที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาคือ 100 ลูกบาศก์เซนติเมตร แรงดันผ่านเยื่อกรอง 446 กิโลปาสคาล (KPa) สำหรับ flat sheet membrane PM-10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 15 Å มี molecular weight cut off 10,000 (เนื่องจากทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23,800) วิธีการศึกษาในระบบไม่ต่อเนื่องและกึ่งไม่ต่อเนื่องจะเหมือนกัน ต่างกันที่วัตถุดิบในถังเก็บวัตถุดิบเท่านั้นคือ ในกรณีของระบบกึ่งไม่ต่อเนื่อง ส่วนของถังเก็บจะบรรจุด้วยบัฟเฟอร์ ขณะที่ระบบต่อเนื่องถังเก็บจะบรรจุสารแขวนลอยของสับสเตรทซึ่งละลายอยู่ในบัฟเฟอร์ ผลการทดลองสรุปได้ดังนี้

ภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการผลิตในระบบไม่ต่อเนื่องคือ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 9.0 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 50 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และอัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นคือ 0.001 โดยน้ำหนัก จากภาวะดังกล่าวทำให้ร้อยละ 61 ของสารตั้งต้นถูกทำให้ละลายภายในเวลา 1 ชั่วโมง สำหรับภาวะที่เหมาะสมในระบบกึ่งไม่ต่อเนื่องพบว่า ภาวะที่เหมาะสมคือ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8.8 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น 50 มิลลิกรัม/ลูกบาศก์เซนติเมตร และอัตราส่วนของทริปซินต่อสารตั้งต้นคือ 0.002 โดยน้ำหนัก จากภาวะดังกล่าวพบว่า ร้อยละ 85 ของปริมาณของแข็งทั้งหมดถูกทำให้ละลายภายในเวลา 4 ชั่วโมง และร้อยละ 62 ของปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นจะอยู่ในส่วนของของเหลวที่ผ่านเมมเบรนออกมา จากการศึกษาระบบต่อเนื่องพบว่า การเติมเอนไซม์ลงไปในเครื่องปฏิกรณ์เมมเบรนอีกเป็นช่วง ๆ จะช่วยในการรักษาระดับของไนโตรเจนของของเหลวที่ผ่านเมมเบรนออกมาให้เท่ากับในส่วนของสารตั้งต้น ปัญหาที่เกิดจากการใช้เมมเบรนคือโปรตีนเข้มข้นจากปลาทำมาจากปลาทั้งตัว ซึ่งส่วนของกระดูก และหนัง เอนไซม์ไม่สามารถย่อยได้ ทำให้เกิดการสะสมของของแข็งในเครื่องปฏิกรณ์ ดังนั้นเมื่อดำเนินการไปได้ระยะหนึ่งอัตราการไหลของของเหลวจะลดลง

(3) การใช้เซลล์ตรึงรูปในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา

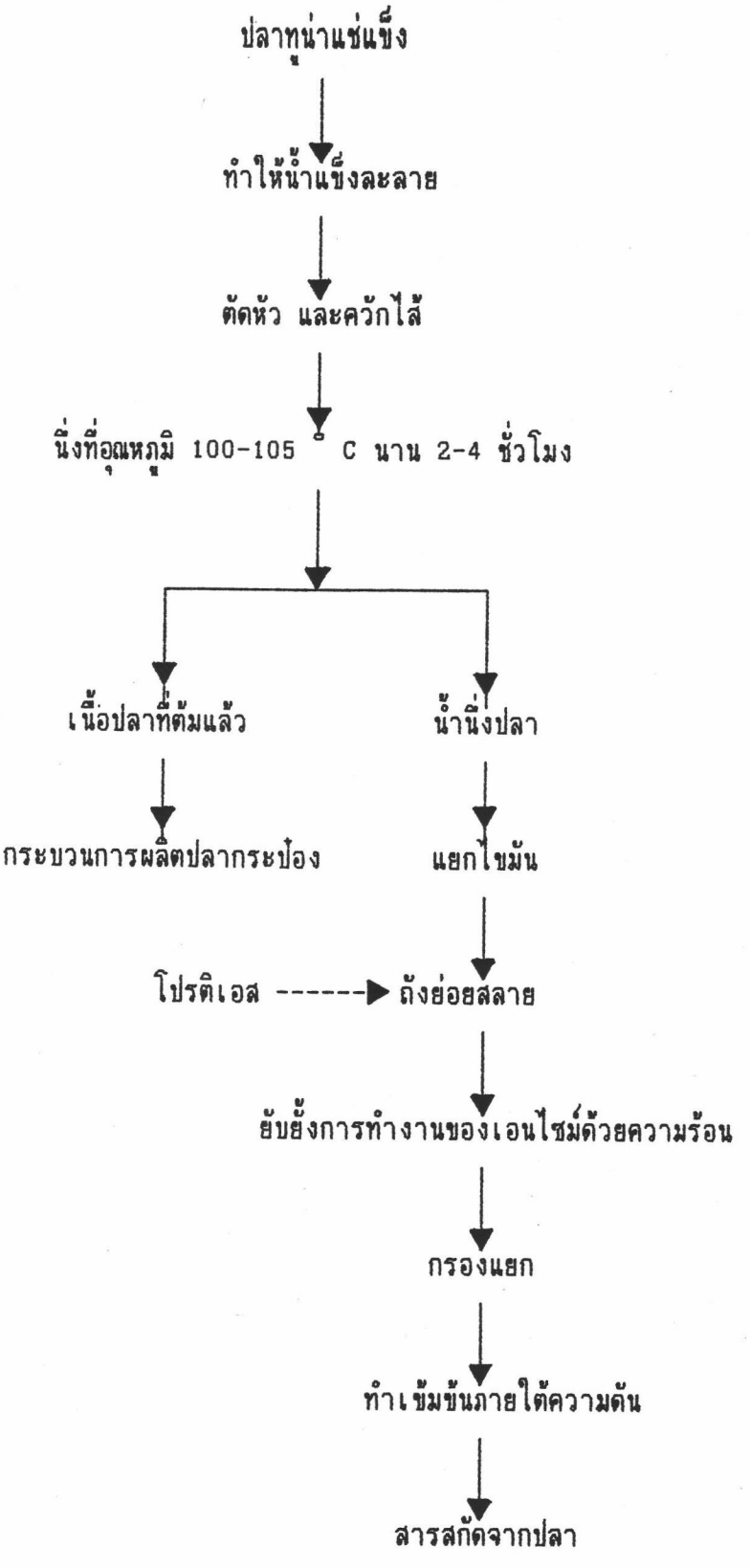
ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้เซลล์ตรึงรูปในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 1989 Venugopal, Alur และ Nerkar ได้ทดลองตรึงเซลล์ *Bacillus megaterium*, *Aeromonas hydrophila* และ *Pseudomonas marinoglutinosa* ในแคลเซียมแอลจิเนต (calcium alginate) โดยสารอาหารที่อยู่ในเนื้อปลาจะส่งเสริมการสร้างเอนไซม์ของเซลล์ที่ถูกตรึง ภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์คือ ช่วงพีเอช 7.5-9.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะนี้ *B. megaterium* จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ สามารถละลายโปรตีนได้ร้อยละ 30 ตามด้วย *A. hydrophila* (ร้อยละ 18) ส่วน *P. marinoglutinos* มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด อัตราส่วนที่เหมาะสมของเนื้อปลาต่อแคลเซียมอัลจิเนตประมาณ 4:3 สำหรับอายุการเก็บของเซลล์ *B. megaterium* และ *A. hydrophila* ที่ถูกตรึงในแคลเซียมอัลจิเนตคือ 30 วัน ที่ 4 องศาเซลเซียส

(4) การใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการย่อยสลายโปรตีนจากปลา

จากการค้นคว้ารายงานการวิจัยตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันพบว่ายังไม่มีนักวิจัยผู้ใดได้ทดลองใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาหรือโปรตีนเข้มข้นจากปลา จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1989 Sakai ได้ทดลองย่อยสลายโปรตีนในน้ำนึ่งปลาโดยใช้เอนไซม์ตรึงรูปและได้รายงานการย่อยสลายโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ในระบบไม่ต่อเนื่อง พร้อมทั้งองค์ประกอบทางเคมีไว้ดังนี้

น้ำนึ่งปลาคือ ของเหลือทิ้งที่ได้จากกระบวนการผลิตปลากระป๋อง สามารถนำมาผลิตสารสกัดจากปลาในระบบไม่ต่อเนื่อง ตามแผนภาพรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 กระบวนการผลิตสารสกัดจากปลาในระบบไม่ต่อเนื่อง

สารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลาที่ได้ประกอบด้วย โปรตีน ร้อยละ 35±5 กรดอะมิโนอิสระร้อยละ 5±1 กรดนิวคลีอิค (RNA) ร้อยละ 2.5±0.5 และน้ำร้อยละ 35±5 จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนพบว่า หลังจากการย่อยสลายแล้ว กรดอะมิโนอิสติดีนในน้ำนึ่งปลาลดลงอย่างมาก ขณะไกลซีน อะลานีน โปรลีน และกลูตามีนมีปริมาณเพิ่มขึ้น

จากการทดลองย่อยสลายโปรตีนจากน้ำนึ่งปลาโดยใช้ Fishes Enzyme จาก *Aspergillus sojae* S297 ตรึงรูปบนตัวพยุง 5 ชนิดคือ Chitosan Epichlorohydrin gel Tannin Chitin gel Aminosilanized alumina Amberlite IRC 50 MR และ Amberlite IRA 93 MR ในเครื่องปฏิกรณ์แบบ Plug Flow Reactor (PFR) ภาวะที่ใช้คือ ความเข้มข้นสับสเตรทร้อยละ 10 พีเอช 7.0 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราการไหล 5 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง พบว่า เอนไซม์มีแอคติวิตี ร้อยละ 2.7, 57.6, 64.7, 1.1 และ 9.7 ตามลำดับ ถึงแม้ว่า Amino-silanized alumina จะเป็นตัวพยุงที่ทำให้เอนไซม์มีแอคติวิตีสูงสุด แต่ก็เป็นตัวพยุงที่ไม่แข็งแรง ดังนั้นจึงเลือกใช้ Tannin Chitin gel เป็นตัวพยุงในการศึกษาอิทธิพลของขนาดอนุภาค (particle size) ของตัวพยุงที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ จากการทดลองพบว่า ยิ่งตัวพยุงมีขนาดเล็กเท่าไร แอคติวิตีของเอนไซม์ยิ่งสูงขึ้น และเมื่อทดสอบทางเสถียรภาพของเอนไซม์ตรึงรูป โดยพิจารณาในเทอมของแอคติวิตีเวลาที่ใช้ผ่านคอลัมน์ 1 ครั้งคือ 3 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยสลายน้ำนึ่งปลาซ้ำ จนถึง 20 ครั้ง มีการสูญเสียแอคติวิตีเกิดขึ้นมาก และเมื่อทำการทดลองถึง 26 ครั้ง จึงกระตุ้นคอลัมน์โดยการตรึงรูปใหม่บนตัวพยุงเดิม ทำให้สามารถยืดอายุเอนไซม์ตรึงรูปบน Tannin Chitin gel ไปได้อีก

2.4 การใช้ประโยชน์จากสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน

มีการใช้สารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนเพื่อปรับปรุงกลิ่นรสของอาหารประเภทเนื้อเป็ด ไก่ และปลา ในผลิตภัณฑ์ประเภทซุป พาย ซอส น้ำแกง เป็นต้น สารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนสามารถนำมาใช้ในในวัตถุประสงค์นี้ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Prendergast, 1974)

(1) ให้กลิ่นรส (flavor donor) ใช้ใส่ลงไปอาหาร หรือผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อให้มีกลิ่นรสตามที่ต้องการ

(2) เพิ่มกลิ่นรส (flavor enhancer) ใช้เพิ่มกลิ่นรสอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ที่มีอยู่แล้วให้สูงขึ้น

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องใช้คุณสมบัติการให้กลิ่นรสคือ อาหารอบกรอบ ซุปผง ซุปบรรจุกระป๋องซึ่งได้ผลิตภัณฑ์ประเภทเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เช่น สตู พาย เนื้ออบ (meat pastes) น้ำแกง น้ำต้มกระดูก เครื่องดื่มบางชนิด และซอสต่าง ๆ เป็นต้น

ผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องใช้คุณสมบัติการเพิ่มกลิ่นรสคือ ครีมซุป ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักในน้ำเกลือ ซุปไก่ ไส้กรอกต่าง ๆ และผลิตภัณฑ์จากปลา เป็นต้น

ลักษณะพิเศษที่เป็นประโยชน์ของสารสกัดจากปลา ได้แก่

(1) มีราคาสูง เป็นการเพิ่มราคาให้กับวัตถุดิบราคาถูก

(2) สะดวกในการใช้งาน สามารถใช้เติมได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการและถึงแม้จะมีลักษณะเป็นของเหลว หรือผงก็สามารถกระจายตัวในอาหารได้ดี

(3) เสถียรต่ออุณหภูมิ เมื่อเติมสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนลงในอาหารที่ต้องผ่านความร้อนสูงจะไม่ทำให้เกิดการสูญเสียทางด้านกลิ่น และรสชาติ

(4) ละลายในน้ำได้ดี สามารถละลายน้ำได้อย่างสมบูรณ์

(5) อายุการเก็บ สารสกัดจากปลาจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคือ เมื่อเวลาการเก็บนานขึ้นรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมสารสกัดจากปลาจะดีขึ้น แต่อาจจะมีการตกตะกอนเล็กน้อยของกรดอะมิโนในผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลว สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงดูดความชื้นง่าย

(6) มีความปลอดภัย เนื่องจากการย่อยสลายผลิตภัณฑ์ที่เป็นโปรตีนในธรรมชาติเป็นเช่นเดียวกับระบบการย่อยสลายโปรตีนในร่างกายมนุษย์ จึงสามารถนำมาใช้เติมในซุป ซอส และน้ำเกรวี่ ได้อย่างปลอดภัยต่อผู้บริโภค

(7) ด้านคุณค่าทางโภชนาการ สารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายมนุษย์

ข้อเสียจากสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีน คือ

(1) ไม่สามารถละลายในน้ำมันและไขมัน เนื่องจากสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความเป็นขั้วมาก ดังนั้นจึงไม่สามารถละลายในน้ำมัน หรือไขมันได้ ถึงแม้ว่าการเป็นอีมัลชั่นที่เสถียรสามารถทำให้เกิดขึ้นได้โดยใช้เทคนิคพิเศษ

(2) ดูดความชื้นได้ง่าย

(3) บางกรณีอาจขาดกลิ่นรสเฉพาะตัว ทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งตั้งต้นของโปรตีนที่นำมาย่อยสลาย

ตัวอย่างรายงานการวิจัยด้านการใช้ประโยชน์จากสารสกัดจากปลา มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 1974 Mackie ได้ใช้สารสกัดจากปลาเป็นสารทดแทนโปรตีนในนมวัวซึ่งจำหน่ายในประเทศฝรั่งเศสเป็นระยะเวลานานแล้ว

ในปี ค.ศ. 1976 Yanez, Ballester และ Monckeberg ได้ทดลองย่อยโปรตีนจากปลา Chilean hake (*Merluccius gayi*) และนำมาเป็นอาหารเสริมทดแทนโปรตีนจากธัญพืชเช่น ข้าวสาลี ข้าวเจ้า และข้าวโพด โดยทดลองในหนูที่กำลังเจริญเติบโต จากการวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า ประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 63 (Nx6.25) เมื่อพิจารณาชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนพบว่า กรดอะมิโนที่จำเป็นทั้งหมดมีปริมาณสูงกว่าที่กำหนดสำหรับความต้องการของมนุษย์ ยกเว้นกรดอะมิโนทรีโอนีนซึ่งต่ำกว่าเล็กน้อย และที่สำคัญคือมีปริมาณไลซีนสูงกว่ามาตรฐานถึง 2 เท่า จากการพิจารณาค่า PER (เคซีน=2.50) พบว่ามีค่าสูงกว่าหรือเทียบเท่ากับมาตรฐาน แสดงให้เห็นถึงคุณภาพของโปรตีนที่ดีเมื่อทดแทนด้วยสารสกัดจากปลาในระดับร้อยละ 2, 4, 6, 8 และ 10 และพบว่า ค่า PER จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารสกัดจากปลาที่ผลิตภัณฑ์ที่เติมลงไป สำหรับในข้าวโพดและข้าวเจ้า ค่า PER จะมีค่าสูงสุดเมื่อทดแทนโปรตีนที่ความเข้มข้นร้อยละ 6 การพัฒนาคุณภาพของโปรตีนในข้าวสาลีโดยทดแทนด้วยสารสกัดจากปลามีความสำคัญและให้ผลดีเนื่องจากในธัญพืชมีไลซีนเป็นกรดอะมิโนจำกัด ขณะที่ในโปรตีนจากปลามีไลซีนอยู่เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์โดยการเติมในอาหารสำหรับสัตว์ที่กินธัญพืชเป็นอาหารในประเทศที่กำลังพัฒนา นอกจากนี้ยังใช้ในการผสมในอาหารทารก ซุป และเครื่องดื่มโปรตีน

ซึ่งโปรตีนจากปลานี้สามารถใช้แก้ปัญหาขาดแคลนโปรตีนในประเทศที่กำลังพัฒนาได้ แต่การใช้ประโยชน์ที่ให้ผลดีมากที่สุดคือ ใช้ทดแทนโปรตีนบางส่วนในนมสำหรับเลี้ยงลูกวัว

ในปี ค.ศ.1977 Dodsworth และ Owen ได้ทดลองใช้สารสกัดจากปลาทดแทนโปรตีนในนมวัว ทั้งนี้องค์ประกอบของอาหารเหมือนกัน ต่างกันเฉพาะปริมาณโปรตีน ทดลองแปรอัตราส่วนของสารสกัดจากปลา:นม ดังนี้ 100:0, 67:33, 33:67 และ 0:100 วัวที่ใช้ทดสอบเป็นวัวตัวผู้พันธุ์ British Friesian เพิ่งหย่านมได้ 42 วัน บันทึกน้ำหนักลูกวัวจนอายุครบ 100 วัน ผลการทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างในอัตราการเจริญเติบโตเมื่อทดแทนถึงร้อยละ 67 แต่ถ้าทดแทนร้อยละ 100 อัตราการเจริญเติบโตจะลดลงร้อยละ 40 ดังนั้นอย่างน้อยที่สุดเราสามารถทดแทนสารสกัดจากปลาถึง 2 ใน 3 ของนมทั้งหมด

ในปี ค.ศ. 1980 Mynov และ Kim ได้ศึกษาอิทธิพลของสารที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากปลาต่อคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์ชนิดพาสตา (pasta) โดยพาสตาทำจากแป้งขนมปังชั้นดีซึ่งมีความชื้นร้อยละ 13.2 โปรตีนร้อยละ 14.1 เถ้าร้อยละ 0.52 และกลูเต็นร้อยละ 28.5 พบว่า ถ้าเติมสารสกัดจากปลาในลักษณะของเหลวร้อยละ 2-5 โดยน้ำหนัก ผลการทดสอบผลิตภัณฑ์อยู่ในระดับที่ยอมรับได้และการเติมสารสกัดจากปลาร้อยละ 3.5 ซึ่งทำให้ปริมาณโปรตีนในผลิตภัณฑ์เพิ่มขึ้นร้อยละ 5 กรดอะมิโนเกือบทุกชนิดเพิ่มขึ้นรวมทั้งไลซีน (ร้อยละ 37.5) วาลีน (ร้อยละ 31) และทรีโอนีน (ร้อยละ 18)

ในปี ค.ศ. 1975 Miller และ Groninger ได้ทดลองผลิตโปรตีนปลาดัดแปลงด้วยเอนไซม์ (enzyme-modified succinylate fish protein) โดยใช้ succinic anhydride ทำปฏิกิริยากับโปรตีนไมโอไฟบริล ซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาการเติมกรดซัคซินิคในโปรตีน จากนั้นนำมาย่อยสลายด้วยโบรมิเลน และนำมาสกัดไขมันออก ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและแบบลูกกลิ้ง พบว่า สามารถใช้ผลิตภัณฑ์นี้ในอาหารที่ต้องการคุณสมบัติทางด้านความเสถียรของเกิดโฟม (foam-stability) และยังใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ได้โดยจะไม่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของอาหาร

2.5 ระดับการย่อยสลายโปรตีน

ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of Hydrolysis) (DH) มีคำจำกัดความดังนี้

$$DH = \frac{\text{จำนวนพันธะเปปไทด์ที่แตกออก}}{\text{จำนวนพันธะเปปไทด์ทั้งหมด}} \times 100\ \%$$

วิธีง่าย ๆ ในการหาค่า DH คือใช้ Trichloroacetic Acid Solubility Index (TCA Index) ซึ่งจะบอกระดับไนโตรเจนซึ่งละลายในกรดไตรคลอโรอะซีติคภายใต้ภาวะที่กำหนด TCA Index นี้ มีประโยชน์สำหรับการวิเคราะห์การกระจายน้ำหนักโมเลกุล เนื่องจาก TCA จะตกตะกอนโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดใหญ่

$$\text{Approximate DH} = \frac{\text{10 \% TCA soluble nitrogen}}{\text{Total nitrogen}} \times 100\ \%$$

สำหรับวิธีการหาค่า DH อีกวิธีหนึ่ง โดยการหาจำนวนพันธะเปปไทด์ที่แตกออกระหว่างการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสามารถวิเคราะห์จากการเพิ่มของหมู่อะมิโนอิสระ (หรือหมู่คาร์บอกซิล) ได้หลายวิธีด้วยกันคือ formol titration หรือ ninhydrin reaction แต่วิธีที่ยอมรับกันมากที่สุดคือ การใช้ Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) ในการหาหมู่ α-amino อิสระของไลซีน สำหรับจำนวนพันธะเปปไทด์ทั้งหมดในโปรตีนคำนวณจากองค์ประกอบของกรดอะมิโน ซึ่งเป็นผลรวมของมิลลิโมลของกรดอะมิโนแต่ละชนิดต่อกรัมโปรตีน แต่สำหรับอาหารประเภทโปรตีนส่วนใหญ่ (ยกเว้นเจลาติน) จะมีค่าประมาณเทียบเท่า 8 (8 equivalents ต่อกิโลกรัมโปรตีน (Adler-Nissen, 1986)

2.6 โปรติเอสตรึงรูป

2.6.1 เอนไซม์ตรึงรูป

เอนไซม์ตรึงรูป หมายถึง เอนไซม์ที่ถูกกำหนดหรือทำให้มาอยู่ภายในขอบเขตที่จัดไว้และยังคงมีความไวต่อปฏิกิริยาสูงกว่าหรือน้อยกว่า หรือเท่ากับเอนไซม์เดิม รวมทั้งสามารถนำมาใช้ซ้ำหรือต่อเนื่องได้ นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้อาจถูกเปลี่ยนเป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำไม่ได้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

แม้ว่าปัจจุบันเรายังไม่สามารถหาสูตรสำเร็จที่จะระบุให้ชัดว่าเอนไซม์ชนิดหนึ่งจะตรึงรูปด้วยวิธีใดก็ตาม แต่ก็มีหลักฐานและผลงานวิจัยพอที่ชี้นำได้ว่าควรใช้วิธีใด ส่วนประสิทธิภาพและความเหมาะสมของการใช้งานก็เป็นกรณี ๆ ไป อย่างไรก็ตามวิวัฒนาการเรื่องการศึกษาเอนไซม์ตรึงรูปเกิดขึ้นเป็นลำดับจนปัจจุบันนี้ก็ด้วยเหตุผลที่สืบเนื่องมาจากการใช้เอนไซม์อิสระมีขีดจำกัดบางประการดังนี้

(1) เอนไซม์อิสระไม่เสถียร

(2) เอนไซม์อิสระใช้งานในลักษณะไม่ต่อเนื่องหรือใช้ครั้งเดียว (batch)

(3) เอนไซม์อิสระใน *in vitro* ใช้แบบ multi-enzymes system ไม่ได้

(4) เอนไซม์อิสระถ้าจะให้มีแอคติวิตีสูงต้องทำให้บริสุทธิ์ก่อนการใช้งาน

(5) เอนไซม์อิสระจะผสมปนลงไปในสารละลายของสับสเตรท และผลผลิต ทำให้แยกออกไม่ได้ และเนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีนจะปนเปื้อนในลักษณะ proteineous contaminants โดยเฉพาะถ้าอยู่ในอาหาร จะเกิดเป็นตะกอนเมื่อถึงระดับอุณหภูมิ พีเอชของโปรตีนชนิดนั้น แยกออกได้ต้องใช้กรรมวิธีเพิ่มขึ้น กล่าวคือผ่านหน่วยแยกอีกครั้ง

(6) เอนไซม์อิสระมี reaction condition จำเพาะ ฉะนั้นบางครั้งอาจไม่เหมาะสมในกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออุตสาหกรรมที่ต้องใช้เอนไซม์นั้น ๆ

(7) เอนไซม์อิสระส่วนใหญ่ละลายน้ำ ละลายในสารละลายได้ ฉะนั้นจะนำมาใช้ในลักษณะ solid catalyst ไม่ได้ มีผลทำให้ไม่สามารถใช้กับเครื่องปฏิกรณ์ประเภทต่าง ๆ เช่น fluidized bed, packed bed ในระบบต่อเนื่อง (continuous)ได้ อาจจะใช้ได้กับ stirred tank, ultrafiltration membrane ได้

(8) เอนไซม์อิสระในอุตสาหกรรมมีต้นทุนการใช้งานสูง

(9) เอนไซม์อิสระในเซลจุลินทรีย์ (intracellular enzyme) เมื่อนำมาใช้งานต้องผ่านกระบวนการสกัด และทำบริสุทธิ์ก่อน

(10) เอนไซม์อิสระก่อพิษต่อผู้ใช้ ในลักษณะของการสูด หายใจ การสัมผัสในปริมาณมาก

ด้วยขีดจำกัดของการใช้เอนไซม์อิสระทั้ง 10 ประการ จึงเป็นทางออกที่จะนำไปสู่การแก้ปัญหาด้วยการนำเทคโนโลยีของเอนไซม์ตรึงรูปมาใช้ ด้วยวิธีการต่าง ๆ และแก้ปัญหาไปตามลักษณะสมบัติของเอนไซม์ตรึงรูปที่ได้ ถ้าหากแก้ได้หมดทั้ง 10 ประการ ก็นับว่าได้ประสบผลสำเร็จยิ่ง อย่างไรก็ตามในบางครั้งผลกระทบจากการเตรียมและการใช้เอนไซม์ตรึงรูปก็อาจมีบ้างดังนี้

<u>ข้อได้เปรียบของการใช้เอนไซม์ตรึงรูป</u>

(1) มีโอกาสเพิ่มแอคติวิตีและเสถียรภาพของเอนไซม์ได้ ถ้าวิธีเหมาะสม

(2) ใช้กับระบบ multienzyme ในลักษณะ *in vitro* ได้

(3) ใช้ซ้ำ ใช้ต่อเนื่อง ใช้เป็นเครื่องมือวิเคราะห์ได้

(4) ใช้ภาวะการทำปฏิกิริยาที่ต่างไปจากเอนไซม์อิสระหรือเอนไซม์เดิมได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดตัวพยุง และวิธีการตรึงรูป

(5) ใช้ให้เหมาะสมกับเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ได้ ทั้งนี้ขึ้นกับรูปร่างตัวพยุงและลักษณะสับสเตรท

(6) เอนไซม์ที่นำมาตรึงรูป ไม่ต้องทำให้บริสุทธิ์ก็สามารถทำงานได้ดีเหมือนเอนไซม์บริสุทธิ์ ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการตรึงรูป

<u>ข้อเสียเปรียบบางประการ</u>

(1) แอคติวิตีอาจจะถูกกระทบกระเทือน เนื่องจากการเปลี่ยนโครงแบบ (conformation) ของเอนไซม์โดยตัวพยุงที่ไม่เหมาะสม

(2) ตัวพยุงที่ไม่เหมาะสมอาจจะมีผลกระทบต่อผลผลิต

2.6.2 กรรมวิธีการตรึงรูปเอนไซม์

กรรมวิธีการตรึงรูปเอนไซม์ แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ ๆ คือ

2.6.2.1 การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier-binding method)

หมายถึง การเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ ปัจจัยสำคัญของวิธีนี้คือ การเลือกชนิดของตัวพยุงและการเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุง หรืออีกนัยหนึ่ง ปริมาณของเอนไซม์ที่จะเชื่อมกับตัวพยุงได้ และความไวของเอนไซม์หลังตรึงรูปจะขึ้นอยู่กับสภาพธรรมชาติของตัวพยุงและเอนไซม์นั้น

การเชื่อมกับตัวพยุงโดยวิธีนี้ แบ่งออกเป็น 3 วิธีตามลักษณะการเชื่อมกับเอนไซม์

(1) การดูดซับทางกายภาพ

วิธีนี้เป็นการดูดซับของเอนไซม์โปรตีนบนผิวของตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำ วิธีนี้มีผลกระทบเล็กน้อย หรือไม่มีเลยต่อการเปลี่ยนความคงรูปของเอนไซม์โปรตีน และมีผลกระทบต่อการทำลายบริเวณเร่งน้อย ไม่ซับซ้อน แต่จะมีข้อเสียคือ เอนไซม์กับตัวพยุงเกาะกันไม่แน่นเพราะแรงเกาะกันอ่อน

(2) การเชื่อมแบบไอออนิค

หมายถึง การเชื่อมระหว่างโปรตีนเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำโดยพันธะไอออนิควิธีนี้มีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์น้อย ทั้งด้านการเปลี่ยนโครงรูป และการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเร่ง มีข้อเสียที่แรงเกาะอ่อน ทำให้เอนไซม์หลุดง่ายในระหว่างปฏิกิริยาที่มีความเข้มของไอออนิคสูง หรือเปลี่ยนพีเอช

(3) การเชื่อมแบบโควาเลนต์

หมายถึง การเชื่อมเอนไซม์กับตัวพยุงที่ไม่ละลายน้ำด้วยพันธะโควาเลนต์ วิธีนี้ได้นำมาใช้มากที่สุด อย่างไรก็ตามการเกิดพันธะโควาเลนต์ค่อนข้างจะซับซ้อนและไม่ค่อยนุ่มนวล ดังนั้นในบางครั้งการเกิดพันธะโควาเลนต์จะไปกระทบกระเทือนต่อการเปลี่ยนโครงรูปและศูนย์กลางบริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ลดความไวต่อปฏิกิริยาและยังอาจจะเปลี่ยนความจำเพาะต่อสับสเตรท แต่แรงเกาะกันระหว่างเอนไซม์กับตัวพยุงค่อนข้างจะแข็งแรง เอนไซม์จะหลุดจากการเกาะเกี่ยวกับตัวพยุงได้ยาก แม้ว่าจะอยู่ในภาวะของสาร

ละลายเกลือที่มีความแรงไอออนสูงก็ตาม

2.6.2.2 วิธีเชื่อมขวาง (Cross-linking method)

หมายถึง การเชื่อมขวางระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์โดยใช้ตัวกลางซึ่งเชื่อมระหว่าง 2 โมเลกุล (bifunctional reagent) หรือตัวกลางเชื่อมระหว่างหลายโมเลกุล (multifunctional reagent)

2.6.2.3 วิธีห่อหุ้ม (Entrapping method)

หมายถึง การบรรจุเอนไซม์ลงในช่องว่างของตาข่ายโพลีเมอร์หรือห่อหุ้มเอนไซม์ไว้ด้วยเมมเบรนที่ยอมให้มีสารซึมผ่านได้บางส่วน ดังนั้นจึงแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ บรรจุในตาข่าย (lattice type) และห่อหุ้มในแคปซูลเล็ก (microcapsule type) วิธีนี้แตกต่างจากวิธีเชื่อมแบบพันธะโควาเลนต์และวิธีเชื่อมขวางคือ เอนไซม์ไม่เชื่อมกับเจลของตาข่ายหรือเมมเบรนที่ห่อหุ้ม ด้วยเหตุนี้วิธีนี้จึงได้นิยมใช้อย่างแพร่หลาย แม้ว่าปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิดสารโพลีเมอร์สำหรับห่อหุ้มนั้นต้องการภาวะที่รุนแรงมากอาจจะมีผลกระทบต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ จึงต้องเลือกหาภาวะที่มีผลกระทบน้อยที่สุด

2.7 ตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงรูปโปรติเอส

ในปี ค.ศ. 1964 Goldstein, Levin และ Katchalski ได้ทดลองตรึงรูปทริปซินด้วยพันธะโควาเลนต์บน copolymer ของ maleic acid และ ethylene ในอัตราส่วน 1:1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า pH activity profile ของ IMET (water insoluble copoly-(maleic acid-ethylene)-trypsin) เมื่อใช้ benzoyl-L-arginine ethyl ester เป็นสับสเตรท และความเข้มข้นอิออนของสารละลายปฏิกิริยาต่ำ ($r/2=5.8x10^{-3}$) เลื่อนไปจากเดิมทางด่างประมาณ 2.5 หน่วย เมื่อเทียบกับทริปซินในรูปอิสระภายใต้สภาวะเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นอิออนของสารละลายปฏิกิริยาขึ้น มีผลทำให้ pH activity profile ($r/2=1.0$) ของ IMET เลื่อนไปใกล้เคียงกับเอนไซม์อิสระมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของelectrostatic potential ของตัวพยุงที่มีประจุ ความแตกต่างของการกระจายความเข้มข้นของโปรตอนที่แตกต่างกัน ระหว่างสารละลายภายนอกกับบริเวณรอบ ๆ โมเลกุลเอนไซม์และประจุของสับสเตรทเป็นบวก มีผลทำให้ pH activity profile และค่าคงที่ไมคิลิส (Km) ของเอนไซม์ตรึงรูปเปลี่ยนไป

ในปี ค.ศ. 1965 Goldman และคณะ ได้ทดลองตรึงรูปป่าเปนบน collodion matrix แบบดูดซับทางกายภาพ และใช้ bisdiazobenzidine 3,3'-disulfonic acid เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า พีเอชที่เอนไซม์ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงที่สุดเลื่อนไปทางด่างเมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระ ทั้งนี้เนื่องจากพีเอชภายในเมมเบรนต่ำลงเนื่องจากการปลดปล่อยโปรตอนเนื่องจากการย่อยสลาย ester substrate

ในปี ค.ศ. 1969 Weetall ได้ทดลองตรึงรูปทริปซินและป่าเปนบนแก้วพรุนโดยใช้ ɣ-aminopropyltriethoxysilane ในสารละลายโทลูอีน เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และทำเป็นอนุพันธ์ของ isothiocyanate โดยการเชื่อมแบบ sulfonamide linkage หรือทำปฏิกิริยากับ p-nitrobenzoic acid โดยการเชื่อมแบบ azo-linkage เพื่อทำให้เป็น amino aryl derivatives พบว่า ปริมาณเอนไซม์ที่เกาะบนตัวพยุงโดยการตรึงรูปด้วยวิธีนี้อยู่ในช่วง 0.12-2.60 มิลลิกรัมต่อกรัมของแก้วพรุน เสถียรภาพต่อตวามร้อนของเอนไซม์ตรึงรูปด้วยวิธี azo- และ sulfonamide linkage มีค่าใกล้เคียงกัน โดยการเสียสภาพธรรมชาติจะเริ่มที่อุณหภูมิ 53 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อบ่มเอนไซม์ไว้นาน 30 นาที อย่างไรก็ตาม ป่าเปนตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนที่ดีกว่าคือ สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 88 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 80 นาที โดยไม่เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1970 Goldstein และคณะ ได้ทดลองตรึงรูปป่าเปน mercuri-papain subtilopeptidase A และ polytyrosyl trypsin บน (dialdehyde)-starch-methylenedianiline (S-MDA) และ p,p'-diamino-diphenylmethane (MDA) จากการวิเคราะห์กรดอะมิโนของเอนไซม์ตรึงรูปทั้ง 3 ชนิดบน S-MDA พบว่า ปริมาณไทโรซีน อาร์จินีน และไลซีน ในเอนไซม์ตรึงรูปต่ำกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ ทั้งนี้เนื่องจากกรดอะมิโนเหล่านี้อาจมีส่วนร่วมในการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างโปรตีนเอนไซม์และตัวพยุง นอกจากนี้ยังพบว่า pH activity profile ของป่าเปน subtilopeptidase A และ polytyrosyl trypsin เมื่อใช้ benzoyl-glycine ethyl ester, acetyl-L-tyrosine ethyl ester และ benzoyl-L-arginine ethyl ester เป็นสับสเตรท ตามลำดับ เลื่อนไปจาก

เดิมทางด่าง 1-2 หน่วย เมื่อเทียบกับเอนไซม์อิสระที่ภาวะเดียวกัน โดยอิทธิพลนี้ไม่ขึ้นกับความเข้มข้นอิออนในสารละลายปฏิกิริยา

ในปี ค.ศ. 1986 Chiou และ Beuchat ได้ทดลองตรึงรูปปาเปนบน Dowex MWA-1 (ขนาด 20-50 เมช) โดยวิธีดูดซับทางกายภาพและใช้กลูตารัลดีไฮด์ร้อยละ 1 เป็นสารสร้างพันธะร่วมภายใต้พีเอชที่เป็นกลาง การใช้โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 12.5) ในการตรึงรูปเอนไซม์จะให้แอคติวิตีที่สูงกว่าการใช้อะซีเตทบัฟเฟอร์ (0.1 โมลาร์ พีเอช 4.0) พบว่าปริมาณไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการตรึงรูปกับกลูตารัลดีไฮด์จาก 0.5 เป็น 15 นาที และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จาก 1 ถึง 80 มิลลิกรัมต่อ 0.3 มิลลิตรของบัฟเฟอร์ต่อ 0.2 กรัมของเรซิน นอกจากนี้พบว่าซีสเตอีน (0.08 โมลาร์) และอีดีทีเอ (2.0 มิลลิโมลาร์) ช่วยในการรักษาแอคติวิตีของปาเปนตรึงรูปได้นานถึง 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ส่วน $NaHSO_3$ และกรดแอสคอร์บิคมีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1992 Hayashi, Hirayama และ Iwatsuki ได้ทดลองตรึงรูปปาเปนบน poly (ɣ-methyl L-glutamate) beads (PMLG) โดยใช้พันธะโควาเลนต์ พบว่าวิธีการตรึงรูปที่ให้แอคติวิตีสูงคือ azide method เมื่อเทียบกับ peptide binding method ค่าคงที่ไมคีลิส (Km) ของเอนไซม์ตรึงรูปมีค่ามากกว่าเอนไซม์อิสระ ขณะที่ความเร็วสูงสุดของเอนไซม์อิสระมีค่าน้อยกว่าเอนไซม์ตรึงรูป เอนไซม์ตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนมากกว่าเอนไซม์อิสระ แอคติวิตีของเอนไซม์ตรึงรูปแทบจะไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ และมีเสถียรภาพดีต่อปฏิกิริยาการใช้ซ้ำ

ในปี พ.ศ. 2535 ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม และ ปราณี อ่านเปรื่อง ได้ทดลองตรึงรูปนิวเตรสบนผ้าไนลอนแบบเชื่อมด้วยพันธะโควาเลนต์ พบว่า ภาวะที่เหมาะสมคือ ใช้ผ้าไนลอนที่ย่อยบางส่วนด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 2 นอร์มัล นาน 4 ชั่วโมง เป็นตัวพยุง มีสารละลายเอพีทีเอส ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร (พีเอช 5.0) เป็นตัวกระตุ้น สารละลายกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (พีเอช 9.0)เป็นสารสร้างพันธะร่วม และใช้สารละลายนิวเตรสความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยปริมาตร (พีเอช 9) นิวเตรสตรึงรูปที่ได้แสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 6.6 ในขณะที่นิวเตรสอิสระแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และขณะที่พีเอช 7.1 ค่าคงที่ไมคิลิส (Km) ของนิวเตรสตรึงรูปเท่ากับ 9.7×10^{-4} มิลลิโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าของนิวเตรสอิสระ 6.9 เท่า แอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 611.8 ยูนิต/มิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งต่ำกว่านิวเตรสอิสระ 0.9 เท่า นอกจากนี้นิวเตรสตรึงรูปมีเสถียรภาพ เมื่อเก็บในสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 7.1 ที่อุณหภูมิ 8-10 และ 30-33 องศาเซลเซียส ดีกว่านิวเตรสอิสระ โดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 80 วัน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนในเบียร์ด้วยนิวเตรสตรึงรูปคือ 30 องศาเซลเซียส

สำหรับตัวอย่างงานวิจัยเกี่ยวกับการตรึงรูปโปรติเอสบนทราย มีดังนี้

ในปี ค.ศ. 1980 Puvankrishnan และ Bose ได้ทดลองตรึงรูปทริปซินบนทรายด้วยวิธีต่าง ๆ 5 วิธี คือ ใช้ 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) hexamethylenetetramine (HMT) hexamethylenediamine (HMD) และ melamine เป็นสารที่ใช้ในการเพิ่มหมู่อะมิโนบนทราย และใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า วิธีการตรึงรูปที่ให้แอคติวิตีสูงสุดคือ ใช้ APTS เป็นตัวกระตุ้น และกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พีเอชที่เอนไซม์ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเลื่อนไปทางกรดในทุก ๆ 5 วิธีของการตรึงรูป อุณหภูมิที่เอนไซม์อิสระและตรึงรูปที่เตรียมโดย silane-glutaraldehyde แสดงแอคติวิตีสูงสุดคือ 45 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเสถียรภาพต่อพีเอชและความร้อนของทริปซินตรึงรูปดีกว่าเอนไซม์ในรูปอิสระ

ในปี ค.ศ. 1980 Puvankrishnan และ Bose ได้ศึกษาสมบัติของทริปซินตรึงรูปบนทรายที่ได้จากการเตรียมโดยใช้ APTS เป็นสารกระตุ้นตัวพยุงและกลูตารัลดีไฮด์เป็นสารสร้างพันธะร่วม พบว่า พีเอชที่เอนไซม์ตรึงรูปแสดงแอคติวิตีสูงสุดเลื่อนไปจากเดิมทางกรด 1.7 หน่วย ค่า Km ของเอนไซม์ตรึงรูปสูงกว่าเอนไซม์อิสระเล็กน้อย (1.34 เท่า) เมื่อเก็บทริปซินตรึงรูปแบบแห้งที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ไม่มีการเปลี่ยนแปลงแอคติวิตีเป็นเวลาถึง 90 วัน แต่เมื่อเก็บที่อุณหภูมิห้อง แอคติวิตีลดลงร้อยละ 50 นอกจากนี้ยังมีเสถียรภาพต่อยูเรียความเข้มข้น 6 โมลาร์ ดีกว่าทริปซินอิสระ และยิ่งมีเสถียรภาพที่ดีมากเมื่อเติมแคลเซียมอิออน เนื่องจากแคลเซียมอิออนเป็นปัจจัยสำคัญช่วยในการรักษาโครงรูปของโปรตีนเอนไซม์

ในปี ค.ศ. 1984 Puvanakrishnan และ Bose ได้ทดลองตรึงรูปเปปซินบนทรายโดยวิธีที่แตกต่างกัน 5 วิธี โดยวิธีที่ 1 ใช้ APTS เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง และ 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide.HCl (EDC) เป็นสารสร้างพันธะร่วม ส่วนวิธีที่ 2 3 และ 4 ใช้ hexamethylenetetramine (HMT) hexamethylenediamine (HMD) และ melamine ตามลำดับ เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง ส่วนสารสร้างพันธะร่วมเป็น EDC เหมือนกัน วิธีที่ 5 เป็นการใช้ titanium tetrachloride เป็นสารสร้างพันธะร่วมระหว่างทรายกับเอนไซม์โดยตรง พบว่า การตรึงรูปโดยใช้ APTS และ EDC เป็นวิธีที่ทำให้ได้เอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีสูงสุด พีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงที่สุดเลื่อนไปทางกรด 0.3 ยูนิต อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงที่สุดเพิ่มขึ้นจากเดิม 40 เป็น 45 องศาเซลเซียส ค่า Km เพิ่มจาก 1.3×10^{-3} เป็น 1.8×10^{-3} โมลาร์ เสถียรภาพต่อพีเอชเพิ่มขึ้นในช่วงพีเอช 4.0-6.0 และเสถียรภาพต่อความร้อนเพิ่มขึ้นในช่วง 30-45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้พบว่าแอคติวิตีไม่เปลี่ยนแปลงจากแอคติวิตีเริ่มต้นเมื่อเก็บของเอนไซม์ตรึงรูปที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แบบแห้งเป็นเวลา 60 วัน

ในปี ค.ศ.1983 Thomplison, Angelo และ Mathur ได้ทดลองตรึงรูปเรนินบนตัวพยุงทรายโดยใช้ APTS และกลูตารัลดีไฮด์ เตรียมทรายแม่น้ำขนาด 50 เมช โดยแช่ในกรดไนตริคความเข้มข้น 14 นอร์มัล จากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นหลาย ๆ รอบ เติม APTS ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้าง APTS ออกด้วยน้ำกลั่น เติมกลูตารัลดีไฮด์ ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างกลูตารัลดีไฮด์ออกด้วยน้ำขจัดไอออน จากนั้นนำมาตรึงรูปเรนิน พบว่าทรายเป็นตัวพยุงที่เหมาะสมสำหรับการตรึงรูปเรนินโดยวิธีเชื่อมพันธะโควาเลนต์

ในปี ค.ศ. 1989 Anprung, Chuengsaengsatityaporn และ Thunpithayakul ได้ทดลองตรึงรูปเรนินบนทรายขนาด 50 เมช ด้วยพันธะโควาเลนต์ พบว่า ภาวะที่เหมาะสมประกอบด้วยสารละลาย APTS เข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร เป็นสารกระตุ้นตัวพยุง สารละลายกลูตารัลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 2.5 เป็นสารสร้างพันธะเชื่อมขวาง และสารละลายเรนินเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยปริมาตร เรนินตรึงรูปที่เตรียมได้มีค่าคงที่ไมคิลิส (Km) เท่ากับ 4.18 ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าเรนินอิสระ 1.6 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าเรนินตรึงรูปมีเสถียรภาพต่อความร้อนตลอดช่วงอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส แต่พีเอชที่เอนไซม์แสดงแอคติวิตีสูงสุดไม่เปลี่ยนแปลง มีค่าแอคติวิตีจำเพาะเท่ากับ 6.08 KRU ต่อมิลลิกรัม และมีเสถียรภาพต่อการเก็บในบัฟเฟอร์พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 8-10 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ดีกว่าเรนินอิสระโดยมีค่าครึ่งชีวิตมากกว่า 4 เดือน

2.8 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป

ชนิดของเครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตรึงรูป (Chibata, 1978) แบ่งเป็นประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้

2.8.1 เครื่องปฏิกรณ์แบบถังกวน (Stirred tank reactor)

2.8.1.1 เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง

เป็นถังปฏิกิริยาธรรมดาที่มีตัวปั่น แสดงดังรูป 1ก ในรูปที่ 2.8 เหมาะสำหรับสับสเตรทที่มีความหนืดสูงและเอนไซม์ตรึงรูปที่มีแอคติวิตีต่ำ ข้อเสียของเครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้คือ การเสียสภาพของเอนไซม์ตรึงรูปเนื่องจากการถูกทำลายทางกายภาพจากการเสียดสีกับตัวปั่น

2.8.1.2 เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนแบบต่อเนื่อง

เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนแบบต่อเนื่องแสดงดังรูปที่ 1ข ในรูปที่ 2.8 มีข้อได้เปรียบในด้านการควบคุมพีเอช และการเปลี่ยนเอนไซม์ทำได้ง่าย เหมาะสำหรับเอนไซม์ตรึงรูปที่มีค่าครึ่งชีวิตต่ำ มีประสิทธิภาพดีกว่าแบบไม่ต่อเนื่อง

2.8.2 เครื่องปฏิกรณ์แบบอัดแน่น (Packed bed reactor)

เครื่องปฏิกรณ์แบบอัดแน่นที่นิยมใช้สำหรับเอนไซม์หรือเซลล์ตรึงรูป แสดงดังรูปที่ 2ก 2ข และ 2ค ในรูปที่ 2.7 ซึ่งแตกต่างกันตามทิศทางการไหลของสับสเตรท โดยทั่วไปมักจะป้อนสับสเตรทแบบไหลขึ้น เนื่องจากการไหลลงอาจทำให้เกิดการอัดแน่นของเอนไซม์ตรึงรูปได้ สับสเตรทที่ใช้ไม่ควรมีความหนืดสูงเพราะจะทำให้เกิดความดันลดสูงมาก ข้อเสียของเครื่องปฏิกรณ์แบบนี้คือ มีราคาแพง เปลี่ยนเอนไซม์ยาก ไม่เหมาะกับเอนไซม์ตรึงรูปที่มีค่าครึ่งชีวิตต่ำ และยากต่อการควบคุมพีเอชให้สม่ำเสมอตลอดทั้งคอลัมน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่ปฏิกิริยามีการปลดปล่อยกรดหรือด่าง อย่างไรก็ตามข้อดีของเครื่องปฏิกรณ์นี้คือ มีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นผลิตภัณฑ์ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยานั้นจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ก็ตาม ง่ายต่อการควบคุมแบบอัตโนมัติ ลดค่าแรงงาน มีเสถียรภาพในการใช้งาน และง่ายต่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์

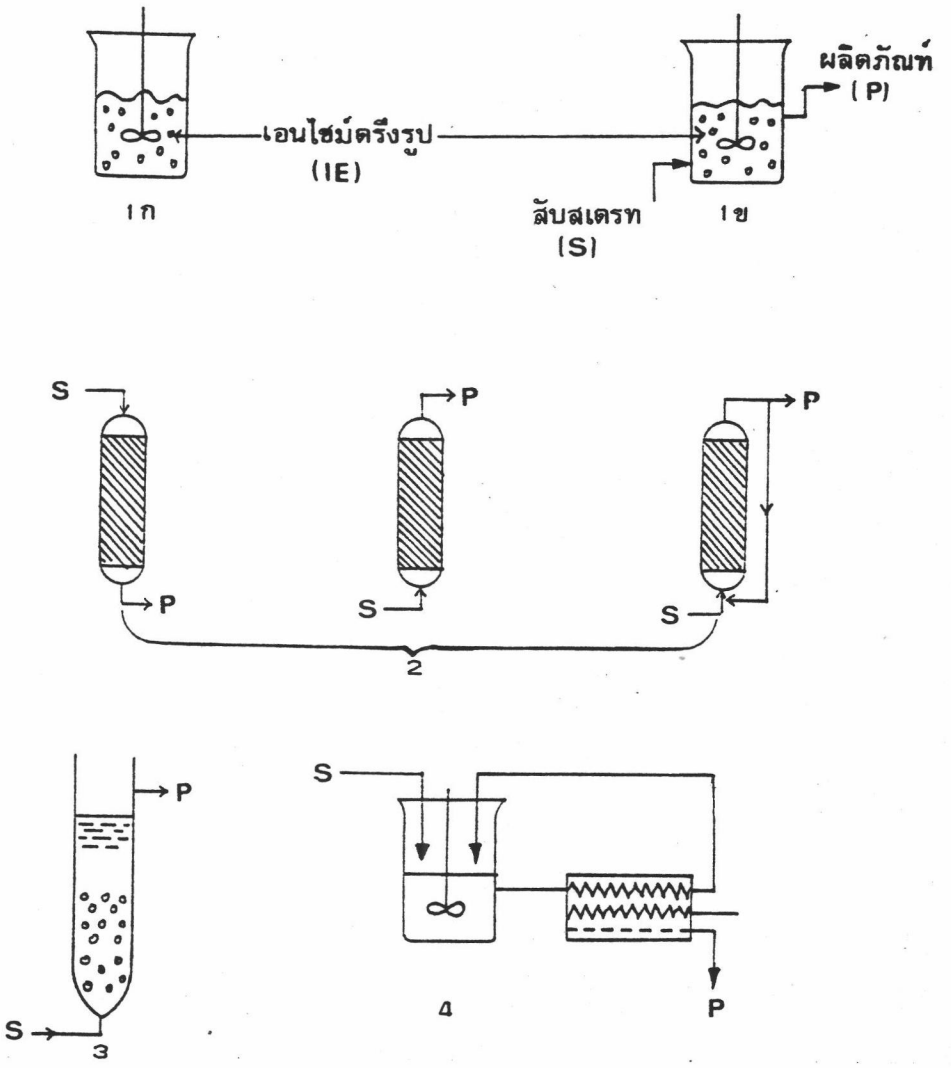
2.8.3 เครื่องปฏิกรณ์ฟลูอิไดซ์เบด (Fluidized bed ractor)

เครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์เบดเหมาะสำหรับสับสเตรทที่มีความหนืดสูงหรือสับสเตรทหรือผลิตภัณฑ์ที่เป็นก๊าซ แสดงดังรูปที่ 3 ในรูปที่ 2.7 เครื่องปฏิกรณ์ชนิดนี้มีข้อได้เปรียบกว่าเครื่องปฏิกรณ์แบบอัดแน่น ในแง่การถ่ายเทความร้อนและการถ่ายเทมวล เนื่องจากลักษณะการไหลของของไหลในคอลัมน์ จากเหตุผลดังกล่าวทำให้เอนไซม์ตรึงรูปมีแอคติวิตีสูงในการทำปฏิกิริยากับสับสเตรท

2.8.4 เครื่องปฏิกรณ์อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรน

(Ultrafiltration membrane devices)

เครื่องปฏิกรณ์อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรน แสดงดังรูปที่ 4 ในรูปที่ 2.7 เหมาะสำหรับสับสเตรทที่มีโมเลกุลสูงและผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ



รูปที่ 2.7 เครื่องปฏิกรณ์เอนไซม์ตริงรูป

1 = เครื่องปกิกรณ์ถังกวน (1ก = เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนแบบไม่ต่อเนื่อง, 1ข = เครื่องปฏิกรณ์ถังกวนแบบต่อเนื่อง) ; 2 = เครื่องปฏิกรณ์แบบอัดแน่น (2ก = แบบไหลลง, 2ข = แบบไหลขึ้น, 2ค = แบบไหลวนซ้ำ) ; 3 = เครื่องปฏิกรณ์แบบฟลูอิไดซ์เบด ; 4 = เครื่องปฏิกรณ์อุลตร้าฟิลเตรชั่นเมมเบรน

2.9 ฟลูอิไดเซชั่น

2.9.1 นิยาม

ฟลูอิไดเซชั่นคือ กระบวนการที่ของไหล ซึ่งได้แก่ ของเหลว และก๊าซ ทำให้อนุภาคของของแข็งเกิดการเคลื่อนไหวแบบของไหล (สมศักดิ์ ดำรงค์เลิศ, 2532)

ลักษณะทั่วไปของการเกิดฟลูอิไดเซชั่นจะเกิดภายในภาชนะ ซึ่งนิยมใช้รูปทรงกระบอกบรรจุไว้ด้วยอนุภาคของของแข็ง ซึ่งวางอยู่บนแผ่นกระจายตัว (distributor) ซึ่งอาจเป็นแผ่นวัสดุที่มีรูพรุนเช่น แผ่นเซรามิค หรือโลหะเจาะรูเล็ก ๆ หรือตะแกรงถี่ ชั้นของอนุภาคนี้เรียกว่า เบด (bed) เมื่อของไหลไหลผ่านเบดความดันของของไหลจะลดลงเนื่องจากแรงเสียดทานระหว่างของไหลกับผนังภาชนะและแรงเสียดทานระหว่างของไหลกับอนุภาคของของแข็ง ความดันของของไหลที่ลดลงหมายถึง พลังงานจลน์ที่สูญเสียไปเนื่องจากการไหลผ่านภาชนะที่บรรจุด้วยอนุภาคของแข็ง ซึ่งขึ้นกับความเร็วหรืออัตราการไหลของของไหล ขณะที่ความเร็วต่ำเบดจะไม่มีการเคลื่อนไหว แต่ความดันลดลงมากขึ้น เมื่อเพิ่มความเร็วของของไหลมากขึ้นจนถึงจุดหนึ่งที่เบดเริ่มมีการเคลื่อนไหว เนื่องจากแรงที่กระทำต่ออนุภาคอยู่ในลักษณะสมดุล อนุภาคพยายามจัดเรียงตัวใหม่เพื่อให้เกิดแรงต้านต่อการไหลลดลงน้อยที่สุด เป็นผลให้อนุภาคเกิดการเคลื่อนไหว ขณะเดียวกันเบดจะมีการขยายตัว ทำให้ความสูงของเบดเพิ่มขึ้น ความดันที่วัดได้ขณะนี้จะมีค่าเท่ากับน้ำหนักของอนุภาคหารด้วยพื้นที่หน้าตัดของเบด เมื่อเพิ่มความเร็วต่อไปอีก เบดจะมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แต่ความดันที่วัดได้มีค่าคงที่เท่ากับน้ำหนักของเบดหารด้วยพื้นที่หน้าตัดและหากเพิ่มความเร็วต่อไปอีก จนกระทั่งความเร็วของของไหลมีค่าเท่ากับความเร็วที่อนุภาคตกอย่างอิสระ (free falling velocity หรือ terminal velocity) อนุภาคจะหลุดออกจากภาชนะไปพร้อมกับของไหล

2.9.2 ข้อได้เปรียบและเสียเปรียบของฟลูอิไดเซชั่น

2.9.2.1 ข้อได้เปรียบ

(1) เนื่องจากเม็ดของแข็งเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการผสมกันได้อย่างรวดเร็วและสม่ำเสมอ อุณหภูมิภายในเบดคงที่ตลอด

(2) พื้นที่สัมผัสระหว่างเม็ดของแข็งกับของไหลจะมีมากกว่าเมื่อเทียบกับเบดนิ่งที่ใช้จำพวกเม็ดของแข็งเท่ากัน จึงมีประโยชน์ในการขยายงานที่มีทั้งการถ่ายเทความร้อน และการถ่ายเทมวลสาร

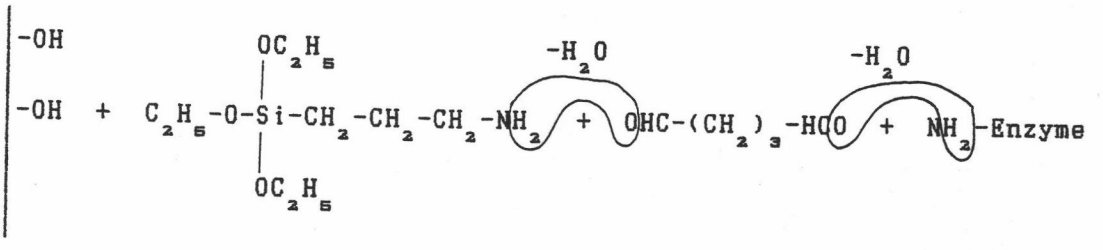
(3) การทำงานด้วยฟลูอิไดซ์เบดจะเสียพลังงานน้อยกว่า เพราะแรงเสียดทาน และความดันตกของเบดน้อยกว่าเบดบรรจุมาก

2.9.2.2 ข้อเสียเปรียบ

เวลาของของไหลสัมผัสกับเม็ดของแข็งสั้นมาก จึงต้องใช้เบดสูง ๆ หรือเบดหลายชั้น ทำให้สิ้นเปลืองเงินลงทุนมาก

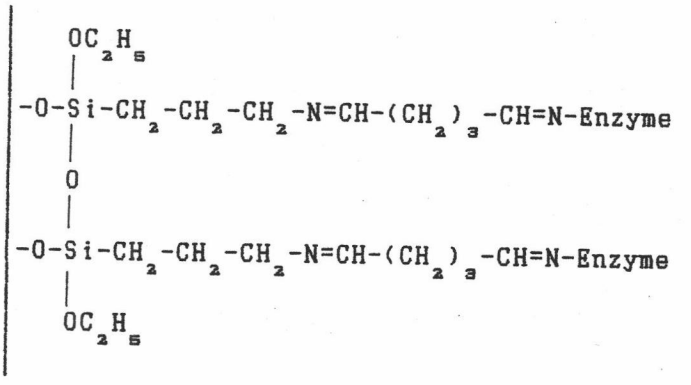
จากวารสารปริทัศน์ด้านต่าง ๆ ที่ได้กล่าวถึง อาทิ ข้อมูลทางเศรษฐกิจการค้าผลิตภัณฑ์ประเภทสารสกัดจากปลา บทบาทเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนจากปลาหรือของเหลือทิ้งจากโรงงานแปรรูปปลาทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว เทคโนโลยีการพัฒนาการตรึงรูปเอนไซม์ ตลอดทั้งรูปแบบและหลักการของกระบวนการของการทำงานของเครื่องปฏิกรณ์ระบบฟลูอิไดซ์เบด ได้นำไปสู่งานวิจัยเรื่องนี้ด้วยเหตุปัจจัยและประสิทธิผลที่ประเมินไว้เบื้องต้นดังนี้ : สารสกัดจากปลาน่าจะเป็นอุตสาหกรรมที่นักลงทุนในประเทศน่าจะให้ความสนใจและเกิดขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานข้อมูลการวิจัยในประเทศได้ แต่เนื่องด้วยระบบการผลิตที่มีอยู่ปัจจุบันยังอยู่ในลักษณะจำกัดด้วยการใช้เอนไซม์อิสระ ดังนั้นการนำเสนอรูปแบบการตรึงรูปเอนไซม์อาจจะนำไปสู่ประสิทธิผลที่สอดรับกับการขยายส่วนได้ด้วยเหตุผลที่กล่าวถึงและหรืออ้างถึงไว้แล้วตอนต้น สำหรับวิธีการตรึงรูปที่ได้กำหนดไว้ในงานวิจัยนี้ใช้ระบบของการตรึงรูปแบบเชื่อมพันธะระหว่างโมเลกุลเอนไซม์กับตัวพยุงประเภทกึ่งเฉื่อย (semi-inert) ในที่นี้คือ ทรายแม่น้ำ (river-bed sand) ขนาดอนุภาคโดยเฉลี่ย 50 เมช ข้อสังเกตสำหรับทรายแม่น้ำนี้ก็คือ มีหมู่ไฮดรอกซิลเป็นหมู่ฟังก์ชั่นมีอยู่ทั่วไปในปริมาณมาก ทนต่อการกัดกร่อน เสถียรต่อการปนเปื้อน และการทำลายด้วยจุลินทรีย์และเอนไซม์ทั่วไป และสามารถนำคืนกลับมาใช้ใหม่ได้โดยวิธีการไม่ซับซ้อน ส่วนวิธีการตรึงรูปซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการกระตุ้นหมู่ไฮดรอกซิลให้เป็นหมู่อนุพันธ์ของอะมิโนที่มีความไวด้วยสารประกอบ δ-aminopropyltriethoxysilane (APTS) ตามด้วยการใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสาร

เชื่อมขวาง โดยผ่านการสร้างพันธะเปปไทด์ด้วยปฏิกิริยาเกิด Schiff's base ดังรูปที่ 2.8 ดังนี้ (Thomplison และคณะ, 1983; Anprung และคณะ, 1989)



River-bed sand APTS Glutaraldehyde Enzyme

Schiff's base formation reaction



รูปที่ 2.8 ปฏิกิริยาเคมีของการเชื่อมพันธะโควาเลนต์ระหว่างเอนไซม์และทราย

ลำดับต่อมาของงานวิจัยได้ทดลองนำเอนไซม์ตรึงรูปบนเม็ดทรายมาใช้ในลักษณะ "คะตะลิสต์แข็ง (solid catalyst)" โดยประกอบเป็นเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพเอนไซม์ตรึงรูปทำงานในลักษณะฟลูอิไดเซชั่น มีเป้าหมายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสารสกัดจากปลาจากน้ำนึ่งปลา Skiptjack กรณีนี้จะมีผลโดยตรงต่อการลดการสูญเสียของวัตถุดิบโดยจุลินทรีย์ปนเปื้อนด้วย และในขั้นตอนสุดท้ายได้เลือกทดลองใช้สารสกัดจากปลาในลักษณะสารแต่งกลิ่นรสและสารเสริมกลิ่นรสในอาหาร ตลอดทั้งอาจจะเป็นสารเพิ่มโปรตีนในอาหารได้บ้าง ตัวอย่างอาหารที่ประกอบขึ้นในการทดลองนี้จะช่วยยืนยันถึงศักยภาพในการผลิตสารสกัดจากปลาเพื่ออุตสาหกรรมของชาติ ดังรายละเอียดที่จะเสนอเป็นลำดับไป