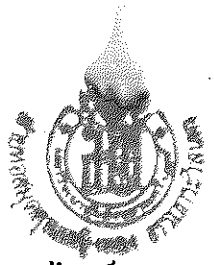


การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตและปุ๋ยน้ำ

Application of Enzymes from Tuna Viscera for the Production of Protein Hydrolysate and Liquid Fertilizer

วิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล

Wiphawan Trairatananukoon

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology
Prince of Songkla University

2544

เลขหมู่ TP248.P19 T64 2544 ฉ.2
Bib Key 216901
19 มิ.ย. 2547

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตและปุ๋ยน้ำ

ผู้เขียน นางสาววิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงพร โตวัฒนะ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปิติ ทฤษฎิคุณ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตและปุ๋ยน้ำ

ผู้เขียน นางสาววิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2544

บทคัดย่อ

การสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (yellow fin tuna : *Thunnus albacares*) ด้วยสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 10.0 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน มีค่าเท่ากับ 16.88, 0.11 และ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้เคซีน เอ็นโทลูอีนซัลโฟนิลแอลอาร์จินีนเมทิลเอสเทอร์ และ เบนโซอิลแอลไทโรซีนเอทิลเอสเทอร์เป็นสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของการทำแห้งเอนไซม์โดยวิธีพ่นฝอยและแช่เยือกแข็ง พบว่า เอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยมีค่ากิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์สูงกว่าเอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งร้อยละ 6.62 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ พบว่าเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 90 วัน ที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์สกัดมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 81.7 70.4 และ 5.5 และเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 97.5 93.5 และ 70.2 ตามลำดับ เอนไซม์สกัดมีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 8.0 -10.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์สกัดในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น ไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบอยู่ในช่วงร้อยละ 86.22-95.35 และ 37.47-42.26 ในขณะที่ค่าดังกล่าวในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าสกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 68.44-72.82 และ 29.89-32.78 ตามลำดับ เมื่อศึกษาการผลิตปุ๋ยน้ำ พบว่า ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีปริมาณไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ร้อยละ 1.42 0.97 0.25 และปริมาณแคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 90.63 2.77 29.26 0.24 1.05 และ 13.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทดสอบการตอบสนองของผักบุ้งต่อปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ พบว่าปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีผลทำให้ผักบุ้งมีการเจริญเติบโตได้ดีเช่นเดียวกับปุ๋ยน้ำทางการค้าและปุ๋ยเคมี

Thesis Title	Application of Enzymes from Tuna Viscera for the Production of Protein Hydrolysate and Liquid Fertilizer
Author	Miss Wiphawan Trairatananukoon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2001

Abstract

Proteolytic enzymes were extracted from the viscera of tuna (*Thunnus albacares)*. The activities of protease, trypsin and chymotrypsin in crude enzymes were determined by using casein, *N*-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester and benzoyl-L-tyrosine ethyl ester as substrates, respectively. The corresponding activities were 16.88, 0.11 and 0.07 U/ml. The effect of spray-drying and freeze-drying were compared. The residual activity of the spray-dried enzyme was 6.6% higher than the freeze-dried enzyme. The influence of storage conditions on the activity of crude and freeze-dried enzymes was investigated. After storage for 90 days at –20, 4 and 37°C, the residual activities of the crude enzyme were 81.7, 70.4, 5.5% while those of the freeze-dried enzyme were 97.5, 93.5, 70.2% respectively. The optimum pH and temperature of crude enzymes were pH 10.0 and 37 °C and the enzymes were stable at pH 8.0-10.0 and temperature of 37 °C.

Use of crude enzyme to recover proteins was investigated. Enzyme and substrate concentration non-significantly affected the nitrogen recovery (NR) and degree of hydrolysis (DH) ($p < 0.05$). NR and DH varied from 86.22-95.35% and 37.47-42.26% using tuna viscera as substrate whereas those of extracted tuna viscera as substrate were 68.44-72.82% and 29.89-32.52%, respectively. Liquid fertilizer was produced, containing N, P, K in the concentration of 1.42, 0.97, 0.25 % and Ca, Mg, Fe, Mn, Cu and Zn in the concentration of 90.63, 2.77, 29.26, 0.24, 1.05 and 13.77 mg/ml, respectively. Experimental results showed that yields of water spinach grown with liquid fertilizer were not significantly different from those using chemical fertilizer and commercial liquid fertilizers.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำ ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจในการค้นคว้าวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ ดร. นงพร โตวัฒนะ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัย บริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด มหาชนที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวัตถุดิบ เจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือกลาง เจ้าหน้าที่หน่วยวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ และบุคลากรคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ นักศึกษาปริญญาโทและปริญญาเอกทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำ และให้กำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามมาในที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

สุดท้ายที่ขาดไม่ได้คือ ขอขอบคุณคุณพ่อ คุณแม่ คุณน้า และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน และเป็นกำลังใจสำคัญให้ผู้เขียนมาโดยตลอด

วิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(4)
กิตติกรรมประกาศ	(5)
สารบาญ	(6)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
1 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	3
1.1 ลักษณะทั่วไปของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	3
1.2 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่า	4
1.3 อุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง	5
2 เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ	7
2.1 ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ	7
2.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำในทางอุตสาหกรรม	8
3 การเก็บรักษาเอนไซม์	13
4 โปรตีนปลาไฮโดรไลเสต	15
4.1 การย่อยสลายโปรตีนปลา	15
4.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการทางเอนไซม์	16
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส	17
5 ปุ๋ย	24
5.1 คำจำกัดความเกี่ยวกับปุ๋ย	24
5.2 การผลิตปุ๋ยจากวัสดุเศษเหลือ	25
วัตถุประสงค์	28

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ 29
วัสดุ 29
อุปกรณ์ 30
การวิเคราะห์ 30
วิธีการ 33
1 ผลของวิธีการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง 33
2 สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ 34
3 คุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง 34
4 สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต 36
5 การผลิตปุ๋ยน้ำและการตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ 37
3 ผลและวิจารณ์ 38
1 ผลของวิธีการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง 38
1.1 การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ 38
1.2 ผลของวิธีการทำแห้งในการเตรียมเอนไซม์ผงจากสารละลายเอนไซม์สกัด 39
2 สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์ 42
2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม 42
2.2 อายุการเก็บรักษาเอนไซม์ 49
3 คุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง 54
3.1 พีเอชที่เหมาะสม 54
3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม 56
3.3 ความคงตัวต่อพีเอช 58
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ 58
3.5 ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบชนิดต่างๆ 60

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.6 ความสามารถของเอนไซม์สกัดในการย่อยสลายวัตถุดิบเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า 61

4 สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต 62

4.1 การเตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ 62

4.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสม 63

4.3 ระยะเวลาการย่อยสลาย 66

5 การผลิตปุ๋ยน้ำและการตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ 68

5.1 การผลิตปุ๋ยน้ำ 68

5.2 การตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ 71

4 สรุป 76

ข้อเสนอแนะ 77

เอกสารอ้างอิง 78

ภาคผนวก 86

ก วิธีการวิเคราะห์ 86

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 86

2. ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ 87

3. ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 89

4. ปริมาณความชื้น 91

5. ปริมาณเถ้า 92

6. ปริมาณไขมัน 93

7. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด 94

8. ปริมาณโปแตสเซียมทั้งหมด 95

9. ปริมาณธาตุอาหารรอง 96

ข การเตรียมสารละลายและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ 100

1 สารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 100

2 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ 101

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
3 สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์	102
4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส	103
5 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด	103

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

1 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจจำเพาะของประเทศนิวซีแลนด์ระหว่างฤดูกาลจับในปี 1982 4

2 การจำแนกชนิดและคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ 9

3 ข้อดีและข้อเสียของการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง 14

4 วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต 18

5 ปริมาณผลผลิต (Yield) ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (NR) และองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสต 19

6 ผลของวัสดุเศษเหลือชนิดต่างๆต่อการเจริญของมะเขือเทศในโรงเรือน 26

7 ปริมาณธาตุอาหารของปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้จากวัสดุเศษเหลือจากทะเล 27

8 ปริมาณผลผลิตของแครอท กะหล่ำปลี และถั่วลันเตาที่ได้รับปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้จากวัสดุเศษเหลือจากทะเล 27

9 ค่ากิจกรรมจำเพาะและกิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งเอนไซม์โดยวิธีพ่นฝอยและวิธีแช่เยือกแข็ง 40

10 กิจกรรมสัมพัทธ์ของสารละลายเอนไซม์สกัดและเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 50 องศาเซลเซียส 41

11 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 10.0 55

12 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 57

13 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้วัตถุดิบต่างชนิดกัน 60

14 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เอนไซม์สกัดเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า 61

15 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ 62

16 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัดที่ใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นต่างๆกัน 64

รายการตาราง

ตารางที่ หน้า

17 ระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัด ที่ใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆกัน 65

18 ปริมาณธาตุอาหารพืชของเครื่องในปลา ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้และปุ๋ยน้ำทางการค้า 69

19 ปริมาณธาตุอาหารพืชของวัสดุเศษเหลือบางชนิด และปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ 70

20 ผลของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยน้ำ และปุ๋ยน้ำทางการค้าที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักบุ้ง 73

21 ความเข้มข้นเฉลี่ยของแร่ธาตุในน้ำหนักแห้งของพืชที่ได้รับธาตุอาหารอย่างเพียงพอ 74

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะทั่วไปของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	3
2 กระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องและวัสดุเศษเหลือที่เกิดขึ้น	6
3 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการทางเอนไซม์	16
4 เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่า และเอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยและวิธีแช่เยือกแข็ง	40
5 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	43
6 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อพีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	44
7 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	45
8 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อพีเอชของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	46
9 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	47
10 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน	48
11 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน	50
12 พีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน	51
13 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ผงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน	52
14 พีเอชของเอนไซม์ผงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20, 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน	53
15 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	55

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
16 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	57
17 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	59
18 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	59
19 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่เวลาการย่อยสลายต่างๆ	67
20 ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยน้ำทางการค้า และ ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้	73
21 การเจริญเติบโตของผักบุ้งที่เวลาปลูกต่างๆ	75

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทูน่าของไทยสามารถนำรายได้เข้าประเทศปีละไม่ต่ำกว่า 10,000 ล้านบาท โดยมีมูลค่าการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาทูน่ากระป๋องในปี 2537 2538 2539 2540 2542 2543 และ ช่วง 3 เดือนแรกของปี 2544 คิดเป็น 15,619 13,629 12,383 17,336 21,831 18,678 และ 5,097 ล้านบาทตามลำดับ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2537-2544) วัตถุดิบที่ใช้ในอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทูน่าได้จากการจับภายในประเทศและการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยวัตถุดิบภายในประเทศ สามารถรองรับภาวะการขยายตัวด้านการส่งออกผลิตภัณฑ์ปลาทูน่าได้ไม่เกินร้อยละ 20 ของปริมาณความต้องการทั้งหมด ที่เหลืออีกร้อยละ 80 จำเป็นต้องพึ่งพาการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยในปี 2537 – 2540 ประเทศไทยนำเข้าวัตถุดิบปลาทูน่าปริมาณมากกว่า 500,000 ตันต่อปี โดยส่วนใหญ่เป็นปลาโอแถบในรูปปลาสดแช่เย็นและปลาสดแช่แข็ง และมีมูลค่าการนำเข้าปลาทูน่าสดในปี 2537 2538 2539 2540 2542 2543 และช่วง 3 เดือนแรกของปี 2544 คิดเป็น 11,412 9,082 8,909 13,007 13,306 10,606 และ 3,479 ล้านบาท ตามลำดับ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2537-2544) ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ปลาทูน่าบรรจุกระป๋องของไทยมีราคาสูงเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศคู่แข่ง ดังนั้นโรงงานแปรรูปจึงพยายามลดต้นทุนการผลิตเพื่อแข่งขันด้านราคาผลิตภัณฑ์ โดยลดการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยวของวัตถุดิบและพยายามหาทางใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือที่มีอยู่อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด

แนวโน้มการขยายตัวของอุตสาหกรรมการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของวัสดุเศษเหลือเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ ได้แก่ เนื้อปลาร้อยละ 35 หัวปลา หางปลา และก้างปลาร้อยละ 28-30 เครื่องในปลาร้อยละ 5-7 น้ำเลือดปลาร้อยละ 10-12 และน้ำนึ่งปลาร้อยละ 20 (สุมาลัย ศรีกำไลทอง, 2537) แนวทางการนำวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทูน่าไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ได้แก่ การใช้เป็นอาหารสัตว์ การผลิตเป็นปลาป่น การใช้เป็นปุ๋ย และการสกัดเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่พบมากในเครื่องในปลาคือ เอนไซม์โปรติเอส (ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์, 2541) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น

โดยเอนไซม์โปรติเอสมีปริมาณการผลิตและการใช้คิดเป็นร้อยละ 60 ของเอนไซม์ทั้งหมด และเนื่องจากปริมาณโปรตีนในวัสดุเศษเหลือจากปลามีค่าใกล้เคียงเนื้อปลาส่วนที่ใช้บริโภค คือ ปริมาณโปรตีนในส่วนหัว เครื่องใน หนัง เนื้อดำ เนื้อขาวและปลาทั้งตัวคิดเป็นร้อยละ 20.0 21.8 24.1 24.8 25.6 และ 23.4 ตามลำดับ (Vlieg *et al.*, 1983) และสามารถย่อยสลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากการย่อยวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องใน จึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ และก่อให้เกิดการใช้ทรัพยากรอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด โปรตีนไฮโดรเสตสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่ การผลิตเป็นเปปโตน สำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ ทดแทนโปรตีนจากนมแก่สัตว์เลี้ยงวัยอ่อน เป็นสารปรุงแต่งอาหาร เสริมแทนไข่ขาวในอาหารหลายประเภท เช่น คุกกี้ ไอศกรีม เยลลี่

ประเทศไทยมีการนำเข้าปุ๋ยปริมาณมากและมีปริมาณการนำเข้าเพิ่มขึ้นทุกปี โดยปริมาณการนำเข้าปุ๋ยในปี พ.ศ. 2535 2536 2537 2538 และ 2539 คิดเป็น 12,585 13,694 13,550 15,812 และ 18,242 ตามลำดับ (สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2537-2539) ถึงแม้ว่าปุ๋ยเคมีจะมีประสิทธิภาพสูงและใช้ได้สะดวก แต่ก็มีผลเสียต่อดินเมื่อใช้เป็นเวลานาน วัสดุเศษเหลือจากการแปรรูป ปลาทูน่ามีองค์ประกอบของธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ แคลเซียม และเมื่อนำวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทูน่ามาพัฒนาเป็นปุ๋ยน้ำโดยย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 20 ปุ๋ยน้ำที่ได้มีปริมาณธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจนทั้งหมด ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม ปริมาณไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแอมโมเนีย โปรตีน คิดเป็นร้อยละ 1.64 0.56 0.14 0.39 0.09 0.09 และ 9.75 ตามลำดับ (สุริยา สาสนรักกิจ และคณะ, 2542) การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทูน่าในการผลิตปุ๋ยน้ำ จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือและก่อให้เกิดประโยชน์ในทางการเกษตรอีกด้วย

ตรวจเอกสาร

1. ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

ชื่อสามัญ Yellowfin tuna

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Thunnus albacares*

1.1 **ลักษณะทั่วไปของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง** (ภาพที่ 1) ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองหรือปลาโอกราน เป็นปลาผิวน้ำ (pelagic fish) หากินเป็นฝูง มีการเคลื่อนไหวว่องไว กล้ามเนื้อแข็งแรง อาศัยบริเวณผิวน้ำตามเขตชายฝั่งและเขตน้ำลึก จัดอยู่ในสกุล *Scombridae* วงศ์ *Thunnidae* (วิมล เหมะจันทร์, 2528) เป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ ความยาวเฉลี่ย 50 – 150 เซนติเมตร ความยาวสูงสุดที่เคยพบ 195 เซนติเมตร บริเวณส่วนหัวสีน้ำเงินดำ พื้นท้องสีเหลืองและสีเงิน มีจุดประทั่วลำตัว (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531)

ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

ที่มา : Collete และ Nauen (1983 อ้างโดย วิมล เหมะจันทร์, 2528)

1.2 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่า องค์ประกอบทางเคมีของสัตว์น้ำ แตกต่างกันตามประเภทและชนิดของสัตว์น้ำ เนื้อปลาส่วนที่บริโภคได้ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น อยู่ในช่วง ร้อยละ 6.0-28.0 0.2-64.0 0.4-1.5 และ 28.0-90.0 ตามลำดับ (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531) ในปลาชนิดเดียวกันพบว่ามีปัจจัยหลายประการที่ทำให้องค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน คือ อาหาร อายุ เพศ ฤดูกาลที่จับ แหล่งที่อยู่อาศัย และความแตกต่างทางสรีรวิทยา (Spenelli and Dassaw, 1982)

ในการจัดจำแนกประเภทของสัตว์น้ำโดยยึดปริมาณไขมันและโปรตีนเป็นหลัก พบว่าปลาทูน่าจัดเป็นปลาประเภทน้ำมันน้อย-โปรตีนสูง คือ มีปริมาณไขมันต่ำกว่าร้อยละ 5 และมีปริมาณโปรตีนสูงกว่าร้อยละ 20 (Stansby and Hall (1967 อ้างโดย นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531) Vlieg และคณะ (1983) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) ที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจจำเพาะของประเทศนิวซีแลนด์ระหว่างฤดูกาลจับในปี 1982 พบว่า ส่วนเครื่องในมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 21.8 ไขมันร้อยละ 6.9 ความชื้นร้อยละ 69.0 และเถ้าร้อยละ 2.3 ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเนื้อปลาส่วนที่ใช้บริโภคได้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจจำเพาะของประเทศนิวซีแลนด์ระหว่างฤดูกาลจับในปี 1982

องค์ประกอบทางเคมี	ส่วนต่างๆของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ					
	หัว	เครื่องใน	หนัง	เนื้อดำ	เนื้อขาว	ปลาทั้งตัว
โปรตีน [1]	20.0	21.8	24.1	24.8	25.6	23.4
ไขมัน [2]	11.0	6.9	19.7	8.4	8.2	9.0
ความชื้น [1]	61.3	69.0	51.4	63.9	64.7	63.8
เถ้า [2]	7.7	2.3	4.8	2.9	1.5	3.8

[1]ร้อยละโดยน้ำหนักเปียก

[2]ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง

ที่มา : Vlieg และคณะ (1983)

1.3 อุตสาหกรรมการแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง

1.3.1 ขั้นตอนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง กระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องมีรายละเอียดในแต่ละขั้นตอนแสดงดังภาพที่ 2 คือ ตรวจสอบคุณภาพทางกายภาพของวัตถุดิบ คือ เหงือก ตา ผิวหนังและความยืดหยุ่นของเนื้อปลา นำมาละลายน้ำแข็งโดยแช่ในบ่อพักปลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง ผ่าท้องควักไส้ปลาออก นึ่งปลาโดยใช้ความร้อนจากไอน้ำ เพื่อแยกผิวหนังและกระดูกออกจากกล้ามเนื้อ ทำให้สะดวกในขั้นตอนการขูดปลา ลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำฉีดพ่นไปบนตัวปลา ขูดปลาเพื่อแยกสิ่งที่ไม่ต้องการออก เช่น หนัง เลือด ก้าง ให้เหลือเพียงเนื้อปลา แบ่งระดับปลาโดยอาศัยความสะอาดและสีของเนื้อปลา บรรจุเนื้อปลาลงกระป๋อง เติมเกลือหรือน้ำมัน ปิดผนึกฝาโดยทำให้เป็นสุญญากาศ นึ่งฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อ ทำกระป๋องให้เย็นลงทันที ทำให้แห้ง ปิดฉลาก นำไปเก็บรักษาหรือนำไปจำหน่ายต่อไป

1.3.2 ปริมาณวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง

จากกระบวนการแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง ก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือ (ภาพที่ 2) ซึ่งจำแนกเป็น 2 ประเภท คือ วัสดุเศษเหลือที่เป็นของแข็ง มีประมาณร้อยละ 25-30 ของวัตถุดิบทั้งหมด ได้แก่ หัวปลา เครื่องในปลา กระดูก หนังและเศษเนื้อดำ เป็นต้น และวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลว มีประมาณร้อยละ 35 ของวัตถุดิบทั้งหมด ได้แก่ น้ำเลือด น้ำนึ่งปลาทูน่า เป็นต้น (Prasertsan *et al.*, 1988) สุมาลัย ศรีกำไลทอง (2537) สำรวจข้อมูลกระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง พบว่ามีปริมาณวัตถุดิบและวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิต คือ เนื้อปลาร้อยละ 35 ผลพลอยได้ร้อยละ 45 จำแนกเป็น หัวปลา หางปลา ก้างปลา ร้อยละ 28-30 ไส้ปลาร้อยละ 5-7 เลือดปลาร้อยละ 10-12 และวัสดุเศษเหลืออื่นได้แก่ น้ำนึ่งปลาร้อยละ 20 ของปลาสด จากการสำรวจดังกล่าวพบว่า โรงงานปลาทูน่ามีกำลังการผลิตมากถึง 647,000 ตันต่อปี เมื่อนำตัวเลขดังกล่าวมาคำนวณเป็นปริมาณวัสดุเศษเหลือ จะมีปริมาณวัสดุเศษเหลือทั้งสิ้น 291,150 ตันต่อปี โดยคิดเป็นส่วนต่างๆของปลาดังนี้ ส่วนหัวปลาหางปลา ก้างปลา ร้อยละ 30 คิดเป็นปริมาณทั้งสิ้น 194,000 ตันต่อปี ไส้ปลาร้อยละ 5 คิดเป็นปริมาณทั้งสิ้น 32,350 ตันต่อปี และเลือดปลาร้อยละ 10 คิดเป็นปริมาณทั้งสิ้น 64,700 ตันต่อปี

กระบวนการผลิต	ของเสีย
ปลาทูน่าแช่เยือกแข็ง	
↓	
ละลายน้ำแข็ง	น้ำ ชิ้นส่วนที่แตกหัก
↓	
นำเครื่องในออก	น้ำ เครื่องใน เลือด
↓	
ล้างทำความสะอาด	น้ำ น้ำมัน เมือกปลา
↓	
นึ่ง	น้ำนึ่งปลาทูน่า
↓	
ทิ้งให้เย็น	น้ำ
↓	
แยกเนื้อขาว	หัว กระดูก หนัง เศษเนื้อดำ เศษเนื้อขาว
↓	
บรรจุกระป๋อง	เศษเนื้อขาว
↓	
เติมน้ำมันหรือน้ำเกลือ	น้ำมันหรือเกลือ
↓	
ปิดฝากระป๋อง	
↓	
ล้างทำความสะอาดกระป๋อง	น้ำ น้ำมัน
↓	
ฆ่าเชื้อ	น้ำ
↓	
ทำให้เย็น	น้ำเย็น
↓	
ผลิตภัณฑ์ปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง	

ภาพที่ 2 กระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋องและวัสดุเศษเหลือที่เกิดขึ้น

ที่มา : ดัดแปลงจาก ประเสริฐ สายสิทธิ์ (2514)

2. เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ

2.1 ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนให้มีขนาดเล็กลงเป็นโพลิเปปไทด์หรือกรดอะมิโน โดยทำการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ด้วยน้ำ (Walker *et al.*, 1995) โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญและมีการใช้อย่างกว้างขวางที่สุดในอุตสาหกรรม สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมเนยแข็ง เบียร์ ไวน์ เนื้อสัตว์ ธัญพืช การฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และอาหารสัตว์ เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) เอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ มีเพียงปริมาณเล็กน้อยที่ได้จากพืชหรือสัตว์ เนื่องจากเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์มีความจำเพาะต่อสับสเตรตหลายชนิดและมีราคาถูก (Loffer, 1986) การใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำไม่แพร่หลายในอุตสาหกรรม เนื่องจากมีข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์จากสัตว์น้ำค่อนข้างน้อย การจัดหาวัตถุดิบที่ใช้สกัดได้ไม่สม่ำเสมอเนื่องจากวงจรชีวิตของสัตว์น้ำและทัศนคติของผู้บริโภคต่อแหล่งของวัตถุดิบ เช่น เศษปลา เครื่องใน เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สัตว์น้ำมีความหลากหลายของสายพันธุ์ แหล่งที่อยู่ และสภาวะแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความดัน ความเค็ม ความเข้มแสง ทำให้เอนไซม์ที่สกัดได้จากสัตว์น้ำมีคุณสมบัติเฉพาะตัว เมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่สกัดจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น (Reece, 1988)

คุณสมบัติเด่นจำเพาะบางประการของเอนไซม์ที่สกัดจากสัตว์น้ำ ได้แก่ มีประสิทธิภาพการย่อยและความคงตัวสูงที่อุณหภูมิต่ำ Simpson และ Haard (1987) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากสัตว์น้ำในเขตหนาวต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากสัตว์น้ำในเขตน้ำอุ่นหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 30 องศาเซลเซียส เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์น้ำบางชนิดยังมีประสิทธิภาพการย่อยและความคงตัวที่ช่วงพีเอชเป็นกลางถึงด่างมาก ทริปซินจากปลากรีนแลนด์คอด (Greenland cod : *Gadas ogas*) มีความคงตัวต่อพีเอชด่างและไม่คงตัวที่พีเอชกรด ซึ่งต่างจากทริปซินจากสัตว์บกที่มีความคงตัวต่อพีเอชค่อนข้างสูงที่พีเอชเป็นกรด (Simpson and Haard, 1984) เอนไซม์แกสตริกซิน (gastricsin) จากปลาเฮก (Hake : *Merluccius gayi*) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับเอนไซม์แกสตริกซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เอนไซม์จากปลาเฮกมีความคงตัวต่อพีเอชที่พีเอชมากกว่า 10 แต่เอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกยับยั้งการทำงานที่พีเอชสูงกว่า 7.5 (Sanchez-Chiang and Ponce, 1981) เอนไซม์ที่ได้จากสัตว์น้ำยังมีตัวกระตุ้นและตัวยับยั้งการทำงานที่แตกต่างจากเอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอีกด้วย เอนไซม์เปปซิน (pepsin) จากปลากรีนแลนด์คอด (Greenland cod : *Gadas ogas*) จะใช้โซเดียมคลอไรด์เป็นตัวกระตุ้นการทำงาน แต่เอนไซม์เปปซินจากสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนมจะถูกยับยั้งโดยโซเดียมคลอไรด์ (Squires *et al*, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์จากปลามีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนธรรมชาติ (native protein) ได้ดี (Haard, 1998)

เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำสามารถจำแนกโดยใช้หลักเกณฑ์เช่นเดียวกับการจำแนกเอนไซม์จากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น แบ่งตามความคล้ายเอนไซม์โปรติเอส หรือแบ่งตามความจำเพาะต่อพีเอช เป็นต้น การแบ่งเอนไซม์ตามหลักของ Enzyme Commission of the International Union of Applied Biochemists แบ่งเอนไซม์โดยใช้หลักเกณฑ์หลายอย่างร่วมกัน ได้แก่ กลไกการทำงาน ชนิดของสารตั้งต้น บริเวณเร่ง ความจำเพาะต่อวัตถุดิบ สามารถแบ่งเอนไซม์ได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ ซีรีนโปรติเอส (serine protease) แอซิดโปรติเอส (acid protease) ซีสทีนโปรติเอส (cystein protease or thiol protease) และ เมทาลโลโปรติเอส (metallo protease) (Haard and Simpson, 1999) (ตารางที่ 2)

2.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำในทางอุตสาหกรรม

2.2.1 การประยุกต์ใช้เอนไซม์กับผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำ

1) การผลิตไข่ปลาคาร์เวียร์และไข่ปลาชนิดอื่น (Carviae and other roe productuion)

ในกระบวนการผลิตไข่ปลา มีปัญหาในขั้นตอนการแยกไข่ออกจากรังไข่ ซึ่งการใช้แรงงานคนหรือเครื่องจักรจะให้ผลผลิตต่ำกว่าร้อยละ 50 จึงมีการนำเอนไซม์ไปใช้ในขั้นตอนนี้โดยใช้ในการย่อยสลายเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในรังไข่ เพื่อแยกไข่ออกมา ผลผลิตของไข่คาร์เวียร์เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 90 เมื่อใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิต นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำในเชตหนาวในกระบวนการอื่นๆเช่น กำจัดชั้นมิวโคโปรตีน (mucoprotein) ในไข่ปลาดุกเพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อน (Haard and Simpson, 1999)

2) เร่งกระบวนการหมักน้ำปลา (Accelerated of fish sauce fermentation)

ในกระบวนการหมักน้ำปลา การย่อยสลายโปรตีนเกิดจากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) โดยเอนไซม์ภายในตัวปลาและการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ทนเค็ม ซึ่งใช้เวลาในหมักนาน 8-10 เดือน การเร่งกระบวนการหมักสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเพิ่มอุณหภูมิในระยะเริ่มต้นของการหมัก (Gildberg, 1993) การหมักในสภาวะความเป็นกรดสูงความเข้มข้นเกลือต่ำ (Beddows and Ardeshir, 1979 ; Gildberg *et al*., 1984) การหมักในสภาวะความเป็นด่างสูงความเข้มข้นเกลือต่ำ (Gildberg, 1993) ซึ่งสามารถลดระยะเวลาเหลือ 2 เดือน

ตารางที่ 2 การจำแนกชนิดและคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ

Group	Examples	Sources	References
Serine	Trypsin	Cod	Shin and Zall (1986) [a]
		Crayfish	Kim และคณะ (1994) [a]
		Anchovy	Martinez และคณะ (1998) [a]
		Threadfin bream	Kinoshita และคณะ (1990) [c]
		White croacker	Folco และคณะ (1989) [c]
		Sardine	Noda และ Murakami (1981) [d]
		Antarctic krill	Bustor และคณะ (1999)
	Chymotrypsin	Skipjack tuna	Pyeun และคณะ (1988) [a]
		Mackeral	Kim and Pyeun (1986) [a]
		Dogfish	Ramakrishna (1987) [a]
		Mendahen	Pyeun และคณะ (1990) [a]
		Deep sea fish	Krzyzosiak and Daniel (1997)
		Grass carp	Fong และคณะ (1998)
		Anchovy	Heu (1995)
Acid	Pepsin	Cod	Brewer และคณะ (1984) [b]
		Dogfish	Mernett และคณะ (1969) [b]
		Trout	Owen และ Wigges (1971) [b]
	Chymosin	Harp seal	Shamsuzzaman และ Haard (1985) [d]
	Gastricsin	Salmon	Fruton และ Bergmann (1940) [d]
		Hake	Sanchez-Chiang และ Ponce (1981) [d]

ตารางที่ 2 (ต่อ)

Group	Examples	Sources	References
Cysteine	Cathepsin L	Anchovy	Heu และคณะ (1997)
		Mackeral	Lee และคณะ (1993) [c]
		Salmon	Yamashita and Konagaya (1991) [c]
	Cathepsin B	Carp	Futoshi และคณะ (1997)
		Calm	Shen and Zall (1985) [c]
		Salmon	Yamashita (1990) [c]
	Cathepsin C	Carp	Makinoda และ Ikeda (1971) [c]
		Squid	Hameed และ Haard (1985) [c]
Metallo	Neutral	Carp	Makinodan และคณะ (1971) [c]
		Squid	Okamoto และคณะ (1993) [c]
	Alkaline	Pacific rockfish	Bracho and Haard (1995) [c]
	Aminopeptidase	Tuna	Hajjou and Le-Gal (1994) [c]
		Shrimp	Doke and Ninjoor (1987) [c]

ที่มา : a : ดัดแปลงจาก Heu และคณะ (1995)

b : ดัดแปลงจาก Reece (1988)

c : ดัดแปลงจาก Kolodzieiska และ Sikorski (1996)

d : ดัดแปลงจาก Haard และ Simpson (1999)

การเติมเอนไซม์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ลดระยะเวลาการหมักได้สูง Gildberg และ Quan (1994) พบว่า เมื่อทำการหมักน้ำปลาโดยใช้เครื่องในปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod : Gadus morhua) เป็นวัตถุดิบที่อุณหภูมิ 22-27 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการหมักเพียง 25 วัน และสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ทริปซินในช่วงระยะแรกของการหมักเป็นผลพลอยได้อีกด้วย

3) ใช้ในกระบวนการแปรรูปปลา (Enzymes as fish processing aids)

เอนไซม์ถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตปลาในขั้นตอนการลอกหนัง ขอดเกล็ด และกำจัดเยื่อหุ้มบางชนิด การใช้เอนไซม์ในกระบวนการผลิตมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มคุณภาพและปริมาณผลผลิต เอนไซม์เปปซินจากปลา (fish pepsin) สามารถย่อยหนังปลาได้อย่างรวดเร็วแต่ย่อยเนื้อปลาได้ช้ามากในสภาวะที่เป็นกรด เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากทางเดินอาหารของปลาหมึกถูกนำมาใช้ในการลอกหนัง 2 ชั้นของปลาหมึก เนื่องจากเครื่องจักรสามารถลอกหนังปลาหมึกได้เพียงชั้นเดียว การขอดเกล็ดปลาโดยใช้เครื่องจักร เช่น ปลาเรด (Redfish : *Sebastes marinus*) ปลากุเลา (Haddock : *Melanogrammus aeglefinus*) จะใช้เวลานาน และทำลายหนังปลาบางส่วน จึงมีการนำเอนไซม์มาใช้ในการขอดเกล็ด โดยการบ่มปลาในสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำแล้วใช้น้ำฉีดเศษเกล็ดออก นอกจากนี้เอนไซม์ยังถูกนำมาใช้ในการกำจัดเยื่อหุ้มอีกด้วย เช่น ใช้กำจัดส่วนเยื่อหุ้มสีดำในกระเพาะปลาคอด (fresh cod swim bladder) โดยใช้เอนไซม์เปปซินจากปลาคอด (pepsin from cod) หรือเอนไซม์คอลลาจิเนสจากปู (collagenase from crab hepatopancreas) ใช้กำจัดเยื่อหุ้มคอลลาเจน (thin collagenase membrane) ที่ตับปลาคอด (cod liver) ในการผลิตตับปลาบรรจุกระป๋อง (Haard and Simpson, 1999)

4) สกัดแคโรทีนอยด์จากวัสดุเศษเหลือจากกุ้ง

เอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเปลือกกุ้งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มทริปซิน การสกัดแคโรทีนอยด์โดยใช้เอนไซม์จะได้แคโรทีนอยด์ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนแคโรทีโนโปรตีน (Cano-Lopez *et al.*, 1987; Haard, 1992) Cano-Lopez และคณะ (1987) ศึกษาการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod trypsin) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทริปซินจากลูกวัว (bovine trypsin) พบว่า ทริปซินจากปลาแอตแลนติกคอดสามารถสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งได้ แอสตราแซนทีนร้อยละ 64 และโปรตีนร้อยละ 81 ในขณะที่เอนไซม์ทริปซินจากลูกวัวสามารถสกัดได้ ร้อยละ 49 และ 65 ตามลำดับ

2.2.2 การประยุกต์ใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำกับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น

การใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำกับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดอื่น โดยทั่วไปมักใช้เอนไซม์กับผลิตภัณฑ์นม เช่น การใช้เปปซินจากปลาคอดและแกสตริกซินจากปลาทูน่าสำหรับตกตะกอนโปรตีนในนม การใช้อะมิโนเปปติเดสจากปลาหมึกในการผลิต Cheddar cheese นอกจากนี้ยังมีการใช้เอนไซม์โปรติเอสในการป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในนม เช่น เอนไซม์เปอร์ออกซิเดส ทริปซินจากปลาในเขตหนาวป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นในนมดิบและไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ภายหลังการพาสเจอร์ไรซ์ (Haard and Simpson, 1999)

3. การเก็บรักษาเอนไซม์

การเสียสภาพหรือการลดลงของกิจกรรมของเอนไซม์ มักเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเก็บเกี่ยว (downstream processing) และระหว่างการเก็บรักษาเอนไซม์ การเสียสภาพของเอนไซม์เกิดขึ้นเนื่องจากปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ปัจจัยทางเคมี เช่น สารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) สารซักฟอก (detergent) โลหะหนัก ตัวทำละลายอินทรีย์ ปัจจัยทางกายภาพ เช่น พีเอช อุณหภูมิ การแช่แข็งและการละลาย รังสี ความดัน ปัจจัยทางชีวภาพ เช่น เอนไซม์โปรติเอส เอนไซม์คาร์โบไฮเดรส เป็นต้น (Walsh and Headon, 1994)

การป้องกันและลดการเสียสภาพของเอนไซม์ สามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นกับปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสียสภาพ เช่น การเติมสารรีดิวส์ (reducing agent) การเติมสารจับโลหะ การปรับสภาวะให้เหมาะสมต่อความคงตัวของเอนไซม์ การเลือกระบบบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม การสกัด การทำบริสุทธิ์และเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นต้น (Wiseman, 1973 ; Walsh and Headon, 1994) วิธีการที่ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาและเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์ในระหว่างเก็บรักษาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเติมสารเพิ่มความคงตัว (stabilizing agent) การเติมโปรตีนบางชนิด การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การแช่เยือกแข็ง การตรึงรูปเอนไซม์ (immobilization) (Wiseman, 1973 ; Walsh and Headon, 1994 ; Bryjak and Noworyta, 1994 ; Bustos *et al.*, 1996)

การทำแห้งเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาเอนไซม์ การทำแห้งโดยวิธีฟ่นฝอย เป็นวิธีการหนึ่งในการเก็บเกี่ยวของแข็งแห้งจากสารละลายหรือสารแขวนลอย โดยสารละลายหรือสารแขวนลอยจะถูกฟ่นให้เป็นละอองลงในห้องร้อนซึ่งมีไอร้อน ทำให้ความชื้นถูกระเหยออกไปกับอากาศและส่วนของแข็งจะตกลงมา (Walker *et al.*, 1995) การทำแห้งวิธีนี้นิยมใช้ในการทำแห้งเอนไซม์ที่มีปริมาณมากๆในเชิงอุตสาหกรรม แต่มีข้อด้อยคือ ไม่เหมาะสมในการทำแห้งผลิตภัณฑ์ที่ไม่ทนร้อน (Walsh and Headon, 1994) การทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง เป็นวิธีการนำน้ำหรือตัวทำละลายออกจากสารละลายในสภาวะเยือกแข็งและสภาวะสุญญากาศ สารละลายจะถูกนำมาแช่แข็ง จากนั้นนำมาให้ความดันและเพิ่มอุณหภูมิ น้ำจะถูกกำจัดออกในรูปของไอน้ำ (Walsh and Headon, 1994) โปรตีนหลายชนิดโดยเฉพาะโปรตีนที่มีราคาสูง ปริมาณน้อย เช่น วัคซีน ฮอร์โมน แอนติบอดี นิยมใช้การทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Walsh and Headon, 1994) ข้อดีและข้อเสียของการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ข้อดีและข้อเสียของการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง

ข้อดี	ข้อเสีย
1. เป็นวิธีการที่รุนแรงน้อยที่สุดในการทำแห้ง	1. เครื่องมือที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมมีราคาแพงมาก
2.ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีน้ำหนักเบา ทำให้ลดค่าใช้จ่ายในการขนส่ง	2. ค่าใช้จ่ายในกระบวนการทำแห้งสูง
3. โปรตีนที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งสามารถคืนรูปได้อย่างรวดเร็วก่อนการใช้งาน	3. ใช้เวลาในการทำแห้งนาน (โดยทั่วไปใช้เวลาประมาณ 3-5 วัน)
4. วิธีการนี้ได้รับการยอมรับว่าผลิตภัณฑ์จะมีลักษณะใกล้เคียงกับเริ่มต้นมากที่สุด	4.โปรตีนบางชนิดมีการเสียสภาพระหว่างการทำแห้งโดยวิธีนี้
	5.ผลิตภัณฑ์ที่ได้บางครั้งมีการกระจายความชื้นไม่สม่ำเสมอ

ที่มา : Walsh and Headon (1994)

Cepeda และคณะ (1998) ศึกษาการทำแห้งแป้งถั่วฟาบา (*Vicia faba*) โดยวิธีพ่นฝอยและแช่เยือกแข็ง พบว่า แป้งถั่วที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยจะมีสีขาว มีความสม่ำเสมอ และมีความสามารถในการละลาย (solubility) ดีกว่าแป้งถั่วที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง แต่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ทริปซินได้ยากกว่า Johnson และ Etzel (1995) พบว่าการเก็บรักษาเชื้อ *Lactobacillus helveticus* CNRZ 32 โดยวิธีแช่เยือกแข็ง และโดยการทำแห้งวิธีแบบแช่เยือกแข็งจะทำให้เชื้อที่เก็บคงความมีชีวิตได้สูงกว่าการเก็บรักษาเชื้อโดยการทำแห้งวิธีพ่นฝอย แต่เชื้อที่ผ่านการทำแห้งวิธีพ่นฝอยโดยใช้อุณหภูมิต่ำ (โดยใช้อุณหภูมิอากาศขาออก 82 องศาเซลเซียส) จะมีกิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) และเอนไซม์เบต้ากาแล็คโตซิเดส (β-galactosidase) เหลืออยู่สูงที่สุด เท่ากับร้อยละ 85 และ17 ตามลำดับ Gildberg และ Quan (1994) ทำแห้งเอนไซม์ที่ได้จากการหมักเครื่องในปลาคอดโดยวิธีพ่นฝอย พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน เหลืออยู่ ร้อยละ 86 77 และ 94 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเอนไซม์ในรูปสารละลาย เอนไซมในรูปผงสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียสได้นาน 8 เดือนโดยไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์

4. โปรตีนปลาไฮโดรไลเสต

4.1 การย่อยสลายโปรตีนปลา

กระบวนการย่อยสลายโปรตีนจากปลา ทำได้ 3 วิธี ได้แก่ (พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2540)

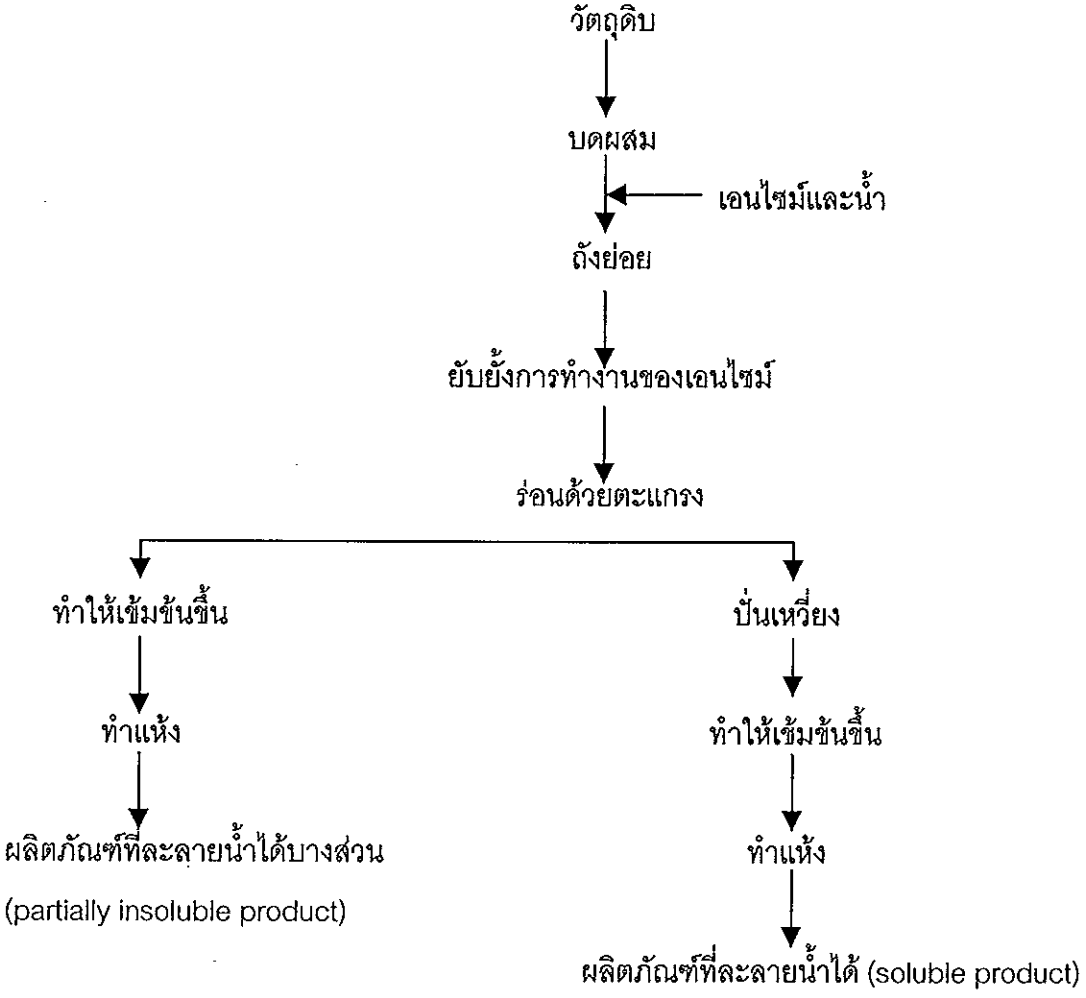
1. การย่อยสลายตัวเอง (Autolysis) เป็นกระบวนการย่อยสลายอันเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ภายในลำไส้และกล้ามเนื้อปลา อาจมีการเติมกรดหรือเกลือเพื่อชะลอการเสียสภาพจากจุลินทรีย์ (Mackie, 1994) การย่อยสลายตัวเองของปลา capelin (*Mallotus villosus*) ที่อุณหภูมิห้องโดยเอนไซม์ภายในตัวปลาสามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้ร้อยละ 23 ภายในเวลา 3 ชั่วโมง (Shahidi *et al.*, 1995) ความเร็วในการย่อยสลายตัวเองขึ้นกับ อุณหภูมิ พีเอช และความเข้มข้นของเกลือที่เติมลงไป หากเติมกรดและลดปริมาณเกลือสามารถเพิ่มอัตราการย่อยสลายตัวเองในปลาได้ (Gildberg *et al.*, 1984) การย่อยสลายตัวเองของ *Stolephorus* sp. ที่มีการเติมเกลือร้อยละ 5 ให้ปริมาณไนโตรเจนสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 59.5 ในขณะที่ตัวอย่างที่มีการเติมเกลือสูงสุด ร้อยละ 25 ให้ปริมาณไนโตรเจนต่ำที่สุดเท่ากับร้อยละ 33.2 (Gildberg *et al.*, 1984) ซึ่งสอดคล้องกับ Poosaran (1986) ซึ่งพบว่า ตัวอย่างปลาที่ไม่เติมเกลือจะย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่สุดเท่ากับร้อยละ 25.2 และจะเสียสภาพด้วยจุลินทรีย์หลังหมักเป็นเวลา 6 วัน Morioka และคณะ (1999) ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของปลาแม็คเคอเรล (*Auxis rochei*) ที่อุณหภูมิต่างๆคือ 25 20 15 และ 10 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถย่อยสลายโปรตีนได้มากที่สุดแต่จะมีกลิ่นไม่ดีหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้มีกลิ่น umami และมีความขมน้อย ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส

2. กระบวนการทางเคมี โดยการย่อยสลายด้วยกรดหรือด่าง การย่อยสลายที่อุณหภูมิสูง (100-125 องศาเซลเซียส) ในระยะเวลาการย่อยสลาย 12-54 ชั่วโมง การย่อยสลายต้องทำในภาชนะที่ทนกรดหรือด่าง การย่อยสลายโดยกระบวนการทางเคมีนั้น จะทำลายกรดอะมิโนในรูปแอล (L-form amino acid) คงเหลือแต่เฉพาะกรดอะมิโนในรูปดี (D-form amino acid) และสร้างสารพิษ เช่น lysino-alanine (Lahl and Braun, 1994)

3. กระบวนการทางเอนไซม์ โดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน เปลี่ยนแปลงโปรตีนในรูปของแข็งให้อยู่ในรูปสารละลาย เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีคุณค่าทางอาหารสูง สามารถประมาณขอบเขตการย่อยสลายและขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ เนื่องจากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงในการตัดพันธะเปปไทด์สูง ปฏิกิริยาไม่รุนแรง แต่มีข้อเสียคือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสขมไม่เป็นที่ยอมรับ (Mackie, 1994)

4.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการทางเอนไซม์

โปรตีนปลาไฮโดรไลเสตเป็นผลผลิตที่ได้จากปลาและวัสดุเศษเหลือจากปลาที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์กลุ่มโปรติเอส โดยควบคุมสภาวะการย่อยสลาย ได้แก่ ระยะเวลา อุณหภูมิ และพีเอช ให้เหมาะสม (Mackie, 1982) ขั้นตอนหลักๆในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการทางเอนไซม์แสดงในภาพที่ 3 วัตถุดิบถูกนำมาบด เติมน้ำในปริมาณที่เหมาะสม ผสมกับเอนไซม์ในถังย่อย ทำการย่อยในสภาวะที่เหมาะสม ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แยกกระดูกออกโดยการร่อนด้วยตะแกรง ส่วนที่ผ่านการร่อนเป็นสารแขวนลอยของโปรตีนที่ไม่ละลายในสารละลายของกรดอะมิโนและเปปไทด์ นำมาทำให้เข้มข้นขึ้นและทำแห้ง หรือนำสารแขวนลอยมาปั่นเหวี่ยงจะได้ส่วนที่ละลายกับส่วนที่ไม่ละลาย ส่วนที่ละลายจะถูกทำให้เข้มข้นขึ้นและทำให้แห้ง (Mackie, 1982)



ภาพที่ 3 กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีการทางเอนไซม์

ที่มา : Mackie (1982)

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอส

การย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเอสมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น วัตถุดิบ เอนไซม์ พีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลาการย่อยสลาย เป็นต้น (Lahl and Braun, 1994)

1. วัตถุดิบ

ชนิดและองค์ประกอบของวัตถุดิบ การเตรียมวัตถุดิบ ความเข้มข้นของวัตถุดิบ มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีน โดยทั่วไปไม่มีข้อมูลระบุชัดเจนว่าปลาชนิดใดเหมาะสมต่อการเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต การเลือกวัตถุดิบขึ้นกับความสะดวกในการผลิต อย่างไรก็ตาม สามารถแบ่งวัตถุดิบที่นำมาผลิตได้ 2 กลุ่ม คือ ปลาสด และ วัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปปลา (ตารางที่ 4) อัจฉริยา เชื้อช่วยชู (2542) พบว่า การใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบมีแนวโน้มให้ผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลเสตสูงกว่าการใช้หัวปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบ (ตารางที่ 5) เนื่องจากหัวปลามีองค์ประกอบที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้ยากต่อการบดและการย่อยด้วยเอนไซม์ จากการศึกษาส่วนกล้ามเนื้อปลาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน พบว่า โปรตีนชนิดไมโอไฟบริลาถูกย่อยมากที่สุดในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย แต่ส่วนเนื้อเยื่อเลือกผ่าน (elaborate membrane system) จะเป็นส่วนที่ย่อยสลายยาก (Mohr (1977 อ้างโดย Shahidi *et al.*, 1995) Kim และคณะ (1997) พบว่าอัตราการย่อยสลายเคซีนสูงกว่าการย่อยสลายเนื้อปลาเมื่อใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่ง (pyloric caeca) ของปลาทูน่าในการย่อย เนื่องจากความสามารถในการละลายของวัตถุดิบทั้งสองชนิดต่างกัน

นอกจากนี้ปริมาณไขมันในวัตถุดิบยังมีผลต่อการย่อยสลายอีกด้วย วัตถุดิบที่มีไขมันสูงอาจเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (Mackie, 1982) การสกัดไขมันออกจากวัตถุดิบก่อนการย่อยสลายจะช่วยลดกลิ่นคาว แต่จะทำให้ระดับการย่อยสลายลดลง การให้ความร้อนแก่วัตถุดิบก่อนการย่อยสลายจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณค่าทางอาหารลดลง การย่อยโปรตีนจากปลาเฮอริง (Herring : *Clupea harengus*) ที่เตรียมด้วยวิธีต่างกันคือ เฮอริงสด เฮอริงที่สกัดไขมันออกโดยให้ความร้อนและโดยใช้เอทานอล พบว่า การใช้ปลาเฮอริงสดเป็นวัตถุดิบให้ปริมาณผลผลิตสูงที่สุดและมีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้สูงกว่าเฮอริงที่สกัดไขมันออกโดยให้ความร้อนและโดยใช้เอทานอลร้อยละ 40 และ 23 ตามลำดับ (Hoyle and Merritt, 1994) (ตารางที่ 5) วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และคณะ (2541) ศึกษาการเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อยโดยแช่ในสารละลายด่างให้ความร้อนภายใต้ความดัน และแช่ในน้ำกลั่น พบว่า การแช่วัตถุดิบในสารละลายด่างก่อนการย่อย จะได้ไฮโดรไลเสตที่มี emulsifying capacity สูงกว่าการเตรียมโดยวิธีอื่น 3 เท่า แต่ให้ปริมาณโปรตีนไม่ต่างกัน

ตารางที่ 4 วัตถุดิบและเอนไซม์ที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

วัตถุดิบ	เอนไซม์	เอกสารอ้างอิง
ปลา rockfish	Rhozyme P-11	Spinelli และคณะ (1972)
เนื้อปลาคอด	อัลคาเลส	Lalasidic และคณะ (1978)
ปลาซาร์ดีน	อัลคาเลส นิวเทรส ปาเปน	Quaglia และ Orban (1987)
เนื้อปลากระบอก	HT200 Protease N	Rebeca และคณะ (1991)
ปลา *Alaskan pollack*	Samonase	Mitsutoshi และคณะ (1992)
ปลา Oreochromis mossambicus	อัลคาเลส	Yu และ Tan (1992)
เนื้อปลาเฮอริง	อัลคาเลส ปาเปน	Hoyle และ Merritt (1994)
ปลา Mallotus villosus	อัลคาเลส นิวเทรส ปาเปน	Shahidi และคณะ (1995)
ปลา salmon (*Salmo salar*)	อัลคาเลส Flavourzyme Corolase เอนไซม์จาก pyloric caeca ของปลา salmon	Kristinsson และ Rasco (2000a) ; Kristinsson และ Rasco (2000b)
เศษเนื้อดำปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง	โบรมิเลน	Raghunath (1993)
เศษปลาแปซิฟิกไวทิง	อัลคาเลส นิวเทรส	Benjakul and Morrissey (1997)
เศษปลาคอด	เอนไซม์จากpyloric caeca ของปลาทูน่า	Kim และคณะ (1997)
หัวและไส้ปลาทรายแดง	อัลคาเลส	วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร และคณะ (2541)
หัวและเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ	อัลคาเลส นิวเทรส ปาเปน	อัจฉริยา เชื้อช่วยชู (2542)

ตารางที่ 5 ปริมาณผลผลิต (Yield) ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (NR) และองค์ประกอบทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเสต

วัตถุดิบ	เอนไซม์	Yield	NR *	องค์ประกอบทางเคมี			เอกสารอ้างอิง
				โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	
เศษปลาแปซิฟิกไวท์ทิง	อัลคาเลส		13.82	82.25	3.94	13.82	Benjakul และ Morrissey (1997)
เฮอริงสด	อัลคาเลส	5.5	-	87.9	4.0	12.5	Hoyle และ Merritt (1994)
	ปาเปน	4.8	-	85.3	4.7	9.6	
เฮอริงที่สกัดไขมันด้วยความร้อน	อัลคาเลส	4.8	-	82.3	3.7	13.3	
	ปาเปน	3.4	-	83.4	3.6	9.9	
เฮอริงที่สกัดไขมันด้วยเอทานอล	อัลคาเลส	3.6	-	83.7	0.9	7.5	
	ปาเปน	2.9	-				
ปลาคาเพลิน (*Mallotus villsus*)	ปาเปน		57.1	78.3	0.39	17.7	Shahidi และคณะ (1995)
	อัลคาเลส		51.6	71.2	0.21	21.50	
	นิวเทรส		70.6	72.4	0.18	20.80	
	เอนไซม์ภายในของปลา		22.9	74.4	1.51	17.7	
ปลาแซลมอน (*Salma salar*)	อัลคาเลส		57.03	88.39	0.23	8.96	Kristinsson และ Rasco (2000)
	เอนไซม์จาก pyroric caeca ของปลาแซลมอน		48.59	71.67	0.06	22.34	

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ตารางที่ 5 (ต่อ)

วัตถุดิบ	เอนไซม์	Yield	NR *	องค์ประกอบทางเคมี			เอกสารอ้างอิง
				โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	
หัวปลาโอแถบ	อัลคาเลส	11.01	63.92	84.90	0.24	9.38	อัจฉริยา เชื้อช่วยชู (2542)
	นิวเทรส	8.38	46.98	83.16	0.4	13.67	
	ปาเปน	8.35	45.28	85.90	0.71	11.40	
เครื่องในปลาโอแถบ	อัลคาเลส	17.97	95.85	80.86	0.26	4.73	
	นิวเทรส	17.27	90.41	81.21	0.26	5.35	
	ปาเปน	15.74	88.34	82.67	0.24	6.20	
ปลาคอด	อัลคาเลส	-	89	90.5	0.3	8.1	Lalasidic และคณะ (1978)
ปลาคอดสกัดไขมัน	อัลคาเลส	-	86	87.6	-	9.5	

* NR – Nitrogen recovery = ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้

ความเข้มข้นของวัตถุดิบเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลาย Raghunath (1993) พบว่า ความเข้มข้นของวัตถุดิบไม่มีผลต่อการละลายของแข็ง แต่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้ โดยเมื่อความเข้มข้นของวัตถุดิบสูงขึ้นปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้จะสูงขึ้นด้วย ซึ่งไม่สอดคล้องกับ Benjakul และ Morrissey (1997) ซึ่งพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อบัฟเฟอร์ (เพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์) ตั้งแต่ 1: 0.5 1: 1 1: 2 1: 3 1: 5 และ 1: 8 จะทำให้ความเข้มข้นของกรดอัลฟาอะมิโนและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง จนกระทั่งอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อบัฟเฟอร์เท่ากับ 1: 3 (สำหรับเอนไซม์อัลคาเลส) และ 1: 1 (สำหรับเอนไซม์นิวเทรส) การเพิ่มอัตราส่วนของวัตถุดิบต่อบัฟเฟอร์จะไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของกรดอัลฟาอะมิโนและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้

2. เอนไซม์

ชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายวัตถุดิบ โดยทั่วไปมักใช้เอนไซม์ผสมที่มีทั้งโปรติเอสที่ตัดพันธะภายนอกและภายใน (Lahl and Braun, 1994) เอนไซม์โปรติเอสที่ตัดพันธะภายในที่มีความจำเพาะต่ำ เช่น เอนไซม์จากพืชหรือจุลินทรีย์ จะมีประสิทธิภาพในการละลายกล้ามเนื้อปลามากกว่าเอนไซม์ที่มีความจำเพาะสูง เช่น เปปซิน ทริปซิน (Mackie, 1982) เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และ พิทยา อดุลยธรรม (2541) ศึกษาการย่อยหัวปลาทูน่าพันธุ์โอแถบโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ เอนไซม์อัลคาเลส นิวเทรส และปาเปน พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน เอนไซม์อัลคาเลสจะย่อยสลายหัวปลาทูน่าให้ปริมาณไนโตรเจนในสารละลายส่วนใสสูงสุด เช่นเดียวกับการย่อยวัสดุเศษเหลือจากปลาแปซิฟิกไวท์ทิง (Pacific whiting : *Merluccius productus*) ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายได้ดีกว่าเอนไซม์นิวเทรส และการย่อยโปรตีนจากปลาเฮอริงด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีประสิทธิภาพการในย่อยสลายได้ดีกว่าเอนไซม์ปาเปน (ตารางที่ 5) (Hoyle and Merritt, 1994 ; Benjakul and Morrissey, 1997)

ปัจจุบันการใช้เอนไซม์จากสัตว์น้ำในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์จากสัตว์น้ำมีคุณสมบัติจำเพาะและมีราคาถูกกว่าเอนไซม์ทางการค้า Kim และคณะ (1997) พบว่าการย่อยเนื้อปลาคอด (Cod : *Gadus macrocephalus*)โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่ง (pyroric caeca) ของปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้าชนิดอื่น โดยเมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 80 ซึ่งสูงกว่าการย่อยโดยเอนไซม์โปรเนสและไคโมทริปซิน ร้อยละ 15 เช่นเดียวกับ Ooshiro (1971 อ้างโดย Ramakrishna และคณะ, 1987) ซึ่งรายงานว่า เอนไซม์โปรติเอสจากไส้

ติ่งของปลาแม็คเคอเรล สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในเคซีนได้ร้อยละ 70 สูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากลูกวัวซึ่งย่อยได้ร้อยละ 15 สอดคล้องกับเอนไซม์ไคโมทริปซินจากตับอ่อน (pancreas) ของปลาฉลามหนู (Dogfish : *Squalus acanthias*) ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยพันธะเปปไทด์ในวัตถุดิบหลายชนิดได้ดีกว่าเอนไซม์จากลูกวัว (Ramakrishna *et al.*, 1987) ในทางกลับกัน มีรายงานว่าเอนไซม์ที่สกัดจากปลาและเอนไซม์ภายในตัวปลามีกิจกรรมการย่อยสลายต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้า (Hale, 1969 ; Shahidi *et al.*, 1995 ; Kristinsson and Rasco, 2000) Kristinsson และ Rasco (2000) พบว่าการใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาแอตแลนติกแซลมอน (Atlantic salmon : *Salmo salar*) ย่อยสลายเนื้อปลาแซลมอนได้ค่าไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery) ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าอีก 4 ชนิด เช่นเดียวกับการย่อยปลาคาเพลิน (Capelin : *Mallotus villosus*) และปลาเฮก (Hake : *Urophycis chuss*) โดยเอนไซม์ภายในตัวปลาเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (ตารางที่ 5) (Hale, 1969 ; Shahidi *et al.*, 1995)

ปริมาณเอนไซม์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลาย Yu และ Tan (1992) ศึกษาปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเนื้อปลา *Oreochomis mossambicus* พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่งและจะมีระดับการย่อยสลายคงที่แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ก็ไม่มีผลในการเพิ่มระดับการย่อยสลาย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Chuapoehuk และ Raksakulthai (1992) ที่ทดลองย่อยสลายเนื้อหอยนางรมด้วยเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลน ในทางกลับกัน มีรายงานว่าเอนไซม์จากภายในตัวปลาเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการย่อยสลายตัวปลา และการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อการละลายของวัตถุดิบและไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายของเครื่องในปลา (Hale, 1969 ; Freeman and Hoogland, 1956 อ้างโดย Kristinsson and Rasco, 2000)

3. สภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย

3.1 พีเอช

พีเอชที่ใช้ในการผลิตมักอยู่ในช่วงพีเอชที่เหมาะสมที่จะทำให้เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด (Lahl and Braun, 1994) Raghunath (1993) ศึกษาการย่อยเศษเนื้อแดงของปลาทูน่าโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน พบว่าที่พีเอช 5.5 มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณของแข็งที่ละลายได้สูงที่สุด และที่พีเอช 6.0 มีปริมาณไนโตรเจนที่ละลายได้สูงที่สุด สอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนซึ่งอยู่ในช่วงพีเอช 5-8 ส่วนพีเอชที่เหมาะสมต่อการย่อยโปรตีนจากปลาแปซิฟิกไวท์ทิงโดยเอนไซม์นิวเทรสและอัลคาเลสเท่ากับ 7.0 และ 9.5 สอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นิวเทรสซึ่งอยู่ในช่วงพีเอช 6.0-8.0 และพีเอชที่เหมาะสมต่อ

การทำงานของเอนไซม์อัลคาเลสซึ่งอยู่ในช่วงพีเอชด่าง (กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสจะลดลงเมื่อพีเอชมากกว่า 10.5) (Benjakul and Morrissey, 1997)

3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เลือกใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ควรสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ (Lahl and Braun, 1994) Benjakul และ Morrissey (1997) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยเศษปลาแปซิฟิกไวท์ทิงโดยเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรส เท่ากับ 60 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยหัวและเครื่องในปลาทูน่าโดยเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรส เท่ากับ 60 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (อัจฉริยา เชื้อช่วยชู, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาเลสและนิวเทรสซึ่งอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 55-70 และ 45-55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

4. ระยะเวลาการย่อยสลาย

เวลาในการย่อยสลายมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราส่วนของกรดอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนรวม ถ้าใช้เวลาในการย่อยสลายสูงจะทำให้อัตราส่วนของกรดอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนรวมสูง (Lahl and Braun, 1994) โดยทั่วไประดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะเริ่มต้นของการย่อยสลาย หลังจากนั้นระดับการย่อยสลายจะคงที่หรือเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย (Mackie, 1982) ในการย่อยสลายโปรตีนปลา โปรตีนส่วนที่ละลายได้จะถูกปลดปล่อยออกมาในระยะเริ่มต้นของการย่อยสลายและจะคงที่ การเติมเอนไซม์ลงไปในระยะคงที่ จะไม่มีผลในการเพิ่มขึ้นของโปรตีนที่ละลายได้ ซึ่งการที่การย่อยโปรตีนถูกยับยั้ง เนื่องจาก การมีโปรตีนที่ละลายได้อยู่ในสารละลายสูง ความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายได้ที่สูงขึ้นในสารละลายผลิตภัณฑ์มีผลในการลดอัตราการย่อยสลายและการเก็บเกี่ยวโปรตีน (Shahidi *et al.*, 1995)

5. ปุ๋ย

5.1 คำจำกัดความเกี่ยวกับปุ๋ย

ปุ๋ยเป็นสารอินทรีย์หรือสารอนินทรีย์ไม่ว่าจะเกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือทำขึ้นก็ตาม สำหรับใช้เป็นธาตุอาหารพืช ไม่ว่าโดยวิธีใดหรือทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในดิน เพื่อบำรุงความเติบโตแก่พืช

ปุ๋ยอินทรีย์ หมายถึง ปุ๋ยที่ได้มาจากอินทรีย์สารซึ่งผลิตขึ้นโดยกรรมวิธีต่างๆ และจะเป็นประโยชน์ต่อพืช ก็ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพเสียก่อน ปุ๋ยอินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ ปุ๋ยหมัก ปุ๋ยคอก และปุ๋ยพืชสด ปุ๋ยชนิดนี้จะให้ปริมาณธาตุอาหารพืชน้อย แต่จะให้ธาตุอาหารพืชอย่างครบถ้วน ทั้งธาตุอาหารพืชหลัก ธาตุอาหารพืชรอง และ ธาตุอาหารพืชเสริม และช่วยให้ดินสามารถดูดซับธาตุอาหารพืชไว้ได้สูง ทำให้การใช้ปุ๋ยเคมีมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ช่วยให้ดินปรับลดความเป็นกรดด่างอย่างช้าๆ นอกจากนี้ยังช่วยปรับปรุงคุณสมบัติของดินทางด้านกายภาพให้ดีขึ้นด้วย กล่าวคือ ทำให้ดินมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดีขึ้น และช่วยเพิ่มชนิดและกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์แก่พืชในดินมากยิ่งขึ้น (ปรัชญา ธัญญาดี, 2536)

ปุ๋ยเคมี หมายถึง ปุ๋ยที่ได้จากสารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์สังเคราะห์ ให้ธาตุอาหารที่จำเป็นแก่พืช ทั้งธาตุอาหารหลัก หรือ ธาตุอาหารรอง หรือ ธาตุอาหารพืชเสริม ทั้งนี้ขึ้นกับกรรมวิธีการผลิตปุ๋ยนั้นๆ ปุ๋ยเคมีบางชนิด เมื่อเติมลงไปในดินจะมีผลต่อความเป็นกรดด่างของดิน ปุ๋ยไนโตรเจนที่อยู่ในรูปแอมโมเนีย เช่น ปุ๋ยแอมโมเนียมคลอไรด์ ปุ๋ยแอมโมเนียมฟอสเฟต มีผลตกค้างทำให้ดินเป็นกรดมาก ปุ๋ยที่มีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบ เช่น ปุ๋ยแคลเซียมไนเตรต ปุ๋ยที่เอาปูน หินปูน โคโลไมท์ มาผสม มีผลตกค้างทำให้ดินเป็นด่าง (ปรัชญา ธัญญาดี, 2536)

ธาตุอาหารพืชแบ่งเป็น ธาตุอาหารพืชหลัก คือธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณมาก ได้แก่ ธาตุไนโตรเจน ฟอสฟอรัส และ โปแตสเซียม ธาตุอาหารพืชรอง คือ ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณไม่มากนักแต่ขาดไม่ได้ ได้แก่ ธาตุกำมะถัน แคลเซียม แมกนีเซียม ธาตุอาหารพืชเสริม คือ ธาตุอาหารที่พืชต้องการในปริมาณน้อยมากแต่จะขาดไม่ได้ ได้แก่ ธาตุเหล็ก แมงกานีส สังกะสี ทองแดง โบรอน โมลิบดีนัม และคลอรีน (คณะอาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2519)

การจำแนกประเภทของปุ๋ยสามารถจำแนกโดยใช้หลักการต่างๆกัน เช่น การจำแนกตามสภาพของสารประกอบที่ใช้เป็นปุ๋ย ได้เป็น ปุ๋ยอินทรีย์ และปุ๋ยอนินทรีย์ การจำแนกตามธาตุอาหารที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้เป็น ปุ๋ยไนโตรเจน ปุ๋ยฟอสฟอรัส และ ปุ๋ยโพแทสเซียม การจำแนกตามระดับของสูตรหรือเกรดของปุ๋ย ได้เป็น ปุ๋ยสูตรต่ำ ปุ๋ยสูตรกลาง ปุ๋ยสูตรสูง และ ปุ๋ยสูตรเข้มข้น (คณะอาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา, 2519)

5.2 การผลิตปุ๋ยจากวัสดุเศษเหลือ

อาหารทะเลและวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปอาหารทะเล สามารถนำมาผลิตเป็นปุ๋ยอินทรีย์ได้ เนื่องจากวัสดุเศษเหลือเหล่านี้มีองค์ประกอบของธาตุอาหารพืชอยู่ แร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีของปลามีความแตกต่างกันตามอาหารและแหล่งที่อยู่ของปลา แร่ธาตุที่พบในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็มมีประมาณ 60 ชนิด ออกซิเจนร้อยละ 75 ไฮโดรเจนร้อยละ 10 คาร์บอนร้อยละ 9.5 ไนโตรเจนร้อยละ 2.5-3.0 แคลเซียมร้อยละ 1.2-1.5 ฟอสฟอรัสร้อยละ 0.6-0.8 กำมะถันร้อยละ 0.6-0.8 ส่วนแร่ธาตุอื่นๆมีปริมาณน้อยมาก วัสดุเศษเหลือจากปลามีธาตุอาหารพืช ได้แก่ ไนโตรเจนจากส่วนเนื้อเยื่อปลาในรูปโปรตีน ฟอสฟอรัสและแคลเซียมจากส่วนกระดูกและหัวปลา เหล็กและทองแดงจากอวัยวะภายในของปลา (สุริยา สาสนรักกิจ และคณะ, 2542) Fernandez-Cornejo และคณะ (1998) รายงานว่า ในสหรัฐอเมริกามีการนำผลิตภัณฑ์จากปลามาใช้เป็นปุ๋ยสำหรับพืชร้อยละ 20 ของปริมาณการใช้ปุ๋ยอินทรีย์และมีแนวโน้มการใช้ปุ๋ยอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น

Gagnon และ Berrouard (1994) ศึกษาการใช้วัสดุเศษเหลือจากพืชและสัตว์หลายชนิดมาใช้เป็นปุ๋ยให้ต้นมะเขือเทศ โดยวัสดุเศษเหลือต่างๆมีปริมาณแร่ธาตุอาหารหลักแสดงดังตารางที่ 6 พบว่า วัสดุเศษเหลือมีผลต่อการเจริญของมะเขือเทศ โดยทำให้น้ำหนักแห้งของยอดเพิ่มขึ้นร้อยละ 57-83 เมื่อเทียบกับการไม่ใช้ปุ๋ย และวัสดุเศษเหลือที่ได้จากสัตว์ มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักแห้งของยอดมะเขือเทศได้มากกว่าวัสดุเศษเหลือจากพืช (ตารางที่ 6) Blatt และ Mcrae (1998) ศึกษาองค์ประกอบของปุ๋ยจากวัสดุเศษเหลือทางทะเล พบว่าปุ๋ยจากวัสดุเศษเหลือมีปริมาณธาตุอาหารหลัก ธาตุอาหารรองและธาตุอาหารเสริมอย่างครบถ้วน (ตารางที่ 7) และเมื่อพิจารณาผลของปุ๋ยอินทรีย์เทียบกับปุ๋ยเคมี พบว่า ปริมาณผลผลิตของแครอท และ กะหล่ำปลีที่ได้รับปุ๋ยอินทรีย์มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้รับจากการใช้ปุ๋ยเคมี และดินที่ได้รับปุ๋ยอินทรีย์จะมีค่าพีเอชของดินและปริมาณแคลเซียมในดินสูงขึ้น (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 6 ผลของวัสดุเศษเหลือชนิดต่างๆต่อการเจริญของมะเขือเทศในโรงเรือน

วัสดุเศษเหลือ	ปริมาณธาตุอาหาร (N-P-K)	น้ำหนักแห้งของยอด (กรัมต่อต้น)
Blood meal	12.5-1.1-1.0	18.5
Feather meal	13.6-0.3-0.2	17.3
Meat meal	7.7-3.1-0.7	16.3
Crab-shell meal	8.2-1.5-0.5	18.8
Fish meal	10.1-4.5-0.5	17.1
Fish scale meal	10.0-3.7-0.1	15.8
Canols meal	6.0-1.1-1.3	10.8
Cottonseed meal	6.5-1.1-1.6	16.2
Soybean meal	7.5-0.7-2.4	14.4
Distiller's dried grains	4.3-0.9-1.1	14.5
Wheat bran	2.9-1.4-1.3	13.5
Alfafa meal	2.5-0.3-1.9	10.8
Dried whey sludge	5.3-2.5-0.9	18.3
Without fertilizer		10.3

ที่มา : Gagnon และ Berrouard (1994)

ตารางที่ 7 ปริมาณธาตุอาหารของปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้จากวัสดุเศษเหลือจากทะเล

ชนิดของปุ๋ย	ธาตุอาหาร (ร้อยละ)						ธาตุอาหาร (มก./กก.)				
	N	P	K	Ca	Mg	Na	Fe	Mn	Cu	Zn	B
0-17-17	0	7.5	14.1	13.6	0.3	0	0	0	0	0	0
17-17-17	17	7.5	14.1	0.1	0.1	0	0	0	0	0	0
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [1]	6	4.4	0.8	15.3	0.3	1.7	262	16	27	64	11
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [2]	7	3.1	5.8	12.1	0.2	1.8	366	16	36	48	10
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [3]	3	1.8	2.5	12.1	1.9	0.7	82	169	80	86	29
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [4]	7	6.7	1.0	14.5	0.3	1.9	198	18	24	57	12

[1] เศษกระดูกปลาป่น [2] เศษกระดูกปลาป่นที่เติมโปแตสเซียมคลอไรด์

[3] ปุ๋ยผสมระหว่างเปลือกหอย หินฟอสเฟต โปแตสเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟต และ ตะกอนดิน

[4] ปุ๋ยผสมระหว่างกระดูกป่น สาหร่ายทะเลป่น และน้ำมันปลา

ที่มา : Blatt และ Mcrae (1998)

ตารางที่ 8 ปริมาณผลิตผลของแครอท กะหล่ำปลี และถั่วลันเตาที่ได้รับปุ๋ยเคมีและปุ๋ยอินทรีย์ที่ได้จากวัสดุเศษเหลือจากทะเล

ชนิดของปุ๋ย	ปริมาณผลิตผล กะหล่ำปลี (ตันต่อเฮกเตอร์)	ปริมาณผลิตผล แครอท (ตันต่อเฮกเตอร์)	ปริมาณผลิตผล ถั่วลันเตา (ตันต่อเฮกเตอร์)
0-17-17	16.5	75.7	89.7
17-17-17	20.0	72.2	89.1
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [1]	23.4	76.4	87.6
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [2]	22.7	76.1	87.7
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [3]	20.9	76.2	87.7
ปุ๋ยอินทรีย์จากปลา [4]	22.2	76.7	86.6

[1] เศษกระดูกปลาป่น [2] เศษกระดูกปลาป่นที่เติมโปแตสเซียมคลอไรด์

[3] ปุ๋ยผสมระหว่างเปลือกหอย หินฟอสเฟต โปแตสเซียม แมกนีเซียม ซัลเฟต และ ตะกอนดิน

[4] ปุ๋ยผสมระหว่างกระดูกป่น สาหร่ายทะเลป่น และน้ำมันปลา

ที่มา : Blatt และ Mcrae (1998)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตและปุ๋ยน้ำจากวัสดุเศษเหลือของโรงงานอาหารทะเลโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่า

2. เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณธาตุอาหารพืชของปุ๋ยน้ำที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าและปุ๋ยน้ำทางการค้า

3. ศึกษาการตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. วัตถุดิบเครื่องใน

- เครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง จากบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด มหาชน

2. ปุ๋ย

ปุ๋ยน้ำอินทรีย์ทางการค้ายี่ห้อซาร่าพลัส (บริษัทอุตสาหเกษตรพัฒนา จำกัด)

ปุ๋ยเคมีสูตร 21-0-0 (บริษัทปุ๋ยแห่งชาติ)

3. เมล็ดผัก

เมล็ดผักบุ้งจีน (บริษัทเจียไต๋ จำกัด)

4. ดินผสม

ดินที่ใช้ปลูกผักเป็นดินผสม (ร้านกรีนวิว การ์เด้นท์) ซึ่งส่วนผสม คือ หน้าดิน : แกลบสด : แกลบเผา : ขุยมะพร้าว ในอัตราส่วน 2 : 2 : 1 : 1

5. สารเคมี

ใช้สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ วิเคราะห์คุณภาพของวัตถุดิบ ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตและปุ๋ยน้ำ ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต (Merck) โซเดียมไบคาร์บอเนต (Merck) เคซีน (Sigma) กรดไตรคาร์บอกซิลิก (Carlo erba) กรดฟอสฟอริก (Lab-scan) กรดซัลฟิวริก (Lab-scan) กรดไฮโดรคลอริก (Lab-scan) ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Lab-scan) กรดบอริก (Merck)

อุปกรณ์

1. เครื่องบดผสม รุ่น SP099 ของบริษัท International จำกัด
2. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U–2000 ของบริษัท Hitachi จำกัด
3. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น SCR 20 B ของบริษัท Hitachi Koki จำกัด
4. เครื่องวัดพีเอช รุ่น CG 825 ของบริษัท Schott จำกัด
5. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น W350 ของบริษัท Memmert จำกัด
6. เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย รุ่น Basic Model ของบริษัท Niro A/S จำกัด
7. เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง รุ่น Maxi Dry Lyo ของบริษัท Heto จำกัด
8. อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ชุดเครื่องมือสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า (ภาคผนวก ก)

การวิเคราะห์

1. กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Hagihara และคณะ (1958) ดังนี้

นำเอนไซม์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ที่เจือจางอย่างเหมาะสมใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) พีเอช 10.0 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) ผสมกับสารละลายสับสเตรต 1 มิลลิลิตร (เคซีนร้อยละ 1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ (stop buffer : tri-chloroacetic acid 0.1 M : sodium acetate 0.22 M : acetic acid 0.33 M ในอัตราส่วน 1: 1: 1) (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (ภาคผนวก ก)

หลอดควบคุม เตรียมโดยเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ลงในสับสเตรต 1 มิลลิลิตร แล้วเติมเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เช่นเดียวกับเอนไซม์

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตได้กรดอะมิโนไทโรซีน 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (specific activity) ของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไทโรซีน} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$\text{กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (relative activity) (ร้อยละ)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์} \times 100}{\text{กิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์}}$$

2. กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินโดยดัดแปลงวิธีการ ของ Simpson และ Haard, (1984) ดังนี้

นำสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 20 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.012 โมลาร์ 2.6 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายสับสเตรต 0.3 มิลลิลิตร (10 มิลลิโมลาร์เอ็นโทลูอีนซัลโฟนิลแอลอาร์จินีนเมทิลเอสเทอร์ (*N*-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester) ผลิตโดย Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 247 นาโนเมตร

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป} \times 1000 \times 3}{540 \times \text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา}}$$

3. กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินโดยดัดแปลงวิธีการ ของ Ramakrishna และคณะ (1987) ดังนี้

นำสารละลายเอนไซม์ 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับ 20 มิลลิโมลาร์ทริสไฮโดรคลอริกบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 0.012 โมลาร์ 1.4 มิลลิลิตร แล้วผสมกับสารละลายสับสเตรต 1.5 มิลลิลิตร (10 มิลลิโมลาร์เบนโซอิลแอลไทโรซีนเอทิลเอสเทอร์ (Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) ผลิตโดย Sigma) บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงไปจากค่าดูดกลืนแสงเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 256 นาโนเมตร

กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน 1 ยูนิต หมายถึง ความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ค่าดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไป} \times 1000 \times 3}{964 \times \text{ปริมาตรสารละลายทั้งหมดในปฏิกิริยา}}$$

4. ค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery)

การหาค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery) โดยวิธีของ Shahidi และคณะ (1995) โดย หาปริมาณไนโตรเจนในวัตถุดิบเริ่มต้นและปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในส่วนใสของไฮโดรไลเสต แล้วคำนวณจาก

$$\text{ค่าปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในส่วนใส} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนในวัตถุดิบเริ่มต้น}}$$

5. ค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis)

การหาค่าระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยวิธีของ Hoyle และ Merritt (1994) โดย นำโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ ผสมกับกรดไตรคลอโรอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 20 (โดยน้ำหนัก) ในอัตราส่วน 1 : 1 เขย่าให้เข้ากัน นำเข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนของเหลวใสที่ได้ไปหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคำนวณจาก

$$\text{ค่าระดับการย่อยสลาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายในกรดไตรคลอโรอะซิติก (10\% TCA soluble nitrogen)} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}}$$

6. **ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้** (soluble protein) โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) (ภาคผนวก ก)

7. **องค์ประกอบทางเคมี** ได้แก่ โปรตีน ความชื้น ไขมัน เถ้า โดยวิธีของ AOAC (1990) (ภาคผนวก ก)

8. **ปริมาณธาตุอาหารพืช** ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี ส่งวิเคราะห์ที่หน่วยวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (ภาคผนวก ก)

9. **วิเคราะห์ผลทางสถิติ** โดยใช้ Analysis of variance และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยใช้ Duncan 's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

วิธีการ

1. ผลของวิธีการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

1.1 การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ

สกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าโดยใช้วิธีการที่เป็นผลมาจากการศึกษาของฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์ (2541) โดย นำตัวอย่างเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง มาทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น สกัดด้วยสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ที่เย็น (4 องศาเซลเซียส) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ที่เติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 พีเอช 10.0 ใช้อัตราส่วนเครื่องในปลาต่อ บัฟเฟอร์เท่ากับ 1: 2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บดผสมด้วยเครื่องบดผสม กรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 12,735 x g (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 30 นาที สารละลายส่วนใสคือเอนไซม์สกัด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน

1.2 ผลของวิธีการทำแห้งในการเตรียมเอนไซม์ผงจากสารละลายเอนไซม์สกัด

นำสารละลายเอนไซม์สกัดที่ได้ มาทำแห้งโดยใช้วิธีการทำแห้ง 2 วิธีคือ การทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย และการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง สภาวะที่ใช้ในการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย คือ อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส ความดัน 2.85 บาร์ อัตราการป้อนสารละลาย 10 มิลลิลิตรต่อนาที สภาวะที่ใช้ในการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งคือ อุณหภูมิ –50 องศาเซลเซียส ความดัน 0.3 มิลลิเมตรปรอท วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ก่อนและหลังการทำแห้ง คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์และผลผลิตที่ได้ ใช้สารละลายเอนไซม์เป็นชุดควบคุม เลือกวิธีการทำแห้งที่ให้ผลผลิตและกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดมาศึกษาต่อไป

2. สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์

2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

นำสารละลายเอนไซม์สกัด และเอนไซม์ผงที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม (ผลจาก ข้อ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ คือ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน เก็บตัวอย่างทุก 3 วันเพื่อวัดพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ เลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด สำหรับการเก็บรักษาเอนไซม์เพื่อศึกษาต่อไป

2.2 อายุการเก็บรักษาเอนไซม์

นำสารละลายเอนไซม์สกัดและเอนไซม์ผงที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีการทำแห้งที่เหมาะสม (ผลจาก ข้อ 1) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน เก็บตัวอย่างทุก 15 วัน เพื่อวัดพีเอช วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส และปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

3. คุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

3.1 พีเอชที่เหมาะสม

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยผสมสารละลายเอนไซม์สกัดกับสับสเตรต (เคซีน) ที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆคือ พีเอช 3 4 5 และ 6 (ละลายสับสเตรตในซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พีเอช 7 8 9 (ละลายสับสเตรตในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) พีเอช 10 10.5 และ 11 (ละลายสับสเตรตในคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์)

วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยบ่มสารละลายเอนไซม์ผสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยนำสารละลายเอนไซม์สกัดใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.1) วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสโดยบ่มที่อุณหภูมิ 4 20 30 37 45 55 และ 60 องศาเซลเซียส

3.3 ความคงตัวต่อพีเอช (pH stability)

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ โดยผสมสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 8 9 (ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) พีเอช 10 และ 11 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 และ 120 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (residual activity)

3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability)

ศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์ โดยบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 60 90 120 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่

3.5 ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบชนิดต่างๆ

ศึกษาความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบ 4 ชนิด คือ เครื่องในปลาทูน่า เครื่องในปลาทูน่าที่สกัดเอนไซม์แล้ว เนื้อปลาบด และเคซีน โดยนำวัตถุดิบมาเติมคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 5 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 10.0 เติมเอนไซม์สกัดความเข้มข้นร้อยละ 5 ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น โดยมีวัตถุดิบที่ไม่เติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,735 x g (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลาย

3.6 ความสามารถของเอนไซม์สกัดในการย่อยสลายวัตถุดิบเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (เอนไซม์อัลคาเลส)

วัตถุดิบที่ใช้คือเครื่องในปลา และเคซีน โดยนำวัตถุดิบมาเติมคาร์บอเนต - ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 5 ปรับพีเอชให้เท่ากับ 10.0 เจือจางเอนไซม์ทางการค้าให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับเอนไซม์สกัด คือให้มีกิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นเท่ากับ 16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เติมเอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 5 ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น โดยมี

วัตถุดิบที่ไม่เติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,735 x g (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลาย

4. สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

4.1 การเตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง และเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่สกัดเอนไซม์ออกแล้วในข้อ 1.1 วัตถุดิบชนิดแรกเตรียมโดย นำเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง มาล้างทำความสะอาด ทำให้สะเด็ดน้ำ แล้วบดด้วยเครื่องบดผสมจนละเอียด บรรจุในกล่องพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ชนิดที่ 2 เตรียมโดยนำเครื่องในที่สกัดเอนไซม์ในข้อ 1.1 บดด้วยเครื่องบดผสมจนละเอียด บรรจุในกล่องพลาสติก เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า โดยสุ่มตัวอย่างวัตถุดิบที่บดละเอียดชนิดละ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ มาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยวิธีของ AOAC (1990)

4.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสม

ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนจากเครื่องในปลา วางแผนการทดลองแบบแฟกทอเรียลโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0 5 10 15 ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น และใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 3 5 7 10

นำวัตถุดิบจากข้อ 4.1 มาเติมคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ต้องการศึกษา ปรับพีเอชให้เท่ากับ 10.0 เติมเอนไซม์สกัดที่ระดับความเข้มข้นต่างๆที่ต้องการศึกษา โดยมีวัตถุดิบที่ไม่เติมเอนไซม์เป็นชุดควบคุม นำไปย่อยสลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,735 x g (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลาย คัดเลือกความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่มีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงที่สุด

4.3 ระยะเวลาการย่อยสลาย

นำวัตถุดิบจากข้อ 4.1 มาทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์สกัดโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมจากข้อ 4.2 เป็นเวลา 0 0.5 1 1.5 2 4 6 8 ชั่วโมง โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด คัดเลือกระยะเวลาการย่อยสลายที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่มีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงที่สุด

5. การผลิตปุ๋ยน้ำและการตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ

5.1 การผลิตปุ๋ยน้ำ

ผลิตปุ๋ยน้ำโดยการย่อยสลายเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 10 ไม่เติมเอนไซม์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,735 x g (10,000 รอบต่อนาที) เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายส่วนใสไปปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงพีเอช 6.5-7.5 ด้วยกรดฟอสฟอริก นำปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้และเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองไปวิเคราะห์ธาตุอาหารพืช

5.2 การตอบสนองของผักบุ้งต่อปุ๋ยน้ำ

ทดลองปลูกผักบุ้งจีนในดินผสม ใช้กระถางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร รดน้ำวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น ก่อนทำการปลูกนำเมล็ดผักบุ้งจีนไปแช่น้ำนาน 6-12 ชั่วโมง แล้วนำเฉพาะเมล็ดที่ไม่ลอยน้ำมาปลูก ทำการปลูกในกระถางกระถางละ 7 เมล็ด เมื่อกล้าอายุได้ 7 วัน ถอนแยกเหลือกระถางละ 5 ต้น และวัดความสูงเริ่มต้นของต้นกล้า ให้ปุ๋ยในอัตรา 7 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ (0.309 กรัมไนโตรเจนต่อกระถาง) โดยแบ่งใส่ 2 ครั้ง ครั้งละ 0.154 กรัมไนโตรเจนต่อกระถาง ครั้งแรกเมื่อกล้าอายุ 7 วัน และครั้งที่ 2 เมื่อกล้าอายุ 14 วัน โดยการรดปุ๋ยลงไปที่โคนต้น วัดความสูงของลำต้นทุก 7 วัน เก็บเกี่ยวผักบุ้งจีนโดยตัดต้นผักบุ้งในระดับเดียวกับขอบกระถาง ชั่งน้ำหนักและวัดความสูง เมื่ออายุได้ 25 วัน (กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม, 2542)

การให้ปุ๋ย ให้ปุ๋ยในอัตรา 7 กิโลกรัมไนโตรเจนต่อไร่ (0.309 กรัมไนโตรเจนต่อกระถาง) แบ่งการให้ปุ๋ยเป็น 4 แบบคือ

แบบที่ 1 ไม่ให้ปุ๋ย

แบบที่ 2 ให้ปุ๋ยน้ำที่ผลิตจากเครื่องในปลาทูน่า (ครั้งละ 10.88 มิลลิลิตรต่อกระถาง)

แบบที่ 3 ให้ปุ๋ยน้ำทางการค้า (ครั้งละ 1.73 มิลลิลิตรต่อกระถาง)

แบบที่ 4 ให้ปุ๋ยเคมี (ครั้งละ 0.736 กรัมต่อกระถาง)

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. ผลของวิธีการทำแห้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

1.1 การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในและกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ

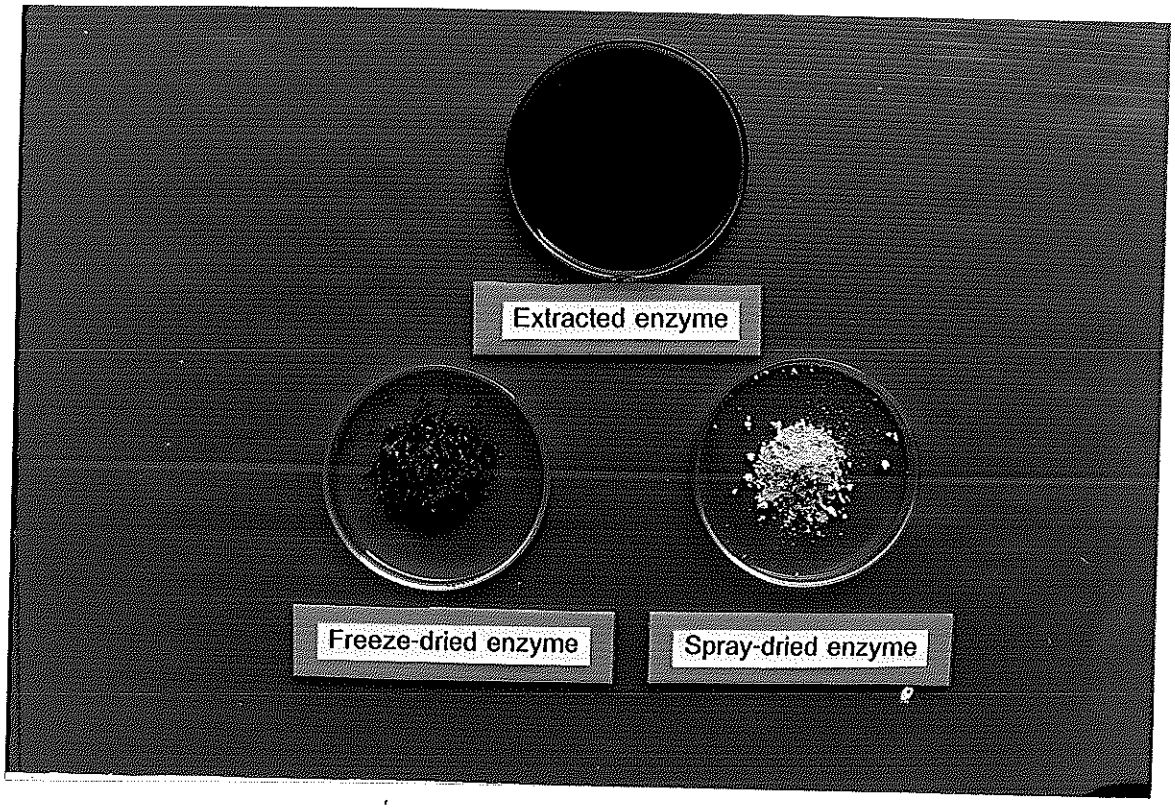
เครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองจากโรงงานฯที่เก็บตัวอย่างระหว่างเดือนกรกฎาคม ถึง สิงหาคม ปี พ.ศ. 2542 นำมาสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 10.0 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน มีค่าเท่ากับ 16.88 0.11 และ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้เคซีน เอ็นโทลูอีนซัลโฟนิลแอลอาร์จินีนเมทิลเอสเทอร์ (*N*-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester) และ เบนโซอิลแอลไทโรซีนเอทิลเอสเทอร์ (Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) เป็นสับสเตรทตามลำดับ โดยเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน มีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์เท่ากับร้อยละ 0.65 และ 0.41 ตามลำดับเมื่อเทียบกับเอนไซม์โปรติเอส กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทดลองนี้ต่ำกว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในการทดลองของฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์ (2541) ซึ่งพบว่า การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธ์ครีบเหลืองโดยใช้บัฟเฟอร์ พีเอช 10.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 72.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่เมื่อสกัดโดยใช้บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ให้กิจกรรมของเอนไซม์ 16.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร การที่กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าต่ำกว่า เนื่องจากฤดูกาล ระยะเวลาการจับ แหล่งที่อยู่ อาหารการกิน และสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน เป็นต้น นอกจากนี้เอนไซม์ที่สกัดได้มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินต่ำกว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองโดยใช้ทริสไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ผสมอยู่ ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน เท่ากับ 44.07 และ 3.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Jantaro, 2000) จากผลการทดลองนี้จะเห็นว่า ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินที่ได้ดังนี้ เนื่องจากพีเอชของบัฟเฟอร์ที่สกัดคือ พีเอช 10.0 ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่า พีเอช 7.0-8.0 ที่โดยทั่วไปใช้ในการสกัดเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ (Shin and Zall, 1986 ; Kim *et al.*, 1997 ; Fong *et al.*, 1998 ; Bustor *et al.*, 1999 ; Jantaro, 2000) รวมทั้งไม่มีการเติมแคลเซียมในบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Krzyzosiak และ Daniel (1997) ที่ว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินจากเครื่องในของ

ปลาในทะเลลึกสายพันธุ์ *Allocyttus niger* (Black Oreo Dory) มีความคงตัวลดลงเมื่อไม่ได้เติมแคลเซียมลงในสารละลายเอนไซม์

1.2 ผลของวิธีการทำแห้งในการเตรียมเอนไซม์ผงจากสารละลายเอนไซม์สกัด

เอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้ง 2 วิธี คือ การทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย และ วิธีแช่เยือกแข็ง แสดงดังภาพที่ 4 พบว่าเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งมีสีใกล้เคียงกับเอนไซม์สกัด แต่เอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยมีสีอ่อนกว่าและมีลักษณะเป็นผงละเอียดกว่า เนื่องจากในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่ามีองค์ประกอบที่สำคัญคือสีแดงของฮีโมโกลบิน และเมื่อเอนไซม์ถูกนำมาทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย ทำให้เอนไซม์สัมผัสกับออกซิเจนเกิดการจับกันระหว่างออกซิเจนกับฮีโมโกลบินในสารละลายเอนไซม์เปลี่ยนเป็นออกซีฮีโมโกลบิน (มนตรี จุฬาวัฒนทล และคณะ, 2530) จึงทำให้เอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยมีสีอ่อนกว่าเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง เมื่อพิจารณาค่ากิจกรรมจำเพาะ พบว่าการทำแห้งทั้ง 2 วิธี มีผลทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสลดลงจาก 1.028 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เป็น 0.66 และ 0.782 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ หรือลดลงร้อยละ 35.80 และ 29.18 ตามลำดับ และไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินในเอนไซม์ผงทั้ง 2 ชนิด กิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ของเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยสูงกว่าค่าที่ได้จากการใช้วิธีแช่เยือกแข็งเมื่อเทียบกับเอนไซม์ที่สกัด โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ ร้อยละ 70.82 และ 64.20 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ค่าที่ได้นี้ต่ำกว่าค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอส ทริปซิน และ ไคโมทริปซินของเอนไซม์จากกระบวนการหมักและผ่านการทำแห้งด้วยวิธีพ่นฝอย ซึ่งมีค่าร้อยละ 86 77 และ 94 ตามลำดับ (Gildberg and Quan, 1994)

จากผลการทดลองข้างต้น จะเห็นว่าการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยให้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์สูงกว่าการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งร้อยละ 6.62 ทั้งนี้เนื่องจากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งสามารถทำแห้งได้ครั้งละไม่มาก (30 มิลลิลิตรต่อหลอด) ตัวอย่างเอนไซม์ก่อนการทำแห้งถูกนำมาแช่แข็งและละลายน้ำแข็งและเก็บรักษาเป็นเวลานานก่อนการทำแห้ง ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มต้นลดลง จากการทดลองนี้เลือกการทำแห้งเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าด้วยวิธีแช่เยือกแข็งมาศึกษาในขั้นต่อไป เนื่องจากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ผงได้ง่ายกว่า โดยสามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 87.62 ในขณะที่วิธีพ่นฝอยเก็บเกี่ยวเอนไซม์ได้ร้อยละ 24.79 เนื่องจากในการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งหลอดที่ใช้ทำแห้งไม่ซับซ้อนทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว แต่จะใช้เวลาในการทำแห้งเอนไซม์นานกว่าการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย



ภาพที่ 4 เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่า และเอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยและวิธีแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 9 ค่ากิจกรรมจำเพาะและกิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ของเอนไซม์จากการทำแห้งเอนไซม์โดยวิธีพ่นฝอยและวิธีแช่เยือกแข็ง

ตัวอย่าง	กิจกรรมจำเพาะเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ (ร้อยละ)
เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่า	0.257 ± 0.03	100 ± 0.03
เอนไซม์ผงจากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง	0.165 ± 0.03	64.20 ± 0.03
เอนไซม์ผงจากการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอย	0.182 ± 0.01	70.82 ± 0.01

ในขณะที่ขนาดของอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำแห้งแบบพ่นฝอยมีขนาดใหญ่และมีความซับซ้อน จึงมีการสูญเสียผลผลิตของเอนไซม์โดยไปติดอยู่ตามส่วนต่างๆของเครื่องทำแห้ง ทำให้ยากต่อการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ผง

วิธีการทำแห้งทั้ง 2 วิธี มีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง นอกจากนี้เอนไซม์ที่ได้จากการทำแห้งยังมีความคงตัวต่ออุณหภูมิต่ำกว่าสารละลายเอนไซม์สกัดโดยเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งเหลือกิจกรรมของเอนไซม์ร้อยละ 36.1 และ 89.6 ในขณะที่เอนไซม์สกัดเหลือกิจกรรมอยู่ร้อยละ 62.7 และ 100 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 10) ปัจจัยทางกายภาพที่ทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ ได้แก่ พีเอช อุณหภูมิ การแช่แข็งและละลายน้ำแข็ง การกวน และความดัน เป็นต้น (Walsh and Headon, 1994) การทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยทำให้เอนไซม์เกิดการเสียสภาพโดยใช้ความร้อนในขั้นตอนการทำแห้ง ส่วนการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งสามารถทำให้เกิดการเสียสภาพของเอนไซม์ในขั้นตอนการแช่แข็งก่อนการทำแห้ง และในขั้นตอนการทำแห้งซึ่งมีการใช้ความดัน (Johnson and Etzel, 1995) เช่นเดียวกับ กรณีของเอนไซม์จาก *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32 ซึ่งพบว่าวิธีการทำแห้งทั้ง 2 วิธีมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสและเบต้ากาแลคโตสิเดสภายในเซลล์ลดลง และเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีพ่นฝอยมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนเปปติเดสและเบต้ากาแลคโตสิเดสเหลืออยู่มากที่สุด แต่จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตต่ำกว่าจำนวนเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็ง

ตารางที่ 10 กิจกรรมสัมพัทธ์ของสารละลายเอนไซม์สกัดและเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งที่บ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 50 องศาเซลเซียส

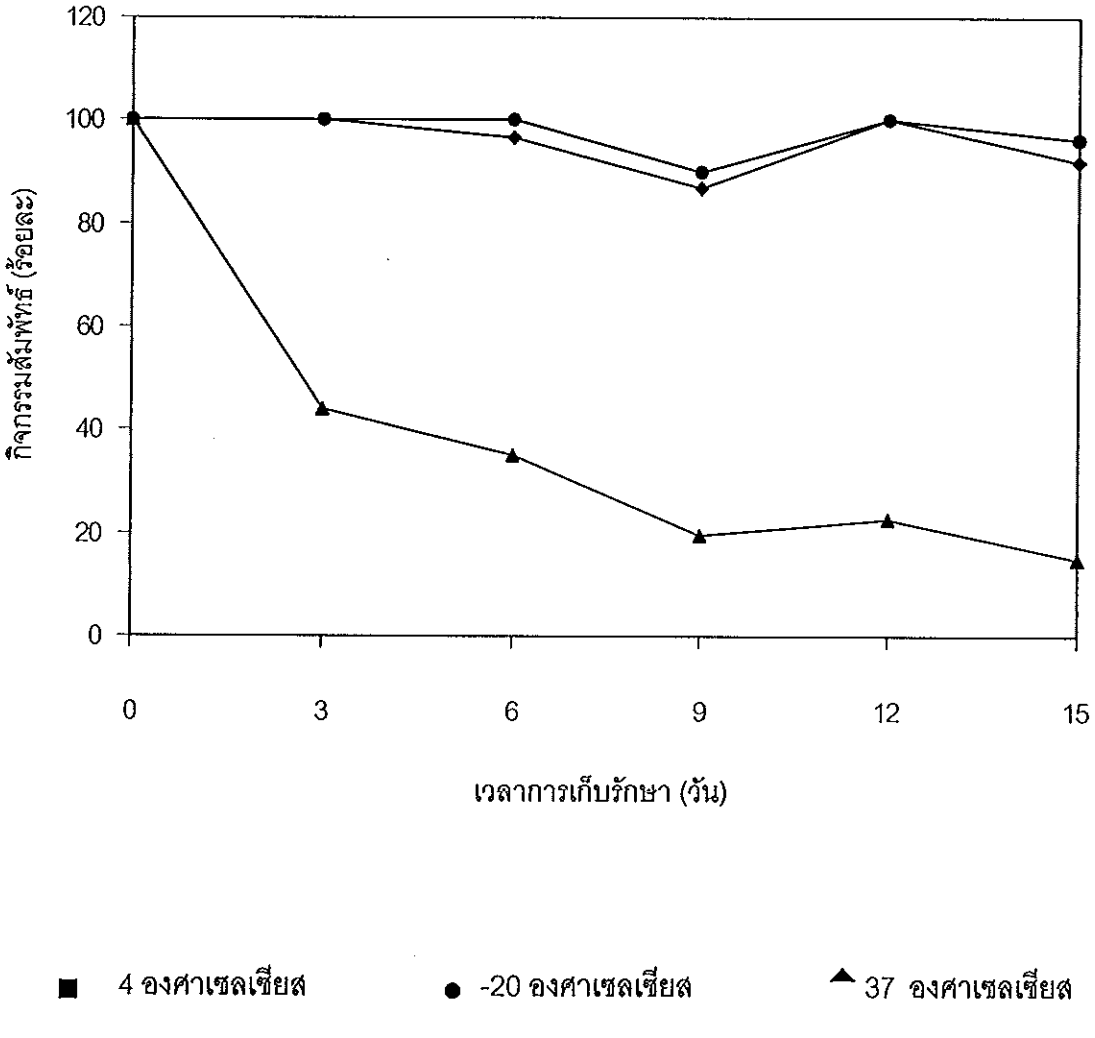
เวลาการบ่ม (ชั่วโมง)	กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (ร้อยละ)			
	บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส		บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส	
	เอนไซม์สกัด	เอนไซม์ผง	เอนไซม์สกัด	เอนไซม์ผง
0	100	100	100	100
4	100	89.6	62.7	36.1
8	77.4	57.1	30.8	0.1
12	77.6	63.1	32.5	10.7
16	75.2	66.7	22.9	8.5
20	61.5	56.1	21.8	6.3
24	59.5	53.1	16.0	0

2. สภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์

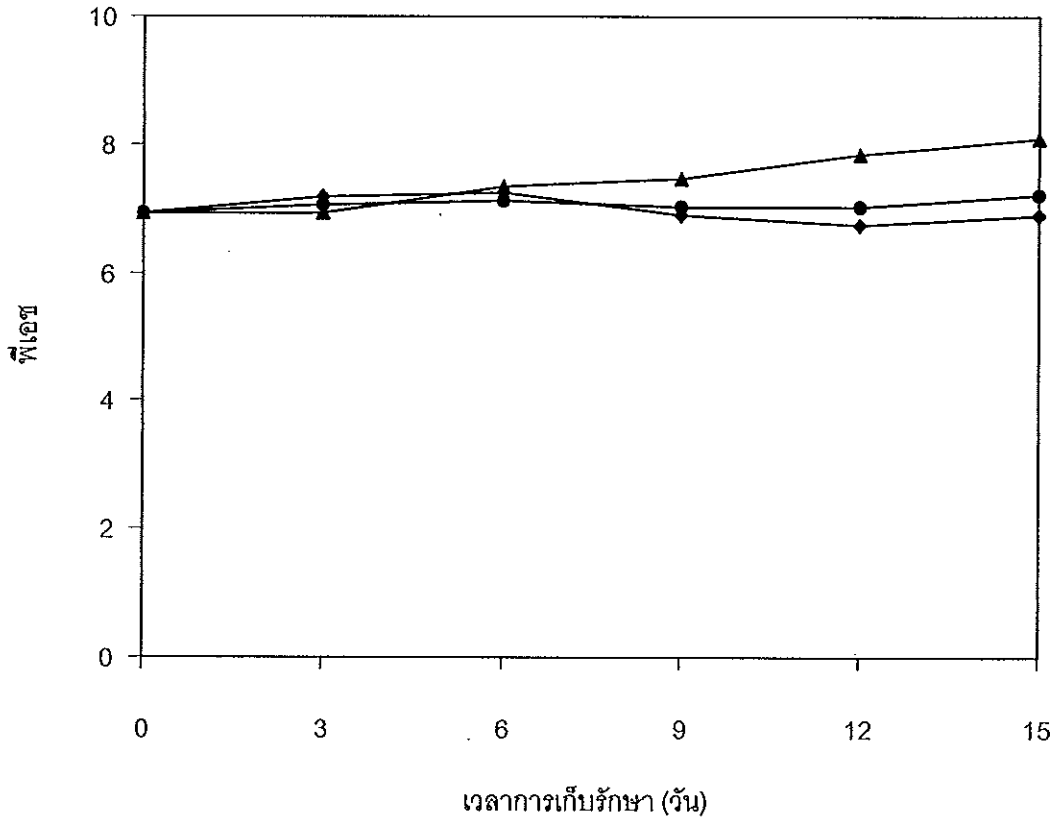
2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เก็บรักษาสารละลายเอนไซม์สกัด (จากเครื่องในปลาทูน่า) และ เอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน พบว่าสารละลายเอนไซม์สกัดมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์คงที่ (ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส โดยมีค่าร้อยละ 96.1 และ 91.9 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แต่มีค่าลดลงเหลือเพียง ร้อยละ 14.7 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 3 วันแรกของการเก็บรักษา และมีกลิ่นเหม็นรวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงสีของสารละลาย ผลที่ได้นี้บ่งชี้การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ ซึ่งย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์สกัดและปลดปล่อยแอมโมเนียที่มีผลทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 6.93 เป็น 8.10 หลังการเก็บรักษาเอนไซม์เป็นเวลา 15 วัน (ภาพที่ 6) ผลการทดลองนี้จะเห็นว่าสารละลายเอนไซม์สกัดเกิดการเสียสภาพที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำกว่าการเก็บรักษาเอนไซม์ทริปซินจากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิต Antarctic krill ซึ่งสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 40 และ 75 ตามลำดับ (Bustor *et al.*, 1999) ส่วนเอนไซม์ผงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสค่ากิจกรรมสัมพัทธ์มีแนวโน้มคงที่ โดยมีค่าเท่ากับร้อยละ 90.1 100 และ 78.1 ตามลำดับ (ภาพที่ 7) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับค่าพีเอชที่มีแนวโน้มคงที่ (ภาพที่ 8)

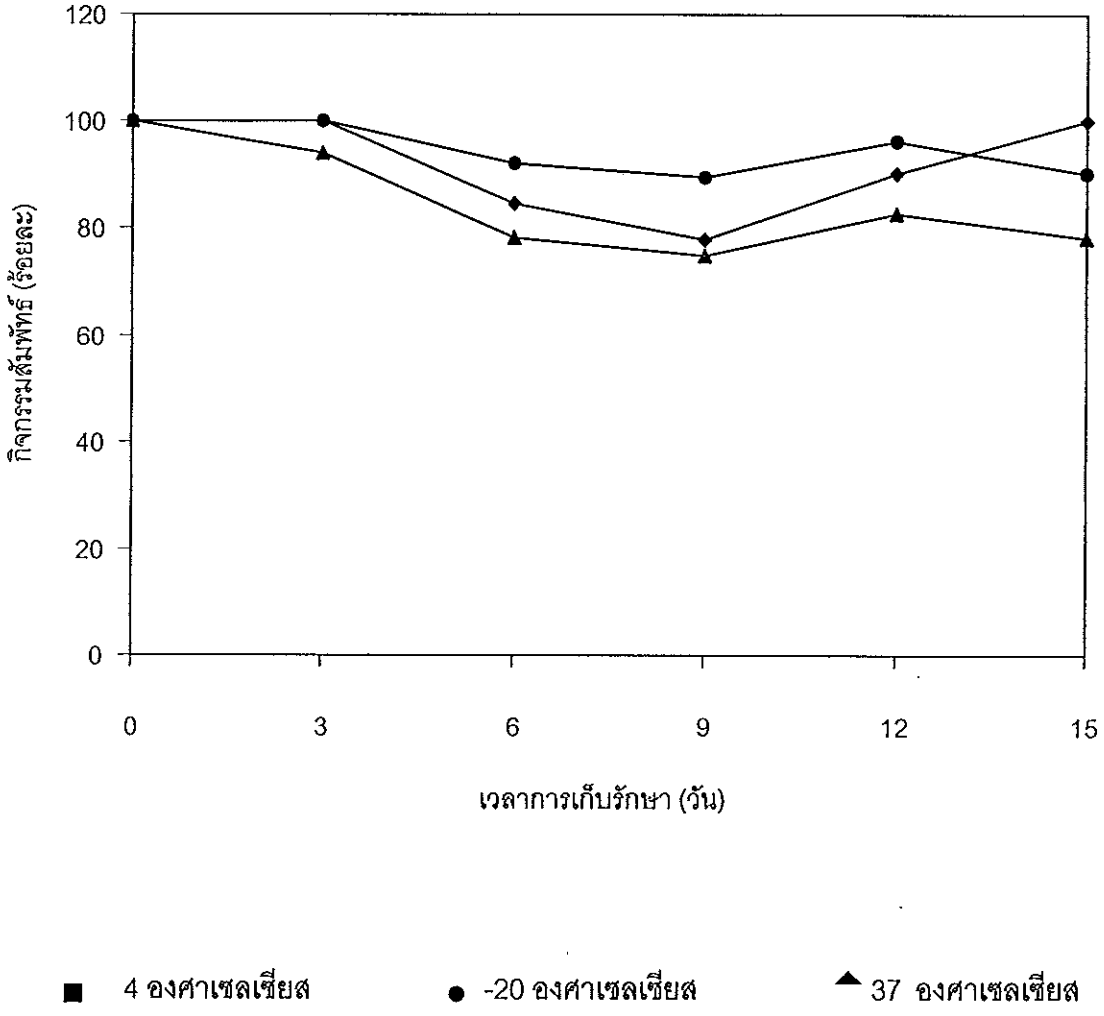
สำหรับปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด พบว่า มีแนวโน้มลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น แต่การลดลงของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายเอนไซม์สกัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ –20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีค่าลดลงมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์สกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 9) มีค่าเท่ากับ 13.86 11.15 และ 9.66 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน ในขณะที่อุณหภูมิการเก็บรักษาไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายในเอนไซม์ผง (ภาพที่ 10) โดยมีค่าเท่ากับ 14.24 14.31 และ 14.73 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วัน ตามลำดับ



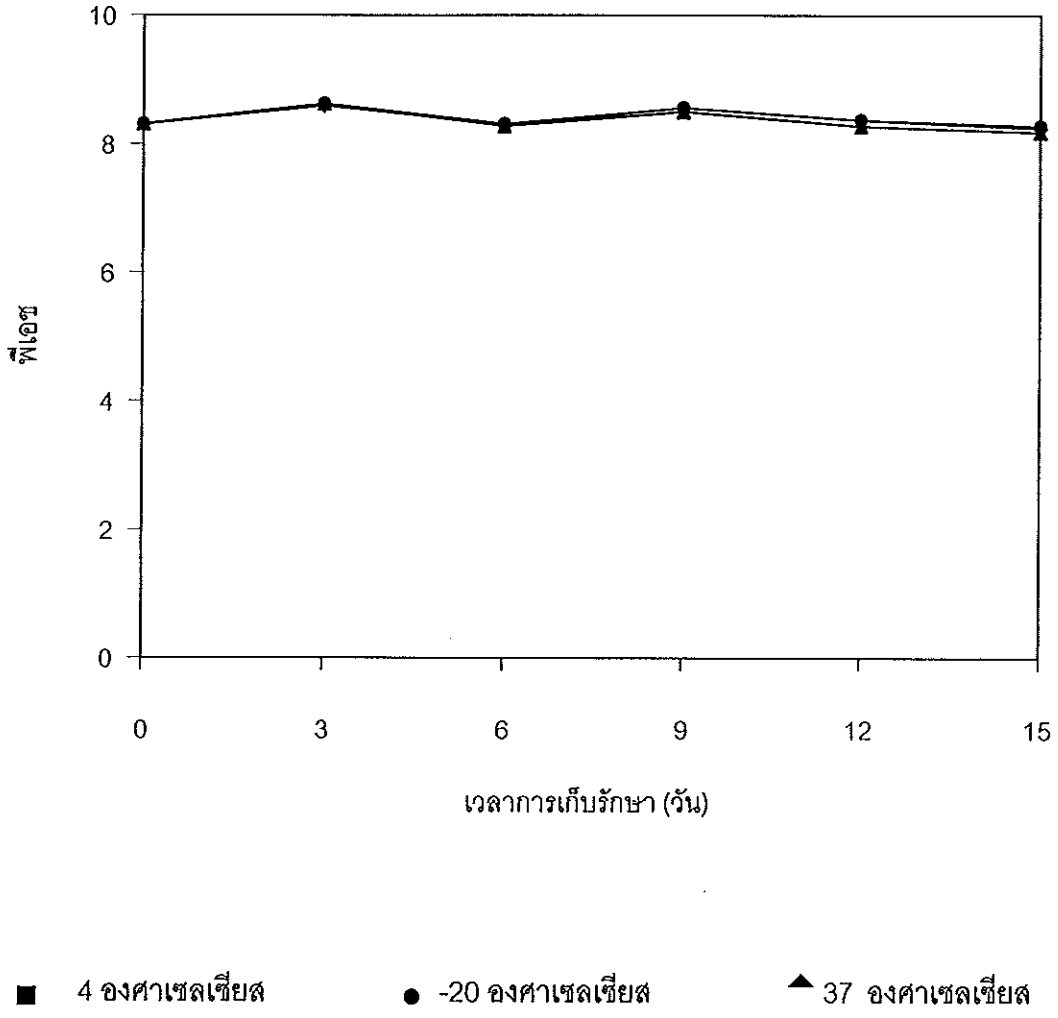
ภาพที่ 5 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องใน ปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน



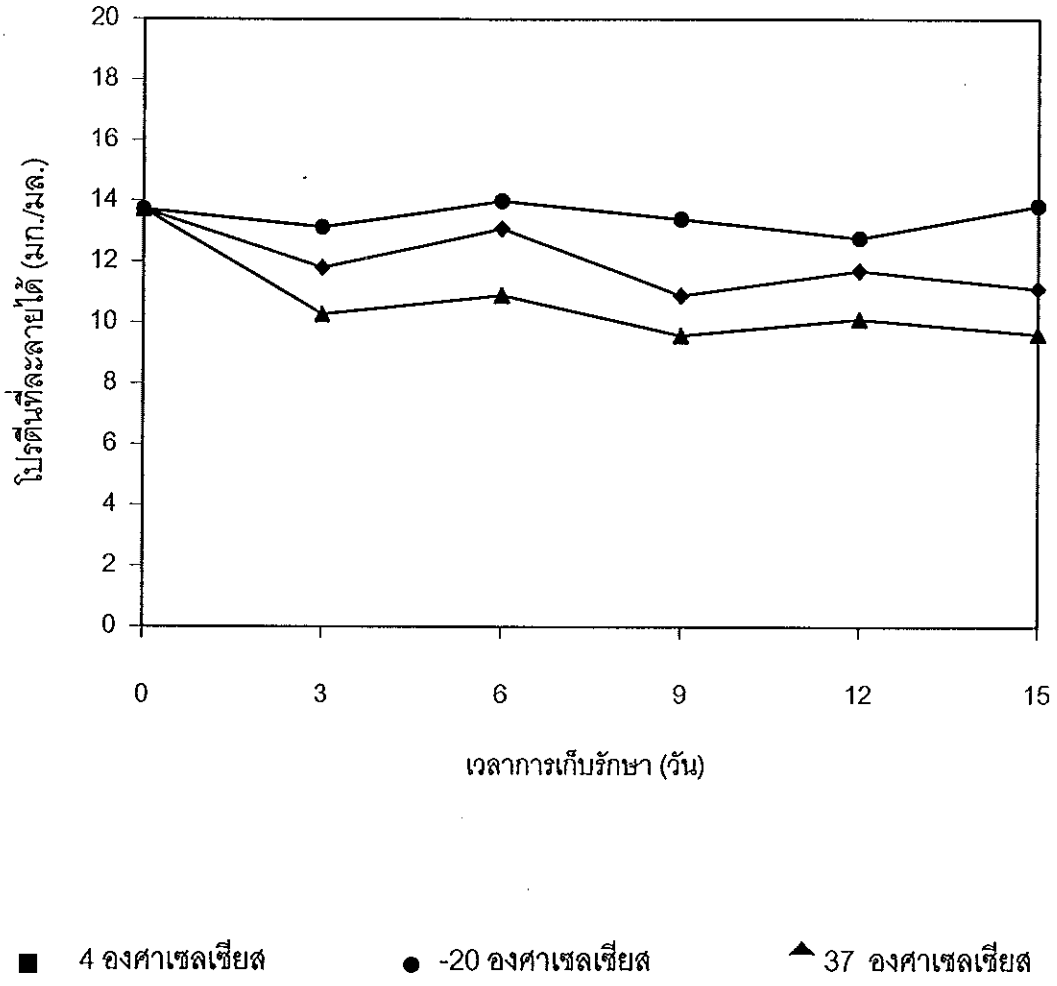
ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อพีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน



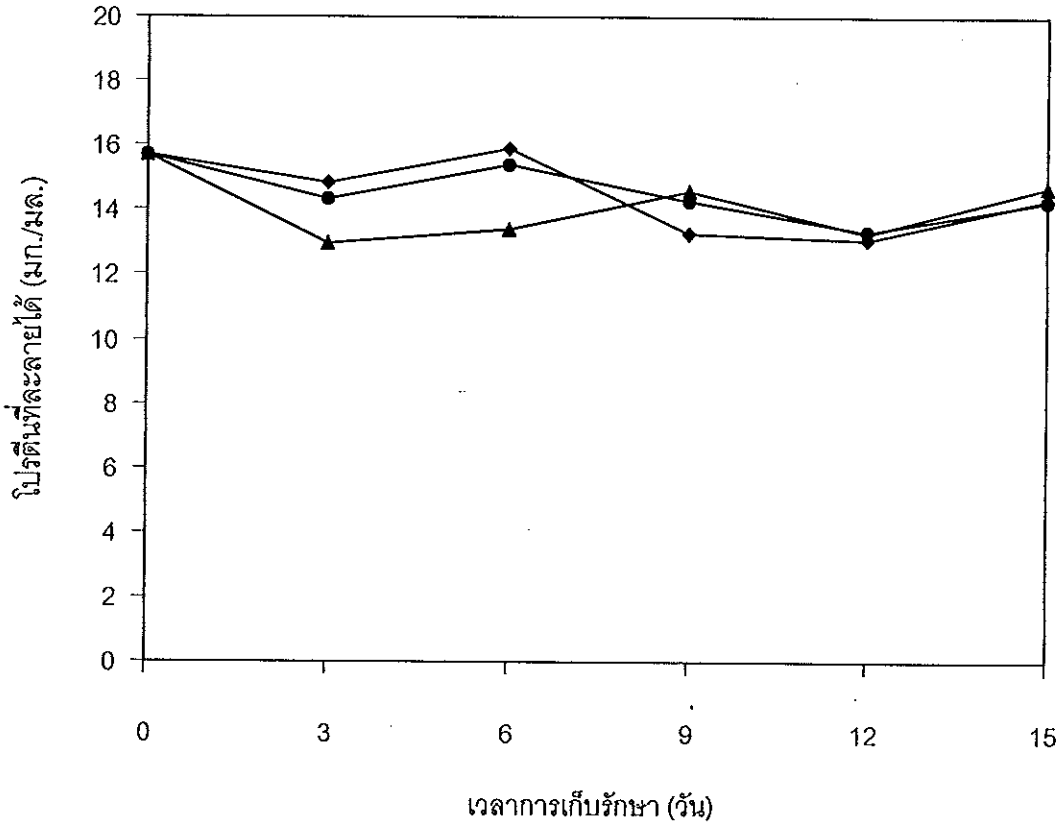
ภาพที่ 7 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน



ภาพที่ 8 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อพีเอชของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน



ภาพที่ 9 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน

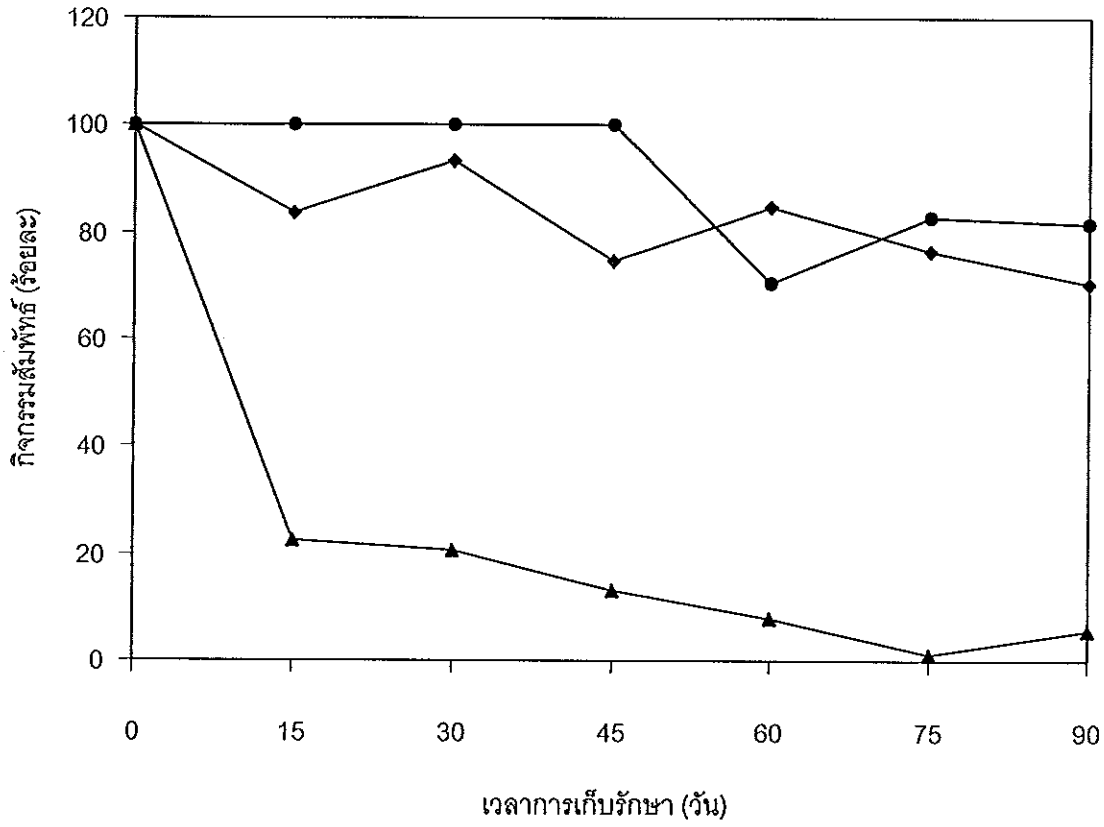


ภาพที่ 10 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเอนไซม์ผงหลังการเก็บเป็นเวลา 15 วัน

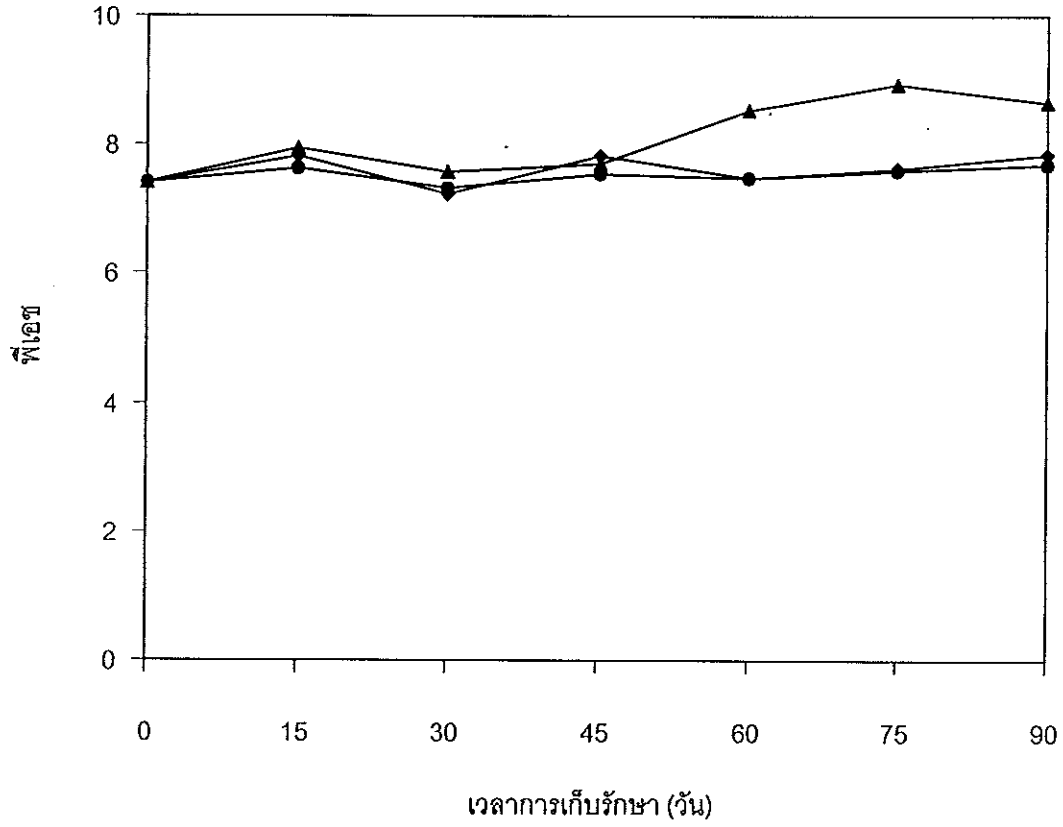
2.2 อายุการเก็บรักษาเอนไซม์

เมื่อเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์สกัดและเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน พบว่า สามารถเก็บรักษาสารละลายเอนไซม์สกัดได้ที่อุณหภูมิ –20 และ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วันโดยเอนไซม์ไม่สูญเสียกิจกรรม (ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญของกิจกรรมของเอนไซม์เมื่อเก็บรักษาเอนไซม์สกัดที่อุณหภูมิเหล่านี้เป็นเวลา 0-90 วัน) ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็ว เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์เหลือเพียงร้อยละ 22.5 ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของสารละลายเอนไซม์สกัดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน เท่ากับ ร้อยละ 81.7 70.4 และ 5.5 ตามลำดับ (ภาพที่ 11) เมื่อพิจารณาค่าพีเอช พบว่า ค่าพีเอชของสารละลายเอนไซม์สกัดมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยค่าพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 7.42 เป็น 7.70 7.85 และ 8.67 เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (ภาพที่ 12) ค่าพีเอชที่เพิ่มขึ้นบ่งชี้การปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในสารละลายเอนไซม์สกัด ซึ่งจะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดมีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นมากที่สุด สำหรับการเก็บรักษาเอนไซม์ผงที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วัน พบว่า เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมน้อยกว่าร้อยละ 30 และมีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์เท่ากับ ร้อยละ 93.5 97.5 และ 70.2 ตามลำดับ (ภาพที่ 13) ในขณะที่พีเอชของเอนไซม์ผงที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆมีค่าค่อนข้างคงที่ (ภาพที่ 14)

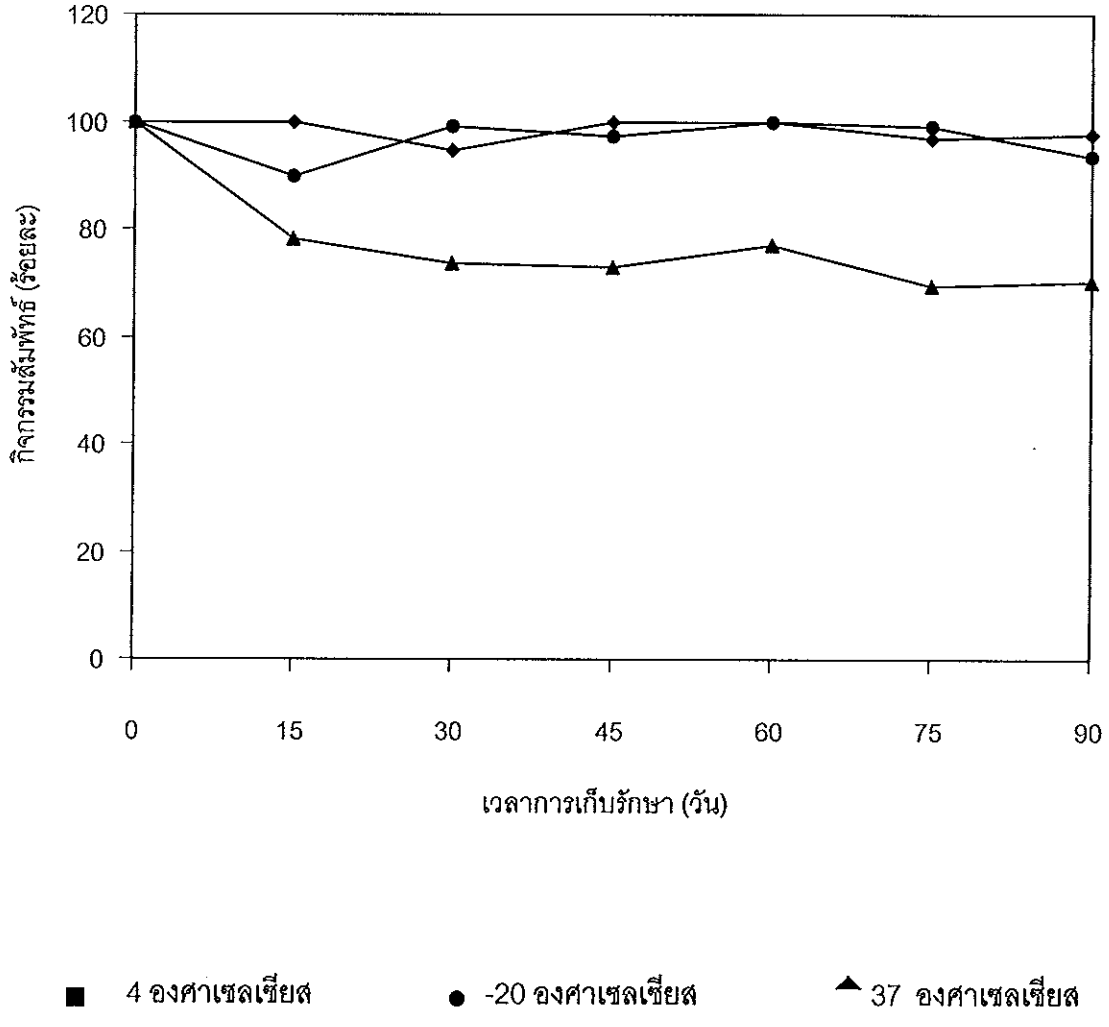
จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปเอนไซม์ผงสามารถรักษาค่ากิจกรรมของเอนไซม์และปริมาณโปรตีนได้ดีกว่าการเก็บในรูปสารละลาย และสามารถเก็บรักษาในช่วงอุณหภูมิที่กว้างกว่า คือ เก็บได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ –20 ถึง 37 องศาเซลเซียส โดยสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย และยังป้องกันการเสียสภาพจากจุลินทรีย์ได้เนื่องจากตัวอย่างมีความชื้นต่ำ ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Reece (1988) ซึ่งรายงานว่า สารละลายเอนไซม์โปรติเอสชนิดกรดที่สกัดจากเครื่องในปลาคอด แม็คคอเรล และแซลมอน สามารถเก็บรักษาที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยไม่สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ และเมื่อเก็บรักษาเอนไซม์เป็นเวลา 20 วัน พบว่า เอนไซม์ที่สกัดจากปลาคอดมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่มากที่สุด ร้อยละ 93.9 และสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus* สายพันธุ์ PS 719 ซึ่งสามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่างๆ (4 25 35 40 และ 55 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 วัน โดยเหลือกิจกรรมของเอนไซม์มากกว่าร้อยละ 75 (สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง, 2539)



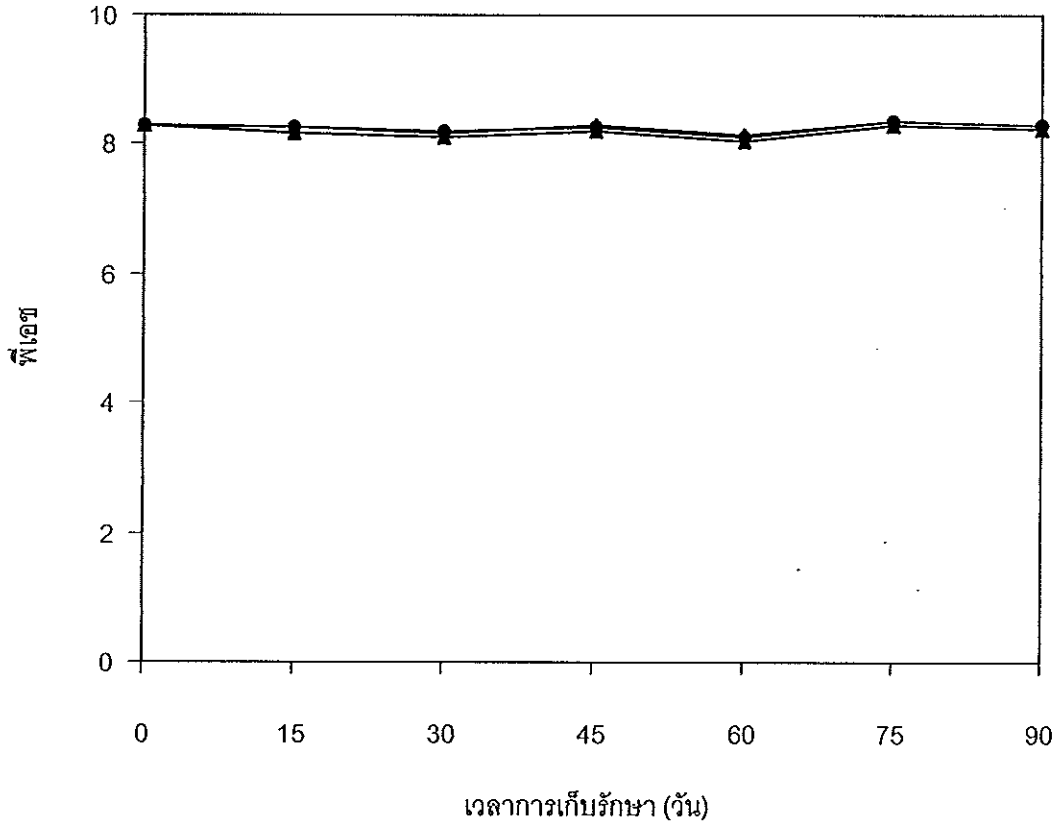
ภาพที่ 11 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน



ภาพที่ 12 พีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน



ภาพที่ 13 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ผงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน

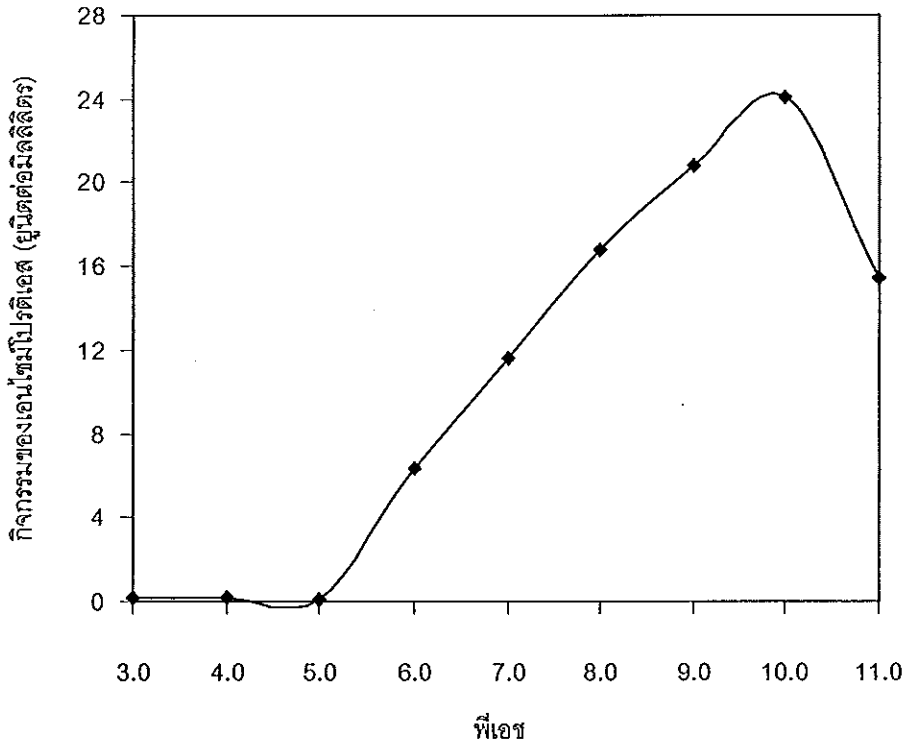


ภาพที่ 14 พีเอชของเอนไซม์ผงระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 90 วัน

3. คุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

3.1 พีเอชที่เหมาะสม

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงพีเอช 3.0-11.0 พบว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส คือ พีเอช 10.0 (ภาพที่ 15) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 24.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตร พีเอชที่สูงหรือต่ำกว่าพีเอช 10.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์มีค่ามากกว่าร้อยละ 80 ที่พีเอชช่วงเป็นด่าง (พีเอช 9.0-10.5) แต่มีค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์น้อยกว่าร้อยละ 1 ที่พีเอชช่วงเป็นกรด (พีเอช 3.0-5.0) (ตารางที่ 11) แสดงว่าเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองสามารถทำงานได้ดีในสภาวะด่าง ซึ่งสอดคล้องกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) พันธุ์โอแถบ (skipjack tuna : *Katsuwonus pelanis*) และพันธุ์โอดำ (tonggol tuna : *Thunnus tonggol*) ปลาทะเลน้ำลึกสายพันธุ์ *Allocyttus niger* (Black Oreo Dory) และปลาไส้ตัน (anchovy : *Engraulis japonica*) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอช 9.0-10.0 (ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์, 2541 : Krzyzosiak and Daniel, 1997 : Heu *et al.*, 1995) นอกจากนี้มีรายงานว่า ชนิดของสับสเตรตมีผลต่อพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ด้วย โดยพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดเดียวกันจะต่างกัน เมื่อใช้สับสเตรตต่างชนิดกัน เช่น เอนไซม์จาก Antarctic krill (*Euphausia superba*) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเท่ากับ 8.0 6.5-10.0 และ 6.0-11.0 เมื่อใช้เคซีน ฮีโมโกลบิน และ สับสเตรตสังเคราะห์ คือ *N*-α-benzoyl-D,L-arginine p-nitroanilide (Bustor *et al.*, 1999) เช่นเดียวกับพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 9.0 และ 8.0 เมื่อใช้เคซีนและสับสเตรตสังเคราะห์ คือ *N*-α-benzoyl-D,L-arginine p-nitroanilide ตามลำดับ (Heu *et al.*, 1995)



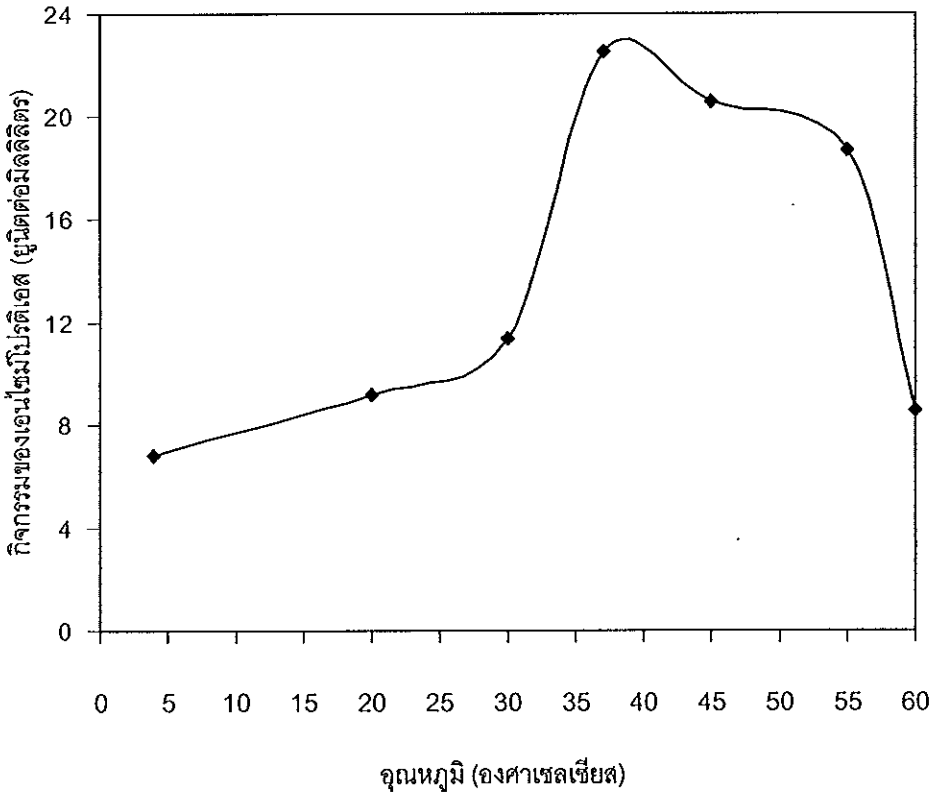
ภาพที่ 15 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

ตารางที่ 11 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 10.0

พีเอช	กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (ร้อยละ)
3	0.6
4	0.6
5	0.5
6	26.3
7	48.1
8	69.9
9	86.5
10	100
11	64.4

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในช่วงอุณหภูมิ 4-60 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคือ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 16) ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ 22.48 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูงโดยเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 45 และ 55 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์จะมีกิจกรรมสัมพัทธ์น้อยกว่าร้อยละ 40 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 12) จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 37-55 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ในช่วงร้อยละ 91.5–100 ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (35-60 องศาเซลเซียส) ที่สกัดจากสัตว์น้ำชนิดอื่น เช่น เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) (50 องศาเซลเซียส) พันธุ์โอแถบ (skipjack tuna : *Katsuwonus pelanis*) (50 องศาเซลเซียส) พันธุ์โอดำ (tonggol tuna : *Thunnus tonggol*) (50 องศาเซลเซียส) (ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์, 2541) เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากม้ามและตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (50 องศาเซลเซียส) (Jantaro, 2000) เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากเครื่องในปลาไส้ตัน (anchovy : Engraulis japonica) (45 องศาเซลเซียส) (Heu *et al.*, 1995) เอนไซม์ทริปซินจากปลากรีนแลนด์คอด (Greenland cod : *Gadus ogas*) (35 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ทริปซินจากปลาแอตแลนติกคอด (Atlantic cod : *Gadus morhua*) (40 องศาเซลเซียส) (Simpson and Haard, 1984 : Asgelrsson and Bjarnasson (1989 อ้างโดย Haard and Simpson, 1999) ความหลากหลายของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยต่างๆที่ใช้ในการศึกษาต่างกัน เช่น แหล่งของวัตถุดิบที่สกัด พีเอช ชนิดของสับสเตรต และระยะเวลา เป็นต้น



ภาพที่ 16 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

ตารางที่ 12 กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

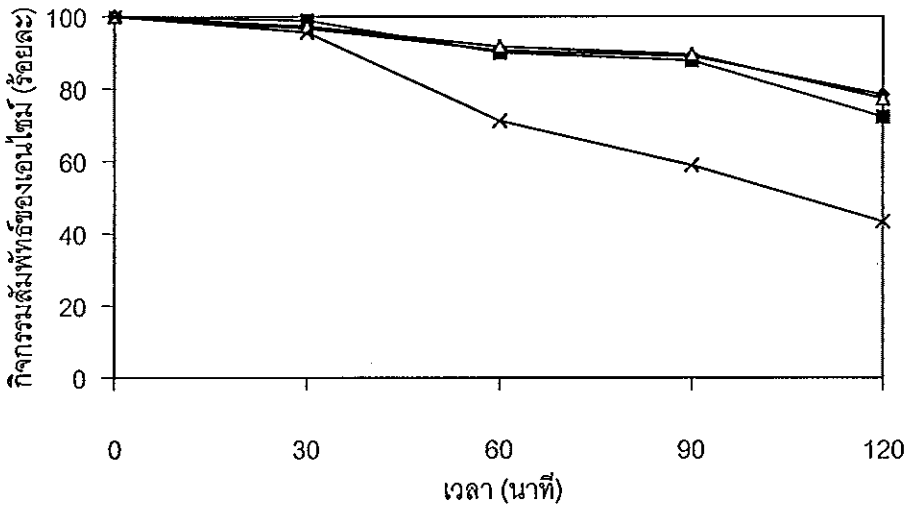
อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	กิจกรรมสัมพัทธ์ของเอนไซม์ (ร้อยละ)
4	30.4
20	40.7
30	50.5
37	100
45	91.5
55	83.1
60	38.1

3.3 ความคงตัวต่อพีเอช (pH stability)

นำสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง มาบ่มในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่เหมาะสม คือ พีเอช 10.0 และพีเอชที่ใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ พีเอช 8.0 9.0 และ 11.0 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส วิเคราะห์กิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ทุก 30 นาที เป็นเวลา 120 นาที พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่ามีความคงตัวต่อพีเอชดีที่สุดในช่วงพีเอช 8.0-10.0 (ภาพที่ 17) โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์มากกว่าร้อยละ 70 หลังการบ่ม 120 นาที ส่วนการบ่มที่พีเอช 11 กิจกรรมสัมพัทธ์มีค่าต่ำกว่าร้อยละ 50 (ร้อยละ 43.5) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่า เอนไซม์มีความคงตัวต่อพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ เช่นเดียวกับเอนไซม์ทริปซินจากไส้ติ่งของปลาคอด (cod : *Gadus morrhua*) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 9.0-9.6 และมีความคงตัวต่อพีเอชที่พีเอช 8.8-9.6 (Shin and Zall, 1986) และเอนไซม์จากตับอ่อนของปลาคาร์ป (carp : *Cyprinus carpio*) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ 6.0 และมีความคงตัวต่อพีเอชที่พีเอช 5.5-6.5 (Futoshi *et al.*, 1997)

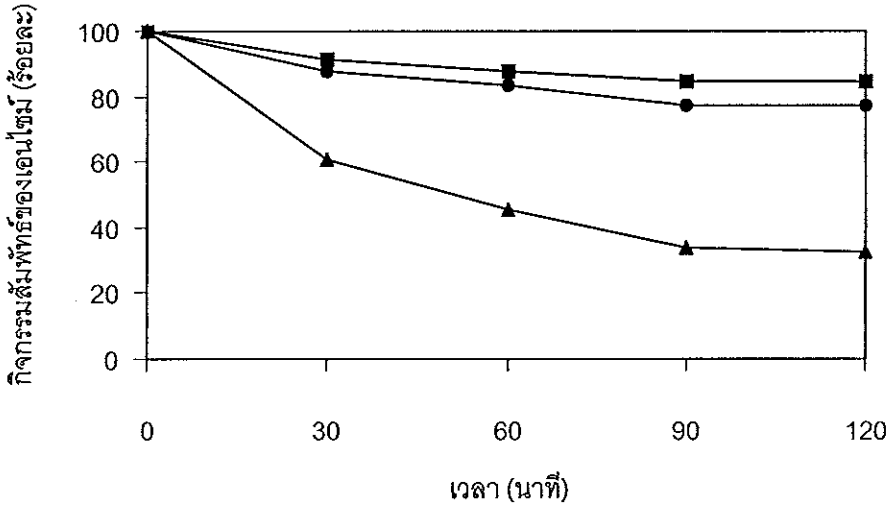
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability)

บ่มสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที วิเคราะห์กิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ทุก 30 นาที พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 18) โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสัมพัทธ์ร้อยละ 84.4 77.2 และ 32.8 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 45 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลา 120 นาที ซึ่งสอดคล้องกับความคงตัวต่ออุณหภูมิของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง พันธุ์โอแถบ และ พันธุ์โอดำ ซึ่งเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สุรารัตน์ ประชุมรัตน์, 2541) และเอนไซม์ทริปซินจากไส้ติ่งของปลาคอด (cod : *Gadus morrhua*) ซึ่งมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสดีกว่าที่ 57 องศาเซลเซียส (Shin and Zall, 1986) และเอนไซม์จากปลา *Allocyttus niger* ซึ่งกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Krzyzosiak and Daniel, 1997)



♦ พีเอช 8.0 ■ พีเอช 9.0 Δ พีเอช 10.0 x พีเอช 11.0

ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง



■ 37 องศาเซลเซียส ● 45 องศาเซลเซียส ▲ 55 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง

3.5 ความสามารถของเอนไซม์ในการย่อยสลายวัตถุดิบชนิดต่างๆ

นำเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่ามาย่อยสลายวัตถุดิบ 4 ชนิด คือ เครื่องในปลาทูน่า เครื่องในปลาทูน่าที่สกัดเอนไซม์แล้ว เนื้อปลาบด และเคซีน พบว่า ไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายสูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 93.50 และ 40.53 ตามลำดับ มีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาที่สกัดเอนไซม์แล้ว เนื้อปลาบด และเคซีนเป็นวัตถุดิบ เท่ากับ ร้อยละ 72.82 และ 31.92 ร้อยละ 85.94 และ 12.36 และร้อยละ 52.63 และ 5.11 ตามลำดับ (ตารางที่ 13) เนื่องจากในเครื่องในปลาทูน่ามีเอนไซม์โปรติเอสเกิดการย่อยสลายตัวเอง ทำให้เกิดการย่อยสลายได้ดีกว่าวัตถุดิบชนิดอื่น สอดคล้องกับอัจฉริยา เชื้อช่วยชู (2542) ซึ่งพบว่า การใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงกว่าการใช้หัวปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบร้อยละ 31.93 43.43 และ 43.06 ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์อัลคาเลส, นิวเทรส และ ปาเปน เนื่องจากหัวปลามีองค์ประกอบที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้ยากต่อการบดและการย่อยด้วยเอนไซม์ แต่ไม่สอดคล้องกับ Kim และคณะ (1997) ซึ่งพบว่าระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เคซีนเป็นวัตถุดิบสูงกว่าที่ใช้เนื้อปลาเป็นวัตถุดิบ เมื่อใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่ง (pyloric caeca) ของปลาทูน่าในการย่อย โดยมีระดับการย่อยสลายเท่ากับ ร้อยละ 37 และ 22 ตามลำดับ เนื่องจากความสามารถในการละลายของวัตถุดิบทั้งสองชนิดต่างกัน

ตารางที่ 13 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้วัตถุดิบต่างชนิดกัน

ชนิดวัตถุดิบ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (NR)	ระดับการย่อยสลาย (DH)
เครื่องในปลา	0	86.57	37.47
	5	93.50	40.53
เครื่องในปลาที่สกัด	0	71.81	31.92
เอนไซม์แล้ว	5	72.82	31.10
เนื้อปลาบด	0	46.68	0
	5	85.94	12.36
เคซีน	0	50.72	2.11
	5	52.63	5.11

3.6 ความสามารถของเอนไซม์สกัดในการย่อยสลายวัตถุดิบเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (อัลคาเลส)

เปรียบเทียบการย่อยสลายวัตถุดิบ โดยใช้วัตถุดิบ 2 ชนิด คือ เครื่องในปลาทูน่า และเคซีน โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าและเอนไซม์ทางการค้า พบว่า ชนิดของเอนไซม์ไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้เอนไซม์สกัดและเอนไซม์อัลคาเลส ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 82.31 เป็น ร้อยละ 83.74 และ 84.39 และค่าดังกล่าวในไฮโดรไลเสตที่ใช้เคซีนเป็นวัตถุดิบ เพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 50.72 เป็น ร้อยละ 52.63 และ 52.53 ตามลำดับ แต่เอนไซม์อัลคาเลสทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นมากกว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าอย่างมีนัยสำคัญ ระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 38.67 เป็นร้อยละ 41.09 และ 59.72 และค่าดังกล่าวในไฮโดรไลเสตที่ใช้เคซีนเป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 2.11 เป็น ร้อยละ 5.11 และ 21.83 ตามลำดับ เมื่อใช้เอนไซม์สกัดและเอนไซม์อัลคาเลส (ตารางที่ 14) สอดคล้องกับหลายการทดลองซึ่งมีรายงานว่า เอนไซม์ที่สกัดจากปลาและเอนไซม์ภายในตัวปลามีกิจกรรมการย่อยสลายต่ำกว่าเอนไซม์ทางการค้า Kristinsson และ Rasco (2000) พบว่าการใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาแอตแลนติกแซลมอน ย่อยสลายเนื้อปลาแซลมอนได้ค่าไนโตรเจนในผลิตภัณฑ์ต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าอีก 4 ชนิด เช่นเดียวกับการย่อยปลาคาเพลิน และปลาเฮก โดยเอนไซม์ภายในตัวปลาเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า (Hale, 1969 ; Shahidi *et al.*, 1995) แต่ไม่สอดคล้องกับ Kim และคณะ (1997) พบว่าการย่อยเนื้อปลาค็อด โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้าโดยเมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จะมีระดับการย่อยสลายร้อยละ 80 ซึ่งสูงกว่าการย่อยโดยเอนไซม์โปรเนสและไคโมทริปซิน ร้อยละ 15 และ Ooshiro (1971 อ้างโดย Ramakrishna และคณะ, 1987) ซึ่งรายงานว่า เอนไซม์โปรติเอสจากไส้ติ่งของปลาแม็คเคอเรล สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในเคซีนได้สูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากลูกวัว

ตารางที่ 14 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เอนไซม์สกัดเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้า

ชนิดวัตถุดิบ	ความเข้มข้นเอนไซม์ (ร้อยละ)	ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (NR)		ระดับการย่อยสลาย (DH)	
		เอนไซม์สกัด	อัลคาเลส	เอนไซม์สกัด	อัลคาเลส
เครื่องในปลา	0	82.31	82.31	38.67	38.67
	5	83.74	84.39	41.09	59.72
เคซีน	0	50.72	50.72	2.11	2.11
	5	52.63	52.53	5.11	21.83

4. สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

4.1 การเตรียมวัตถุดิบและวิเคราะห์องค์ประกอบของวัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้มี 2 ชนิด คือ เครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง และ เครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่สกัดเอนไซม์ออกแล้ว เครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือ ความชื้น โปรตีน ร้อยละ 77.79 16.44 (โดยน้ำหนักเปียก) ไขมัน และ เถ้า ร้อยละ 5.10 และ 5.57 (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ส่วนเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่สกัดเอนไซม์แล้วมีค่าต่างๆ ร้อยละ 85.76 12.83 4.60 และ 6.71 ตามลำดับ (ตารางที่ 15) ผลที่ได้ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจของประเทศนิวซีแลนด์ (ในปี ค.ศ. 1982) ซึ่งมีปริมาณความชื้น โปรตีน (โดยน้ำหนักเปียก) ไขมัน และ เถ้า (โดยน้ำหนักแห้ง) ร้อยละ 69.0 21.8 6.9 และ 2.3 ตามลำดับ (Vileg *et al.*, 1983) นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีของเครื่องในปลาทูน่ามีค่าใกล้เคียงกับปลาทูน่าทั้งตัวโดยปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจของประเทศนิวซีแลนด์ (ในปีค.ศ. 1982) ค่าต่างๆดังกล่าวข้างต้นเท่ากับร้อยละ 63.8 23.4 9.0 และ 3.8 ตามลำดับ (Vileg *et al.*, 1983) เช่นเดียวกับปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่จับได้บริเวณเขตเศรษฐกิจของประเทศไนจีเรียระหว่างเดือนพฤษภาคม ค.ศ. 1982 ถึงเดือนมกราคม ค.ศ. 1983 ซึ่งมีปริมาณความชื้น โปรตีน (โดยน้ำหนักเปียก) ไขมัน และ เถ้า (โดยน้ำหนักแห้ง) ร้อยละ 71.86 23.64 2.02 และ 2.10 ตามลำดับ (Balogun and Talabi, 1986) ทั้งนี้มีปัจจัยหลายประการที่ทำให้องค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน คือ อาหาร อายุ เพศ ฤดูกาลที่จับ แหล่งที่อยู่อาศัย และความแตกต่างทางสรีรวิทยา เป็นต้น (Spenelli and Dassaw, 1982)

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ

องค์ประกอบทางเคมี	วัตถุดิบ	
	เครื่องในปลาทูน่า	เครื่องในปลาทูน่าที่สกัดเอนไซม์แล้ว
โปรตีน [1]	16.44 ± 0.43	12.83 ± 0.82
ความชื้น [1]	77.79 ± 0.11	85.76 ± 0.53
ไขมัน [2]	5.10 ± 0.43	4.60 ± 0.14
เถ้า [2]	5.57 ± 0.31	6.71 ± 0.07

[1] ร้อยละโดยน้ำหนักเปียก [2] ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง

4.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสม

การศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนของเครื่องในปลาโดยใช้เอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0 5 10 15 ของปริมาณโปรตีนเริ่มต้น และใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 3 5 7 10 พบว่า ในวัตถุดิบทั้ง 2 ชนิด ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นและผลร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น ไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (nitrogen recovery ; NR) (ตารางที่ 16) และระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis ; DH) (ตารางที่ 17) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่จะเห็นได้ว่าในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาที่ไม่ได้สกัดเอนไซม์มีระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงกว่าในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาที่สกัดเอนไซม์แล้วเป็นวัตถุดิบอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัดเป็นวัตถุดิบอยู่ในช่วงร้อยละ 86.22-95.35 และ 68.44-72.82 ตามลำดับ ระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัดเป็นวัตถุดิบ อยู่ในช่วงร้อยละ 37.47-42.26 และ 29.89-32.78 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในเครื่องในปลามีมากเพียงพอที่จะย่อยสลายโปรตีน สอดคล้องกับผลการทดลองที่ผ่านมาซึ่งพบว่าเอนไซม์จากภายในตัวปลาเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการย่อยสลายตัวปลา การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ไม่มีผลต่อการละลายของวัตถุดิบและไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายของเครื่องในปลา (Hale, 1969 ; Freeman and Hoogland, 1956 อ้างโดย Kristinsson and Rasco, 2000)

ผลการทดลองนี้ มีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงกว่าการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์จากปลาคาเพลิน (capelin : Mallotus villosus) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 22.9 (Shahidi *et al.*, 1995) และเอนไซม์จากปลาแอตแลนติกแซลมอน (Altantic salmon : *Salmo salar*) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 68.59 ที่ระดับการย่อยสลายร้อยละ 15 (Kristinsson and Rasco, 2000) ผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาแปซิฟิกไวท์ทิง (pacific whiting : *Merluccius productus*) ปลาคาเพลิน (capelin : *Mallotus villosus*) เศษเนื้อแดงของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (tuna red meal) เนื้อปลา *Oreochromis mossambicus* โดยใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งพบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นและความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีน (Benjakul and Morrissey, 1997 : Shahidi *et al*, 1995 : Raghunath, 1993 : Yu and Tan, 1992)

ตารางที่ 16 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ในไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัดที่ใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นต่างๆกัน

ตัวอย่าง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (NR)*	
ความเข้มข้นโปรตีน	ความเข้มข้นเอนไซม์	เครื่องในปลาทูน่าที่สกัดเอนไซม์แล้ว	เครื่องในปลาทูน่า
3	0	68.44 ± 0.88^{a}	$90.21 \pm 1.63^{c,d,e}$
3	5	$71.10 \pm 0.25^{a,b}$	$88.76 \pm 5.99^{c,d,e}$
3	10	$71.16 \pm 0.75^{a,b}$	$90.11 \pm 2.26^{c,d,e}$
3	15	$70.91 \pm 1.50^{a,b}$	$90.32 \pm 5.33^{c,d,e}$
5	0	$71.81 \pm 1.24^{a,b}$	$86.57 \pm 4.75^{c,d}$
5	5	72.82 ± 0.06^{b}	$93.50 \pm 4.65^{d,e}$
5	10	$70.95 \pm 2.64^{a,b}$	95.35 ± 2.81^{e}
5	15	$69.70 \pm 1.77^{a,b}$	$91.32 \pm 1.12^{c,d,e}$
7	0	$69.70 \pm 1.48^{a,b}$	86.37 ± 1.17^{c}
7	5	$70.99 \pm 3.69^{a,b}$	$88.47 \pm 0.52^{c,d,e}$
7	10	$70.54 \pm 0.35^{a,b}$	$91.46 \pm 0.35^{c,d,e}$
7	15	$69.67 \pm 2.55^{a,b}$	$91.42 \pm 0.82^{c,d,e}$
10	0	$69.59 \pm 0.42^{a,b}$	$87.76 \pm 0.91^{c,d}$
10	5	$69.87 \pm 0.57^{a,b}$	$87.42 \pm 1.90^{c,d}$
10	10	$70.68 \pm 1.34^{a,b}$	$89.51 \pm 1.62^{c,d,e}$
10	15	$69.34 \pm 0.47^{a,b}$	86.22 ± 0.08^{c}

* ตัวอักษร a, b, c, d, e ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

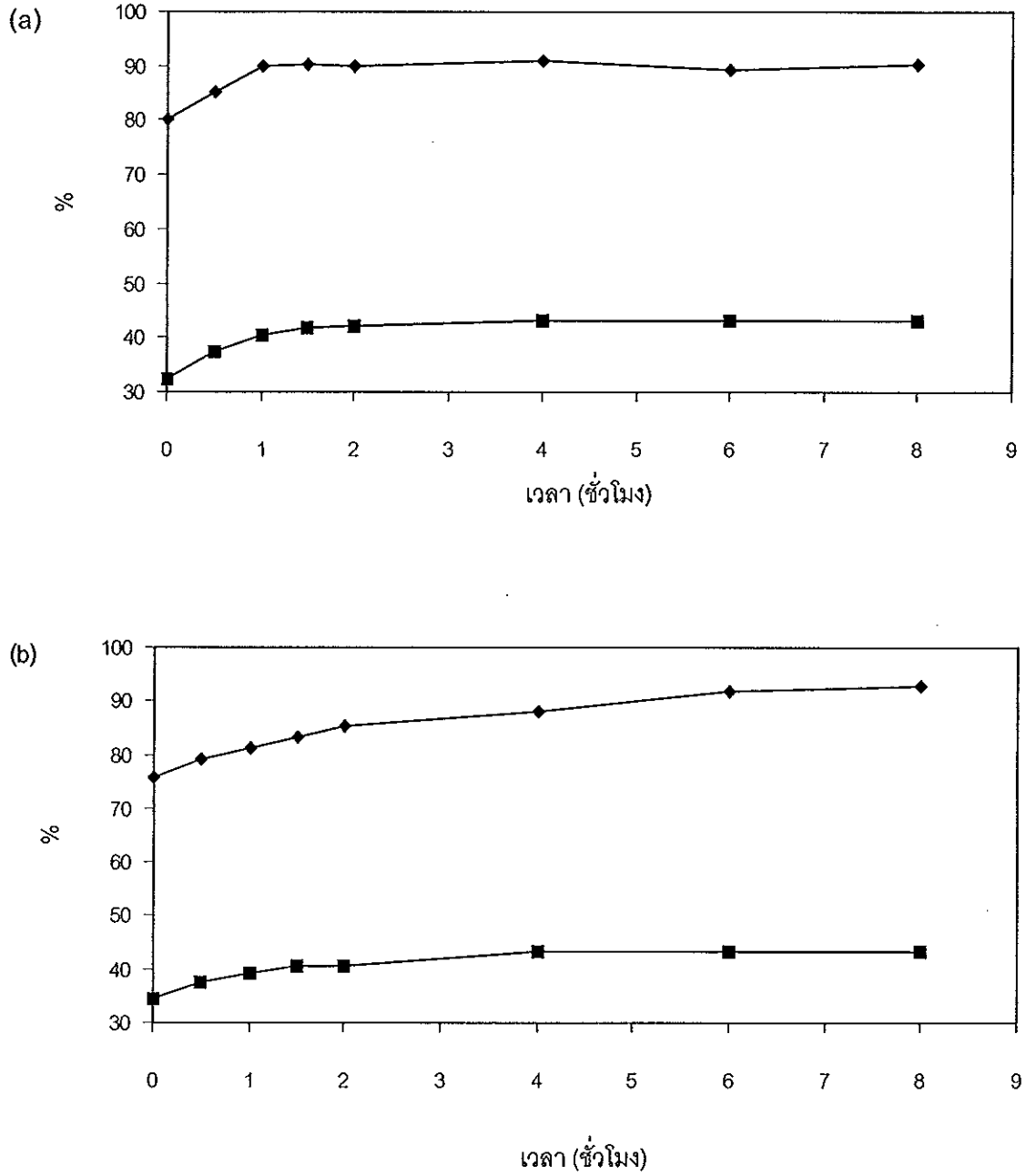
ตารางที่ 17 ระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตจากเครื่องในปลาทูน่าและเครื่องในปลาทูน่าสกัดที่ใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์และความเข้มข้นของโปรตีนต่างๆกัน

ตัวอย่าง (ร้อยละโดยน้ำหนัก)		ระดับการย่อยสลาย (DH)*	
ความเข้มข้นโปรตีน	ความเข้มข้นเอนไซม์	เครื่องในปลาทูน่าที่สกัดเอนไซม์แล้ว	เครื่องในปลาทูน่า
3	0	29.89 ± 1.72^{a}	42.26 ± 6.14^{b}
3	5	30.85 ± 2.82^{a}	40.67 ± 5.71^{b}
3	10	30.42 ± 3.27^{a}	40.77 ± 1.22^{b}
3	15	30.13 ± 1.34^{a}	40.10 ± 0.64^{b}
5	0	31.92 ± 0.81^{a}	37.47 ± 0.99^{b}
5	5	31.10 ± 0.76^{a}	40.53 ± 0.74^{b}
5	10	30.95 ± 1.27^{a}	41.98 ± 0.39^{b}
5	15	32.78 ± 2.58^{a}	39.84 ± 1.82^{b}
7	0	30.94 ± 0.32^{a}	38.35 ± 0.41^{b}
7	5	31.71 ± 3.20^{a}	40.28 ± 0.03^{b}
7	10	31.14 ± 0.75^{a}	41.30 ± 0.20^{b}
7	15	31.35 ± 1.79^{a}	42.12 ± 1.99^{b}
10	0	31.03 ± 1.24^{a}	39.78 ± 0.25^{b}
10	5	30.46 ± 0.77^{a}	38.65 ± 0.25^{b}
10	10	30.77 ± 0.19^{a}	38.98 ± 0.25^{b}
10	15	30.55 ± 1.14^{a}	38.94 ± 0.25^{b}

* ตัวอักษร a, b, c, d, e ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.3 ระยะเวลาการย่อยสลาย

ศึกษาระยะเวลาการย่อยสลายที่เหมาะสมโดยใช้เครื่องในปลาและเครื่องในปลาสกัดเป็นวัตถุดิบ ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 10 ไม่เติมเอนไซม์ เก็บตัวอย่างที่เวลาการย่อยสลาย 0 0.5 1 1.5 2 4 6 8 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกของการย่อยสลาย หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือคงที่ เมื่อใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 80.20 เป็นร้อยละ 89.85 ที่เวลา 1 ชั่วโมง และระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 32.40 เป็น 42.97 ที่เวลา 4 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มเวลาการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่าต่างๆที่เวลา 8 ชั่วโมงเท่ากับร้อยละ 90.4 และ 42.97 ตามลำดับ (ภาพที่ 19 a) เมื่อใช้เครื่องในปลาทูน่าสกัดเป็นวัตถุดิบค่าต่างๆเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 75.65 เป็น 88.01 และจากร้อยละ 34.56 เป็น 43.43 ตามลำดับ ที่เวลา 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 19 b) เมื่อเพิ่มเวลาการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายไม่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยค่าต่างๆที่เวลา 8 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 92.84 และ 43.43 ตามลำดับ สอดคล้องกับการย่อยสลายหัวและเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (skipjack : *Katsuwonas pelamis*) โดยเอนไซม์อัลคาเลส ซึ่งปริมาณไนโตรเจนและระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะ 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลาย หลังจากนั้นจะมีค่าคงที่ ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายจากหัวและเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบที่เวลา 4 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 63.92 95.85 และ ร้อยละ 46.78 56.59 ตามลำดับ (อัจฉริยา เชื้อช่วยชู, 2542) Baek และ Cadwallader (1995) รายงานว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยสลายกุ้งนาง (crayfish) เท่ากับ 2.5 ชั่วโมงใกล้เคียงกับการย่อยสลายเนื้อปลากระบอก (mullet : *Mugil cephalus*) ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงที่สุดที่เวลาการย่อย 2 ชั่วโมง (Rebeca *et al.*, 1991) ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการย่อยสลายวัตถุดิบอื่น ซึ่งมีอัตราการย่อยสลายสูงในระยะแรกของปฏิกิริยา และอัตราการย่อยสลายจะช้าลงและคงที่ เช่น การย่อยเนื้อปลาแปซิฟิกไวท์ทิง (pacific whiting : *Merluccius productus*) ด้วยเอนไซม์นิวเทรสมีอัตราการย่อยสลายอย่างรวดเร็วในช่วง 10 นาทีแรกของการย่อยและอัตราการย่อยสลายเริ่มคงที่เมื่อย่อยเป็นเวลา 20 นาที (Benjakul and Morrissey, 1997) เช่นเดียวกับการย่อยปลาคาเพลิน (capelin : *Mallotus villosus*) โดยเอนไซม์นิวเทรส (Shahidi *et al.*, 1995)



ภาพที่ 19 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (Nitrogen recovery) และระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) ในไฮโดรไลเสตที่เวลาการย่อยสลายต่างๆ

a) เมื่อใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบ

b) เมื่อใช้เครื่องในปลาทูน่าสกัดเป็นวัตถุดิบ

5. การผลิตปุ๋ยน้ำและการตอบสนองของผักต่อปุ๋ยน้ำ

5.1 การผลิตปุ๋ยน้ำ

นำเครื่องในปลาทูน่า ปุ๋ยน้ำที่ได้จากการย่อยสลายเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่สภาวะ พีเอชเริ่มต้น 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 10 ไม่เติมเอนไซม์ ย่อยสลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และปุ๋ยน้ำอินทรีย์ทางการค้า วิเคราะห์ปริมาณธาตุอาหารพืช พบว่า มีปริมาณธาตุอาหารพืชแสดงดังตารางที่ 18 ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีพีเอชเท่ากับ 7.0 และมีปริมาณธาตุอาหารพืชหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ร้อยละ 1.42 0.97 0.25 ปริมาณธาตุอาหารพืชรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เท่ากับ 90.63 2.77 ส่วนในล้าน และปริมาณธาตุอาหารพืชเสริม ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 29.26 0.24 1.05 และ 13.77 ส่วนในล้าน ตามลำดับ ปริมาณธาตุอาหารพืชต่างๆในเครื่องในปลาเท่ากับ ร้อยละ 2.8 0.62 0.43 และ 623.10 537.92 57.29 1.06 2.27 24.56 ส่วนในล้าน ปริมาณธาตุอาหารพืชต่างๆในปุ๋ยน้ำทางการค้า เท่ากับ ร้อยละ 8.95 5.32 7.57 และ 62.53 104.23 9.14 2.33 0.99 3.11 ส่วนในล้าน และมีค่าพีเอชเท่ากับ 6.45 เมื่อพิจารณาปริมาณธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ของปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับวัสดุเศษเหลืออื่นๆ พบว่าปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีปริมาณไนโตรเจน และฟอสฟอรัสสูงกว่า แต่มีปริมาณโปแตสเซียมต่ำกว่าส่าเหล้าและสาหร่ายป่น ปริมาณธาตุอาหารหลัก (N-P-K) ของปุ๋ยน้ำ ส่าเหล้า และ สาหร่ายป่น เท่ากับ ร้อยละ 1.42 0.97 0.25 ร้อยละ 0.15 0.018 0.72 และร้อยละ 0.7 0.1 1.9 (ตามลำดับ) แต่ปุ๋ยน้ำที่ได้มีปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ 1.42) ต่ำกว่า อามิอามิ (ร้อยละ 4.6) ปลาหมัก (ร้อยละ 1-3) และ ปลาป่น (ร้อยละ 6-10) ตามลำดับ (ตารางที่ 19) (Blatt, 1991 : หรรษา คุณาไท, 2539 : สุรพล ถ้ำกระแสร์ และคณะ, 2538)

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณธาตุอาหารพืชทุกชนิดในปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีค่าต่ำกว่าเครื่องในปลาทูน่ายกเว้นปริมาณธาตุฟอสฟอรัส เนื่องจากมีการเติมกรดฟอสฟอริกลงไปในไฮโดรไลเสตในขั้นตอนการปรับพีเอช ในปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีปริมาณธาตุเหล็กสูง เนื่องจากปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีเลือดปลาเป็นองค์ประกอบสำคัญ และในเลือดมีฮีโมโกลบินซึ่งมีเหล็กเป็นองค์ประกอบทำให้มีธาตุเหล็กสูง นอกจากนี้ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีปริมาณแคลเซียม ทองแดง และ สังกะสี สูงกว่าปุ๋ยน้ำทางการค้า ซึ่งแร่ธาตุต่างๆเหล่านี้เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของอวัยวะภายในของปลา (สุริยา สาสนรักกิจและคณะ, 2542)

ตารางที่ 18 ปริมาณธาตุอาหารพืชของเครื่องในปลา ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้และปุ๋ยน้ำทางการค้า

ปริมาณธาตุอาหารพืช	เครื่องในปลา [a]	ปุ๋ยน้ำ [a]	ปุ๋ยน้ำทางการค้า [a]	ปุ๋ยน้ำ [d]	ปุ๋ยน้ำทางการค้า [d]
ไนโตรเจน [b]	2.8	1.42	8.95	7	7
ฟอสฟอรัส [b]	0.62	0.97	5.32	4.78	4.16
โปแตสเซียม [b]	0.43	0.25	7.57	1.23	5.92
แคลเซียม [c]	623.10	90.63	62.53	446.80	48.90
แมกนีเซียม [c]	537.92	2.77	104.23	13.66	81.51
เหล็ก [c]	57.29	29.26	9.14	144.25	7.15
แมงกานีส [c]	1.06	0.24	2.33	1.18	1.82
ทองแดง [c]	2.27	1.05	0.99	5.18	0.774
สังกะสี [c]	24.56	13.77	3.11	67.89	2.43

[a] ผลการวิเคราะห์จาก หน่วยวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[b] ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)

[c] ส่วนในล้าน

[d] ปริมาณธาตุอาหารที่ให้กับผักบุ้งเมื่อศึกษาการตอบสนองของผักบุ้ง โดยให้ในปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นที่เท่ากัน

ตารางที่ 19 ปริมาณธาตุอาหารพืชของวัสดุเศษเหลือบางชนิด และปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้

ปริมาณธาตุอาหารพืช	ปุ๋ยน้ำ [a]	ส่าเหล้า [d]	อามิอามิ [e]	สาหร่ายปน [f]	ปลาหมัก [f]	ปลาป่น [f]
ไนโตรเจน [b]	1.42	0.15	4.6	0.7	1-3	6-10
ฟอสฟอรัส [b]	0.97	0.018	0.3	0.1	0.4-2.6	5-9
โปแตสเซียม [b]	0.25	0.72	0.6	1.9	0.4	0.1
แคลเซียม [c]	90.63	0.9	ND	1.3	1.0	11-18
แมกนีเซียม [c]	2.77	0.64	ND	0.8	0.1	0.5
เหล็ก [c]	29.26	0.04	ND	135	4-8	500-1500
แมงกานีส [c]	0.24	0.02	ND	28	0.5-3.0	25-45
ทองแดง [c]	1.05	<0.01	ND	1.5	0.5-1.0	20-50
สังกะสี [c]	13.77	0.04	ND	33	1-6	100-200

[a] ผลการวิเคราะห์จาก หน่วยวิเคราะห์กลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

[b] ร้อยละ (โดยน้ำหนัก)

[c] ส่วนในล้าน

[d] หรรษา คุณาไท (2539)

[e] อามิอามิเป็นอาหารพืชบำรุงดินชนิดน้ำ ผลพลอยได้จากโรงงานผลิตผงชูรส บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ (ประเทศไทย) จำกัด (สุรพล ถ้ำกระแสร์ และคณะ, 2538)

[f] Blatt (1991)

ND = ไม่มีข้อมูล

5.2 การตอบสนองของผักบุ้งต่อปุ๋ยน้ำ

ศึกษาผลของการตอบสนองของผักบุ้งต่อการใช้ปุ๋ยชนิดต่างๆ คือ ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยน้ำทางการค้า และปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ (ภาพที่ 20) พบว่า ผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำทางการค้าให้น้ำหนักสดมากที่สุด โดยให้น้ำหนักสดเท่ากับ 59.35 กรัมต่อทรีตเมนต์ (ตารางที่ 20) รองลงมาคือ ผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำ ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม ซึ่งให้น้ำหนักสดเท่ากับ 50.35 40.42 และ 36.37 กรัมต่อทรีตเมนต์ ตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสูงของผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยชนิดต่างๆ พบว่าให้ผลไปในทำนองเดียวกับน้ำหนักสด คือ ผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยน้ำทางการค้า ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม มีความสูงเฉลี่ย 22.92 22.47 19.13 และ 17.20 เซนติเมตร ตามลำดับ ภาพที่ 21 แสดงการเจริญเติบโตของผักบุ้งที่เวลาการปลูกต่างๆ การที่ผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำทางการค้าและปุ๋ยน้ำที่ผลิตเองมีการเจริญและให้น้ำหนักสดดีกว่ากลุ่มผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยเคมี เนื่องจากปุ๋ยน้ำทั้งสองชนิดมีธาตุอาหารพืชทั้งธาตุอาหารหลัก และธาตุอาหารรองอย่างครบถ้วน แต่ปุ๋ยเคมีมีแต่ธาตุอาหารหลักเท่านั้น สอดคล้องกับการนำวัสดุเศษเหลือจากทะเลมาใช้เป็นปุ๋ยให้กับกะหล่ำปลีและแครอทซึ่งให้ผลผลิตดีเทียบเท่ากับการให้ปุ๋ยเคมีสูตร 17-17-17 (Blatt and Mcrae, 1998) และการทดลองของภาวนา ลิกขนานนท์ และสมศักดิ์ วังใน (2539) ซึ่งทำการทดลองเปรียบเทียบการให้ปุ๋ยหมัก และปุ๋ยเคมีกับผักบุ้ง พบว่า ผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยหมักจะมีการเจริญเติบโตและมีผลผลิตดีกว่าผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยเคมี และที่ไม่ได้รับปุ๋ย โดยผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยหมัก ปุ๋ยเคมี และไม่ได้รับปุ๋ย มีความสูงเท่ากับ 34.3 เซนติเมตร 26.0 เซนติเมตร และ 24.4 เซนติเมตร และน้ำหนักสด 82.22 กรัมต่อทรีตเมนต์ 35.3 กรัมต่อทรีตเมนต์ และ 22.0 กรัมต่อทรีตเมนต์ ตามลำดับ และการทดลองของสมชัย สว่างจันทร์ และคณะ (2539) ซึ่งพบว่าผักกาดหัวที่ใช้มูลสุกรและน้ำจากคอกสุกรที่ผ่านการบำบัดด้วยอีเอ็ม (EM ; Effective Microorganism) เป็นปุ๋ยให้ผลผลิตสูงสุด และผักกาดหัวที่ได้รับปุ๋ยเคมีให้ผลผลิตรองลงมา แต่เมื่อใช้ปุ๋ยชนิดเดียวกันนี้กับผักคะน้า ผักคะน้าที่ได้รับปุ๋ยเคมีจะให้ผลผลิตสูงสุด นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการนำวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมอีกหลายชนิดมาใช้เป็นปุ๋ย เช่น การใช้ส่าเหล้าในการเพิ่มผลผลิตข้าวซึ่งพบว่า ส่าเหล้าสามารถทำให้ข้าวเจริญเติบโตและแตกกอได้ดี และให้ผลผลิตใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี การใช้วัสดุเศษเหลือจากโรงงานผลิตผงชูรสเป็นอาหารบำรุงดินในการปลูกอ้อย, การนำกากขี้แป้งจากอุตสาหกรรมน้ำยางข้นเป็นวัสดุบำรุงดินสำหรับปลูกหญ้านวลน้อย (หรรษา คุณาไท, 2539 ; สุรพล ถ้ำกระแสร์ และคณะ, 2538 ; วราศรี เถกประสิทธิ์, 2543) เป็นต้น เมื่อพิจารณาความสูงของผัก พบว่า ความสูงของผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำทางการค้า เนื่องจากเมื่อคิดปริมาณธาตุอาหารพืชที่เติมลงไปแล้วปริมาณธาตุอาหารพืช (ไนโตรเจน

ฟอสฟอรัส แมงกานีส) ที่ใส่ในผักบุ้งเมื่อใช้ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกับเมื่อใช้ปุ๋ยน้ำทางการค้า และปริมาณธาตุอาหารที่เติมลงไปเมื่อใช้ปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ มีธาตุแคลเซียม เหล็ก ทองแดง และสังกะสีสูงกว่า แต่มีธาตุโปแตสเซียมและแมกนีเซียมต่ำกว่า (ตารางที่ 18) เมื่อพิจารณาแร่ธาตุอาหารพืชในปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ ซึ่งมีแคลเซียม เหล็ก ทองแดง และสังกะสีอยู่สูงนั้น น่าจะเหมาะกับการนำไปใช้เป็นปุ๋ยเพื่อเพิ่มธาตุอาหารรองแก่ มะม่วง ส้ม มะเขือเทศ แครอท ซึ่งมีความต้องการธาตุต่างๆเหล่านี้ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 21) แต่การจะนำไปใช้นั้น นอกจากจะต้องพิจารณาความต้องการธาตุอาหารของพืชแล้ว ยังต้องพิจารณาพื้นที่ที่ใช้ในการปลูกพืชด้วย เพราะพื้นที่แต่ละแห่งมีความอุดมสมบูรณ์ของแร่ธาตุต่างๆกัน เช่น ดินที่มีการให้ปูนสูง จะมีแนวโน้มการขาดธาตุฟอสฟอรัส โปแตสเซียม เหล็ก ดินโซเดียม จะมีแนวโน้มการขาดธาตุ แคลเซียม แมกนีเซียม ดินที่ถูกชะล้างมาก จะมีแนวโน้มการขาดไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม สังกะสี โบรอน (สัมฤทธิ์ เพื่องจันทร์, 2538) ดินในทุกภาคของประเทศไทยมักขาดแคลนแมกนีเซียม กำมะถัน ดินทรายในภาคตะวันออกและภาคใต้มักขาดธาตุแคลเซียม ดินที่มีการปลูกพืชซ้ำเดิมหมุนเวียนตลอดทั้งปี มักขาดธาตุอาหารเสริมของพืช (สำเนา เพชรฉวี และคณะ, 2542) ดังนั้น การเลือกนำปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้ไปใช้จะต้องพิจารณาปัจจัยหลายประการ ได้แก่ ปริมาณแร่ธาตุในปุ๋ยที่ผลิตได้ ชนิดและความต้องการธาตุอาหารของพืชที่จะถูกนำปุ๋ยไปใช้ พื้นที่ที่จะปลูก สภาพภูมิอากาศ เป็นต้น (สัมฤทธิ์ เพื่องจันทร์, 2538) นอกจากนี้ยังอาจนำปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้มาใช้ทดแทนคีเลตปุ๋ยซึ่งมีราคาแพงเพื่อแก้ปัญหาการขาดธาตุอาหารเสริมด้วย โดยเหล็กคีเลตมีการแนะนำให้ใช้กับไม้ผลผลัดใบ เช่น ท้อ แอปเปิ้ล ส้ม องุ่น สังกะสีคีเลตมีการแนะนำให้ใช้กับต้นอโวคาโด องุ่น ท้อ และ แอปเปิ้ล (สุนทร พูนพิพัฒน์, 2529) แคลเซียม-โบรอนคีเลตมีการแนะนำให้ใช้กับมะม่วง โดยพ่นทางใบในช่วงก่อนดอกบาน ทำให้มะม่วงติดผลได้ดี (เปรมปรี ณ สงขลา, 2544) ในทางปฏิบัติมีการนำปุ๋ยปลาจากต่างประเทศเข้ามาใช้ในวงการเกษตรนานมาก โดยมีการใช้ในกล้วยไม้มากที่สุดใช้ในการเลี้ยงลูกไม้ต้นเล็กที่ยังไม่ให้ดอก แต่เนื่องจากปุ๋ยที่ใช้มีราคาแพง (ลิตรละมากกว่า 100 บาท) จึงจำกัดการใช้อยู่แต่การให้ทางใบ แต่ในปัจจุบันมีการผลิตปุ๋ยปลาใช้เองมากขึ้น จึงมีการใช้อย่างแพร่หลายขึ้น โดยนำมาผสมน้ำราดรอบบริเวณโคนต้นสะละ ต้นละ 500 มิลลิลิตรต่อเดือน ทำให้สะละมีสีแดงสดและติดผลง่าย ผลลีบลดลง (เกษตรเบอร์ 30, 2542)

ตารางที่ 20 ผลของปุ๋ยเคมี ปุ๋ยน้ำ และปุ๋ยน้ำทางการค้าที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของผักบุ้ง

ทรีตเมนต์	น้ำหนักสด (กรัมต่อทรีตเมนท์)	ความสูงของผัก (เซนติเมตร)
1. ไม่ใส่ปุ๋ย	36.37 [a]	17.20 ± 2.75 [a]
2. ใส่ปุ๋ยเคมี	40.42 [b]	19.13 ± 1.66 [b]
3. ใส่ปุ๋ยน้ำทางการค้า	59.35 [d]	22.92 ± 1.98 [c]
4. ใส่ปุ๋ยน้ำที่ผลิตเอง	50.35 [c]	22.47 ± 1.11 [c]

* ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างกันแสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 20 ปุ๋ยเคมี ปุ๋ยน้ำทางการค้า และปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้

ตารางที่ 21 ความเข้มข้นเฉลี่ยของแร่ธาตุในน้ำหนักแห้งของพืชที่ได้รับแร่ธาตุอาหารอย่างเพียงพอ

ปริมาณธาตุอาหารพืช	ทั่วไป	มะม่วง	ส้ม	ลิ้นจี่	มะเขือเทศ	แครอท	แตงกวา	เบญจมาศ
ไนโตรเจน [b]	1.5	0.36-1.45	2.5-2.7	1.3-1.4	3.25-6.0	2.1	4.0-5.0	4.5-6.0
ฟอสฟอรัส [b]	0.2	0.04-1.25	0.12-0.16	0.08-0.2	0.39-0.8	0.2	0.7-1.0	0.26-1.15
โปแตสเซียม [b]	1.0	0.1-1.20	1.2-1.7	0.8-1.2	4.0-7.0	-	2.5-3	3.5-10.0
แคลเซียม [b]	0.5	1.16-3.48	3.0-4.5	0.5-2.5	1.0-5.0	2.5	-	0.5-4.6
แมกนีเซียม [b]	0.2	0.43-1.33	0.3-0.49	0.4-0.7	0.48-1.9	0.24	0.6-1.0	0.14-1.5
กำมะถัน [b]	0.1	0.056-0.184	0.2-0.39	-	-	0.43	-	0.3-0.75
สังกะสี [c]	20	0-900	25-49	15-150	20-40	125	40-100	7.26
ทองแดง [c]	6	1-33	5-12	5-15	-	25	8-20	10.0
แมงกานีส [c]	50	20-110	25-49	30-500	27-384	145	100-300	195-260
เหล็ก [c]	100	17-533	50-120	50-200	-	-	100-200	-
โมลิบดินัม [c]	0.1	-	0.1-1.0	-	-	-	50	-
โบรอน [c]	20	-	36-100	25-100	15-100	-	40-80	25-200

ที่มา : สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์ (2538)

ภาพที่ 21 การเจริญเติบโตของผักบุ้งที่เวลาการปลูกต่างๆ

ก) 7 วัน (ก่อนใส่ปุ๋ย) ข) 21 วัน (หลังใส่ปุ๋ย)

บทที่ 4

สรุป

1. เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ทริปซิน และ ไคโมทริปซิน มีค่าเท่ากับ 4.22 0.11 และ 0.07 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อใช้เคซีน เอ็นโทลูอีนซัลโฟนิลแอลอาร์จินีนเมทิลเอสเทอร์ (*N*-toluenesulfonyl-L-arginine methyl ester) และ เบนโซอิลแอลไทโรซีนเอทิลเอสเทอร์(Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) เป็นสับสเตรท ตามลำดับ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ พีเอช 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 8.0-10.0 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

2. การทำแห้งเอนไซม์สกัดโดยวิธีแช่เยือกแข็งและวิธีพ่นฝอยให้ผลผลิตของเอนไซม์ผงร้อยละ 87.62 และ 24.79 และเอนไซม์ผงที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะสัมพัทธ์ร้อยละ 64.20 และ 70.82 ตามลำดับ โดยการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งให้ผลผลิตของเอนไซม์สูงกว่าร้อยละ 62.8 แต่มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าร้อยละ 6.6

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเอนไซม์สกัดคือ อุณหภูมิ -20 และ 4 องศาเซลเซียส แต่เอนไซม์ผงสามารถเก็บได้ที่ทุกอุณหภูมิที่ศึกษา เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 90 วัน ที่อุณหภูมิ –20 4 และ 37 องศาเซลเซียส เอนไซม์สกัดมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 70.4 81.7 5.5 และเอนไซม์ผงที่ได้จากการทำแห้งโดยวิธีแช่เยือกแข็งมีกิจกรรมของเอนไซม์เหลืออยู่ร้อยละ 97.5 93.5 70.2 ตามลำดับ

4. ความเข้มข้นของเอนไซม์ และความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น ไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้และระดับการย่อยสลายในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นวัตถุดิบอยู่ในช่วงร้อยละ 86.22-95.35 และ 37.47-42.26 ในขณะที่ค่าต่างๆในไฮโดรไลเสตที่ใช้เครื่องในปลาทูน่าสกัดอยู่ในช่วงร้อยละ 68.44-72.82 และ 29.89-32.78 ตามลำดับ

5. ปุ๋ยน้ำที่ได้จากการย่อยสลายเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ที่สภาวะพีเอชเริ่มต้น 10.0 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นร้อยละ 10 ไม่เติมเอนไซม์ ย่อยสลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมงมีปริมาณธาตุอาหารพืชหลัก ได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม ร้อยละ 1.42 0.97 0.25 ปริมาณธาตุอาหารพืชรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เท่ากับ 90.63

2.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณธาตุอาหารพืชเสริม ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส ทองแดง และสังกะสี เท่ากับ 29.26 0.24 1.05 และ 13.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

6. ผลของการตอบสนองของผักบุ้งต่อการใช้ปุ๋ย พบว่า ผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำทางการค้าให้น้ำหนักสดมากที่สุด รองลงมาคือ ผักบุ้งกลุ่มที่ได้รับปุ๋ยน้ำ ปุ๋ยเคมี และชุดควบคุม โดยให้น้ำหนักสดเฉลี่ยต่อต้นเท่ากับ 59.35 50.35 40.42 และ 36.37 กรัมตามลำดับ เมื่อพิจารณาความสูงและจำนวนใบเฉลี่ยต่อต้นของผักบุ้งที่ได้รับปุ๋ยชนิดต่างๆ พบว่าให้ผลไปในทำนองเดียวกับน้ำหนักสด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการนำโปรตีนไฮโดรไลเสตไปใช้ประโยชน์ทางด้านอื่นๆ เช่น ใช้ผสมในอาหารสัตว์ ทำเป็นเปปโตนในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น
2. ควรศึกษาวิธีการในการเก็บรักษาปุ๋ยให้นานขึ้น และลดกลิ่นเหม็นของปุ๋ยน้ำที่ผลิตได้
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดของพืชที่เหมาะสมต่อการใช้ปุ๋ย และอัตราที่เหมาะสมต่อพืชแต่ละชนิดด้วย

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการฐานเกษตรกรรม. 2542. รวมเรื่องผัก. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์ฐานเกษตรกรรม.

เกษตรเบอร์ 30. 2542. ทำปุ๋ยปลาใช้เองด้วยวิธีง่ายๆ. ว. เคหการเกษตร. 23 (12) : 120-125.

คณะอาจารย์ภาควิชาปฐพีวิทยา. 2519. ปุ๋ยและการใช้ปุ๋ย. *ใน* ปฐพีวิทยาเบื้องต้น. หน้า 457-472. ภาควิชาปฐพีวิทยา คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์. 2541. ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นงลักษณ์ สุทธิวานิช. 2531. คุณภาพสัตว์น้ำ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2514. การทำปลาทูน่ากระป๋อง. *ใน* ผลิตภัณฑ์ประมงและการถนอมอาหาร. คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 264-272.

ปรัชญา ธัญญาดี. 2536. แนวทางการจัดการดินและปุ๋ยในระบบเกษตรยั่งยืน. รายงานการประชุมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การพัฒนาการเกษตรยั่งยืน. ณ. ศูนย์การศึกษาพัฒนาเขาหินซ้อน จังหวัดฉะเชิงเทรา. 26-30 เมษายน 2536. หน้า 13-15.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เปรมปรี ณ สงขลา. 2544. การจัดการธาตุอาหารพืช : กลยุทธ์สู่คุณภาพและกำไรที่ดีกว่า. ว.เคหการเกษตร. 25 (3) : 54-60.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2540. การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของโรงงานอาหารทะเล. *ใน* การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือ. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 21-46

ภาวนา ลิกขนานนท์ และ สมศักดิ์ วังใน. 2539. การทดสอบประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักที่ผลิตโดยใช้ EM (โบกาฉิ) โดยเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 30 : 121-127.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, ยงยุทธ ยุทธวงศ์, ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, ประหยัด โกมารทัต, ประพนธ์ วิไลรัตน์, สกล พันธุ์ยิ้ม และ ภิญโญ พานิชพันธ์. 2530. ชีวเคมี. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

วราศรี เถกประสิทธิ์. 2543.การนำกากขี้แป้งจากอุตสาหกรรมน้ำยางข้นมาใช้ประโยชน์เพื่อทำเป็นวัสดุบำรุงดิน.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิมล เหมะจันทร์. 2528. ชีววิทยาของปลา. กรุงเทพฯ. : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, สุปราณี แย้มพราย และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2541. การใช้ประโยชน์จากของเหลือ โรงงานผลิตซูริมิ : การผลิตโปรตีนสกัดชนิดผงในระดับห้องทดลอง. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 38 : 28-40.

สัมฤทธิ์ เฟื่องจันทร์. 2538. แร่ธาตุอาหารพืชสวน. พิมพ์ครั้งที่ 1. ขอนแก่น : ภาควิชาพืชสวน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมชัย สว่างจันทร์, ปิยะ อมรสันติสุข และ อรรถ บุญนิธิ. 2539. การศึกษาการใช้น้ำจากคอกสุกรที่ผ่านการบำบัดด้วยอีเอ็มปลูกผัก. ว.เกษตรศาสตร์ (วิทย.) 30: 203-210.

สุนทร พูนพิพัฒน์. 2529. คีเลต : ปุ๋ยจุลธาตุอาหารเสริมสำหรับพืช. ชาวเกษตร. 5 (60) : 28-30.

สุมาลัย ศรีกำไลทอง. 2537. กรดไขมันอิ่มตัวชนิดโอเมก้า-3 จากน้ำนึ่งของอุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง. รายงานฉบับที่ 1/ภ.37-10. สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

สุรพล ถ้ำกระแสร์, มานพ มังพรมราช, สุรชัย วงศ์ภักดิ์, พิเชษฐ์ สนธิสว่าง, ชนะ กะรีวัต และเจ้าหน้าที่งานวิทยาศาสตร์ ศอก. 2538. การทดลองใช้ อามิ-อามิ พืชอาหารบำรุงดินชนิดน้ำกับการปลูกอ้อย (อ้อยปลูก). วารสารน้ำตาล. มี.ค.- เม.ย. : 11-16.

สุริยา สาสนรักกิจ, เปรมสุดา สมาน และ ทวิช ทำนาเมือง. 2542. การผลิตปุ๋ยปลาจากวัสดุเศษเหลือในอุตสาหกรรมปลากระป๋อง. รายงานการสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง การนำวัสดุเหลือใช้ในอุตสาหกรรมเกษตรมาทำให้เกิดประโยชน์ทางเศรษฐกิจ. ณ. ห้องประชุมศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมภาค 11 อ. หาดใหญ่. จ. สงขลา. 11 มีนาคม 2542.

สุดเอื้อม พัฒนใหญ่ยิ่ง. 2539. การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่เป็นด่างและอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกุล และ พิทยา อดุลยธรรม. 2541. การย่อยสลายโปรตีนของหัวและเครื่องในปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ผลิตทางการค้า. รายงานการวิจัย. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2537-2544. สถิติการค้าระหว่างประเทศ *ใน* สมุดสถิติประเทศไทย. หน้า 242-270. กรุงเทพ : สำนักงานสถิติแห่งชาติ.

สำเนา เพชรฉวี, เลื่อนศักดิ์ วัฒนกุล และ ไกรจิตต์ นิลตะสุวรรณ. 2542. มุมมองของการใช้ธาตุอาหารพืชเสริมเพื่อการผลิตพืชให้มีคุณภาพ. กสิกร. 72 (6) : 740-745.

หรรษา คุณาไท. 2539. ใช้สาหล้าเพิ่มผลผลิตข้าว. นสพ. กสิกร. 69(2): 152-154.

อัจฉริยา เชื้อช่วยชู. 2542. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหัวและเครื่องในปลาโอแถบโดยวิธีการทางเอนไซม์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15 ed. Virginia : The Association of Official Analytical Chemists INC.

Baek, H.H. and Cadwallader, K.R. 1995. Enzymatic hydrolysis of crayfish processing by-product. J. Food. Sci. 60(5) : 929-935.

Beddows, C.G. and Ardeshir, A.G. 1979. The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture I the use of added enzymes. J. Food Technol. 14 : 603-612.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from pacific whiting solid wastes. J. Agric. Food. Chem. 45 : 3423-3430.

Blatt, C.R. and Mcrae, K.B. 1998. Comparison of four organic amendments with a chemical fertilizer applied to three vegetables in rotation. Can. J. Plant. Sci. 78 : 641-646.

Blatt, C.R. 1991. Comparison of several organic amendments with a chemical fertilizer for vegetable production. Sci. Hortic. 47: 177-191.

Bryjak, J. and Noworyta, A. 1994. Storage stabilization and purification of enzyme by water-soluble synthetic polymers. Enzyme. Microb. Technol. 16 (7) : 616-621.

Bustor, R.B., Romo, C.R. and Healy, M.G. 1999. Purification of trypsin-like enzymes from antarctic krill processing wastewater. Proc Biochem. 35 : 327-333.

Bustos, R.O., Romo, C.D. and Healy, M.G. 1996. Stabilization of trypsin-like enzymes from antarctic krill : effect of polyols, polysaccharides and proteins. J.Chem. Tech. Biotechnol. 65 : 193-199.

Cano-Lopez, A., Simpson, B.K. and Haad, N.F. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp process wastes with the aid of trypsin from atlantic cod. J. Food Sci. 52 (2) : 503-506.

Cepeda, E., Villaran, M.C. and Aranguiz, N. 1998. Functional properties of Faba bean *(Vicia faba)* protein flour dried by spray drying and freeze drying. J. Food Eng. 36 : 303-310.

Chuapoehuk, P and Raksakulthai, N. 1992. Use of papain and bromelain in the production of oyster sauce. ASEAN Food J. 7(4) : 196-199.

Fernandez-Cornejo, J., Greene, C., Penn, R. and Newton, D. 1998. Organic vegetable production in the U.S. : certified growers and their practices. American J. Alt. Agric. 13 (2) : 69-78.

Fong, W.P., Chan, E.Y.M. and Lau, K.K. 1998. Isolation of two chymotrypsins from grass carp. Biochem. Mol. Biol. Int. 45(2) : 409-418.

Futoshi, A., Kenji, H., Kiyoshi, O. and Tadashi, I. 1997. Purification and characterization of cathepsin B from hepatopancreas of carp *Cyprinus carpio*. Comp.Biochem.Physiol. 117B(4) : 579-587.

Gagnon, B. and Berrouard, S. 1994. Effect of several organic fertilizers on growth of greenhouse tomaot transplants. Can. J. Plant Sci. 74 : 167-168.

Gildberg, A., Espejo-Hermes, J. and Magno-Orejana, F. 1984. Acceleration of autolysis during fish sauce fermentation by adding acid and reducing the salt content. J. Sci. Food. Agric. 35 : 1363-1369.

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

Gildberg, A. and Quan, S.X. 1994. Recovery of tryptic enzymes from fish sauce. Proc. Biochem. 29 : 151-155.

Hale, M. 1969. Relative activities of commertially-available enzymes in the hydrolysis of fish protein. Food Technol. 23 : 107-110.

Haard, N.F. 1998. Specialty enzymes from marine organisms. Food Technol. 52 (7) : 64-67.

Haard, N.F and Simpson, B.K. 1999. Seafood enzymes : utilization and influence on postharvest sedfood quality. New York : Marcel Dekker Inc.

Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M. and Okunuki, K. 1958. Crystalline bacterial proteinase I. preparation of crystalline protease of *B. subtilis*. J. Biochem (Tokyo). 45 : 185-194.

Heu, M.S., Kim, H.R., Cho, D.M., Godber, J.S. and Pyeun, J.H. 1997. Purification and characterization of cathepsin L-like enzyme from the muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol. 118B (3) : 523-529.

Heu, M.S., Kim, H.R. and Pyeun, J.H. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. Comp. Biochem. Physiol. 112B (3) : 557-567.

Hoyle, N.T. and Merritt J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). J. Food Sci. 59(1) : 76-79.

Jantaro, S. 2000. Purification and characterization of trypsin and chymotrypsin from viscera of yellofin tuna (*Thunnus albacares*) and enzyme application. Thesis of master of science (Biotechnology), Prince of Songkla University.

Johnson, J.A.C. and Etzel, M.R. 1995. Properties of *Lactobacillus helveticus* CNRZ-32. Attenuated by spray-drying, freeze-drying, or freezing. J. Dairy. Sci. 78 : 761-768.

Kim, S.K., Jeon, Y.J., Byeun, H.G., Kim, Y.T. and Lee, C.K.1997. Enzymatic recovery of cod frame proteins with crude proteinase from tuna pyloric caeca. Fisheries Sci. 63(3): 421-427

Kolodzieiska, I. and Sikorski, Z.E. 1996. Neutral and alkaline proteases of marine fish and invertebreates. J. Food Biochem. 20 : 349-363

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

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000 b. Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. J. Agric. Food. Chem. 48 : 657-666.

Krzyzosiak, J and Daniel, R.M. 1997. Isolation and characterisation of two chymotrypsins from *Allocyttus niger* (black oreo dory) viscera. N. Z. J. Mar. Fresh. Res. 31 : 497-504.

Lahl, W.J. and Braun, S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. Food Technol. 46 : 68-71.

Lalasidic, 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 (3) 751-756

Loffer, A. 1986. Proteolytic enzyme : source and applications. Food Technol. 21 : 63-67.

Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Faww, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenal reagent. J. Bio. Chem. 193 : 265-275.

Mackie, M.I. 1982. Fish protein hydrolysate. Proc. Biochem. 17 : 26- 28.

Mackie, I.M. 1994. Fish protein. In New and developing sources of food proteins. (Hudson, B.F.J.). pp.95-143. London : Chapman and Hall.

Morioka, K., Fujii, S., Itoh, Y., Liu, C. and Obatake, A. 1999. Recovery of amino acid from the protein in the head and viscera of frigate mackeral by autolysis. Fisheries Sci. 65 (4) : 588-591.

Mitsutoshi, N., Tamotsu, S and Hiroshi, N. 1992. Protease hydrolysis of water soluble fish proteins using a free enzyme membrane reactor. Proc. Biochem. 27 : 155-160.

Poosaran, N. 1986. Fish sauce I acid hydrolysis at ambient temperature. Songklanakarin J. Sci. Technol. 8 (2) : 43-46.

Prasertsan, P., Wuttijumnong, P., Sophanodora, P. and Choorit, W. 1988. Seafood processing industries within Songkhla-Hatyai region : The survey of basic data emphasis on wastes. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 10 : 447-451.

Quaglia, G.B. and Orban, E. 1987. Enzymic solubilisation of proteins of sardine (*Sardina pilchardus*) by commertial protease. J. Sci. Food. Agric. 38 : 263-269

Raghunath, M.R. 1993. Enzymatic protein hydrolysate from tuna canning wastes: standardisation of hydrolysis parameters. Fishery Tech. 30 : 40-45.

Ramakrishna, M., Hultin, H. and Atallah, M. 1987. A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins in relation to protein hydrolysis. J. Food. Sci. 52(5) : 1198-1202.

Rebeca, B.D., Pena-Vera, M.T. and Diaz-Castaneda, M. 1991. Producion of fish protein hydrolysatea with bacterial proteases ; yield and nutritional value. J. Food Sci. 56 (2) : 309-314.

Reece, P. 1988. Recovery of proteases from fish waste. Proc. Biochem. 23 : 62-66.

Sanchez-Chiang, L. and Ponce, O. 1981. Gastricsinogens and Gastricsins from Merluccius gayi : purification and properties. Comp. Biochem. Physiol. 68B : 251-258.

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

Shin, D.H. and Zall, R.R. 1986. Purification and identification of trypsin-like enzyme from the pyloric caeca of cod. Proc. Biochem. 21 : 11-15.

Simpson, B.K. and Haard, N.F. 1984. Trypsin from Greenland cod (*Gadus ogas*) : kinetic and thermodynamic characteristics. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 62 : 894-900.

Simpson, B.K. and Haard, N.F. 1987. Cold adapted enzymes from fish. *In* Food biochemistry (Knorr, D. eds.) pp. 495-527. New York : Marcel Dekker.

Spenelli, J. and Dassaw, J.A. 1982. Fish protein : their modification and potential uses in the food industry. *In* Chemistry of biochemistry of marine food product. (Martin, R.E., Flick, G.J., Hebard, C.E., Ward, D.R., eds.). pp. 447-451. Westport, Connecticut : The AVI Publishing Company, Inc.

Spinelli, J., Koury, B. and Miller, R. 1972. Approaches to the utilization of fish for the preparation of protein isolates : enzymic modifications of myofibrillar fish proteins. J. Food. Sci. 37 : 604-608

Squires, E.J., Haard, N.F. and Feltham, L.A.W. 1986. Pepsin isozymes from Greenland cod 2 : substrate specificity and kinetic properties. Can. J. Biochem. Cell. Biol. 64 : 210-214.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffer : Principle and Practice. *In* Method in enzymology (Deutscher, M.P. ed.)_Vol 182, pp 24-38, New York : Academic Press.

Vlieg, P., Habib, G.and Clement, G.I.T. 1983. Proximate composition of skipjack tuna (*Katsuwonas pelamis*) from New Zealand and New Caledonia water. N.Z.J. Sci. 26 : 243.

Walker, J.M., Cox, M., Whitaker, A. and Hall, S. 1995. The langauge of biotechnology : a dictionary of terms. Second edition. Washington D.C. : American Chemical society.

Walsh, G and Headon, D.R. 1994. Protein biotechnology. New York : John Wiley and Sons.

Wiseman, A. 1973. Industrial enzyme stabilisation. Proc. Biochem. 8 : 14-15.

Yu, S.K. and Tan, L.K. 1992. Enzymic solubilization of proteins of *Oreochromis mossambicus* by alcalase. ASEAN Food J. 7(3) : 157-158.

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

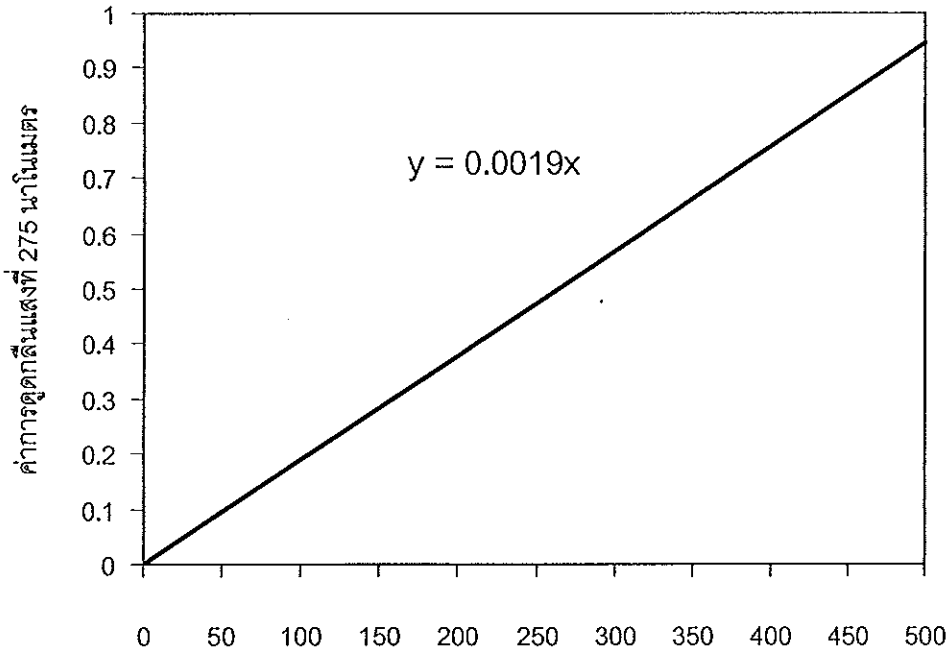
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Hagihara *et al.*,1958)

1. ชั่งไทโรซีน 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลายไทโรซีนให้อยู่ในช่วง 50-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ ก1)



ภาพที่ภาคผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

2. **ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้** (soluble protein) โดยวิธี Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

A = สารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaOH) 0.1 นอร์มอล

B = สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต($CuSO_4$)ร้อยละ 0.5

C = สารละลายโซเดียมโพแตสเซียมทาร์เทรทร้อยละ 1

D = สารผสมระหว่าง A : B: C ในอัตราส่วน 98 : 1 : 1 (ผสมก่อนใช้)

E = สารผสมระหว่าง Folin-ciocateau reagent และน้ำในอัตราส่วน 1 : 1 (ผสมก่อนใช้)

วิธีการ

1.นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 0.2 มิลลิลิตร เติมสารผสม D 2.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

2. เติมสารผสม E 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

3. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA (ภาพภาคผนวกที่ ก2)

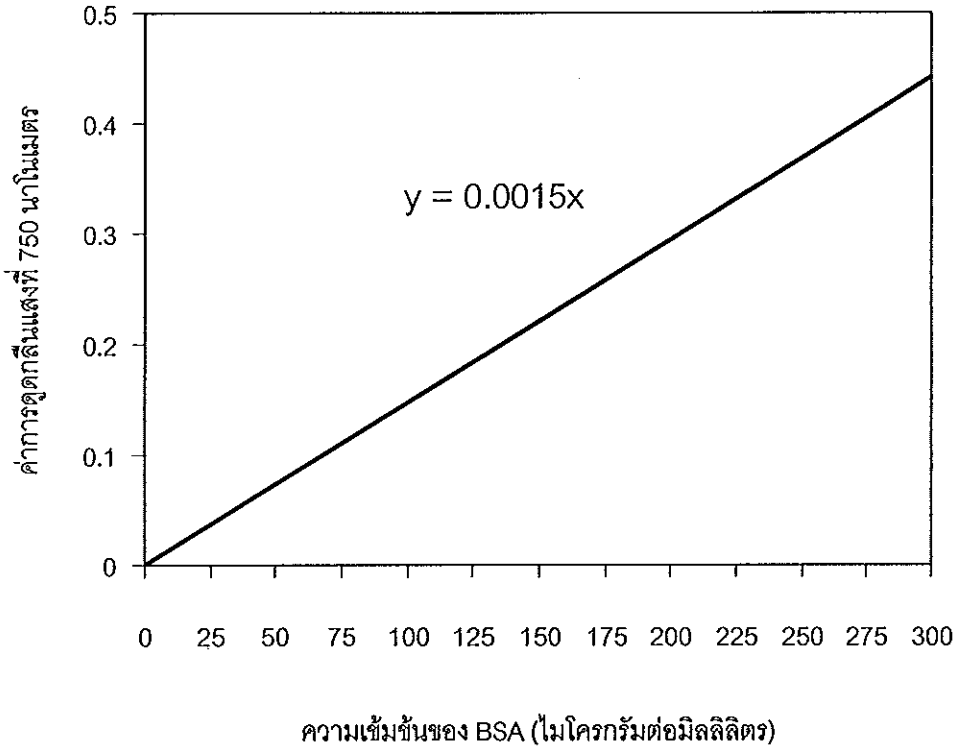
การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง BSA 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้ คือ สารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เจือจางสารละลาย BSA ให้อยู่ในช่วง 25-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951)

4. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ ก2)



ภาพที่ภาคผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐาน BSA

3. **ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด** (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ขวดย่อยโปรตีน (Kjeldahl flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. ขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask)ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร
3. ปิเปตขนาด 5, 10 มิลลิลิตร
4. บิวเรตขนาด 25 มิลลิลิตร
5. ชุดย่อยโปรตีน ประกอบด้วย เตาย่อย (heater) และ เครื่องจับไอกรด (scrubber)
6. ชุดกลั่นโปรตีน Kjeltech system distilling unit รุ่น Model 2000 ของบริษัท Tecator จำกัด

<u>สารเคมี</u>

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น
2. สารเร่งปฏิกิริยา ซึ่งเป็นสารผสมระหว่างคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) และ โพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) อัตราส่วน 1 : 9
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 20 และ ร้อยละ 60 (โดยน้ำหนัก)
4. สารละลายกรดบอริกเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยน้ำหนัก)
5. สารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.1 (โดยปริมาตร) (ภาคผนวก ข)
6. อินดิเคเตอร์ผสมระหว่าง เมทิลเรด เมทิลีนบลู และโบรโมครีซอลกรีน (ภาคผนวก ข)

<u>วิธีวิเคราะห์</u>

ขั้นตอนการย่อย

1. ชั่งตัวอย่าง(ของแข็ง)ให้ได้น้ำหนักแน่นอนประมาณ 0.5-1 กรัม (ตัวอย่างของเหลวใช้ปริมาตร 1-10 มิลลิลิตร) ใส่ลงในขวดย่อยโปรตีน ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนที่ตัวอย่าง
2. เติมสารเร่งปฏิกิริยา 5 กรัม
3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20 มิลลิลิตร
4. วางหลอดย่อยในเตาย่อยแล้วประกอบสายยางระหว่างฝาครอบ ขวดใส่ด่างที่มีสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 20 500-600 มิลลิลิตร และเครื่องจับไอกรดให้เรียบร้อย
5. เปิดเครื่องจับไอกรดและเตาย่อย แล้วตั้งอุณหภูมิเป็น 350 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ย่อยจนได้สารละลายใส ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น

ขั้นตอนการกลั่น

1. เปิดสวิทช์ชุดกลั่นโปรตีน และน้ำหล่อเย็น
2. กลั่นล้างเครื่องด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
3. นำขวดย่อยโปรตีนต่อเข้ากับชุดกลั่นโปรตีน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 50 มิลลิลิตร
4. นำขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีการเติมกรดบอริกร้อยละ 4 20 มิลลิลิตร และอินดิเคเตอร์ ไปรองรับของเหลวที่จะกลั่นออกมาโดยให้ส่วนปลายของอุปกรณ์ควบแน่นจุ่มลงในสารละลาย
5. กลั่นโดยใช้เวลาประมาณ 4 นาที
6. ไตเตรตสารละลายที่กลั่นได้กับสารละลายกรดเกลือเข้มข้นร้อยละ 0.1 สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วง

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007}{W}$$

$$\text{ปริมาณโปรตีน (ร้อยละ)} = \frac{(a-b) \times N \times 1.4007 \times F}{W}$$

โดยที่ a = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

b = ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรตกับblank (มิลลิลิตร)

N = ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)

W = น้ำหนักหรือปริมาตรของตัวอย่างเริ่มต้น (กรัมหรือมิลลิลิตร)

F = แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับอาหารชนิดต่างๆ

(แฟกเตอร์ที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณโปรตีนสำหรับผลิตภัณฑ์จากปลาเท่ากับ 6.25)

4. **ปริมาณความชื้น** (AOAC, 1990)

<u>อุปกรณ์</u>

1. ตู้อบไฟฟ้า (electric oven)
2. โถดูดความชื้น (desiccator)
3. ภาชนะอะลูมิเนียมสำหรับหาความชื้น (moisture can)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

<u>วิธีการ</u>

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบไฟฟ้า ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาความชื้นให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-2 กรัม ใส่ลงในภาชนะหาความชื้นที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 5-6 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนักภาชนะพร้อมตัวอย่าง
4. อบซ้ำ จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{ผลต่างของน้ำหนักตัวอย่างก่อนอบและหลังอบ (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}} \times 100$$

5. **ปริมาณเถ้า** (AOAC, 1990)

<u>อุปกรณ์</u>

1. เตาเผา (muffle furnace)
2. ถ้วยกระเบื้องเคลือบ (porcelain crucible)
3. โถดูดความชื้น (desiccator)
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

<u>วิธีการ</u>

1. เผาถ้วยกระเบื้องเคลือบในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปิดสวิทช์เตาเผาแล้วรอประมาณ 30-45 นาที เพื่อให้อุณหภูมิภายในเตาเผาลดลงก่อน แล้วนำออกจากเตาเผาใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนกระทั่งอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก
2. เผาซ้ำอีกครั้งประมาณ 30 นาที และทำเช่นเดียวกับข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม
3. ชั่งตัวอย่างที่ต้องการหาเถ้าให้ได้น้ำหนักแน่นอน 1-2 กรัม ใส่ลงในถ้วยกระเบื้องที่ทราบน้ำหนักแน่นอน นำไปเผาในตู้ควันจนหมดควัน แล้วจึงนำเข้าเตาเผา ตั้งอุณหภูมิเตาเผาไว้ที่อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส และกระทำเช่นเดียวกับข้อ 1-2

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังเผา (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)}}$$

6. **ปริมาณไขมัน** (AOAC, 1990)

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ชุดสกัดไขมัน (Soxlet apparatus) ประกอบด้วย ขวดกลมใส่ตัวทำละลายซอคเลต (soxlet) เครื่องควบแน่น (condensate) และเตาให้ความร้อน (heating mantus)
2. หลอดใส่ตัวอย่าง (extraction thimble)
3. ตู้อบไฟฟ้า
4. เครื่องชั่งไฟฟ้าอย่างละเอียด
5. โถดูดความชื้น
6. สำลี
7. กระดาษกรอง

<u>สารเคมี</u>

1. ปิโตรเลียมอีเธอร์

<u>วิธีการ</u>

1. อบขวดกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดของความจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างบนกระดาษกรองที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 1-2 กรัม ห่อให้มิดชิดแล้วใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลี เพื่อให้สารทำละลายมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอ
3. นำหลอดสำหรับใส่ตัวอย่างในข้อ 2 ใส่ลงในซอคเลต
4. เติมสารตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเธอร์ ลงในขวดกลมประมาณ 150 มิลลิลิตร แล้ววางบนเตาให้ความร้อน
5. ทำการสกัดไขมันเป็นเวลา 14 ชั่วโมง โดยปรับความร้อนให้หยดของสารทำละลายกลั่นตัวจากอุปกรณ์ควบแน่นด้วยอัตรา 150 หยดต่อนาที
6. เมื่อครบเวลา 14 ชั่วโมง นำหลอดใส่ตัวอย่างออกจากซอคเลต และกลั่นเก็บสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดกลมเพียงเล็กน้อย
7. นำขวดหาไขมันนั้นไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 80-90 องศาเซลเซียส จนแห้ง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
8. ชั่งน้ำหนักและอบซ้ำ จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}} \times 100$$

7. ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

<u>สารเคมี</u>

1. กรดผสม HNO_3 /$HClO_4$ เตรียมโดยผสม HNO_3 1,250 มิลลิลิตร $HClO_4$ 250 มิลลิลิตร และ NH_4VO_3 0.06 กรัม (ละลาย NH_4VO_3 0.06 กรัม ในน้ำ deionized ประมาณ 5-10 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายหมด วางให้เย็นแล้วผสมลงในกรด)
2. สารละลาย vanadomolybdate เตรียมโดย
   2.1 ละลาย ammonium molybdate 40 กรัม ในน้ำ deionized ที่อุ่นแล้ว 400 มิลลิลิตร
   2.2 ละลาย ammonium meta-vanadate 2 กรัม ในน้ำ deionized ที่ต้มเดือด 300 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนละลายหมด วางให้อุณหภูมิลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วเติมกรดไนตริกเข้มข้น 160 มิลลิลิตร
   2.3 ผสมสารในข้อ 2.1 และ 2.2 เข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา เมื่อต้องการใช้แต่ละครั้งนำมาเจือจางด้วยน้ำ deionized 4 เท่า
3. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย KH_2PO_4 (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) 3.4800 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร ค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized
4. สารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 0 5 10 15 20 25 30 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน $HClO_4$ ร้อยละ 4 เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0 0.5 1.0 1.5 2.0 2.5 และ 3.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร เติม $HClO_4$ ร้อยละ 20 ลงไป 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 0.5-2 กรัม ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมกรดผสม HNO_3 /$HClO_4$ 15 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆให้เข้ากัน ปิดปากขวดรูปชมพู่ด้วยกรวยแก้ว จากนั้นย่อยบน hot plate ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนควันน้ำตาลหมด แล้วเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเรื่อยๆจนเกิดควันสีขาว ทำการย่อยต่อไปจนได้สารละลายใส
3. วางไว้ให้เย็น แล้วกรองผ่านกระดาษกรองลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ใช้น้ำ deionized ล้างตัวอย่างปุ๋ยบนกระดาษกรอง จนได้ปริมาตรเกือบ 250 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
4. ปิเปตสารละลาย vanadomolybdate 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร และปิเปตสารละลายมาตรฐานหรือสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติมลงไป เขย่าให้เข้ากัน
5. วางไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร
6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของฟอสฟอรัส ในสารละลายมาตรฐาน โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกนตั้ง

การคำนวณ

ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด (ร้อยละ) = (X-b) x 250/(10000 x น้ำหนักตัวอย่าง) x 2.291 x mof

x=ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสในสารละลายตัวอย่างเทียบจากกราฟมาตรฐาน (มก./ลิตร)

b=ความเข้มข้นของฟอสฟอรัสใน blank เทียบจากกราฟมาตรฐาน (มก./ลิตร)

mof (moisture correction factor) = (100 + ความจุความชื้นในดิน) /100

8. **ปริมาณโปแตสเซียมทั้งหมด** (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

สารเคมี

1. กรดผสม HNO_3 /$HClO_4$ เตรียมเช่นเดียวกับการวิเคราะห์ปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด
2. 20% $HClO_4$ เตรียมโดยผสม $HClO_4$ 563 มิลลิลิตรในน้ำ deionizedแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 2 ลิตรด้วยน้ำ deionized
3. สารละลายโปแตสเซียมมาตรฐานความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย KCl (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) 1.9067 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized

4. สารละลายโปแตสเซียมมาตรฐานความเข้มข้น 0 20 40 60 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อลิตร ใน $HClO_4$ ร้อยละ 4 เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานฟอสฟอรัสความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0 2 4 6 8 และ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตร เติม $HClO_4$ ร้อยละ 20 ลงไป 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างปุ๋ย 0.5-1 กรัมลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมกรดผสม HNO_3/$HClO_4$ 15 มิลลิลิตร แล้วทำการย่อยเช่นเดียวกับข้อ 2-3 ในการหาปริมาณฟอสฟอรัสทั้งหมด
3. นำไปวัดค่าการปลดปล่อยแสงด้วยเครื่อง Flame Photometer
4. ทำ blank เช่นเดียวกับข้อ 2-3
5. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการปลดปล่อยแสงกับความเข้มข้นของโปแตสเซียม ในสารละลายมาตรฐาน โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกนตั้ง

การคำนวณ

ปริมาณโปแตสเซียมทั้งหมด (ร้อยละ) = (X-b) x 250/(10000 x น้ำหนักตัวอย่าง) x 1.204 x mof

x=ความเข้มข้นของโปแตสเซียมในสารละลายตัวอย่างเทียบจากกราฟมาตรฐาน(มก./ลิตร)

b=ความเข้มข้นของโปแตสเซียมใน blank เทียบจากกราฟมาตรฐาน (มก./ลิตร)

mof (moisture correction factor) = (100 + ความจุความชื้นในดิน) /100

9. **ปริมาณธาตุอาหารรอง** (แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี) (ดัดแปลงจาก AOAC, 1990)

สารเคมี

1. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น
2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล เตรียมโดย เจือจางกรดไฮโดรคลอริก 166.7 มิลลิลิตร ในน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร
3. สารละลาย Sr 5000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $SrCl_2.6H_2O$ 15.2146 กรัม ในน้ำ deionized เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 200 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized ให้ครบ 1 ลิตร

4. สารละลายมาตรฐานแคลเซียมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $CaCO_3$ (ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง) 2.4973 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized
5. สารละลายมาตรฐานแมกนีเซียมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $MgSO_4.7H_2O$ 10.1411 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized
6. สารละลายมาตรฐานเหล็กความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $FeSO_4.7H_2O$ 4.9782 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized
7. สารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $MnSO_4.H_2O$ 3.0762 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized ได้เป็นสารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ 10 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized
8. สารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 3.9295 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized ได้เป็นสารละลายมาตรฐานทองแดงความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ 10 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized
9. สารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลาย $ZnSO_4.7H_2O$ 4.9782 กรัม ด้วยน้ำ deionized ในขวดปรับปริมาตร แล้วค่อยๆเติมกรดไนตริกเข้มข้น 12 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตรด้วยน้ำ deionized ได้เป็นสารละลายมาตรฐานสังกะสีความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตสารละลายที่ได้ 10 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized

10. สารละลายมาตรฐานแคลเซียมและแมกนีเซียมความเข้มข้น 0 2 4 6 8 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานแคลเซียมและแมกนีเซียมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตรอย่างละ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรด้วยสารละลาย Sr
11. สารละลายมาตรฐานเหล็กความเข้มข้น 0 2 4 6 8 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานเหล็กความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร 0 0.2 0.4 0.6 0.8 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized
12. สารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 0 0.25 0.5 1.0 1.5 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานแมงกานีสความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร 0 0.25 0.5 1.0 1.5 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized
13. สารละลายมาตรฐานทองแดงและสังกะสีความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.3 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยปิเปตสารละลายมาตรฐานทองแดงและสังกะสีความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร อย่างละ 0 0.1 0.2 0.3 0.4 มิลลิลิตรลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำ deionized

<u>วิธีการ</u>

1. ชั่งตัวอย่างปุ๋ยประมาณ 1 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร ต้มบน hot plate จนสารละลายเกือบแห้ง
3. เติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 2 นอร์มอล 20 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด วางไว้ให้เย็น กรองผ่านกระดาษกรองลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร
4. ล้างตะกอนด้วยน้ำ deionized แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Atomic Absorption Spectrophotometre (สำหรับตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์แคลเซียมและแมกนีเซียม นำไปเจือจางด้วยสารละลาย Sr ให้ได้ความเข้มข้นอยู่ช่วงกลางของสารละลายมาตรฐาน)

6. เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของธาตุนั้นๆ โดยให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นแกนตั้ง

<u>การคำนวณ</u>

ปริมาณธาตุอาหารรองต่างๆทั้งหมด (ร้อยละ) = (X-b) x 100/10000 x น้ำหนักตัวอย่าง x mof

x=ความเข้มข้นของธาตุต่างๆในสารละลายตัวอย่างเทียบจากกราฟมาตรฐาน(มก./ลิตร)

b=ความเข้มข้นของธาตุต่างๆใน blank เทียบจากกราฟมาตรฐาน (มก./ลิตร)

mof (moisture correction factor) = (100 + ความจุความชื้นในดิน) /100

ธาตุอาหารรอง ได้แก่ แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก แมงกานีส ทองแดง สังกะสี

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารละลายและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. **การเตรียมสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์** (citrate-phosphate buffer) **ตามวิธีของ** Gomori (1955 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7.H_2O$ 10.51 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M dibasic sodiumphosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 13.398 กรัมในน้ำ 1 ลิตร หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 17.898 กรัมในน้ำ 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.0	30.7	19.3
4.4	27.8	22.2
4.8	25.2	24.8
5.0	24.3	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.0	17.9	32.1
6.4	15.4	34.6
6.8	9.1	40.9
7.0	6.5	43.6

2. **การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์** (Tris-HCl buffer) **ตามวิธีของ** Bates and Bower (1956 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane

สารละลาย B : 0.05 M HCl

พีเอช	สารละลาย B
7.0	46.6
7.1	45.7
7.2	44.7
7.3	43.4
7.4	42.0
7.5	40.3
7.6	38.5
7.7	36.6
7.8	34.5
7.9	32.0
8.0	29.2
8.1	26.2
8.2	22.9
8.3	19.9
8.4	17.2
8.5	14.7
8.6	12.4
8.7	10.3
8.8	8.5
8.9	7.0
9.0	5.7

3. **การเตรียมสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์** (carbonate-bicarbonate buffer) **ตามวิธีของ** Bates and Bower (1956 **อ้างโดย** Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A **กับสารละลาย** B **ตามพีเอชที่ต้องการ**

สารละลาย A : 0.05 M anhydrous sodium carbonate

สารละลาย B : 0.05 M sodium bicarbonate

พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B
9.2	4.0	46.0
9.3	7.5	42.5
9.4	9.5	40.5
9.5	13.0	37.0
9.6	16.0	34.0
9.7	19.5	30.5
9.8	22.0	28.0
9.9	25.0	25
10.0	27.5	22.5
10.1	30.0	20.0
10.2	33.0	17.0
10.3	35.5	14.5
10.4	38.5	11.5
10.5	40.5	9.5
10.6	42.5	7.5
10.7	45.0	5.0

4. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (stop buffer) เตรียมโดยใช้ tri-chloroacetic acid 0.1 M (1.6339 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร) sodium acetate 0.22 M (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 12.87 กรัม เติมกรดอะซิติก 1.32 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร) acetic acid 0.33 M ในอัตราส่วน 1 : 1 : 1

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

5.1 การเตรียมและหาความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

<u>วิธีเตรียม</u>

ตวงกรดเกลือเข้มข้นปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 1 ลิตร ซึ่งมีน้ำกลั่นบรรจุอยู่ เติมน้ำกลั่นลงไปจนถึงขีดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน ได้เป็นสารละลายกรดเกลือเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

<u>วิธีหาความเข้มข้นมาตรฐาน</u>

ชั่งโซเดียมเทตราบอเรต (Borax : $Na_2B_4O_7.10H_2O$) ให้ได้น้ำหนักแน่นอน 0.4 กรัม (สำหรับความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล) ใส่ลงในฟลาสก์ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เติมอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วไตเตรตกับสารละลายกรดเกลือที่ต้องการหาความเข้มข้นมาตรฐาน สีของสารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีม่วงที่จุดยุติ คำนวณความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายกรดเกลือได้จาก

$$\text{ความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ (นอร์มอล)} = \frac{\text{น้ำหนักของโซเดียมเทตราบอเรต (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของสารละลายกรดเกลือที่ใช้ไตเตรต (มล.)} \times 0.1907}$$

(กรัมสมมูลของโซเดียมเทตราบอเรต = 190.72)

5.2 การเตรียมอินดิเคเตอร์ผสมสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด

อินดิเคเตอร์ผสมที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดสามารถเตรียมได้โดย

1. ชั่งเมทิลเรด 0.125 กรัม และเมทิลีนบลู 0.082 กรัม ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 100 มิลลิลิตร
2. ชั่งโบรโมคริซอลกรีน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร
3. ผสมสารละลายจากข้อ 1 และ 2 ในอัตราส่วน 5 : 1

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาววิภาวรรณ ไตรรัตนานุกูล

วัน เดือน ปีเกิด 5 มิถุนายน 2520

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2540

ผลงานทางวิชาการ

Trairatananukoon, W., Prasertsan, P. and Jitbunjerdkul, S. 2000. Effect of drying and storage condition on the properties of proteases from viscera of tuna (*Thunnus albacares*). Poster presentation at The 12 th Annual Meeting of Thai Society for Biotechnology "Biotechnology : Impact & Trends". 1-3 November, 2000. Kanchanaburi, Thailand. Abstract p.102.