โครงการวิจัย
เรื่อง

การศึกษาสภาวะการย่อยโปรตีนในการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตเพื่อใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร

(The Study of Effect of Hydrolysing Condition of Hydrolysated Fish Protein for Food Additive)

โดย

อาจารย์จิรนาถ ทิพย์รักษา

ปีการศึกษา 2549 ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ปัญหาและที่มาของการวิจัย

โปรตีนจากปลาทะเลประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นที่ร่างกายจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและซ่อมแซมเนื้อเยื่อ กล้ามเนื้อที่สึกหรอ โปรตีนจากปลาเป็นโปรตีนที่ใกล้เคียงกับโปรตีนในเนื้อสัตว์ทั่วไป เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่ครบถ้วนสมบูรณ์ โปรตีนจากปลาเข้มข้นหรือโปรตีนไฮโดรไลเซต (Hydrolysated fish protein, Concentrated fish protein) เตรียมได้จากปลาทะเลชนิดต่างๆ โดยมีขั้นตอนการสกัดไขมันออก แยกส่วนก้าง หรือกระดูก และได้วัตถุดิบที่มีโปรตีนสูงถึงร้อยละ 85-95 จากนั้นใช้เอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีนและหรือกรดในการย่อยจนได้เป็นโปรตีนเข้มข้นหรือโปรตีนไฮโดรไลเซต

ดังนั้นการย่อยเพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพดีจะต้องมีปัจจัยที่สำคัญ รวมถึงสภาวะในการผลิตและการเลือกวัตถุดิบ โดยทั่วไปวัตถุดิบที่มีคุณภาพต้องประกอบด้วยโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 30 (น้ำหนักแห้ง) ราคาถูกและหาได้ง่าย (Jantawat, 1998) เนื่องจากปลาทะเลเป็นแหล่งโปรตีนที่สมบูรณ์ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาทะเล และประยุกต์ใช้เป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารได้

วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร (Food additive) มีความหมายตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 120 ว่า “หมายถึงวัตถุที่นำมาใช้แต่งกลิ่นรสหรือรสตามต้องการ” วัตถุประสงค์ในการใช้วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสที่สำคัญได้แก่ เพื่อเป็นการให้กลิ่นรสทดแทนแก่อาหารที่สูญเสียกลิ่นรสไป หรือเพื่อเป็นการแต่งกลิ่นรสให้กับผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบที่ไม่มีกลิ่นรสตามที่ต้องการ หรือเพื่อช่วยเน้นกลิ่นรสให้เด่นชัดขึ้น (กระทรวงสาธารณสุข, 2533) สารเติมแต่งกลิ่นรสได้แก่ ซอสถั่วเหลือง ซีอิ๊ว น้ำปลา ซอสหอยนางรม โปรตีนไฮโดรไลเซตจากพืช (Hydrolysated vegetable protein) และโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสัตว์ (Hydrolysated animal proein) ซึ่งนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้โดยตรงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีในอาหารแปรรูปต่างๆ หลายชนิดทั้งอาหารคาวและหวานในซุปก้อน ซอส ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์นมและกาแฟ หรือใช้เป็นส่วนประกอบหลักของสารแต่งกลิ่นรสหลายชนิด ใช้เป็นแหล่งโปรตีนในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์โดยเติมลงในแป้งหรือทำเป็นแคปซูลเพื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนให้แก่ประเทศที่ประชากรของประเทศด้อยพัฒนาที่มีอาการขาดโปรตีน (ณัฏฐา, 2548)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาดาบเงิน โดยศึกษาปัจจัยสัดส่วนเนื้อปลาต่อกรด และเวลาในการย่อยโปรตีน

2. เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. ปัจจัยด้านสัดส่วนของเนื้อปลาต่อกรด และเวลาในการย่อยน่าจะมีผลต่อสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพต่อสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

2. โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตน่าจะประยุกต์ใช้เป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารได้

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

1. ศึกษาผลของสัดส่วนสารตั้งต้นต่อกรด และเวลาในการต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

2. ศึกษาสมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต ได้แก่ ระดับการย่อยสลาย ความยาวของสายเปปไทด์ ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน และองค์ประกอบทางเคมี

3. ศึกษาสมบัติทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต ได้แก่ ความหนืดและค่าสี

1.5 คำนิยามศัพท์

1. วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร หมายถึง วัตถุที่นำมาใช้แต่งกลิ่นรสหรือรสตามต้องการ" วัตถุประสงค์ในการใช้วัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสที่สำคัญได้แก่ เพื่อเป็นการให้กลิ่นรสทดแทนแก่อาหารที่สูญเสียกลิ่นรสไป หรือเพื่อเป็นการแต่งกลิ่นรสให้กับผลิตภัณฑ์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบที่ไม่มีกลิ่นรสตามที่ต้องการ หรือเพื่อช่วยเน้นกลิ่นรสให้เด่นชัดขึ้น

2. โปรตีนไฮโดรไลเซต หมายถึง ส่วนผสมของเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนบริเวณพันธะเพปไทด์ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์โปรตีเอส ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของโปรตีน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต และสมบัติทางเคมี-กายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซต
2. เพื่อประยุกต์ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารที่มีกลิ่นรสดี มีคุณค่าทางโภชนาการอุดมด้วยกรดอะมิโนและโปรตีน
3. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

2.1 ปลาดาบเงิน

ปลาดาบเงิน (Largehead hairtail) เป็นปลาหน้าดินที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งทางฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 และมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ Hairtail, Cutlassfish และ Ribbon fish ซึ่ง Collette และ คณะได้จัดไว้ในวงศ์ปลาดาบเงิน (Family Trichiuridae) แบ่งออกเป็น 9 สกุล 32 ชนิด พบในน่านน้ำไทยทั้งหมด 3 สกุล 4 ชนิด คือ *Eupleurogrammus glossodon, E. muticus, Lepturacanthus savala* และ *T. lepturus* โดยชนิดที่พบมากที่สุดคือ *T. lepturus* มีขนาดความยาวตลอดตัวทั่วไปที่พบ ประมาณ 50-100 เซนติเมตร และขนาดความยาวสูงสุด 120 เซนติเมตร พบแพร่กระจายทั่วไปในทะเลเขตร้อนและเขตอบอุ่นทั่วโลก ที่ระดับความลึกตั้งแต่ 50 เมตร ชอบอาศัยอยู่บริเวณผิวพื้นท้องทะเล โดยอยู่รวมกันเป็นฝูงขนาดใหญ่ในเวลากลางวัน และเกาะกลุ่มหลวมๆในเวลากลางคืนเพื่อหาอาหาร จัดเป็นปลากินเนื้อ และปลาที่โตเต็มวัยเป็นพวกที่ชอบกินปลาด้วยกัน (piscivorous) โดยเฉพาะพวกปลาผิวน้ำขนาดเล็ก เช่น ปลากะตัก ปลาหลังเขียว ปลาสีกุน และปลากุเราแคระ รวมทั้งหมึกและกุ้งปู (กรมประมง, 2530) จากผลการศึกษาชนิดและองค์ประกอบของอาหารในกระเพาะปลาดาบเงิน *T. lepturus* บริเวณอ่าวไทย พบว่า องค์ประกอบของอาหารในกระเพาะปลาดาบเงินชนิดนี้ ประกอบด้วย ปลา ร้อยละ80.67 กุ้ง ร้อยละ7.12 หมึกร้อยละ 2.16 ปูร้อยละ 0.02 เคยร้อยละ 0.01 และอื่นๆร้อยละ 10.02 สำหรับเครื่องมือที่ใช้ทำการประมงปลาชนิดนี้ได้แก่ อวนลาก อวนติดตา ลอบ และเบ็ดมือ ส่วนการนำมาใช้ประโยชน์ นิยมนำมาทอด ปิ้งหรือย่าง ตากแห้ง และทำลูกชิ้น ส่วนเนื้อสดที่มีคุณภาพดี นำยมนำมาทำซาซิมิ หรือปลาดิบได้อีกด้วย

การศึกษาชีววิทยาของปลาดาบเงินชนิดนี้ในทะเลญี่ปุ่น โดย Shiokawa (1988) พบว่าปลาส่วนใหญ่โตเต็มวัยเมื่ออายุ 2 ปี มีขนาดความยาวที่วัดจากปลายจะงอยปากถึงรูก้น (preanal length, PL) ในปลาเพศผู้และเพศเมีย เท่ากับ 28 เซนติเมตร และ 30 เซนติเมตรตามลำดับ บางตัวอาจสมบูรณ์เพศเมื่ออายุเพียง 1 ปี ความดกของไข่ที่ได้จากปลาขนาดความยาวที่วัดจากปลายจะงอยปากถึงรูก้น เท่ากับ 45 เซนติเมตร มีจำนวนมากกว่า 130,000 ฟอง และไข่ที่รวบรวมได้จากถุงลากแพลงก์ตอนเป็นประเภทไข่ลอย มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.59-1.88 มิลลิเมตร ใช้เวลาในการฟักประมาณ 3-6 วัน และขนาดความยาวตลอดตัวของลูกปลาเมื่อแรกฟัก เท่ากับ 5.5-6.5 มิลลิเมตร ส่วนฤดูวางไข่อยู่ในระหว่างเดือนมิถุนายน-ตุลาคม มีช่วงการวางไข่สูงสุดในเดือนกรกฎาคม-สิงหาคม ขณะที่ปลาชนิดนี้ในบริเวณทะเลจีนตะวันออก มีฤดูวางไข่อยู่ในระหว่างเดือนเมษายน-สิงหาคม โดยวางไข่สูงสุดในเดือนมิถุนายน

เมื่อประมาณอายุจากหูกระดูก (otolith) พบว่า ปลาเพศผู้อายุ 1-6 ปี มีความยาว PL เท่ากับ 23, 28, 31, 33, 34 และ 35 เซนติเมตรตามลำดับ ส่วนปลาเพศเมียที่ช่วงอายุเดียวกัน มีความยาว PL เท่ากับ 24, 30, 34, 37, 40 และ 41 เซนติเมตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าปลาเพศเมียมีอัตราการเติบโตมากกว่าปลาเพศผู้ ในขณะที่การศึกษาเกี่ยวกับปลาชนิดนี้ในประเทศไทยโดยเฉพาะข้อมูลด้านชีววิทยามีค่อนข้างน้อย ซึ่งศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงทะเลฝั่งอันดามัน เล็งเห็นความสำคัญของปลาชนิดนี้ จึงได้ทำการศึกษาด้านชีววิทยา เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการกำหนดมาตรการควบคุมการประมงให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ได้สูงสุดและสมดุลกับการทดแทนตามธรรมชาติต่อไป

2.2 แหล่งของโปรตีนและองค์ประกอบของกลิ่นรสจากปลาทะเล

ปลาทะเลเป็นแหล่งโปรตีนที่ครบถ้วนสมบูรณ์ มีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน (ณัฏฐา, 2548) ซึ่งองค์ประกอบของกลิ่นรสในเนื้อปลา ประกอบด้วยสารกลุ่มใหญ่ ได้แก่

1. สารประกอบไนโตรเจน

กรดอะมิโนไกลซีน (glycine) อะลานีน (alanine) ซีรีน (serine) และทรีโอนีน (threonine) ให้รสหวาน ส่วน อาร์จีนีน (arginene) ลิวซีน (leucine) วาลีน (valine) เมไทโอนีน (methionine) ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) ฮีสทิดีน (hisdtidine) และไอโซลิวซีน (isoleucine)ให้รสขม (แสดงในตารางที่ 1) สารที่กลิ่นได้แก่ สารประกอบนิวคลีโอไทด์จะให้กลิ่นหอม สารประกอบไตรเมทิลเอมีน (TMA) เป็นสารที่ให้กลิ่นซึ่งเกิดจากการให้ความร้อนแก่สารไตรเมทิลออกไซด์ (TMA oxide) (สุทธวัฒน์, 2536)

ตารางที่1 กรดอะมิโนชนิดที่ให้กลิ่น-รส

ชนิดของกรดอะมิโน	กลิ่น-รส
Glycine Alanine Serine Threonine	กลิ่น-รสหวาน
Arginine Leucine Valine Methionine Phenylalanine Histidine Isoleucine	กลิ่น-รสขม

2. สารประกอบคาร์บอนิล

สารประกอบไดคาร์บอนิล (dicarbonyl) และอัลฟา-ไฮดรอกซิล คาร์บอนิล (α-hydroxyl carbonyl) ซึ่งมีคาร์บอนอะตอม 4 ตัวหรือน้อยกว่า พบในสารที่กลั่นตัวจากปลาแฮดดอค (haddock) ทั้งสดและแช่แข็ง สารประกอบคาร์บอนิลทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นระหว่างกระบวนการผลิตปลากระป๋องที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเวียส สารอัลฟา-อะมิโน เวอรัลดีไฮด์ (α-amino veraldehyde) เป็นกลิ่นปลาซึ่งจะถูกผลิตขึ้นจากไลซีนหรือออกซิไดซ์ไพริดีน (pyridine) สารที่ให้กลิ่นหืนได้แก่ มาโลนัลดีไฮด์ (malonaldehyde) ซึ่งเกิดจากการออกซิไดซ์ไขมัน

3. สารประกอบซัลไฟด์

สารประกอบซัลไฟด์ในเนื้อปลามีแหล่งและที่มาต่างกัน สารประกอบซัลไฟด์ที่มีลักษณะโมเลกุลเป็นโซ่ยาวมักพบในน้ำมันปลา ส่วนสารประกอบไดเมทิลไดซัลไฟด์ เป็นสารที่เกิดจากการออกซิเดชันของมีเทนไทออล (methanthiol) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการย่อยสลายของเมไทโอนีนในเนื้อปลาโดยจุลินทรีย์ สำหรับไดเมทิลไตรซัลไฟด์ พบในเนื้อปลาที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนและก่อให้เกิดกลิ่นที่ไม่ยอมรับของผู้บริโภค ซัลไฟด์ชนิดวงแหวนและซัลเฟอร์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่ให้กลิ่นรสเฉพาะของอาหารทะเล ได้แก่ 3,5-ไดเมทิล-1,2,4-ไตรไทโอเลน (3, 5-dimethyl-1,2,4-trithiolane) ซึ่งให้กลิ่นคล้ายหัวหอม (สุทธวัฒน์, 2536)

3. การย่อยสลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต หมายถึง ของผสมของเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนบริเวณพันธะเพปไทด์ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์โปรตีเอส ทั้งนี้เพื่อปรับปรุงคุณสมบัติบางประการของโปรตีน เช่นคุณสมบัติการละลาย คุณสมบัติการเกิดอิมัลชัน และคุณสมบัติการเกิดโฟม เป็นต้น ซึ่งการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต โดยทั่วไปมี 2 วิธีได้แก่

3.1 การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี ได้แก่ การย่อยสลายด้วยสารละลายกรดและเบส ซึ่งการย่อยสลายด้วยสารเคมีเป็นวิธีการที่มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่มีข้อจำกัดมากในด้านการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีการที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่

3.1.1 การย่อยสลายด้วยสารละลายกรด เช่น การย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกหรือกรดซัลฟูริก เป็นต้น ซึ่งการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดนั้น พันธะเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนแอสปาร์ติก (aspartic) อยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยได้เร็วกว่าพันธะเพปไทด์อื่นๆประมาณ 100 เท่า วิธีการนี้จะทำให้กรดอะมิโนทริปโตฟาน ซีรีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ เช่น ซีสเตอีน และกรดอะมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย และยังทำให้ กรดอะมิโนแอสปาราจีน และกลูตามีน ถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนแอสปาร์ติกและกลูตามิก นิยมทำการผลิต

โปรตีนไฮโดรไลเซตโดยการย่อยสลายด้วยสารละลายกรดเพื่อนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร หรือเป็นอาหารเลี้ยงสัตว์

3.1.2 <u>การย่อยสลายด้วยสารละลายเบส</u> เช่น การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสจะเร็วกว่าการย่อยด้วยสารละลายกรด ถ้าหากทำการย่อยสลายด้วยสารละลายเบสที่สภาวะรุนแรง จะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (racimization) ของกรดอะมิโนขึ้น โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของกรดอะมิโนจากรูปแบบแอล (L-form) เป็นรูปแบบดี (D-form) ซึ่งร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้แล้วถ้าหากทำการย่อยสลายที่สภาวะความเป็นกรดเบสและอุณหภูมิสูง จะทำให้เกิดปฏิกิริยาบีต้า-อิลิมิเนชัน (β-eilimination) ของกรดอะมิโนซีรีน และซีสทีนเป็นผลให้เกิดสารประกอบดีไฮโดรอะลานีน (dehydroalanine) ขึ้น ซึ่งสารนี้สามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆได้ เช่น ซีสเตอีนและไลซีน เป็นต้น อีกทั้งทำให้เกิดสารประกอบหลายชนิด เช่น แลนทิโอนิน (lanthionine) ออนิทิโออะลานีน (ornithioalanine) ไลซิโนอะลานีน (lysinoalanine) ทำให้เกิดการสูญเสียสารอาหารที่สำคัญและเกิดสารพิษขึ้น

Jantawat (1998) ศึกษาผลของสัดส่วนกรดไฮโดรคลอริกต่อโปรตีน ความเข้มข้นของกรด เวลาและอุณหภูมิในการย่อยสลายต่อสมบัติทางเคมี และทางประสาทสัมผัสของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว พบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ สัดส่วนโปรตีนต่อกรดไฮโดรคลอริก เท่ากับ 1:3 อุณหภูมิในการย่อยสลาย 120 องศาเซลเซียส เวลาในการย่อยสลาย 6 ชั่วโมง และความเข้มข้นของกรด 6 M ซึ่งสภาวะนี้จะให้ปริมาณไนโตรเจนที่เป็นกรดอะมิโน อัตราส่วนไนโตรเจนที่เป็นกรดอะมิโนต่อไนโตรเจนทั้งหมด และระดับคะแนนทางประสาทสัมผัสสูงสุด

Adler-Nissen (1979) พบว่าความแม่นยำของวิธีการวัดถือเป็นพื้นฐานของวิธีการที่ใช้ตรวจสอบอัตราการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) มีการใช้วิธีใหม่ที่พัฒนาขึ้นมา โดยวิธีที่เรียกว่า Trinitrobenzenesulfonic acid ซึ่งวิธีการนี้สามารถหาอัตราการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตได้ถูกต้องแม่นยำ โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างตัวอย่างและสารทดสอบ วัดค่าดูดกลืนแสงเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

3.2 <u>การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส</u>

เป็นการย่อยสลายโปรตีนที่บริเวณพันธะเพปไทด์ด้วยเอนไซม์โปรตีเอส ทำให้เกิดสารผลิตภัณฑ์คือ เพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ โดยปกติแล้วโปรตีนปลาสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ตามธรรมชาติในกล้ามเนื้อและเครื่องในปลา (autolysis) เช่น เพปซิน ทริปซิน ไคโมทริปซิน และคาเทปซิน เป็นต้น ซึ่งวิธีการย่อยสลายดังกล่าวนี้เป็นวิธีที่ซับซ้อน เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสที่มีอยู่ในปลามีอยู่มากมายหลายชนิด แต่ละชนิดมีกิจกรรมการทำงานที่

แตกต่างกัน ทำให้ไม่สามารถที่จะควบคุมการเกิดการย่อยสลายของโปรตีนปลา และใช้เวลาในการย่อยสลายยาวนาน ผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จึงประกอบไปด้วยเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระ จึงมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ไม่ดีนัก นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหาร เช่น น้ำปลา เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้การย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอส จากแหล่งต่างๆเพื่อผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตนั้นกำลังได้รับความสนใจมาก เนื่องจากวิธีนี้เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูง โดยจะทำให้เกิดสารเพปไทด์ในปริมาณสูง เนื่องจากเอนไซม์โปรตีเอสจะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น ความเป็นกรดเบส ความคงตัวต่อความร้อน ตัวกระตุ้นและตัวยับยั้ง จึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และสภาวะในการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสม อีกทั้งสภาวะในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้นไม่รุนแรง ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีคุณภาพดี และมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามที่ต้องการ อย่างไรก็ตามโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์นั้น มีข้อจำกัด คือ ถ้าหากทำการย่อยสลายที่ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) สูง โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้อาจมีรสขม ซึ่งรสขมนี้เกิดขึ้นเนื่องจากชนิดของเพปไทด์โมเลกุลเล็กที่ได้จากการย่อยสลาย ทำให้เกิดปัญหาในการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร

Noguchi (1975) การย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซตหรือโปรตีนเข้มข้นจากเนื้อปลาทะเลด้วยเอนไซม์ พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่ให้กลิ่นรสที่ดี โอลิโกเปปไทด์ที่ได้ถูกแยกออกเป็นส่วนๆ ด้วยวิธีทางเคมีและแมสสเปกโตรโฟโตเมตรี (MS method) ลำดับกรดอะมิโนของโอลิโกเพปไทด์ 30 หน่วย พบว่ามีกรดอะมิโนชนิดกลูทามิกสูง ซึ่งให้กลิ่นรสที่ดีมีคุณภาพใกล้เคียงกับผงชูรส (MSG)

4. คุณภาพและการใช้ประโยชน์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

4.1 <u>คุณภาพของโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต</u>

1. คุณภาพทางเคมี

คุณภาพของโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทอาจพิจารณาได้จากองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดอะมิโนที่อยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยที่ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีควรมีปริมาณโปรตีนสูง ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในปริมาณสูง และมีปริมาณไขมันต่ำ องค์ประกอบทางเคมี และประกอบด้วยกรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทขึ้นกับปริมาณองค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่ใช้ เอนไซม์ที่เลือกใช้ และกระบวนการผลิต และมีการศึกษาพบว่าการย่อยสลายเนื้อปลาคอต และ เครื่องในปลาคอตด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายเครื่องในปลาคอต มีกรดอะมิโนไกลซีน และโพรลีนสูง ทั้งนี้เนื่องจากส่วนของเครื่องในปลามีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสูงกว่าในเนื้อปลาคอต

2. คุณภาพทางทางกายภาพ

สีเป็นคุณลักษณะทางกายภาพที่ต้องคำนึงถึงของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท โดยสีของผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต การสกัดไขมัน และการทำแห้ง เป็นต้น Hoyle and Merritt (1994) พบว่าการนำเนื้อปลาเฮอร์ริงสด ปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยการบีบอัด และปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 90 มาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และปาเปน พบว่าสีของโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการนำเนื้อปลาเฮอร์ริงสด ปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยการบีบอัดมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนจะมีค่าความสว่างมากกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการนำเนื้อปลาเฮอร์ริงที่ผ่านการกำจัดไขมันด้วยตัวทำละลายเอทานอลมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าความสว่างมากที่สุด และเนื่องจากโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ผลิตได้ส่วนใหญ่มีสีน้ำตาล ทำให้เกิดข้อจำกัดในการนำไปใช้ในอาหารบางประเภท

3. คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนปลาด้วยเอนไซม์โปรตีเอสนั้นมักจะมีรสขม ซึ่งรสขมเป็นคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่สำคัญมีผลต่อการยอมรับของผู้บริโภค รสขมที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทเกิดจากกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ เช่น ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ทริปตอฟาน และวาลีน เป็นต้น กรดอะมิโนเมื่ออยู่รวมกันเป็นเพปไทด์จะให้รสขมมากกว่าเมื่อกรดอะมิโนอยู่อิสระ (Hall and Ahmad, 1992) ความยาวของเพปไทด์มีความสำคัญต่อการเกิดรสขม และรสขมจะลดลงเมื่อมีจำนวนหมู่ที่ไม่ชอบน้ำมากกว่า 3 หมู่ในสายเพปไทด์ นอกจากนี้แล้วรสขมที่เกิดขึ้นยังมีความสัมพันธ์กับค่าความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ของสายเพปไทด์ ถ้าสายเพปไทด์ใดมีค่าความไม่ชอบน้ำมากกว่า 5.85 กิโลจูลต่อโมล จะให้รสขม แต่ถ้าสายเพปไทด์ใดมีค่าความไม่ชอบน้ำน้อยกว่า 5.43 กิโลจูลต่อโมล จะไม่ก่อให้เกิดรสขม ความเข้มของรสขมที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับองค์ประกอบ และการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ และชนิดของเอนไซม์โปรตีเอสที่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทขึ้นกับที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ชอบน้ำ เช่น เจลาติน จะให้รสขมน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนประเภทที่ไม่ชอบน้ำ เช่น เคซีน และถั่วเหลือง (Damodaran, 1996)

การแก้ปัญหาการเกิดรสขมในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นอาจทำได้โดยการบดบังรสขมที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ เช่น การเติมน้ำตาลซูโครสในผลิตภัณฑ์ (Mahesh และคณะ, 1993) หรือโดยการกำจัดรสขมที่เกิดขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์เอกโซเพปติเดสร่วมกับเอนไซม์เอนโดเปปติเดสในการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้เรียกว่า ปฏิกิริยาพลาสเตอิน (plastein) (Kristinsson และ Rasco, 2000b)

กลิ่นคาวปลาอาจจัดได้ว่าเป็นคุณภาพทางประสาทสัมผัสที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทซึ่งโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ดีควรจะไม่มีกลิ่น หรือมีกลิ่นคาวปลาอย่างอ่อนๆ แต่โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้ยังคงมีกลิ่นคาวปลาอยู่ ซึ่งคาดว่าอาจจะมีอิทธิพลมาจากปริมาณไขมัน และสารประกอบโมเลกุลต่ำ เช่น ไตรเมทิลลามีน สารประกอบประเภทซัลไฟด์ และ 2-บิวทานอล (Lalasidis และคณะ, 1978) การกำจัดสารที่ให้กลิ่นหรือสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดกลิ่นในโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทนั้นอาจทำได้โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสกัดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ในภาวะวิกฤติ (supercritical carbondioxide) เป็นต้น Morrjani และคณะ (1968) พบว่าการสกัดไขมันออกจากเนื้อปลาด้วยตัวทำละลายเอทานอลบริสุทธิ์จะทำให้โปรตีนปลาเข้มข้นที่ผลิตได้ไม่มีกลิ่นคาวปลา ในขณะที่การสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 96 นั้นโปรตีนปลาเข้มข้นที่ได้จะมีกลิ่นคาวปลาอยู่ ส่วนการสกัดด้วยอะซิโตน และไอโซโพรพานอลนั้นจะทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่เป็นที่ยอมรับในผลิตภัณฑ์

4.2 <u>การนำโปรตีนไฮโดรไลเซตมาใช้ประโยชน์</u>

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ผลิตขึ้นในระยะแรกมิได้ผลิตขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์ในการนำมาใช้เป็นอาหารมนุษย์โดยตรง แต่ผลิตขึ้นเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ต่อมาเมื่อทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตมีคุณค่าทางโภชนาการสูง โดยประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วน และมีวิตามินสูง จึงได้มีการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ที่อยู่ในระยะแรกเกิดและกำลังเจริญเติบโต โดยใช้ทดแทนโปรตีนนมในอาหารสัตว์ จากนั้นจึงได้มีการพัฒนามาใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์หลายชนิด ดังนั้นจึงอาจแบ่งการใช้ประโยชน์จากโปรตีนปลาไอโดรไลเซต ดังนี้

1. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์</u>

โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายที่ระดับการย่อยสลายสูง ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์ขนาดเล็กจำนวนมาก จะเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ดีและเหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จึงมีการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (Sen และคณะ, 1962)

2. <u>อาหารสัตว์</u>

จากการศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเซตพบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบถ้วนในปริมาณสูง จึงมีการนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ที่อยู่ในระยะแรกเกิดและที่กำลังเจริญเติบโต เช่น ลูกแกะ ลูกโค และลูกหมู เป็นต้น

Qrskov และคณะ (1982) ศึกษาการนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมาใช้ทดแทนเคซีนในอาหารลูกแกะ โดยทำการศึกษาในหนูทดลอง พบว่า หนูที่ได้รับอาหารที่ประกอบด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซตจะมีอัตราการเติบโตเท่ากับหนูที่ได้รับสารอาหารที่มีเคซีน

Petchy (1982) ศึกษาการใช้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตแทนหางนมผงในอาหารลูกโค พบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมี Apparent Digestibility Coefficient เท่ากับ 0.92 และสมดุลกรดอะมิโนเหมือนกับหางนมผง และสามารถนำโปรตีนไฮโดรไลเซตมาใช้แทนหางนมผงในปริมาณ 1 ใน 3 ส่วนของหางนมผงในสูตรอาหารลูกโค

Boza (1995) ศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนนม โดยศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การกระจายของโมเลกุล คุณค่าทางโภชนาการ ความสามารถในการเป็นแอนติเจน พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นๆที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3000 ดาลตัน คุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้คุณภาพที่ดี มีองค์ประกอบของไนโตรเจน สูงและมีความสามารถทางชีวภาพเมื่อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (D, L methionine+ casein) มีความสามารถในการเป็นแอนติเจนต่ำกว่า ß-lactoglobulin และแสดงความสามารถในการรักษาโรคในสัตว์จำพวกหมู

Green และ Mattick (1979) ใช้ปลาป่นเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ปาเปน จะได้กรดอะมิโนที่ให้กลิ่นคล้ายเคซีน ใช้เป็นอาหารไก่และหมูได้

3. อาหารมนุษย์

ปัจจุบันได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต เพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีสมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี และเหมาะสมต่อการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารของมนุษย์ เช่น ขนมอบ คุกกี้ เป็นต้น และสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารได้ด้วย

Yu และ Tan (1990) ทดลองนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตจากปลา *Oreochromis mossambicus* มาใช้ในการผลิตข้าวเกรียบปลา พบว่า ข้าวเกรียบปลาที่เติมโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตปริมาณร้อยละ 10 จะมีอัตราการพองตัวสูงสุด และมีค่าคะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้านสี ความกรอบ ลักษณะปรากฏที่ดีกว่าข้าวเกรียบที่ไม่มีการเติมโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

สุปราณี (2539) ศึกษาการนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาทรายแดงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเติมลงในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแฟรงเฟอร์เตอร์หมูในปริมาณร้อยละ 0 3 6 และ 9 พบว่าการเติมในปริมาณร้อยละ 3 จะทำให้ไส้กรอกมีความสามารถในการอุ้มน้ำและมีความคงตัวของอิมัลชันสูงสุด และได้รับการยอมรับทางประสาทสัมผัสในด้าน สี เนื้อสัมผัส และความชุ่มฉ่ำที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแฟรงเฟอร์เตอร์หมูที่เติมโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตยังคงมีกลิ่นคาวปลาอยู่ ทำให้ไม่ได้รับการยอมรับในด้านกลิ่นของผลิตภัณฑ์

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 วัตถุดิบ และสารเคมี

1. ปลาดาบเงิน (Largehead hairtail) จากตลาดทะเลไทย อ. เมือง จ. สมุทรสาคร
2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
3. กรดบอริก (H_3BO_3) E. Merck, ประเทศเยอรมัน
4. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) J. T. Bakeer, ประเทศสหรัฐอเมริกา
5. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) Mallinck rodt Chemical, ประเทศสหรัฐอเมริกา
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) E. Merck, ประเทศเยอรมัน
7. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) E. Merck, ประเทศเยอรมัน
8. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) Carlo Erba Reagent, ประเทศสหรัฐอเมริกา
9. ซิลิเนียมออกไซด์ (SeO_2) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
10. เมทิลลีนบูล (Methylene blue) J. T. Bakeer, ประเทศสหรัฐอเมริกา
11. เมทิลเรด (Methyl red) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
12. กรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA) Fluka Chemika, ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
13. กลีเซอรีน (glycerine) Ajax Finecham, ประเทศออสเตรเลีย
14. ฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) E. Merck, ประเทศเยอรมัน
15. แมกนีเซียมออกไซด์ (Mg_2O) E. Merck, ประเทศเยอรมัน

3.2 เครื่องมือ-ครุภัณฑ์

1. ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น UM30D ยี่ห้อ Memmert ประเทศอังกฤษ
2. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter รุ่นAE-200 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter รุ่นAE-200 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
4. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)
5. ชุดกรองแบบสุญญากาศ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยวง (Centrifuge) รุ่น PK131R ยี่ห้อ A.L.C. ประเทศฝรั่งเศส
7. เครื่องย่อยโปรตีน Unit K-424 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
8. เครื่องกลั่นโปรตีน Unit K-314 ประเทศสวิสเซอร์แลนด์
9. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น 3015 ยี่ห้อ QFL ประเทศเยอรมัน
10. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
11. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21

12. เครื่อง Vortex mixer รุ่น G-560E ยี่ห้อ Bohemia ประเทศสหรัฐอเมริกา
13. ตู้อบลมร้อนอเนกประสงค์ (โครงงานวิจัยของนักศึกษาคณะวิศวกรรมศาสตร์ ภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล มหาวิทยาลัยสยาม)
14. เครื่องบดเนื้อ
12. อ่างควบคุมอุณหภูมิ

3.3 การทดลองหรือเก็บข้อมูล

3.3.1 การเตรียมวัตถุดิบและการร้อยละของผลผลิต

1. แล่เนื้อปลาดาบเงิน โดยตัดส่วนหัว ก้าง และลำไส้ทิ้ง
2. ขูดเนื้อปลาออกจากหนังปลา
3. สับเนื้อปลาให้ละเอียด แล้วนำไปวางบนตะแกรง
4. นำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ นำมาบดเป็นผง
5. การหาร้อยละของผลผลิต (%yield) ของเนื้อปลาดาบเงินที่ได้

<u>วิธีการหาร้อยละของผลผลิต</u>

1. ชั่งน้ำหนักปลาทั้งตัว และจดบันทึกน้ำหนักโดยละเอียด
2. นำปลาที่บันทึกน้ำหนักแล้วไปแล่เนื้อปลา โดยตัดส่วนหัว ก้าง และลำไส้ทิ้ง
3. ขูดเนื้อปลาออกจากหนังปลา สับเนื้อปลาให้ละเอียด
4. นำไปชั่งน้ำหนัก และจดบันทึกน้ำหนักโดยละเอียด
5. นำไปวางบนตะแกรง เข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส
6. อบจนได้น้ำหนักคงที่ และจดบันทึกน้ำหนักโดยละเอียด
7. นำน้ำหนักที่ได้มาคำนวณหาร้อยละของผลผลิต (ฐานแห้ง)

3.3.2 การสกัดแยกไขมันออกจากเนื้อปลา

1. นำเนื้อปลาดาบเงินอบแห้งที่เตรียมได้จากข้อ 1.5.1 ละลายใน 95% เอธิลแอลกอฮอลล์ (อัตราส่วน 1:2)
2. แยกเนื้อปลาออกโดยการกรอง และล้างด้วยตัวทำละลายอินทรีย์อีกสองครั้ง
3. ระเหยตัวทำละลายอินทรีย์ออก
4. นำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนได้น้ำหนักคงที่ จะได้เนื้อปลาที่ปราศจากไขมัน
5. นำมาบดเป็นผงจะได้เนื้อปลาที่ปราศจากไขมันเพื่อใช้ทดลองต่อไป

3.3.3 การศึกษาผลของสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

3.3.3.1 ศึกษาผลของสัดส่วนสารตั้งต้นต่อปริมาณกรด

1) แปรสัดส่วนของโปรตีนปลาต่อกรดที่ระดับ 1:1 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ในขวดดูแรน (Duran Bottle)

2) นำไปย่อยในเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 2 ชั่วโมง ความเข้มข้นกรด 6 โมลาร์

3) นำของเหลวที่ได้ตั้งไว้ที่อุณภูมิห้อง และปรับพีเอชด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 50 จนกระทั่งสารละลายมีพีเอช 6

4) กรองแยกกากออก

5) เก็บสารละลายที่ได้เพื่อไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพ โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ด้วย ANOVA

3.3.3.2 ศึกษาผลของปัจจัยทางด้าน เวลาในการย่อย

สัดส่วนของโปรตีนปลาต่อกรดที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิต (%Yield) สูงสุด จากการทดลองที่ 1.5.3.1 และทำการย่อยตามวิธีการในข้อ 1.5.3.1

1) แปรปัจจัยด้านเวลาในการย่อย ที่ระยะเวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง

2) วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตตามวิธีการทดลองในข้อ1.5.3.1

3) เก็บสารละลายที่ได้เพื่อไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและสมบัติทางกายภาพ วางแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ด้วย ANOVA

3.3.4 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.3.4.1 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (ดัดแปลงจาก Qi และ คณะ, 1997)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. นำโปรตีนไฮโดรไลเซต และ Trichloroacetic acid (TCA) ความเข้มข้น 10% ในสัดส่วนที่เท่ากันใส่หลอด เซนตริฟิวส์

2. เขย่าให้เข้ากัน 2 นาที

3. นำไปเซนตริฟิวส์ด้วยความเร็ว 3,500 รอบ/นาที นาน 15 นาที

4. นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (AOAC, 2000) และคำนวณตามสูตร

$$\text{ระดับการย่อยสลาย DH (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายใน TCA}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}} \times 100$$

$$\text{ความยาวของสายเพปไทด์} = \frac{100}{\text{DH}}$$

3.3.4.2 การหาปริมาณ α - Amino acid

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. Formaldehyde Nitrogen (AOAC, 1995)

1. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต 1 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 มิลลิลิตร
2. ปิเปตน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร ผสมลงในตัวอย่าง
3. นำสารละลายที่ได้ไปปรับค่า pH ให้มีค่า 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์
4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ที่ปรับค่า pH เป็น 9.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ผสมลงไป 10 มิลลิลิตร
5. ทำการไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนกว่าสารละลายจะมี pH เท่ากับ 9 จึงหยุดทำการไตเตรต บันทึกค่าของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต
6. ค่า Formaldehyde nitrogen จะได้จากการคำนวณจากสูตร

$$X = 14YM$$

เมื่อ X คือ ปริมาณของ Formaldehyde ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (โมลาร์)

Y คือ ปริมาณของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร) เข้มข้น 0.1 โมลาร์

M คือ ค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (มิลลิลิตร) เข้มข้น 0.1 โมลาร์

2. Ammonical nitrogen (AOAC, 1995)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1. ใช้ปิเปตขนาด 5 มิลลิลิตร ดูดสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซต 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอด Kjeldahl
2. ตวงน้ำกลั่นใส่ลงในหลอดทดลอง 45 มิลลิลิตร

3. ชั่ง MgO 3 กรัม ใส่ลงในหลอดทดลอง จากนั้นเติมน้ำกลั่นเพิ่มอีก 100 มิลลิลิตร
4. นำไปทำการกลั่นด้วยเครื่องกลั่นวิเคราะห์โปรตีนเพื่อเก็บ Ammonical nitrogen ลงในสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาณ 50 มิลลิลิตร ที่หยด Methyl red-bromocresol green indicator จำนวน 4-5 หยด
5. นำส่วนที่เก็บได้จากข้อ 4 ไปทำการไตเตรตด้วยกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เพื่อหาจุดยุติ บันทึกปริมาณกรดซัลฟิวริกที่ใช้ในการไตเตรต
6. ค่า Ammonical acid nitrogen จะได้จากการคำนวณจากสูตร

$$X = 5.6YM$$

เมื่อ X คือ ปริมาณของ Ammonical nitrogen ในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (โมลาร์)
Y คือ ปริมาณของสารละลายกรดซัลฟิวริก (มิลลิลิตร) เข้มข้นประมาณ 0.05 โมลาร์
M คือ ค่าความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายกรดซัลฟิวริก (มิลลิลิตร) เข้มข้น 0.05 โมลาร์

7. เมื่อได้ค่า Formaldehyde nitrogen และ Ammonical nitrogen นำค่าทั้งสองไปคำนวณหาค่า α - Amino acid ตามสูตร

Amino acid = Formaldehyde nitrogen – Ammonical nitrogen

3.3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (AOAC, 2000)

โดยใช้เครื่อง Buchi แบ่งวิธีการออกเป็น 2 ส่วนคือ

1) ขั้นตอนการย่อย (เครื่อง Buchi Digestion Unit K)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เปิดเครื่องปรับความร้อนไปที่เบอร์ 7
2) ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ผสมกับ Selenium mixture (Na_2So_4 ร้อยละ 96 + $CuSo_4$ ร้อยละ 3.5 + SeO_2 ร้อยละ0.5) 10 กรัม แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร ลงในหลอด Buchi
3) ต่อหลอด Buchi เข้าช่องที่ไม่มีความร้อนเพื่อพักไว้ ปิดฝาแล้วกดล็อก
4) ต่อขั้วน้ำเข้าทางด้านหลังของเครื่อง เปิดน้ำ (เพื่อจับไอกรดที่เกิดขึ้น)
5) ย้ายหลอด Buchi ไปยังช่องที่มีความร้อนปรับความร้อนลงมาที่เบอร์ 8
6) ทิ้งไว้ให้เครื่องทำงาน (ประมาณ 45 นาที หรือจนตัวอย่างใส) ขณะเครื่องทำงานสามารถยกดูได้
7) หากตัวอย่างใสยกหลอด Buchi ไปยังช่องที่ไม่มีความร้อนแต่ยังเปิดน้ำอยู่
8) ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ปิดน้ำแล้วจึงปิดเครื่อง

2) ขั้นตอนการกลั่น (เครื่อง Buchi Distillation Unit K)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เตรียม Boric Acid ความเข้มข้นร้อยละ 4 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยด Methyl Red + Methylene Blue เป็นอินดิเคเตอร์ โดยในแต่ละขวดควรมีสีเหมือนกัน
2) นำตัวอย่างที่รอให้เย็นจากการย่อยมาเติมน้ำกลั่นหลอดละ 50 มิลลิลิตร
3) ต่อหลอด Buchi เข้ากับเครื่องกลั่น แล้วจึงเปิดเครื่อง
4) เติม NaOH ความเข้มข้นร้อยละ 32 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร หรือจนตัวอย่างเปลี่ยนสี
5) เปิด Stream on (หากอุณหภูมิของตัวอย่างต่ำจะเกิดเสียงดังในช่วงแรก)
6) ใช้เวลาในการกลั่นประมาณ 3-4 นาที (ตัวอย่างเดียวกันควรใช้เวลาเท่ากัน)
7) ปิด Stream on แล้วจึงปิดเครื่อง
8) นำตัวอย่างที่ได้ไปไตเตรทหาปริมาณโปรตีนกับ HCI 0.1 นอร์มัล จดปริมาตร HCI ที่ใช้ในการไตเตรท

<u>การคำนวณ</u>

$$\text{Total Nitrogen (g/l)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (\%)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times 6.25}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

a = ปริมาณของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรทตัวอย่างอาหาร (มิลลิลิตร)

b = ปริมาณของ HCl ที่ใช้ในการไตเตรท Blank (มิลลิลิตร)

N = นอร์มัลของ HCl

3.3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น (AOAC, 2000)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) อบจานอะลูมิเนียมพร้อมด้วยฝาปิดในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง
2) นำมาใส่ เดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นนำไปชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน
3) ชั่งตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ใส่ในจานอะลูมิเนียม ประมาณ 2-5 กรัม
4) อบในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง
5) นำมาใส่ เดซิเคเตอร์ ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่ง

6) นำตัวอย่างไปอบซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่ (ค่าที่ได้แตกต่างไม่เกิน 0.05 กรัม) และคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณความชื้น (\% wet basis)} = \frac{(W_2 - W_3)}{(W_2 - W_1)} \times 100$$

W_1 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียม หน่วยเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียม แล่ตัวอย่างก่อนอบ หน่วยเป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักของจานอะลูมิเนียม แล่ตัวอย่างหลังอบ หน่วยเป็นกรัม

3.3.4.5 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) นำ ครูซิเบิล มาเผาและชั่งน้ำหนักให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน

2) ชั่งโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต 5 กรัม ใส่ลงในcrucible ไประเหยบน hotplate ก่อนแล้วนำไปเผาในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส นาน 2-3 ชั่วโมง จนกระทั้งได้เถ้าสีขาว

3) เอาออกจากเตาเผา ทำให้เย็นใน เดซิเคเตอร์ แล้วนำมาชั่ง

4) นำมาเผาต่อจนได้น้ำหนักต่างกันไม่เกิน 12 มิลลิกรัม และคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{(W_2 - W_3)}{(W_2 - W_1)} \times 100$$

W_1 คือ น้ำหนักของ ครูซิเบิล หลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ หน่วยเป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของ ครูซิเบิล หลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ และตัวอย่างก่อนอบ หน่วยเป็นกรัม

W_3 คือ น้ำหนักของ ครูซิเบิล หลังจากเผาจนได้น้ำหนักคงที่ และตัวอย่างหลังอบ หน่วยเป็นกรัม

3.3.4.6 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน (AOAC, 2000)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) ชั่งตัวอย่างประมาณ 5 กรัม ไปอบที่อุณหภูมิ 103 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงหรือจนน้ำหนักคงที่

2) นำของแข็งจากข้อ 1 ใส่ลงในทิมเบิล (Thimble) ให้หมด ปิดด้วยสำลีที่สกัดเอาไขมันออกแล้วนำ Thimble ใส่ใน Extraction units ของ Soxhlet Apparatus เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ใน

Soxhlet Flask ให้มีปริมาณเพียงพอที่จะทำให้เกิดการสกัดอย่างสมบูรณ์ (ประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของขนาดของขวด) ต่อ Soxhlet Flask และ Extraction units เข้ากับ Condenser

4) สกัดไขมันใช้เวลาประมาณ 4 ชั่วโมง รักษาปริมาตรปิโตรเลียมอีเทอร์ใน Extraction units ให้คงที่ ปิดเตาให้ความร้อนเพื่อปิโตรเลียมอีเทอร์หยุดการสกัดตัวอย่าง

5) ระเหยปิโตรเลียมอีเทอร์ออกจาก Soxhlet Flask โดยใช้เครื่อง Rotary Evaporator จากนั้นอบในตู้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ประมาณ 45 นาที ปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (dessicator)

6) ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาปริมาณไขมันตามสูตร

$$\text{ปริมาณไขมัน (\% dry basis)} = \frac{\text{ปริมาณไขมันที่สกัดได้} \times 100}{100 - \text{ปริมาณความชื้น (\%)}}$$

3.3.4.7 การหาค่าปริมาณเกลือ (AOAC, 2000)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 -15 กรัม (น้ำหนักแน่นอน) ในถ้วยกระเบื้องเคลือบ (crucible) ถ้าเป็นตัวอย่างเหลวต้องนำไปอบระเหยน้ำที่อุณหภูมิ 100 – 120 องศาเซลเซียส จนแห้งก่อน

2) เผาตัวอย่างในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500 – 550 องศาเซลเซียส ให้เป็นเถ้า

3) ละลายเถ้าด้วยน้ำกลั่น โดยพยายามใช้น้ำให้น้อยที่สุด

4) เติมสารละลายโปแตสเซียมโครเมต ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร1 มิลลิลิตร เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ เขย่าให้เข้ากัน

5) ไตเตรตสารละลายที่ได้กับสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จนมีสีส้มปรากฏขึ้น

6) จดปริมาตรสารละลายซิลเวอร์ไนเตรทที่ใช้ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ คำนวณปริมาณของเกลือในตัวอย่างตามสูตร

$$\text{ปริมาณเกลือ (\%)} = \frac{\text{จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย } AgNO_3 \text{ ที่ใช้ไตเตรต} \times 0.005844 \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

3.3.5 การวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ

3.3.5.1 การวัดค่าความหนืด (Brookfield Viscometer)

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เปิดสวิตซ์ Power เช็คระดับลูกน้ำ

2) ใส่หัววัดพร้อมทั้งหมุนสกรูเพื่อให้หัวที่ใช้จุ่มลงในตัวอย่างไฮโดรไลเซตจนถึงขีดที่กำหนดไว้บนหัววัดความหนืด (ในการทดลองนี้ใช้หัววัด LV 1)

3) ปรับปุ่มความเร็วรอบที่ใช้วัดความหนืดไปยังความเร็วรอบที่ต้องการ (ในการทดลองนี้ใช้ความเร็วรอบที่ 30 รอบต่อนาที)

4) เปิดสวิตซ์ เมื่อมีตัวเลขที่ปรากฏให้ปรับจนค่าที่ได้เป็น 0

5) เปิดสวิตซ์มอเตอร์ อ่านค่าความหนืดสูงสุดที่วัดได้ บันทึกผล

6) นำค่าที่วัดได้ไปคูณกับ factor ที่กำหนด

3.3.5.2 การวัดค่าสีในระบบ L* a* b* (Colorimeter) Hunter lab รุ่น Color Flex 4510

<u>วิธีการทดลอง</u>

1) เปิดคอมพิวเตอร์และเลือกโปรแกรมสำเร็จรูป

2) ตรวจสอบการทำงานของเครื่องก่อนใช้ตามคู่มือการ Calibrate ของเครื่อง

3) ทำการเทียบมาตรฐาน (Calibrate) เครื่องวัดค่าสีด้วยแผ่นเทียบสีมาตรฐาน ดังนี้

3.1 เลือก standardize แล้วเลือกขนาด Port 0.5 นิ้ว

2.2 วางแผ่นสีดำโดยวางด้านสีดำมันลงบน Port

3.3 วางแผ่นสีขาวโดยให้จุดสีขาวบนแผ่นสีอยู่กึ่งกลาง Port

4) กำหนดค่าในการวัด โดยเลือก active view

4.1 Scale เลือก CIE Lab เพื่อให้เครื่องวัดค่าสีในระบบ Hunter lab (ค่าที่วัดได้จะเป็นค่า L*, a*, b*)

4.2 Illuminant เลือกเพื่อกำหนดแหล่งกำเนิดแสงที่ใช้ เลือก D65

5) บรรจุตัวอย่างลงถ้วยแก้วสำหรับใส่ตัวอย่าง และวางลงบน Port แล้วปิดฝาครอบเพื่อมิให้แสงรบกวนจากภายนอก

6) เริ่มวัดค่าสีโดย เลือก read sample และรอจนเครื่องอ่านค่าเสร็จ โดยจะอ่านค่าออกมาเป็น L*, a*, b*

<u>หมายเหตุ</u>

1. ค่า L* ใช้กำหนดความสว่าง (Lightness)
   L* = 0 หมายถึง Perfect black sample L* = 100 หมายถึง Perfect white sample
2. ค่า a* ใช้กำหนดสีแดง หรือสีเขียว
   a* มีค่า (+) จะมีสีแดง a* มีค่า (-) จะมีสีเขียว
3. ค่า b* ใช้กำหนดสีเหลือง หรือสีน้ำเงิน
   b* มีค่า (+) จะมีสีเหลือง b* มีค่า (-) จะมีสีน้ำเงิน

บทที่ 4
การวิเคราะห์ข้อมูล : ผลการทดลอง

4.1 การศึกษาคุณสมบัติวัตถุดิบ และการเตรียมวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

4.1.1 การศึกษาหาปริมาณโปรตีน และร้อยละของผลผลิตของเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง

ตารางที่ 1 ปริมาณโปรตีนของเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง (AOAC, 2000)

ชนิดของปลา	ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	โปรตีน (%)
ดาบเงิน	14.30	89.35

จากตารางที่ 1 พบว่าปลาดาบเงินอบแห้งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 14.30 เมื่อนำมาคำนวณหาปริมาณโปรตีนพบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 89.35 ซึ่งมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงและเหมาะที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 2 ร้อยละของผลผลิต (%Yield) ของเนื้อปลาดาบเงิน

ปลา	ร้อยละของผลผลิต (%yield)	
	น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง
ดาบเงิน	43.97	8.94

จากตารางที่ 2 พบว่าปลาดาบเงินมีร้อยละของผลผลิต (%yield) ฐานเปียกเป็น 43.97 และร้อยละของผลผลิต (%yield) ฐานแห้งเป็น 8.94 ซึ่งลักษณะของเนื้อปลาอบแห้งจะมีกลิ่นหอมเฉพาะตัวของเนื้อปลาอบ เมื่อแห้งเนื้อจะแข็งติดกัน มีสีน้ำตาลปานกลาง ดังรูปที่ 1

รูปที่ 1 ลักษณะของเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง

4.1.2 การสกัดแยกไขมันออกจากเนื้อปลา

เมื่อได้เนื้อปลาอบแห้ง จะนำมาสกัดแยกไขมันโดยใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ จะได้เนื้อปลาบดอบแห้ง ดังรูปที่ 2 และ 3

จากรูปที่ 2 ก่อนทำการแยกไขมันออกจากเนื้อปลา ลักษณะของเนื้อปลาดาบเงินบดอบแห้งจะมีสีน้ำตาลปานกลาง มีกลิ่นหอมของเนื้อปลาอบแห้ง เมื่อทำการแยกไขมันออกจากเนื้อปลาดังรูปที่ 3 สีของเนื้อปลาดาบเงินบดอบแห้งจะมีสีน้ำตาลอ่อนลง และมีกลิ่นของเนื้อปลาน้อยลง

รูปที่ 2 เนื้อปลาอบแห้งก่อนแยกไขมัน

รูปที่ 3 เนื้อปลาอบแห้งหลังแยกไขมัน

4.2 ผลของสัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

4.2.1 ลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่แปรสัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด

ที่สัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดเท่ากับ 1:1 ลักษณะปรากฏของเนื้อปลาก่อนทำการย่อยเนื้อปลา มีการดูดซับสารละลายกรด แต่ปริมาณกรดน้อยดูดซับไม่ทั่วถึง และมีความหนืดมาก เมื่อเสร็จสิ้นการย่อยเกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลา กับสารละลายเพียงเล็กน้อยโดยเนื้อปลาจะลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลาย ชั้นบนจะเป็นสีน้ำตาลเข้มของเนื้อปลา ชั้นล่างเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ

ที่สัดส่วนโปรตีนปลาปริมาณกรดเท่ากับ 1:2 ลักษณะปรากฏของเนื้อปลาก่อนทำการย่อยเนื้อปลามีการดูดซับสารละลายกรด เกิดการพองตัวมากที่สุด และมีความหนืดมาก เมื่อเสร็จสิ้นการย่อยเกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลาย โดยเนื้อปลาจะลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลาย ชั้นบนจะเป็นสีน้ำตาลเข้มของเนื้อปลา ชั้นล่างเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ

ที่สัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดเท่ากับ 1:3 ลักษณะปรากฏของเนื้อปลาก่อนทำการย่อยเนื้อปลามีการพองตัว แยกชั้นกับสารละลายกรด โดยเนื้อปลาอยู่ด้านล่าง และสารละลายกรด

อยู่ด้านบน เมื่อเสร็จสิ้นการย่อยมีการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลาย โดยเนื้อปลาจะลอยอยู่ด้านบนของสารละลาย ชั้นบนจะเป็นสีน้ำตาลเข้มของเนื้อปลา ชั้นล่างเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้ม

ที่สัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดเท่ากับ 1:4 ลักษณะปรากฏของเนื้อปลาก่อนทำการย่อยเนื้อปลามีการพองตัว แยกชั้นกับสารละลายกรด โดยเนื้อปลาอยู่ด้านล่าง และสารละลายกรดอยู่ด้านบน เมื่อเสร็จสิ้นการย่อยมีการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลาย โดยเนื้อปลาจะลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลาย ชั้นบนจะเป็นสีน้ำตาลเข้มของเนื้อปลา ชั้นล่างเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้ม

ที่สัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดเท่ากับ 1:5 ลักษณะปรากฏของเนื้อปลาก่อนทำการย่อยเนื้อปลามีการพองตัว แยกชั้นกับสารละลายกรด โดยเนื้อปลาอยู่ด้านล่าง และสารละลายกรดอยู่ด้านบน เมื่อเสร็จสิ้นการย่อยมีการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลาย โดยผงเนื้อปลาจะลอยอยู่บนผิวหน้าของสารละลายเพียงเล็กน้อย ดังเช่นรูปที่ 4 และรูปที่ 5

รูปที่ 4 โปรตีนปลาที่ผสมกับกรดไฮโดรคลอริก (ก่อนย่อย) สัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด 1:5

รูปที่ 5 ไฮโดรไลเซตจากปลา สัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด 1:5

4.2.2 ผลของสัดส่วนเนื้อปลาต่อกรดต่อสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 3 สมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีการแปรสัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรดที่ระดับต่างๆ

สมบัติทางเคมี	สัดส่วนโปรตีนปลา : กรดไฮโดรคลอริก				
	1:1	**1:2**	**1:3**	**1:4**	**1:5**
Degree of Hydrolysis	19.96±0.00[a]	12.43±0.02[b]	8.69±0.00[c]	6.90±0.00[d]	5.11±0.02[e]
Formaldehyde Nitrogen (g/L)	26.32±0.00[a]	16.73±0.00[b]	12.08±0.00[c]	10.23±0.00[d]	7.71±0.03[e]
Ammonical Nitrogen (g/L)	4.85±0.03[a]	2.64±0.06[b]	1.86±0.00[c]	1.51±0.00[d]	1.11±0.00[e]
Amino Nitrogen* (g/L)	21.47±0.03[a]	14.09±0.02[b]	10.22±0.00[c]	8.72±0.03[d]	6.60±0.02[e]
Peptide bond length	5.01	8.05	11.51	14.50	19.58

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* Amino nitrogen was the different between Formaldehyde nitrogen and Ammonical nitrogen

จากตารางที่ 3 พบว่าระดับการย่อยสลาย มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สัดส่วนเนื้อปลาต่อกรดเท่ากับ 1:1 มีค่ามากที่สุดคือ 19.96 รองลงมาคือ 1:2 ,1:3 , 1:4 และ1:5 ตามลำดับ ซึ่งระดับการย่อยสลายมีค่าดังนี้ 12.43 , 8.69 , 6.90 และ 5.11 ตามลำดับ

ปริมาณอะมิโนไนโตรเจน มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สัดส่วนเนื้อปลาต่อกรดเท่ากับ 1:1 มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 1:2 ,1:3 , 1:4 และ1:5 ตามลำดับ ซึ่งปริมาณอะมิโนไนโตรเจนที่ได้มีค่าดังนี้ 21.47 , 14.09 , 10.22 , 8.72 และ 6.60 ตามลำดับ

ค่าความยาวของสายเพปไทด์ที่สัดส่วนสารตั้งต้นต่อปริมาณกรดของ 1:5 มีความยาวมากที่สุดคือ 19.58 รองลงมาคือ 1:4 , 1:3 , 1:2 และ1:1 ตามลำดับ ซึ่งความยาวของสายเพปไทด์มีค่าดังนี้ 14.50 , 11.51 , 8.05 และ 5.01 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการแปรสัดส่วนสารตั้งต้นต่อปริมาณกรด ระดับการย่อยสลาย , ปริมาณกรดอะมิโน และอัตราส่วนของอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมด ที่สัดส่วนโปรตีนปลาต่อปริมาณกรดที่ 1:1ให้ค่ามากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสัดส่วนสารตั้งต้นต่อปริมาณกรดที่ 1:1 ในการศึกษา การแปรระยะเวลาในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไป

4.3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

4.3.1 ลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการแปรระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย

ตารางที่ 4 ลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการแปรเวลาที่ใช้ในการผลิต

เวลาที่ใช้ย่อย (ชั่วโมง)	ลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้	สีของสารละลาย
2	เกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลายไฮโดรไลเซต สารละลายมีสีน้ำตาลเข้ม	+++
4	เกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลายไฮโดรไลเซต สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มปานกลาง	++++
6	เกิดการแยกชั้นระหว่างเนื้อปลากับสารละลายไฮโดรไลเซต สารละลายมีสีน้ำตาลเข้มมาก	+++++

หมายเหตุ

+++++	สีสารละลายน้ำตาลเข้มมาก
++++	สีสารละลายน้ำตาลปานกลาง
+++	สีสารละลายน้ำตาลเข้ม
++	สีสารละลายน้ำตาลอ่อน
+	สีสารละลายน้ำตาลอ่อนที่สุด

จากตารางที่ 4 พบว่าสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่สภาวะการย่อยความเข้มข้นกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลาร์ เวลาที่ใช้ในการย่อย 2 ชั่วโมง มีสีน้ำตาลเข้ม เมื่อเพิ่มเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็น 4 ชั่วโมง ไฮโดรไลเซตที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มปานกลาง และเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยเป็น 6 ชั่วโมง ไฮโดรไลเซตที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มมาก ดังรูปที่ 4.3

รูปที่ 6 โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการแปรเวลาที่ใช้ในการย่อยที่ 2, 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ (จากซ้ายไปขวา)

4.3.2 ผลของระยะเวลาในการย่อยต่อสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 5 สมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีการแปรระยะเวลาในการย่อย

สมบัติทางเคมี	ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)		
	2	4	6
Degree of Hydrolysis	13.99 ± 0.65^{ns}	14.92 ± 0.62^{ns}	15.33 ± 0.60^{ns}
Formaldehyde Nitrogen (g/L)	27.31 ± 1.42^{b}	30.97 ± 0.48^{a}	26.86 ± 0.39^{b}
Ammonical Nitrogen (g/L)	6.76 ± 0.23^{b}	8.38 ± 0.19^{a}	5.85 ± 0.20^{c}
Amino Nitrogen* (g/L)	20.54 ± 1.33^{b}	22.59 ± 0.47^{a}	21.01 ± 0.22^{ab}
Peptide bond length	7.16	6.71	6.53

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

* Amino nitrogen was the different between Formaldehyde nitrogen and Ammonical nitrogen

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการย่อย 2 , 4 และ6 ชั่วโมงมีค่าดังนี้ 19.62 , 18.42 และ 20.52 ตามลำดับ ซึ่งเวลาที่ใช้ในการย่อย 6 ชั่วโมงมีระดับการย่อยสลายที่มากที่สุด

ค่าความยาวของสายเปปไทด์ ณ เวลาที่ใช้ในการย่อย 2 , 4 และ 6 ชั่วโมงมีค่าดังนี้ 5.10 , 5.43 และ 4.87 ตามลำดับ ซึ่งเวลาที่ใช้ในการย่อย 6 ชั่วโมงจะให้ความยาวสายเปปไทด์สั้นที่สุด

ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนที่เวลา 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณอะมิโนไนโตรเจนที่ได้มีค่าดังนี้ 25.31, 23.39 และ 22.34 ตามลำดับ

อัตราส่วนของอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมดที่เวลาในการย่อย 6 ชั่วโมง มีค่ามากที่สุด รองลงมาคือ รองลงมาคือ 4 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีค่าดังนี้ 0.64, 0.59 และ 0.58 ตามลำดับ

จากผลการทดลองการแปรระยะเวลาในการย่อย พบว่า ระดับการย่อยสลาย , ปริมาณกรดอะมิโน และอัตราส่วนของอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมด ที่เวลา 6 ชั่วโมงให้ค่ามากที่สุด

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าระดับการย่อยสลาย (DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ใช้เวลาในการย่อย 2, 4, และ 6 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับร้อยละ 13.99, 14.92 และ 15.33 ตามลำดับ โดยเวลาที่ใช้ในการย่อย 6 ชั่วโมงมีระดับการย่อยสลายมากที่สุด ค่าความยาวของสายเพปไทด์ ณ เวลาที่ใช้ในการย่อย 2, 4, และ 6 ชั่วโมง มีค่าลดลงเท่ากับ 7.16, 6.71 และ 6.53 ตามลำดับ โดยเวลาที่ใช้ในการย่อย 6 ชั่วโมงมีความยาวสายเพปไทด์สั้นที่สุด อย่างไรก็ตามระดับการย่อยและความยาวของสายเพปไทด์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมนิคอลไนโตรเจน และ อะมิโนไนโตรเจน จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย โดยอะมิโนไนโตรเจนจะเพิ่มจาก 27.31, 6.76 และ 20.54 (กรัม/ลิตร) ไปเป็น 30.97, 8.38 และ 22.59 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ แต่เมื่อระยะการย่อยดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 6 พบว่าปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมนิคอลไนโตรเจน และ อะมิโนไนโตรเจน จะลดลง 26.86, 5.85 และ 21.01 (กรัม/ลิตร) ตามลำดับ โดยปริมาณฟอร์มัลดีไฮด์ไนโตรเจน แอมโมนิคอลไนโตรเจน และ อะมิโนไนโตรเจน จะมีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4

ค่าอะมิโนไนโตรเจนระหว่างเวลาที่ใช้ย่อย 4 และ 6 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่แตกต่างจากเวลาในการย่อยที่ 2 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.3.3 ผลของระยะเวลาในการย่อยต่อองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 6 ผลของเวลาในการย่อยต่อปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และ ความชื้นของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

องค์ประกอบทางเคมี	ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)		
	2	4	6
Protein (%)	26.42 ± 1.63^{ns}	26.33 ± 1.15^{ns}	24.50 ± 0.15^{ns}
Fat (%)	0.10 ± 0.05^{ns}	0.13 ± 0.28^{ns}	0.14 ± 0.07^{ns}
Ash (%)	15.02 ± 0.17^{b}	15.45 ± 0.13^{a}	15.34 ± 0.13^{a}
Moisture (%)	46.80 ± 0.79^{c}	47.82 ± 0.81^{b}	49.19 ± 1.14^{a}

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 6 ปริมาณโปรตีนจะลดลงตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย โดยลดลงจากร้อยละ 26.42 จนเหลือร้อยละ 24.50 อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนความไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ปริมาณไขมันที่เวลาต่าง ๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่ปริมาณเถ้าจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย โดยระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย 4 และ 6 ชั่วโมง มีปริมาณเถ้ามากกว่าระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย 2 ชั่วโมง

ปริมาณความชื้นของโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย โดยสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตที่ย่อยแล้ว 6 ชั่วโมง มีปริมาณความชื้นมากกว่าเวลาที่ย่อย 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

4.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

ตารางที่ 7 ผลของเวลาในการย่อยต่อปริมาณเกลือของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเกลือ (ร้อยละ)
2	4.91 ± 1.12^{ns}
4	4.97 ± 1.15^{ns}
6	5.99 ± 1.10^{ns}

หมายเหตุ ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากตารางที่ 7 พบว่าปริมาณเกลือของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามระยะเวลาในการย่อย โดยปริมาณเกลือจะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 4.91 (2 ชั่วโมง) เป็นร้อยละ 5.99 (6 ชั่วโมง) แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

4.3.5 ผลของระยะเวลาในการย่อยต่อความหนืดและค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซต

ตารางที่ 8 ผลของเวลาในการย่อยต่อปริมาณความหนืดและค่าสี ของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

สมบัติทางกายภาพ	ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)		
	2	4	6
Viscosity (centipoises)	3.67 ± 0.58^{c}	8.67 ± 0.58^{a}	5.67 ± 0.58^{b}
L*	2.47 ± 0.03^{c}	2.66 ± 0.05^{a}	2.54 ± 0.07^{b}
a*	0.10 ± 0.07^{b}	0.23 ± 0.11^{a}	0.13 ± 0.11^{b}
b*	0.33 ± 0.10^{a}	0.39 ± 0.10^{a}	0.21 ± 0.16^{b}

หมายเหตุ L* = ความสว่าง (lightness)

a* = สีแดง/สีเขียว (redness/greenness)

b* = สีเหลือง/สีน้ำเงิน (yellowness/blueness)

ns คือ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวนอนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 8 พบว่าความหนืดของโปรตีนไฮโดรไลเซตจะเพิ่มขึ้นจาก 3.67 เซนติพอยด์ เป็น 8.67 เซนติพอยด์ เมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้นไปจนถึง 4 ชั่วโมง แต่เมื่อระยะการย่อยดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 6 พบว่าความหนืดของโปรตีนไฮโดรไลเซตจะลดลงเหลือ 5.67 เซนติพอยด์

ค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้น โดยค่า L* ซึ่งบ่งบอกถึงความสว่างของโปรตีนไฮโดรไลเซต มีค่าเพิ่มจากชั่วโมงที่ 2 จนถึง ชั่วโมงที่ 4 และความสว่างลดลงเล็กน้อยเมื่อย่อยจนถึงชั่วโมงที่ 6 ส่วนค่า a* ซึ่งแสดงโปรตีนไฮโดรไลเซตมีลักษณะสีแดง โดยค่า a* มีค่าสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 4 และลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 6 แสดงว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีค่าสีแดงเพิ่มขึ้น ในขณะที่พิจารณาค่าสีเหลือง (b*) จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น

บทที่ 5
อภิปราย : สรุปและวิจารณ์ผล

5.1 การเตรียมวัตถุดิบและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลาดาบเงิน

5.1.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และร้อยละของผลผลิตของเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง

นำเนื้อปลาดาบเงินที่ได้จากการอบแห้งมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี พบว่ามีปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า เท่ากับร้อยละ 80.08, 88.43, 0.39 และ 3.57 ตามลำดับ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ของ Bykov, (1983) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน และจากผลการทดลองเนื้อปลาดาบเงินอบแห้งมีปริมาณโปรตีนเท่ากับร้อยละ 89.35 และมีร้อยละผลผลิตน้ำหนักเปียกเท่ากับร้อยละ 43.97 น้ำหนักแห้งร้อยละ 8.94

5.1.2 การสกัดแยกไขมันออกจากเนื้อปลา

การสกัดแยกไขมันออกจากเนื้อปลานั้นโดยใช้ เอทานอลร้อยละ 95 ในอัตราส่วนของเนื้อปลาดาบเงินต่อเอทานอลร้อยละเท่ากับ 1 ต่อ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร สามารถที่สกัดไขมันออกจากเนื้อปลาได้ปริมาณร้อยละ 68.39 โดยลักษณะปรากฏของเนื้อปลาอบแห้งก่อนสกัดจะมีสีน้ำตาลปานกลาง มีกลิ่นคาวของเนื้อปลาอบแห้ง หลังจากสกัดมีลักษณะสีน้ำตาลอ่อนลง และมีกลิ่นคาวของปลาน้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ รุ่งอรุณ (2545) ที่มีการใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นตัวทำละลายในการสกัดไขมันออกจากหัวและไส้ปลาทรายแดง พบว่าเอทานอลสามารถสกัดไขมันออกจากหัวและไส้ปลาได้ โดยประสิทธิภาพในการสกัดไขมันอยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งการสกัดไขมันออกจากเนื้อปลานั้นมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อที่จะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน และกลิ่นคาวปลาที่เกิดจากปริมาณไขมันและสารประกอบโมเลกุลต่ำ เช่น ไตรเมทิลลามีน (trimethylamine) สารประกอบประเภทซัลไฟด์ และบิวทานอล (2- butanol) (Lalasidis และ คณะ, 1978)

5.2 การแปรสัดส่วนเนื้อปลาต่อกรดต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

5.2.1 ลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการแปรสัดส่วนเนื้อปลาต่อกรด

ทำการแปรสัดส่วนเนื้อปลาต่อกรดไฮโดรคลอริกที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ที่ระดับ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (โดยน้ำหนัก) พบว่าสารละลายไฮโดรไลเซตที่ได้ทุกสิ่งทดลองมีสีน้ำตาลเข้มจนเกือบดำ เนื่องจากการที่โปรตีนถูกย่อยสลายด้วยสารละลายกรด แล้วให้กรดอะมิโนออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด เนื่องจากกรดอะมิโนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลอิสระ เช่น กลูโคส (glucose) ดีออกซีไรโบส (deoxyribose) และ อีโนซิตอล (inositol) (Jarboe และ Mabrouk, 1969) ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในปลาทะเล ได้แก่ กลูโคส (glucose) ไรโบส (ribose) อะราบิโนส (arabinose) (สุทธวัฒน์, 2548)

5.2.2 การศึกษาสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนปลา ณ เวลาต่างๆ

อัตราการย่อยสลายโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ซึ่งจะมีผลต่อสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ จากการทดลองศึกษาผลของสัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด มีผลต่อสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซต

เมื่อมีการแปรสัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด (กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์) ที่ระดับต่างๆ พบว่า ค่าระดับการย่อยสลาย (DH) ค่า Amino nitrogen และ อัตราส่วนของ Amino nitrogen : Total nitrogen ลดลงเมื่อเพิ่มสัดส่วนของโปรตีนปลาต่อกรด ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียว ซึ่งมีค่าทางเคมีข้างต้นสูงขึ้นตามสัดส่วนโปรตีนถั่วเขียวต่อกรดที่มากขึ้น

ค่าระดับการย่อยสลาย (DH) เป็นค่าที่บ่งชี้จำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายไปเป็นกรดอะมิโน และค่าระดับการย่อยสลายมีความสัมพันธ์กับค่าความยาวของสายเปปไทด์ กล่าวคือ ค่าความยาวของสายเปปไทด์จะสั้นลงตามระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ค่า Amino nitrogen จะเป็นค่าที่บ่งชี้ถึงปริมาณกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย แต่จากผลการทดลองเมื่อเพิ่มสัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรด จะทำให้ค่าทางเคมีข้างต้นลดลง อาจเนื่องมาจากปริมาณกรดที่สูงทำให้โปรตีนหรือกรดอะมิโนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติได้

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนปลาด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วคือ สัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรดที่ระดับ 1:1 (โดยน้ำหนัก)

5.3 การแปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

5.3.1 ลักษณะปรากฏของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการแปรเวลาที่ใช้ในการผลิต

ทำการแปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง โดยสภาวะที่ใช้ในการผลิตที่สัดส่วนของโปรตีนต่อกรดไฮโดรคลอริกที่ระดับ 1:1 และความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก 6 โมลาร์ พบว่าเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มมากขึ้น สารละลายไฮโดรไลเซตที่ได้มีสีน้ำตาลเข้มมากขึ้น เนื่องจากการที่โปรตีนถูกย่อยสลายด้วยสารละลายกรด แล้วให้กรดอะมิโนออกมาทำให้เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด เนื่องจากกรดอะมิโนที่ได้จะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลอิสระ ได้แก่ กลูโคส (glucose) ดีออกซีไรโบส (deoxyribose) และ อีโนซิตอล (inositol) (Jarboe และ Mabrouk, 1969) ซึ่งน้ำตาลรีดิวซ์ที่พบในปลาทะเล ได้แก่ กลูโคส (glucose) ไรโบส (ribose) อะราบิโนส (arabinose) ((สุทธวัฒน์, 2548)

สีเป็นคุณลักษณะทางกายภาพที่ต้องคำนึงถึงของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซต โดยสีของผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ กระบวนการผลิต การสกัดไขมัน และการทำแห้ง เป็นต้น (Hoyle และ Merritt, 1994)

5.3.2 การศึกษาสมบัติทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนปลา ณ เวลาต่างๆ

1. การศึกษาระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis)

การแปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้งที่ 2, 4 และ 6 ชั่วโมง พบว่าระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาที่ใช้ในการย่อยเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ค่าความยาวสายเพปไทด์จะสั้นลง ซึ่งระดับการย่อยสลายคือ เปอร์เซนต์พันธะเพปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเพปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ ถ้าค่าระดับการย่อยสลายสูงแสดงว่า โปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เพปไทด์สายสั้น และกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก (สุปราณี, 2539)

ในช่วงแรกของการย่อยสลายระดับการย่อยสลายมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อโปรตีนถูกย่อยสลายโดยกรดจะทำให้เกิดเพปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มมากขึ้น พบว่าค่าระดับการย่อยสลายมีค่าสูงขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้เนื่องจากเกิดการแข่งขันกันระหว่างโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้น และเพปไทด์ที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ในการทำปฏิกิริยากับกรด ความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการย่อยสลายโปรตีนที่มีต่อค่าระดับการย่อยสลายในการทดลองนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของรุ่งอรุณ (2545) และ Sathivel และคณะ, (2003) ที่มีค่าระดับการย่อยสลายสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะแรกของการย่อยสลาย และเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่งค่าระดับการย่อยสลายจะเริ่มมีค่าคงที่

โดยเมื่อพิจารณาจากเวลาที่ใช้ในการย่อยนั้น พบว่ามีระดับการย่อยและความยาวของสายเพปไทด์ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

2. การศึกษาหาปริมาณอะมิโนไนโตรเจน

จากการวิเคราะห์หาปริมาณอะมิโนไนโตรเจน โดยแปรเวลาในการย่อยโปรตีนจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง พบว่าปริมาณอะมิโนไนโตรเจนจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย (2–4 ชั่วโมง) เนื่องจากโปรตีนจะถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้น (สุปราณี, 2539) เมื่อระยะเวลาในการย่อยดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 6 ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อโปรตีนถูกย่อยด้วยกรดเป็นเวลานาน จะทำให้สารประกอบไนโตรเจนถูกทำลายไปบางส่วน ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองของ สุกัญญา, (2533) ซึ่งกล่าวว่า ปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของโปรตีนภายใต้อุณหภูมิและปริมาณกรดสูงจะทำให้กรดอะมิโนบางตัว เช่น ทริปโตเฟน (tryptophan) และซีสเตอีน (cysteine) เกิดการสลายตัว ทำให้ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนลดลงเมื่อระยะเวลาการย่อยดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 6

นอกจากนี้ มีรายงานของ Manley และ Fagerson, (1970) กล่าวว่าเมื่อการย่อยดำเนินมาจนถึงจุดหนึ่ง ทริปโตเฟน (tryptophan) ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจะทำปฏิกิริยากับน้ำตาลอัลโดส (aldose sugar) เกิดปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) ตามด้วย Strecker degradation เพื่อที่จะผลิตสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile substance) เช่น แอลดีไฮด์ (aldehyde) ฮิวมิน (humin) หรือ สารเมลานอยดิน (melanoidin) ทำให้ปริมาณอะมิโนไนโตรเจนลดลง โดยเฉพาะทริปโตเฟน (tryptophan) ไทโรซีน (tyrosine) ซีสเตอีน (cysteine) อาร์จีนีน (arginine) ไลซีน (lysine) และ ฮิสทิดีน (histidine) จะสูญเสียไป

โดยเวลาในการย่อยที่ 4 และ 6 ชั่วโมง จะมีค่าอะมิโนไนโตรเจนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่จะแตกต่างจากเวลาในการย่อยที่ 2 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

3. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซต

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยได้แปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง พบว่าเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มมากขึ้นปริมาณโปรตีนจะลดลง เนื่องจากโปรตีนจะถูกย่อยสลายด้วยกรดเป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์สายสั้น โดยปริมาณโปรตีนจะแปรผกผันกับระดับการย่อยสลาย ระดับการย่อยสลายสูงขึ้นปริมาณโปรตีนจะต่ำลง

การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยแปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้งพบว่า ระยะเวลาการย่อยจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไขมัน เนื่องจากใช้วัตถุดิบชนิดเดียวกัน และในขั้นตอนการเตรียมเนื้อปลาดาบเงินจะมีขั้นตอนการสกัดไขมันดังนั้นเวลาการย่อยสลายไม่มีผลต่อปริมาณไขมัน จากวิเคราะห์ปริมาณเถ้า พบว่าปริมาณเถ้าจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย ระยะเวลาในการย่อยไม่มีผลต่อปริมาณความชื้น แต่ความชื้นที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในขั้นตอนการปรับ pH ให้

เป็นกลางในขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต จึงเกิดปฏิกิริยาสะเทิน (neutralization reaction) ระหว่างกรดและด่าง (HCl – NaOH) ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ เกลือและน้ำ (Raymond, 1998) เมื่อระยะเวลาการย่อยมากขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จะมีความเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลต่อให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น

4. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ โดยได้แปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง พบว่าระยะเวลาในการย่อยไม่มีผลต่อปริมาณเกลือ แต่ปริมาณเกลือที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากผลของปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในขั้นตอนการปรับ pH ให้เป็นกลางในขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต จึงเกิดปฏิกิริยาสะเทิน (neutralization reaction) ระหว่างกรดและด่าง (HCl – NaOH) ได้เป็นผลิตภัณฑ์คือ เกลือและน้ำ (Raymond, 1998) เมื่อระยะเวลาการย่อยมากขึ้น โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จะมีความเป็นกรดมากขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลต่อให้ปริมาณเกลือเพิ่มขึ้น

5.3.3 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนปลา ณ เวลาต่างๆ

1. การวิเคราะห์ความหนืด

การวิเคราะห์ความหนืดด้วยเครื่อง Brookfield Viscometer โดยแปรเวลาที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาดาบเงินอบแห้ง พบว่าความหนืดของโปรตีนไฮโดรไลเซตจะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้น (2–4 ชั่วโมง) เนื่องจากโปรตีนจะถูกย่อยสลายเป็นกรดอะมิโนและเพปไทด์ทำให้มีความความเข้มข้นของอะมิโนไนโตรเจนมากขึ้น ส่งผลให้มีความหนืดมากขึ้นเล็กน้อย แต่เมื่อระยะการย่อยดำเนินมาถึงชั่วโมงที่ 6 พบว่าความหนืดของโปรตีนไฮโดรไลเซตจะลดลง ซึ่งอาจจะเกิดจากการลดลงของกรดอะมิโนและเพปไทด์ เมื่อโปรตีนถูกย่อยด้วยกรดเป็นเวลานาน จะทำสารประกอบไนโตรเจนที่ได้ถูกทำลายไปบางส่วนเกิดเป็นสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) เช่น แอลดีไฮด์ (aldehyde) ฮิวมิน (humin) หรือ สารเมลานอยดิน (melanoidin) (Manley และ Fagerson, 1970) ส่งผลทำให้ความหนืดของสารละลายโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตลดลง โดยปัจจัยที่มีต่อความหนืด คือ ความเข้มข้น ซึ่งในกรณีที่เป็นที่สารผสมหรือสารละลาย (solution) ความเข้มข้นของตัวถูกละลายจะมีผลต่อความหนืดของสารละลายคือ ถ้าสารละลายมีความเข้มข้นสูง ค่าความหนืดจะสูงขึ้นไปด้วย (Malcolm, 2002)

2. การวิเคราะห์สี

การวิเคราะห์สีด้วยเครื่องวัดสี Hunterlabรุ่น ColorFlex ด้วยระบบ L, a, b ซึ่งค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซตเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาย่อยเพิ่มขึ้น โดยค่า L* ซึ่งบ่งบอกถึงความสว่างของโปรตีนไฮโดรไลเซต มีค่าเพิ่มจากชั่วโมงที่ 2 จนถึง ชั่วโมงที่ 4 และความสว่างลดลงเล็กน้อยเมื่อย่อยจนถึงชั่วโมงที่ 6 ส่วนค่า a* ซึ่งแสดงโปรตีนไฮโดรไลเซตมีลักษณะสีแดง โดยค่า a* มีค่าสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 4 และลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 6 แสดงว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีค่าสีแดงเพิ่มขึ้น ในขณะที่พิจารณาค่าสีเหลือง (b*) จะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ดังนั้นผลการทดลองสรุปได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจะมีค่าความสว่าง (L*) ลดลง มีค่าสีแดง (a*) เพิ่มขึ้น และมีค่าสีเหลือง (b*) ลดลง ซึ่งเป็นผลจากปฏิกิริยาเมลลาร์ด (maillard reaction) ระหว่างกรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวซ์ Manley และ Fagerson (1970) ทั้งนี้สีของผลิตภัณฑ์โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต Hoyle และ Merritt (1994)

ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนปลาด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วคือ สัดส่วนโปรตีนปลาต่อกรดไฮโดรคลอริกที่ระดับ 1:1 (โดยน้ำหนัก) และเวลาในการย่อย 4 ชั่วโมง

5.4 ข้อเสนอแนะ

1. ควรทดลองใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้เป็นสารให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหาร
2. ควรศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตเพื่อประยุกต์ใช้ได้กว้างขวางยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง 2538 ข. สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2536. เอกสารฉบับที่ 12/2538. ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง. กองเศรษฐกิจการประมง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 80 หน้า

ทัศพล กระจ่างดารา, อัญชลีย์ ยะโกะ และสายจิตร เขียวแก้ว. 2546. ชีววิทยาการเติบโตและสืบพันธุ์ของปลาดาบเงิน *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 ทางชายฝั่งทะเลอันดามันของประเทศไทย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2546. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล, กรมประมง, กระทรวงกษตรและสหกรณ์. 25 หน้า.

ฤทัยรัตน์ หวานฉ่ำ. 2547. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทผงแห้งจากเศษเหลือของโรงงานผลิตซูริมิ: การผลิตในระดับนำร่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 25 - 50

สุกัญญา ฉัตรเดชา. 2533. การผลิตและการใช้ประโยชน์ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากถั่วเหลืองสกัดน้ำมันและของเหลือโรงงานวุ้นเส้น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุปราณี แย้มพราย. 2539. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 336 หน้า .

Adler-Nissen, J. 1976. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysated by trinitrobenzenesulfonic acid. *J. Agr. Food Chem. 27(6):*1256 – 1262.

Adler – Nissen, J and Olsen, H.S. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. In functionality and

protein structure. (Pour-El, A., ed.). *American Chemical Society Symposium Series 92*, Washington, DC.

AOAC (1995). Official methods of analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Va., U.S.A.

AOAC (2000). Official methods of analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersberg, MD.

Boza. J., Olga, M. A. and Angel, G. 1995. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 43: 872-875

Bykov, V.P., 1983. Marine fishes: chemical composition and processing properties. Amerind Publishing Co. Pvt. Ltd., New Delhi. 333 p.

Green, J.H. and Mattick, J.F., 1979. Fishery west management: In food processing waste management. Marcel Dekker, New York.

Hall, G.M. and Ahmad, N.H. 1992. Functional properties of fish protein hydrolysates. In G.M. Hall, ed. Fish Processing Technology. *Van Nostrand Reinhold*, New York. pp. 249 – 274.

Hoyle, N.; Merritt, J.H. 1995. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *J.Food Sci.* 59: 76 - 79.

Jantawat, P., Chinprahast, N. And Siripatrawan, U. 1998. Effect of hydrolyzing conditions on chemical and sensory properties of hydrolysed mungbean protein. *J. Sci.Soc*. 24: 147 - 154

Lalasidis, G., Bostrom, S. and Sjoberg, L.B. 1978. Low molecular weight enzymatic fish protein hydrolysates: chemical composition and nutritive value. J. *Agric. Food Chem*. 26: 751 – 756.

Mahesh, T., Setty, T.M.R., Shetty, T.S. and Ravishanker, C.N., 1993. Studies no the preparation of functional fish protein concentrate from *Nemipterus japonicus* by enzymatic method. *Fishery Technol*. 30(1): 57-61.

Malcolm, B. 2002. Food texture and viscosity: concept and measurement. Academic press, London, pp. 78 – 80

Manley, C.H. and Fagerson, I.S. 1970. Major volatile neutral and acid compounds of hydrolyzed soy protein. *J. Food Sci*. 35: 286-291.

Moorjani, M.N., Nair, R.B. and Lahiry, N.L., 1968. Quality of fish protein concentrate prepared by direct extraction of fish with various solvents. *Food Technol*. 22: 1557-1604.

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

Petchy, A.M., 1982. Performance of calves feed on milk replacers containing fish protein hydrolysate. *Anim. Feed Sci. Technol*. 7: 141-146.

Qi, M., Hettiarachchy, N.S. and Kalapathy, U., 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. *J. Food Sci*. 62: 1110-1115.

Qrskov, E.R., Soliman, H.S. and Clark, C.F.S., 1982. Use of fish protein hydrolysate in milk replacers. *Anim. Feed Sci. Technol. 7*:135-140.

Raymond, C. 1998. General Chemistry.MaGraw – Hill Companies Inc. USA. pp. 131 – 132.

Sathivel, S., Bechtel, P., Babbitt, J., Smiley, S., Crapro, C., Reppond, K. and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *J. Food Sci.* 68: 2196 – 2200.

Sen, D.P., 1966. Fish odors and the problem of their removal. Fish Technology Experiment Station, Mangalore.

Shiokawa, T. 1988. Managements of ribbon fish resources in the Central Japan Sea. Japan Fisheries Resource Convention Association, Tokyo. 102 pp.

Yu, S.Y. and Tan, L.K., 1990. Acceptibility of cracker (*Keropok*) with fish protein hydrolysate. *International J. of Food Sci. and Technol*. 25: 204-208.