



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยี
ทางด้านเอนไซม์”

โดย

ดร.พิลานี ไวกนอมสัจย์ และคณะ

10 สิงหาคม 2548

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

“การวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยี
ทางด้านเอ็นไซม์”

คณะผู้วิจัย

สังกัด

ดร.พิลานี ไวถนอมสัจย์ สถาบันผลิตผลเกษตรฯ ม. เกษตรศาสตร์
นายชิตชัย ปัญญาสวรรค์ สถาบันผลิตผลเกษตรฯ ม. เกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

ชื่อโครงการ : การวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์

หัวหน้าโครงการ : ดร.พิลานี ไวนอมสสัย

หน่วยงานที่สังกัด : ฝ่ายเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย

สถาบันคั่นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทคัดย่อ

ได้พัฒนากกรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยีเอนไซม์ จากการศึกษาคุณสมบัติของวัตถุดิบที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลสได้แก่ รังไหมและดักแด้ พบว่า มีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีกรรมวิธีในการผลิตที่แตกต่างกันดังนี้ กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากรังไหมอีรี่ คือ นำรังไหมที่ไม่ผ่านการลอกกาวมาหั่นให้มีขนาดเล็กจากนั้นทำให้ละลายโดยการต้มในสารละลาย แคลเซียมไนเตรท/เอทานอล/น้ำ อัตราส่วน 0.6: 2 : 8 โมล (98.49 g : 92 g : 100.8 g) โดยใช้สัดส่วนรังไหมต่อสารละลายเท่ากับ 6 : 100 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อรังไหมละลายหมดจะได้เป็นสารละลายโปรตีนไหม จากนั้นจึงนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า “อัลคาเลส” ที่สภาวะปริมาณเอนไซม์ 1.0 % (ปริมาตร/น้ำหนัก) ค่าความเป็นกรด-ด่างในการทำปฏิกิริยา 7.5 บ่มที่อุณหภูมิ 60 ° ซ เวลาในการย่อย 60 นาที ในขณะที่ทำการกวนตลอดเวลา โดยที่สภาวะดังกล่าวมีระดับการย่อยสลายสูงสุดคือ 83.78 % ได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ 77.80 % กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากดักแด้ไหมอีรี่ คือ นำดักแด้สดมาบดให้ละเอียดเติมน้ำเพื่อปรับให้มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 4.6 % โดยน้ำหนัก ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7.5 ย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า “อัลคาเลส” ปริมาณ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 50 ° ซ เป็นเวลา 120 นาที ในขณะที่ทำการกวนตลอดเวลา โดยที่สภาวะดังกล่าวมีระดับการย่อยสลายสูงสุดคือ 73.27 % ได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ 62.82 % เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลสทั้ง 2 ชนิดไปทำให้เป็นผงโดยวิธีทำแห้งแช่เยือกแข็ง พบว่า ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้มีคุณสมบัติในการละลายที่ดี และมีคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

Project Title : Research and development of protein hydrolysate production from *Philosamia ricini* by enzyme technology

Principle investigator : Dr. Pilanee Vaithanomsat

Organization : Enzyme Technology and Waste Management Research Unit

Kasetsart Agricultural and Agro-Industrial Product Improvement Institute
Kasetsart University

Abstract

The method for protein hydrolysate production from Eri silk (*Philosamia ricini*) were investigated. Proximate analysis of 2 raw materials, silk cocoon and silk pupa, showed different chemical compositions between the 2 materials and therefore resulting in separately different protein hydrolysate productions. The appropriate process for silk cocoon began with cutting the nondegummed cocoon into small pieces and then dissolving into homogeneous solution by boiling in the mixture of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ /ethanol/ H_2O (0.6:2:8 mole) at the ratio of cocoon to mixture 6:100 (w/v). After that, the silk solution was enzymatically hydrolysed using 1.0 % Alcalase (v/w) for 60 min. at pH 7.5 temperature 60 ° C with stirring. The resulted show the highest degree of hydrolysis obtained from the above condition at 83.78 % with nitrogen recovery 77.80 %. For the production using silk pupa as starting material, the process started by blending fresh pupa into fine particles and the water was added to adjust final protein concentration to 4.6 % (w/w). The pH was adjusted to 7.5, commercial enzyme Alcalase was added to 0.5 % (v/w) and the process was carried out at 50 ° C for 120 min. with stirring. The maximum degree of hydrolysis resulted from this condition was 73.27 % with nitrogen recovery 62.82 %. The protein hydrolysates from both silk cocoon and pupa were freeze-dried, ground into fine powder and analysed. The results indicated that the two hydrolysate products were capable of well dissolving in water and were as high quality as the commercial products.

Executive Summary

ชื่อโครงการ : การวิจัยและพัฒนาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหมอีรี่โดยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์
หัวหน้าโครงการ

ชื่อ : ดร. พิลานี ไวกนอมสตัย

สถานที่ทำงาน: ฝ่ายเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ : 0-2942-8599

โทรสาร: 0-2942-8599

E-mail : p_vaithanomsat@yahoo.com

ผู้ร่วมโครงการ

ชื่อ : นายชิตชัย ปัญญาสุวรรณค์

สถานที่ทำงาน: ฝ่ายเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสีย

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

โทรศัพท์ : 0-2942-8599

โทรสาร: 0-2942-8599

ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

อุตสาหกรรมการผลิตเส้นไหมเป็นอุตสาหกรรมหนึ่งที่รัฐบาลได้ให้ความสนใจและมีการส่งเสริมให้มีการพัฒนาต่าง ๆ ในหลายพื้นที่ ซึ่งประสบความสำเร็จในระดับที่น่าพอใจ และยังเป็นอุตสาหกรรมที่ทำให้เกิดของเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก ได้แก่ ดักแด้ไหม เศษไหม รังไหม และน้ำกาก เป็นต้น ซึ่งส่วนใหญ่ของเหลือทิ้งนี้ยังมีสารอาหารบางอย่าง เช่น โปรตีนและไขมันเหลืออยู่ในปริมาณที่ค่อนข้างมาก ซึ่งน่าจะได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด จากข้อมูลที่ได้จากการทดลองและการสืบค้นฐานข้อมูลแสดงให้เห็นว่าการศึกษาส่วนใหญ่มุ่งเน้นหรือมีความสนใจมากเป็นพิเศษเฉพาะด้านการปรับปรุงการเลี้ยงไหมและกระบวนการผลิตเส้นไหม แต่ยังมีได้ศึกษาอย่างจริงจังถึงการลดปริมาณของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเส้นไหมโดยการนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม

การนำเส้นไหมไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ นอกจากการทำเครื่องนุ่งห่มนั้น ในปัจจุบันจะใช้เพียงไฟโบรอินและเซรีซินซึ่งเป็นส่วนของเส้นใยเท่านั้น ยังไม่ได้มีการศึกษานำของเหลือทิ้งส่วนอื่น ๆ จากกระบวนการผลิตเส้นไหมมาทดลองในการผลิตดังกล่าว ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสัดส่วนของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวดักแด้ไหมหรือของเหลืออื่น ๆ จากกระบวนการ ได้แก่ น้ำกาก เป็นต้น ถึงแม้ว่าจะมีอยู่ในปริมาณที่ไม่สูงเท่ากับปริมาณที่พบในเส้นใยไหมก็ตาม ถ้ามีการศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากของเหลือเหล่านี้ได้ ก็อาจเป็นทางเลือกในการใช้ประโยชน์และการเพิ่มมูลค่าของเหลือจากกระบวนการผลิตเส้นไหมได้อีกทางหนึ่ง

ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาเพื่อให้เกิดทางเลือกในการนำผลผลิตและ/หรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเส้นไหมไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม ได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหม เพื่อลดและ/หรือทดแทนการนำเข้าในการประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง โดยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ ซึ่งเป็นเทคโนโลยีที่ไม่รุนแรงและมีความจำเพาะเจาะจง

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหมออร์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและคุณภาพสูง ด้วยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้าและต้นทุนต่ำ

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี (กรด โปรตีน ไนโตรเจน กรดอะมิโนทั้งหมด) ของวัตถุดิบ (รังไหม และดักแด้) ที่จะใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท
2. ศึกษาชนิดของเอนไซม์และสภาวะที่เหมาะสม (ปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์, ค่าพีเอช อุณหภูมิ และระยะเวลา) ในการไฮโดรไลซ์โปรตีนจากไหมออร์ในระดับห้องปฏิบัติการ
3. ศึกษาวิธีการในการทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้แห้งหรือเข้มข้นขึ้น
4. ศึกษาคุณสมบัติ (กรด ความชื้น โปรตีน ไนโตรเจน กรดอะมิโนอิสระ และกรดอะมิโนทั้งหมด) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์จากการค้า
5. คำนวณต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทในระดับห้องปฏิบัติการและสรุปผลการทดลอง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้โปรตีนไฮโดรไลเสทเกรดต่าง ๆ จากไหมออร์เพื่อลดและ/หรือทดแทนการนำเข้า
2. ได้โปรตีนไฮโดรไลเสทเกรดต่าง ๆ จากไหมออร์เพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง
3. ได้แนวทางหรือองค์ความรู้ใหม่ในการนำผลผลิต ตลอดจนของเหลือทิ้งจากไหมออร์มาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่ม
4. ลดปริมาณของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเส้นไหมออร์

ระยะเวลา 1 ปี

ผลการวิจัย

1. องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท ได้แก่ รังไหมอิตาลี ประกอบด้วย โปรตีน 96.32 % เถ้า 3.22 % ความชื้น 4.26 % และไขมัน 1.55 % (โดยน้ำหนักสด) ดักแด้ไหมอิตาลี ประกอบด้วย ความชื้น 74.66 % โปรตีน 18.44 % ไขมัน 4.24 % และเถ้า 1.58 % (โดยน้ำหนักสด) กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในรังไหมอิตาลี คือ อะลานีน 30.329 % รองลงมาคือ กลูตามิก 22.065 % ทัยโรซีน 8.363 % และซีรีน 7.653 % ในดักแด้ไหมอิตาลี กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคือ กรดกลูตามิก 1.408 % รองลงมาคือ กรดแอสปาร์ติก 1.001 % ลูซีน 0.892 % อะลานีน 0.871 % ไลซีน 0.820 % และอาร์จินีน 0.806 % ซึ่งมีความใกล้เคียงกับคุณสมบัติของรังไหมป่า แต่แตกต่างจากรังไหมหม่อน

2. กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลี ได้แก่ การนำรังไหมมาละลายในสารละลายแคลเซียมไนเตรท/เอทานอล/น้ำ อัตราส่วน 0.6:1:8 โมล ที่อุณหภูมิ 100 °C โดยใช้สัดส่วนรังไหมต่อสารละลายเท่ากับ 6 : 100 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 1.0 % ปริมาตร/น้ำหนัก อุณหภูมิ 60 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เป็นเวลา 60 นาที

3. กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลี ได้แก่ การนำดักแด้ที่บดแล้วมาปรับให้มีปริมาณโปรตีน 4.6 % โดยน้ำหนัก แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก อุณหภูมิ 50 °C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เป็นเวลา 120 นาที

4. การลดสีในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีสามารถทำได้โดยการฟอกสีในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสทก่อนการทำแห้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 15 % โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 15 นาที

5. ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10.08 % ไขมัน 0.62 % เถ้า 27.49 % ความชื้น 7.34 % จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 11.47 % ไขมัน 1.62 % เถ้า 11.97 % จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังและดักแด้ไหมอิตาลีได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (% nitrogen recovery) 77.80 และ 62.82 % ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งสองไปทดสอบการละลายน้ำพบว่าสามารถละลายน้ำได้ดี

6. ต้นทุนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีให้ได้ปริมาณ 100 g มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 477.28 บาท ส่วนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีให้ได้ปริมาณ 100 g มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 51.42 บาท

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ

(1)

Executive summary

(3)

สารบัญ

(6)

สารบัญตาราง

(7)

สารบัญภาพ

(9)

คำนำ

1

อุปกรณ์และวิธีการ

5

ผลและวิจารณ์

22

สรุปผลการวิจัย

53

เอกสารอ้างอิง

54

ภาคผนวก

56

สารบัญตาราง

ตารางที่

หน้า

1	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 2.3.1	9
2	แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 2.3.1	10
3	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 2.3.2	11
4	แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 2.3.2	11
5	แผนผังการทดลอง 3.2.1	13
6	แผนผังการทดลองที่ 3.2.2	13
7	แผนผังการทดลองที่ 3.2.3	13
8	แผนผังการทดลองที่ 3.3.1	14
9	แผนผังการทดลองที่ 3.3.2	15
10	แผนผังการทดลองที่ 3.3.3	16
11	แผนผังการทดลองที่ 4.2.1	17
12	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 4.2.2	18
13	แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 4.2.2	19
14	ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 4.2.3	20
15	แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 4.2.3	20
16	องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมและดักแด้ไหมอิตาลีเมื่อคิดเป็นน้ำหนักสด	22
17	องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมและดักแด้ไหมอิตาลีเมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้ง	22
18	ปริมาณกรดอะมิโนในรังไหมและดักแด้ไหมอิตาลี	23
19	ผลของขนาดวัตถุดิบต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้	25
20	ผลของกรรมวิธีการเตรียมวัตถุดิบต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้	25
21	ผลของปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย	26
22	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	27
23	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย	28
24	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	29
25	ผลของปริมาณเอนไซม์และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย	31
26	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	31
27	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย	32
28	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	33

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
29 ผลของชนิดเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าต่อระดับการย่อยสลาย	34
30 ผลของปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้	37
31 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	38
32 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย	43
33 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม	44
34 ค่า $L^* a^* b^*$ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตผักแค้ที่ได้จากการฟอกสีด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟด์ปริมาณต่าง ๆ	46
35 ค่า $L^* a^* b^*$ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตผักแค้ที่ได้จากการฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ปริมาณและเวลาต่าง ๆ	47
36 คุณภาพทางเคมี (proximate analysis) และคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์	49
37 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์	50
38 ต้นทุนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรำไหมอีรี	51
39 ต้นทุนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากผักแค้ไหมอีรี	51
40 ราคาของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า	52

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกุ้งไหมวิธีที่ 1	6
2 แผนผังการทดลองหาขนาดของไหมบดที่เหมาะสม	7
3 แผนผังการทดลองการเตรียมวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยวิธีทางกายภาพและเคมี	8
4 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกุ้งไหมวิธีที่ 2	12
5 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหม	17
6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อระดับการย่อยสลาย	27
7 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และอุณหภูมิ ต่อระดับการย่อยสลาย	29
8 ลักษณะการตกตะกอนของโปรตีนเมื่อใช้เอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ (A) และเอนไซม์นิวเทรส (B) ในการย่อย	30
9 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย	32
10 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย	33
11 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและดักแด้บดก่อนย่อย	35
12 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ 1) โปรตีนมาตรฐาน 2) ย่อยโดยไม่ใช้เอนไซม์ 3) ย่อยด้วยเอนไซม์ อัลคาเลส 4) ย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส 5) ย่อยด้วยเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์	36
13 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อระดับการย่อยสลาย	38
14 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้	40
15 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยสลาย สภาวะต่าง ๆ	41
16 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยสลาย สภาวะต่าง ๆ	42

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่

หน้า

17	กราฟพื้นผิวตอบสนองของค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เมื่อนำมาซ้อนทับกันบริเวณพื้นที่สีส้มคือสถานะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงสุด	43
18	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยสลายสถานะต่าง ๆ	45
19	ผงโปรตีนไฮโดรไลสที่สกัดได้จากการฟอกสีด้วยโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณต่าง ๆ	46
20	ผงโปรตีนไฮโดรไลสที่สกัดได้จากการฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ปริมาณและเวลาต่าง ๆ	48
21	ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลสจากผักแค้ไหมและรังไหม	49

คำนำ

ไหมเป็นแมลงจำพวกผีเสื้อในตระกูล Bombycidae มีลักษณะพิเศษประจำตระกูล คือ ตัวหนอน (Larvae) จะพั่นเส้นใยเพื่อใช้ในการทำรังห่อหุ้มตัวเองแล้วลอกคราบกลายเป็นดักแด้ (Pupae, silk worm) อยู่ภายในรังนั้น และเส้นไหมที่ใช้ทำรังนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์และมีราคาแพง เส้นไหมเป็นเส้นใยโพลีเอไมด์ที่หนอนไหมสร้างขึ้นมา (เป็นกรด α -อะมิโน) การสังเคราะห์โปรตีนในเส้นไหมทำในเซลล์ของต่อมไหมที่อยู่ในตัวของหนอนไหม สารไหมเหลวจะถูกขับออกทางต่อมไหมส่วนท้าย (posterior silk gland) และหลังจากนั้นส่งไปยังต่อมไหมส่วนกลาง (middle silk gland) ระหว่างที่อยู่ในต่อมไหมส่วนกลาง สารไหมเหลวจะกลายเป็นเจลาติน ส่วนเซรีซินถูกขับออกมาจากส่วนอื่นของต่อมไหมส่วนกลางเพื่อที่จะเคลือบเจลาติน หลังจากนั้นเจลาตินของไฟโบรอินจะมีความเหนียวขึ้น โดยอาศัยการสลายตัวของหนอนไหม อาการเคลื่อนไหวนี้เกิดที่ต่อมไหมส่วนหน้า หลังจากที่ใช้ไฟโบรอิน 2 เส้นรวมกันเป็นเส้นใยไหม โดยเคลือบด้วยกาวเซรีซิน เมื่อผ่านรูเล็กๆก็กลายเป็นเส้นไหมที่นำมาใช้เป็นสิ่งทอ ความแตกต่างของเส้นไหมมีเพียงเล็กน้อย ขึ้นกับชนิดและการเลี้ยงไหม แต่โดยทั่วไปแล้ว เส้นใยจากรังไหม 97% เป็นโปรตีนบริสุทธิ์ ซึ่งแบ่งเป็นไฟโบรอิน (Fibroin) ประมาณ 70% และเซรีซิน (Sericin) ประมาณ 30% และมีส่วนประกอบอื่นๆอีกเพียงเล็กน้อย เช่น ซีผึ้ง คาร์โบไฮเดรต สี สารอนินทรีย์ สิ่งสกปรก และเศษดักแด้

ไหมมีวงจรชีวิตที่ประกอบด้วย ระยะเป็นไข่ ตัวหนอน ดักแด้ และผีเสื้อ วงจรชีวิตของไหมจะวนซ้ำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ซึ่งถือว่าการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในแต่ละขั้นตอนของการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ และแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ระยะที่เป็นดักแด้ (Pupae) หลังจากที่ยอดไหมลอกคราบกลายเป็นดักแด้ภายในรังแล้ว ดักแด้จะนอนอยู่ในรังเฉยๆเป็นเวลา 6-7 วัน ดักแด้ก็จะลอกคราบอีกครั้งหนึ่งแล้วกลายเป็นผีเสื้อไหม กระบวนการสาวไหมจะเริ่มต้นจากการฆ่าดักแด้ และทำให้รังไหมแห้งตัว ซึ่งทำได้หลายวิธี ได้แก่ จากความร้อนของอากาศ (ตากแดด การย่าง ไฟถ่าน) จากความเย็น และจากรังสีปรมาณู เป็นต้น แต่ที่สะดวกที่สุด นิยมการฆ่าตัวดักแด้และทำแห้งด้วยอากาศ เช่น ตากแดด 2-3 วัน หรือทำเตาอบจากเชื้อเพลิงทำความร้อนต่างๆ จากนั้น รังไหมจะถูกคัดเกรดแล้วนำไปต้ม เพื่อให้เซรีซินที่เคลือบรังไหมชั้นนอกอ่อนตัวและเส้นไหมหลุดออกจากรังไหมได้ง่าย เมื่อเส้นไหมถูกสาวออกจนหมดแล้วจะเหลือตัวดักแด้ภายใน

ตัวดักแด้นี้เมื่อนำไปตรวจสอบหาสารอาหาร พบว่ามีปริมาณโปรตีนประมาณ 55.34% ไขมันประมาณ 33.82 และไฟเบอร์ประมาณ 4.96% ซึ่งส่วนมากจะนำไปทำเป็นอาหารสัตว์ นอกจากนี้ ในปัจจุบันยังมียุทธ์บางรายนำไปคั่วกับเครื่องเทศเพื่อนำมารับประทานเป็นของขบเคี้ยวอีกด้วย อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงคุณค่าทางอาหารของตัวดักแด้ซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูงแล้ว จึงเหมาะสมที่จะนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากไหมมีคุณภาพสูงและมีคุณสมบัติพิเศษ จึงมีราคา

แพง มีการนำมาใช้ทำเครื่องสำอาง เช่น แป้ง และครีมบำรุงผิว ขณะนี้ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากไหมยังต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศเพื่ออุตสาหกรรมเครื่องสำอางและอาหาร

นอกจากตัวดักแด้ไหมแล้ว ยังมีของเหลือจากกระบวนการผลิตเส้นไหมอีก ได้แก่ เศษไหม และน้ำ กาว ซึ่งในปัจจุบัน นอกจากการนำไปใช้ประโยชน์เพื่อเป็นปุ๋ยแล้ว ยังไม่ได้มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างอื่นเลย กระบวนการลอกกาเส้นไหมดิบ คือ กระบวนการที่สำคัญอย่างหนึ่งในการปรุงแต่งเส้นไหม โดยการนำเส้นไหมดิบมาลอกกาเวริซินที่เคลือบผิวของเส้นใย เบริซินที่เคลือบใยไฟโบรอินนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดแต่ที่เป็นองค์ประกอบหลัก ได้แก่ เซรีน กรดแอสพาร์ติก กลัยซีน และอาร์จินีน การลอกกาช่วยให้สามารถฟอกและย้อมสีเส้นไหมได้ดี และยังทำให้มีความเงางามเป็นพิเศษด้วย ในปัจจุบัน การลอกกาเส้นไหมใช้สบู่และเกลือด่างที่อุณหภูมิสูง เช่น โซเดียมซิลิเกต โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต โซเดียมฟอสเฟต นอกจากการลอกกาโดยใช้ด่างที่อุณหภูมิสูงแล้ว มีรายงานว่าชาวจีนใช้ตับอ่อนของหมู ซึ่งมีทริปซินที่สามารถละลายกาเวริซินได้ ในปัจจุบันอาจใช้เอนไซม์พวกโปรตีเอสในการลอกกาเวริซินออกจากเส้นไหมดิบได้ โดยอาศัยเอนไซม์ธรรมชาติจากพืชหรือจุลินทรีย์ เช่น ปาเปนจากมะละกอ หรือเอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus* *Actinomyces* หรือ *Filamentous fungi* น้ำกาวที่ได้จากกระบวนการลอกกาไหมดังกล่าว เมื่อนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติ พบว่า ประกอบด้วยโปรตีนประมาณ 20-30% จึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปปรับปรุงและแปรรูปเป็นโปรตีนไหมในรูปของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพื่อให้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปประยุกต์ใช้

โปรตีนไฮโดรไลเสท เป็นโปรตีนที่ถูกย่อยจนได้โพลีเพปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ เริ่มทำการค้าในปี 1990 ที่ประเทศจีนและญี่ปุ่น วัตถุประสงค์ที่ใช้ผลิตส่วนใหญ่ ได้แก่ กลูเตนข้าวสาลี เคซีน แป้งปลา เกลาติน ยีสต์ กลูเตนข้าวโพด หรือแหล่งโปรตีนอื่นๆ เพื่อใช้เป็นสารเพิ่มกลิ่นรสในอาหาร กลิ่นรสที่ได้ขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบและองค์ประกอบของกรดอะมิโนในโปรตีนนั้น ดังนั้นกระบวนการในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจึงมีความสำคัญมาก ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวาง เช่น เป็นอาหารสัตว์ อาหารมนุษย์ และอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณสมบัติที่ดี ได้แก่ มีกลิ่นรสดี มีความสามารถในการเกิดฟอง ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการเกิดอิมัลชัน เป็นต้น นอกจากในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว พบว่าโปรตีนที่ได้จากไหมมีลักษณะเด่นในการให้ความชุ่มชื้นแก่ผิวซึ่งสามารถผสมผสานเป็นหนึ่งเดียวกับธรรมชาติของผิว ดังนั้นจึงได้มีการดัดแปลงนำโปรตีนจากไหมมาใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง โดยนำมาทำเป็นผงและครีม เพื่อใช้ในการแต่งหน้า นอกจากนั้น ยังสามารถช่วยป้องกันอันตรายจากแสงอัลตราไวโอเลต และป้องกันเส้นผมเสียโดยเกิดเป็นฟิล์มเคลือบเส้นผม ช่วยถนอมรักษาผมให้เงางามและชุ่มชื้นอีกด้วย นอกจากการนำเส้นไหมมาใช้ในการทำเครื่องนุ่งห่มและเครื่องสำอางแล้ว พบว่ายังสามารถนำเส้นไหมมาใช้ในการผลิตเจลลี่ประเภทอื่นๆได้อีกด้วย ตัวอย่างเช่น การนำสารละลายของเส้นไหมมาเป็นเครื่องดื่ม ใช้ในการผลิตเจลลี่

ประเภทโปรตีน ผงไหมใช้ในอุตสาหกรรมเคลือบเส้นใยสังเคราะห์เพื่อเพิ่มความสวยงามและดูคล้ายผ้าไหม ใช้เป็นแผ่นฟิล์มเคลือบหรือหุ้มเอนไซม์เพื่อให้เอนไซม์มีความเสถียรมากขึ้น เป็นต้น

โดยปกติ สามารถผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตได้โดยวิธีการใหญ่ๆ 2 วิธี ได้แก่ วิธีการที่ใช้สารเคมี (กรดหรือด่าง) และวิธีการที่ใช้เอนไซม์ การย่อยสลายโปรตีนด้วยสารเคมี (กรดหรือด่าง) เป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำ แต่มีข้อจำกัดมากในการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร และยังเป็นวิธีการที่ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ เป็นการย่อยสลายที่พันธะเพปไทด์ ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์คือเพปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด จะให้ปริมาณเพปไทด์สูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น pH ตัวกระตุ้น และตัวยับยั้ง อีกทั้งยังเป็นสถานะที่ไม่รุนแรง สามารถควบคุมการย่อยสลายได้โดยเลือกใช้ชนิดเอนไซม์และสถานะการย่อยสลายให้เหมาะสมเพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพตามที่ต้องการ

มีรายงานการวิจัยที่ใช้เอนไซม์ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตมากมาย โดยส่วนใหญ่เป็นการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากวัตถุดิบทางทะเล เช่น ปลา และเศษกุ้ง ตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าว ได้แก่ Shahidi และคณะ (1995) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลา Capelin โดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสชนิดต่าง ๆ ที่มีในทางการค้า เปรียบเทียบกับวิธีออโตไลซิสซึ่งใช้เอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลาเอง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากระบวนการออโตไลซิสสามารถจัดการได้ง่ายแต่ต้องใช้เวลาหลายวันถึงหลายเดือน เสียค่าใช้จ่ายน้อย แต่มีข้อเสียคือการย่อยนาน ๆ จะทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ได้ ส่วนการใช้เอนไซม์ที่จำหน่ายทางการค้ามีข้อดีกว่าออโตไลซิสหลายประการ คือ ปฏิกริยาเกิดขึ้นเร็วกว่า เป็นชั่วโมงถึงหลายชั่วโมง ควบคุมอัตราการย่อยสลายได้ ปฏิกริยาไม่รุนแรง และผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติสม่ำเสมอ นอกจากปลา Capelin แล้ว ยังมีการนำปลาชนิดอื่น เช่น ปลาแซลมอน มาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วย โดยปลาแซลมอนเพศเมียที่มีไข่ปลาจะถูกส่งไปกรีดท้องเอาไข่ออก ไข่ปลาที่ได้จะนำไปดองเค็มและทำเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ส่วนเนื้อปลาจะถูกนำไปบดให้ละเอียด แยกเอากะดุกหรือก้างออกทิ้ง ส่งเข้าหม้อหมักพร้อมกับเอนไซม์และควบคุมอุณหภูมิที่พอเหมาะเป็นเวลาประมาณ 2-4 ชม. จนกระบวนการเสร็จสิ้น จะได้โปรตีนไฮโดรไลเซตชั้นสีน้ำตาล

ส่วนงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากใหม่นั้น ยังมิได้มีการเผยแพร่สู่สาธารณชนในรูปของงานวิจัยมากนัก แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของกระบวนการที่มีการจดลิขสิทธิ์ซึ่งไม่ได้มีการเผยแพร่ ซึ่งเห็นได้จากการที่มีการขายโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไหมในทางการค้าเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆอย่างกว้างขวาง แต่เมื่อค้นหาคะบวนการผลิตจากฐานข้อมูล ก็ไม่ปรากฏว่ามีกระบวนการดังกล่าวแต่อย่างใด อย่างไรก็ตาม ยังพอมีงานวิจัยที่กล่าวถึงกระบวนการไฮโดรไลซ์โปรตีนจากไหมด้วยสารเคมีเพื่อให้ได้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตไหมที่สามารถนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนซึ่งเป็นองค์ประกอบของเส้นไหมหรือส่วนประกอบอื่นๆของไหม ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวสามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตโปรตีน

ไฮโดรไลสจากไหมได้ ตัวอย่างของงานวิจัยดังกล่าว เช่น Hess และคณะ (2002) ไฮโดรไลซ์โปรตีนไฟโบรอินจากหนอนไหมและแมงมุมด้วยกรดเข้มข้นภายใต้สภาวะสุญญากาศเป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นนำโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้ไปไลโอไฟไลซ์ และตรวจหาลำดับของกรดอะมิโนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเส้นไหมและใยแมงมุม ศูนย์วิจัยหม่อนไหมนครราชสีมาได้ทำการทดลองผลิตผงไหมจากรังไหมและเศษเส้นไหมเพื่อนำไปเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอาง สบู่ วัสดุแต่งผม และผสมในอาหาร เป็นต้น โดยเริ่มจากการนำเปลือกไหมมาลอกกาวยะชิตออกโดยใช้ด่าง ล้างด้วยน้ำให้สะอาดแล้วผึ่งลมให้แห้ง จากนั้น นำรังไหมที่ลอกกาวยแล้วไปต้มให้สารไหมไฟโบรอินละลายในสารละลายต่าง ไดอะไลซิสในถุง cellulose tube ด้วยน้ำเป็นเวลา 3 วัน นำสารที่ได้ใส่ในเครื่อง Lyophilizer จากนั้นบดด้วยเครื่องบดจะได้ผงไหมไฟโบรอินมีลักษณะเป็นผงสีขาวเหลือง ไม่มีรส นอกจากนี้ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยฝ่ายปฏิบัติการเทคโนโลยีเอนไซม์และการจัดการของเสียประสบความสำเร็จในการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาข้างเหลืองและเปลือกกุ้ง โดยเทคโนโลยีทางเอนไซม์เพื่อเป็นอาหารเสริมในกุ้งและปูอินทรีย์ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณสมบัติเทียบเท่ากับผลิตภัณฑ์จากต่างประเทศ ฝ่ายปฏิบัติการเอนไซม์ฯจึงมีความพร้อมด้านบุคลากรและเทคโนโลยี รวมทั้งครุภัณฑ์ส่วนใหญ่ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลส

โครงการนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิจัยและพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากผลผลิตและ/หรือของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเส้นไหมออร์แกนิกโดยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ เพื่อเพิ่มมูลค่าและทดแทนการนำเข้า โดยเน้นกระบวนการผลิตเพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสเกรดที่ดีที่สุด ซึ่งนอกจากจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางแล้ว ยังอาจดัดแปลงให้เป็นอาหารมนุษย์ อาหารสัตว์ หรืออาหารพืชได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากไหมออร์แกนิกที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและคุณภาพสูง ด้วยเทคโนโลยีทางด้านเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้าและต้นทุนต่ำ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- 1.1 รังไหมอีรี่ (*Philosamia ricini*) จากภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน ม.เกษตรศาสตร์
- 1.2 ดักแด้ไหมอีรี่ (*Philosamia ricini*) จากภาควิชากีฏวิทยา คณะเกษตร กำแพงแสน ม.เกษตรศาสตร์

2. เอนไซม์ที่ใช้ในการวิจัย

- 2.1 เอนไซม์ Alcalase 2.4 L FG ของบริษัท Novozymes A/S ประเทศเดนมาร์ค
- 2.2 เอนไซม์ Neutrase 0.8 L ของบริษัท Novozymes A/S ประเทศเดนมาร์ค
- 2.3 เอนไซม์ Flavourzyme 500 L ของบริษัท Novozymes A/S ประเทศเดนมาร์ค

3. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

- 3.1 เครื่องบด centrifugal mill ของ Retsch รุ่น ZM-1
- 3.2 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของ Memmert รุ่น UM 500
- 3.3 ชุดสกัดไขมัน (soxhlet extractor) ของ Isopad รุ่น RE 6
- 3.4 เครื่องย่อย-กลั่นไนโตรเจน ของ Gerhardt
- 3.5 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ของ Memmert รุ่น WB-22
- 3.6 เตาไฟฟ้า (hot plate) ของ Schott รุ่น SLK-3
- 3.7 เครื่อง stirring motor ของ CAT รุ่น R 17
- 3.8 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) ของ Eutech รุ่น Cyberscan 500
- 3.9 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ของ Tomy รุ่น GRX-200
- 3.10 เครื่องระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dryer) ของ Labconco รุ่น 77535-01
- 3.11 เครื่องมือวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลเจลอิเล็กโทรโฟเรซิส (protein electrophoresis) ของ Pharmacia รุ่น EPS 300
- 3.12 ตะแกรงร่อนขนาด 40 และ 70 mesh
- 3.13 เครื่องแก้วและเคมีภัณฑ์

วิธีการวิจัย

1. การวิเคราะห์คุณสมบัติของวัตถุดิบ

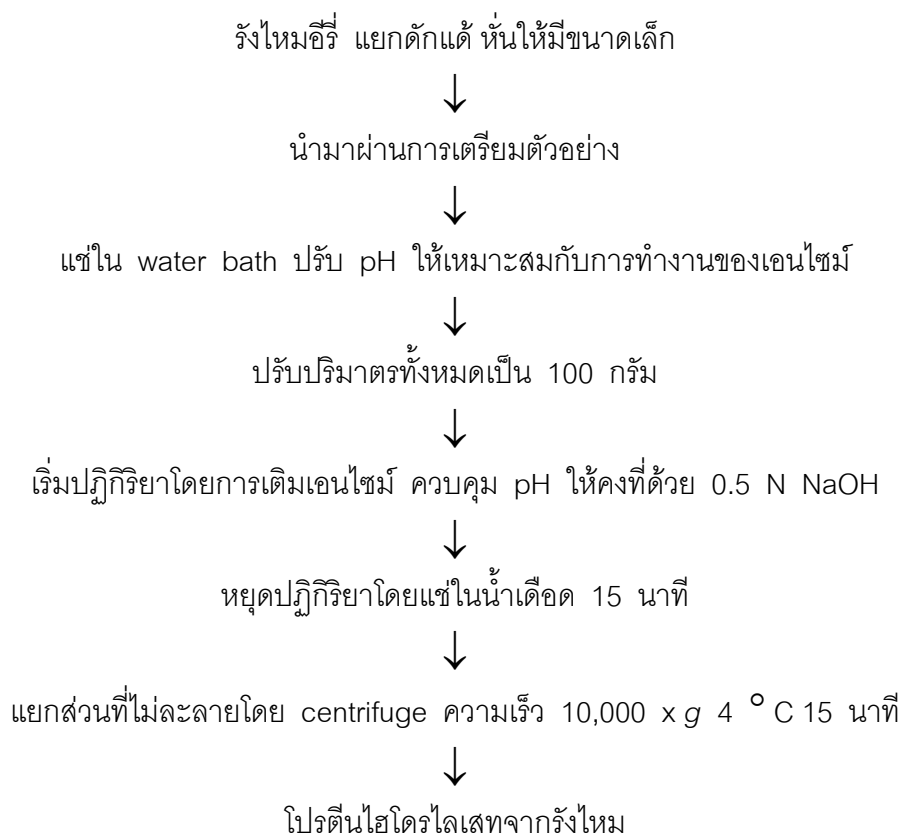
นำวัตถุดิบได้แก่ รังไหม และดักแด้ไหม บดให้ละเอียด โดยการนำรังไหมแยกดักแด้ออก หั่นเป็นชิ้นขนาดเล็ก บดด้วยเครื่อง centrifugal mill (Retsch; ZM-1) ส่วนดักแด้ไหมบดด้วยเครื่องบด

อาหาร Vita mix® จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C สุ่มตัวอย่างไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate analysis) ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธีการของ AOAC (2000) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด ตามวิธีของ AccQ. Tag Amino acid analysis method (1993)

2. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอีรีโดยใช้เอนไซม์วิธีที่ 1

2.1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหม

นำรังไหมอีรีมาแยกดักแด้ออกแล้วหั่นให้มีขนาดเล็ก แล้วนำมาผ่านการเตรียมตัวอย่าง จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ โดยปรับให้มีปริมาณโปรตีนที่เหมาะสม ปริมาตรรวม 100 กรัม และปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ด้วย 0.5 N NaOH หรือ 1 N HCl เติมเอนไซม์ปริมาณที่เหมาะสม บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Stirring motor (CAT; R 17) กวนผสมตลอดเวลาในการทำปฏิกิริยา และควบคุมเวลาในการย่อย ควบคุมระดับ pH ให้คงที่ด้วย 0.5 N NaOH หยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่ไม่ละลายโดยนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (Tomy; GRX-200) ความเร็ว $10,000 \times g$ 4°C เป็นเวลา 15 นาที (Chang-Kee *et al.*, 2002) (ภาพที่ 1)

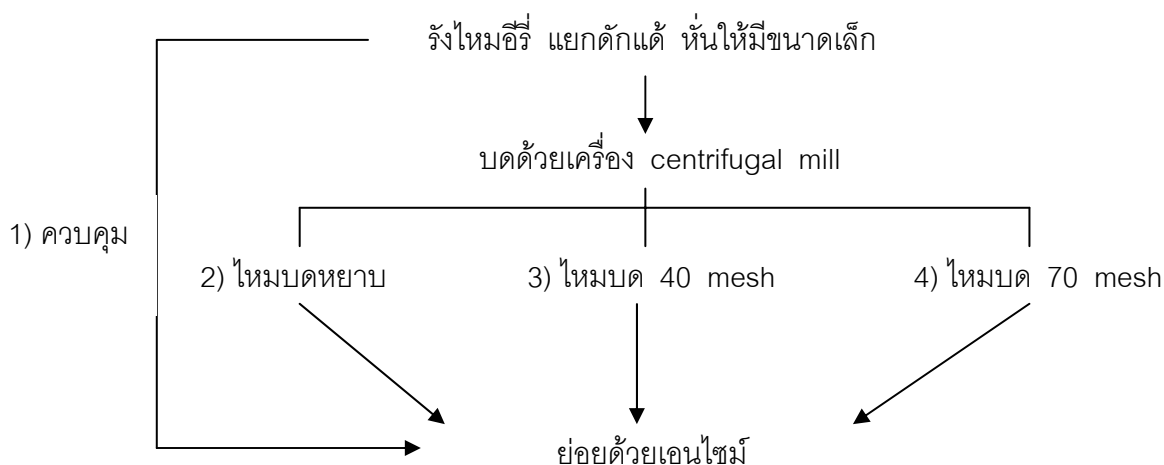


ภาพที่ 1 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมวิธีที่ 1

2.2 การเตรียมวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

2.2.1 การศึกษาขนาดของรังไหมบดที่เหมาะสม

เตรียมวัตถุดิบโดยการบดรังไหมให้เป็นผงขนาดต่าง ๆ ได้แก่ 1) ไม่ผ่านการบด (ควบคุม) 2) บดหยาบ 3) บดให้มีขนาด 40 mesh และ 4) บดให้มีขนาด 70 mesh นำรังไหมบดที่ได้มาย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส โดยใช้สัดส่วนปริมาณโปรตีนต่อเอนไซม์เท่ากับ 2 ต่อ 1 % (Yamada *et al.*, 2001) บ่มที่อุณหภูมิ 55 ° C เป็นเวลา 120 นาที (พิลาณี และคณะ, 2546) นำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Mew Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 2 แผนผังการทดลองหาขนาดของไหมบดที่เหมาะสม

2.2.2 ศึกษาการเตรียมวัตถุดิบโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี

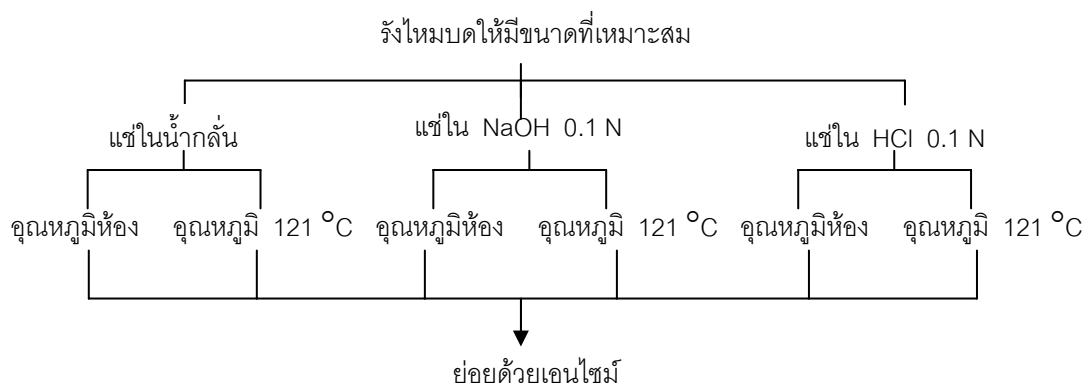
นำรังไหมที่ผ่านการบดให้มีขนาดที่เหมาะสมจากการคัดเลือกในการทดลองที่ 2.2.1 มาผ่านการแช่ด้วยกรด-ด่างก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) มีสิ่งทดลองทั้งหมด 6 สิ่งทดลอง ได้แก่

1. แช่น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิห้อง
2. แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ที่อุณหภูมิห้อง
3. แช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ที่อุณหภูมิห้อง
4. แช่น้ำกลั่น ที่อุณหภูมิ 121 ° C ความดัน 15 psi ด้วย autoclave
5. แช่ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N ที่อุณหภูมิ 121 ° C ความดัน 15

psi ด้วย autoclave

6. แขนสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 N ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 psi ด้วย autoclave

นำรังไหมบดแช่ในน้ำกลั่น/สารละลายกรด/ด่าง ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 บ่มเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Mew Multiple Range Test (DMRT)



ภาพที่ 3 แผนผังการทดลองการเตรียมวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยวิธีทางกายภาพและเคมี

2.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์

2.3.1 ศึกษาปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

นำรังไหมมาผ่านการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.2 ศึกษาปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) มีปัจจัยที่ศึกษา 3 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ปริมาณสับสเตรท เท่ากับโปรตีน 1.3, 2, 3, 4 และ 4.7 % โดยน้ำหนัก ปัจจัยที่ 2 ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลส เท่ากับ 0, 0.8, 2, 3.2 และ 4 % ปริมาตรต่อน้ำหนัก ปัจจัยที่ 3 เวลาในการย่อยเท่ากับ 70, 90, 120, 150 และ 170 นาที (ตารางที่ 1) จะได้จำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 2) โดยในแต่ละสิ่งทดลองกำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 9.5 และ 55 °C คำนวณหา ระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis; DH) จากปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ระดับการย่อยสลาย หมายถึง สัดส่วนเป็นเปอร์เซ็นต์ของพันธะเพปไทด์ที่ถูกย่อยเทียบกับพันธะเพปไทด์ทั้งหมดเมื่อคิดต่อน้ำหนักตัวอย่าง จากสูตร (Adler-Nissen, 1986)

$$\% \text{ DH} = B \times N_b \times \frac{1}{\infty} \times \frac{1}{\text{MP}} \times \frac{1}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

โดยที่ B = ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ (มิลลิลิตร)

N_b = ความเข้มข้นของ NaOH (นอร์มัล)

MP = ปริมาณโปรตีน ($N \times 6.25$) (กรัม)

∞ = degree of dissociation of the ∞ -NH group

h_{tot} = จำนวนพันธะเพปไทด์ในโปรตีนสับสเตรท (meqv/g protein)

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้
สมการลำดับที่ 2 (quadratic model) ดังนี้

$$Y_k = b_{k0} + \sum_{i=1}^3 b_{ki} X_i + \sum_{i=1}^3 b_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{kij} X_i X_j$$

โดยที่ Y_k คือ ตัวแปรตาม

X_i, X_j คือ ตัวแปรอิสระ

b_{k0}, b_{ki}, b_{kii} และ b_{kij} คือ ค่าคงที่สัมประสิทธิ์

เลือกสมการที่มีค่าระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 \geq 0.75$ มาสร้างกราฟ contour plot เพื่อคัดเลือกปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่เหมาะสม
ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลอง 2.3.1

ปัจจัย	ระดับ				
	$-\infty$ (-1.682)	-1	0	+1	$+\infty$ (+1.682)
สับสเตรท (% โปรตีน) (x_1)	1.3	2	3	4	4.7
ปริมาณเอนไซม์ (%) (x_2)	0	0.8	2	3.2	4.0
เวลา (นาท.) (x_3)	70	90	120	150	170

ตารางที่ 2 แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 2.3.1

สิ่งทดลอง	ค่ารหัสของปัจจัย			ค่าจริงของปัจจัย		
	สับสเตรท (% โปรตีน โดยน้ำหนัก)	เอนไซม์ (% ปริมาตร/นน.)	เวลา (นาที่)	สับสเตรท (% โปรตีน โดยน้ำหนัก)	เอนไซม์ (% ปริมาตร/นน.)	เวลา (นาที่)
1	-1	-1	-1	2	0.8	90
2	-1	-1	+1	2	0.8	150
3	-1	+1	-1	2	3.2	90
4	-1	+1	+1	2	3.2	150
5	+1	-1	-1	4	0.8	90
6	+1	-1	+1	4	0.8	150
7	+1	+1	-1	4	3.2	90
8	+1	+1	+1	4	3.2	150
9	$-\infty$	0	0	1.3	2	120
10	0	0	0	3	2	120
11	$+\infty$	0	0	4.7	2	120
12	0	$-\infty$	0	3	0	120
13	0	0	0	3	2	120
14	0	$+\infty$	0	3	4.0	120
15	0	0	$-\infty$	3	2	70
16	0	0	0	3	2	120
17	0	0	$+\infty$	3	2	170

2.3.2 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

นำรังไหมมาผ่านการเตรียมตัวอย่างตามขั้นตอนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.2 และใช้ปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2.3.1 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) มีปัจจัยที่ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ๆ ละ 5 ระดับ ($-\infty$, -1, 0, 1, ∞) ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.0 ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิ เท่ากับ 48, 50, 55, 60 และ 62 °C (ตารางที่ 3) จะได้จำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 11 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 4)

คำนวณหาระดับการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 2.3.1 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 (quadratic model)

ตารางที่ 3 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 2.3.2

ปัจจัย	ระดับ				
	$-\infty$ (-1.414)	-1	0	+1	$+\infty$ (+1.414)
pH (x_1)	7.0	7.5	8.5	9.5	10.0
อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) (x_2)	48	50	55	60	62

ตารางที่ 4 แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 2.3.2

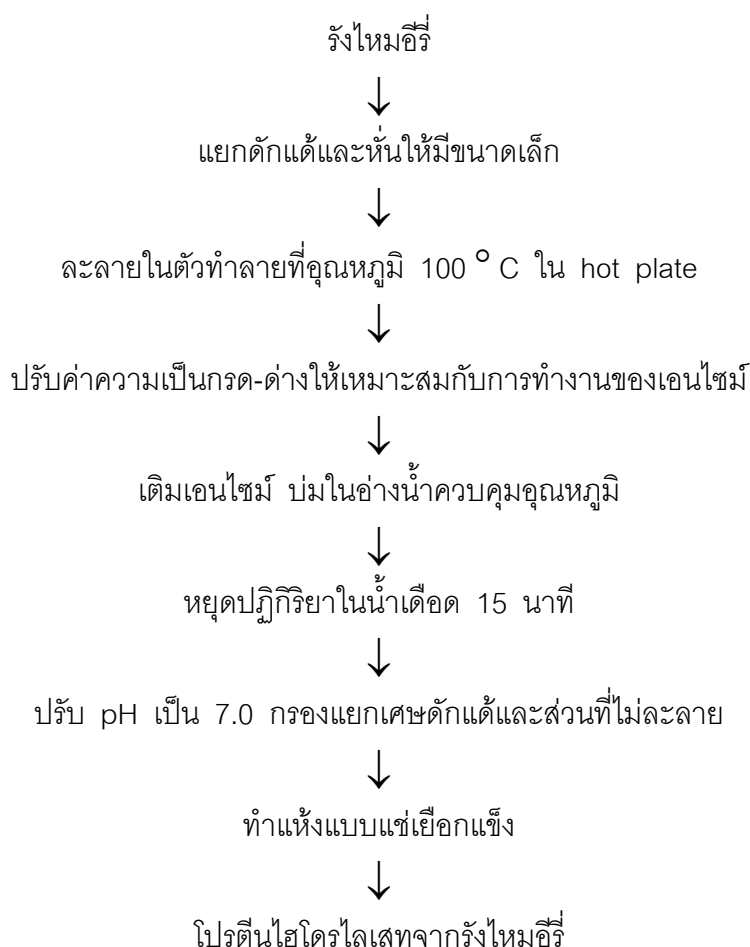
สิ่งทดลอง	ค่ารหัสของปัจจัย		ค่าจริงของปัจจัย	
	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)
1	-1	-1	7.5	50
2	+1	-1	9.5	50
3	0	0	8.5	55
4	-1	+1	7.5	60
5	+1	+1	9.5	60
6	$-\infty$	0	7.0	55
7	0	0	8.5	55
8	$+\infty$	0	10.0	55
9	0	$-\infty$	8.5	48
10	0	0	8.5	55
11	0	$+\infty$	8.5	62

3. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากรังไหมวิธีโดยการใช้น้ำเอนไซม์วิธีที่ 2

จากรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน พบว่า การเตรียมวัตถุดิบโดยการบดรังไหมและแช่ด้วยด่างเมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ทำให้เกิดการย่อยสลายเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตได้น้อย และการบดรังไหมทำได้ยากเนื่องจากมีข้อจำกัดด้านเครื่องบดใหม่ซึ่งมีขนาดเล็ก สามารถบดไหมได้ครั้งละปริมาณน้อย และใช้ปริมาณเอนไซม์มากแต่ใช้ปริมาณสับสเตรทน้อยเพื่อให้เกิดการย่อยสลายเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตได้มาก ดังนั้นจึงทำการทดลองศึกษาการเตรียมวัตถุดิบวิธีใหม่โดยการนำรังไหมมาละลายด้วยตัวทำละลาย (เกลือ) และปรับเปลี่ยนกรรมวิธีการผลิต และสภาวะในการย่อย ดังนี้

3.1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหม

เตรียมวัตถุดิบ โดยนำรังไหมอีรี่มาแยกดักแด้ออกแล้วหั่นให้มีขนาดเล็ก นำมาละลายในตัวทำละลายโดยใช้ชนิด ความเข้มข้น และสัดส่วนที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 100°C บน hot plate จนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน จะได้เป็นสารละลายโปรตีนไหม (เซรีซินและไฟโบรอิน) จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ด้วย 0.5 N NaOH เติมเอนไซม์ปริมาณที่เหมาะสม บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Stirring motor (CAT; R 17) กวนผสมตลอดเวลาในการทำปฏิกิริยา และควบคุมเวลาในการย่อย ควบคุมระดับ pH ให้คงที่ด้วย 0.5 N NaOH หยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 N HCl กรองแยกส่วนที่ไม่ละลาย แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมวิธีที่ 2

3.2 การเตรียมตัวอย่างรังไหมก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยการละลายด้วยเกลือ

3.2.1 ศึกษาชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทำให้รังไหมละลาย

เลือกใช้ตัวทำละลาย 4 ชนิด ได้แก่ 1) $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ /ethanol/ H_2O (ดัดแปลงจาก Chen *et al.*, 2001), 2) CaCl_2 /ethanol/ H_2O , (Chen *et al.*, 2001; Yamada *et al.*, 2001), 3) MgCl_2 /ethanol/ H_2O (ดัดแปลงจาก Otoi and Matsubara, 1980) และ 4) ZnCl_2 /ethanol/ H_2O

(ดัดแปลงจาก Otoi and Matsubara, 1980) (ตารางที่ 5) โดยกำหนดความเข้มข้นของตัวทำละลายแต่ละชนิดเท่ากับ 1 : 2 : 8 โมล (เกลือ : เอทานอล : น้ำ) และใช้สัดส่วนรังไหมต่อสารละลายเท่ากับ 2:100 คัดเลือกตัวทำละลายที่สามารถละลายรังไหมได้และใช้เวลาในการละลายน้อยที่สุด

ตารางที่ 5 แผนผังการทดลอง 3.2.1

สิ่งทดลอง	ชนิดเกลือ	อัตราส่วน (โมล)
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	1 : 2 : 8
2	$\text{CaCl}_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	1 : 2 : 8
3	$\text{MgCl}_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	1 : 2 : 8
4	$\text{ZnCl}_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	1 : 2 : 8

3.2.2 ศึกษาความเข้มข้นของตัวทำละลายที่เหมาะสม

เลือกใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.1 แต่ผันแปรอัตราส่วนของเกลือเป็น 4 ระดับ ได้แก่ 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 โมล (ตารางที่ 6) โดยใช้สัดส่วนรังไหมต่อสารละลายเท่ากับ 2 : 1 0 0 คัดเลือกความเข้มข้นของเกลือที่สามารถละลายรังไหมได้

ตารางที่ 6 แผนผังการทดลองที่ 3 . 2 . 2

สิ่งทดลอง	ชนิดเกลือ	อัตราส่วน (โมล)
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	0.4 : 2 : 8
2	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	0.6 : 2 : 8
3	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	0.8 : 2 : 8
4	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{ethanol}/\text{H}_2\text{O}$	1 : 2 : 8

3.2.3 ศึกษาสัดส่วนของรังไหมต่อตัวทำละลายที่เหมาะสม

เลือกใช้ตัวทำละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 3.2.1 และ 3.2.2 แต่ผันแปรอัตราส่วนรังไหมต่อตัวทำละลายเป็น 5 ระดับ ได้แก่ 2:100, 4:100, 6:100, 8:100 และ 10:100 (หรือใช้ปริมาณไหม 2, 4, 6, 8 และ 10 % โดยน้ำหนัก) (ตารางที่ 7) คัดเลือกปริมาณรังไหมสูงสุดที่สามารถละลายในตัวทำละลายได้

ตารางที่ 7 แผนผังการทดลองที่ 3.2.3

สิ่งทดลอง	อัตราส่วนรังไหมต่อตัวทำละลาย
1	2 : 100
2	4 : 100
3	6 : 100
4	8 : 100
5	10 : 100

3.3 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์

3.3.1 ศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

เตรียมตัวอย่างรังไหมตามสภาวะที่คัดเลือกได้ในการทดลองที่ 3.2 ทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสมในการย่อยสลายโปรตีนไหม วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design เลือกใช้เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ 1) ไม่ใช้เอนไซม์ (ควบคุม) 2) เอนไซม์อัลคาเลส 3) เอนไซม์นิวเทรล และ 4) เอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ โดยในแต่ละสิ่งทดลองกำหนดปริมาณเอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลาในการย่อย 90 นาที ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 7.0 และ 50 °C ยกเว้นการใช้เอนไซม์อัลคาเลสใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ 8.5 และ 55 °C (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 แผนผังการทดลองที่ 3.3.1

สิ่งทดลอง	ชนิดเอนไซม์	ปริมาณ (%ปริมาตร/นน.)	เวลา (นาที)	pH	อุณหภูมิ (°C)
1	ไม่เติมเอนไซม์	-	90	7.0	50
2	อัลคาเลส	0.5	90	8.5	55
3	นิวเทรล	0.5	90	7.0	50
4	เฟเวอร์ไซม์	0.5	90	7.0	50

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลายดังนี้ นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตในปริมาตรที่แน่นอนเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) ความเข้มข้น 20 % ในปริมาตรที่เท่ากัน เขย่าให้เข้ากัน 2 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงแยกความเร็ว 10,000 x g นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (AOAC, 2000) และคำนวณระดับการย่อยสลายจากสูตร

$$\text{ระดับการย่อยสลาย (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายใน 10 \% TCA} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}}$$

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Mew Multiple Range Test (DMRT)

3.3.2 ศึกษาปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

คัดเลือกชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.1 ผันแปรปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย วางแผนการทดลองแบบ 3 x 4 factorial in completely randomized design (CRD) มีปัจจัยที่ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ปริมาณเอนไซม์ 3 ระดับ คือ 0.1, 0.5 และ 1 % ปริมาตร/น้ำหนัก ปัจจัยที่ 2 เวลาในการทำปฏิกิริยา 4 ระดับ คือ 60, 90, 120 และ 150 นาที มีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 12 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 9) โดยในแต่ละสิ่ง

ทดลองกำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 8.5 และ 55 °C นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 3.3.1

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 (quadratic model) ดังนี้

$$Y_k = b_{k0} + \sum_{i=1}^2 b_{ki} X_i + \sum_{i=1}^2 b_{kii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^2 b_{kij} X_i X_j$$

โดยที่ Y_k คือ ตัวแปรตาม

X_i, X_j คือ ตัวแปรอิสระ

b_{k0}, b_{ki}, b_{kii} และ b_{kij} คือ ค่าคงที่สัมประสิทธิ์

เลือกสมการที่มีค่าระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 \geq 0.75$ มาสร้างกราฟ contour plot เพื่อคัดเลือกปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่เหมาะสม

ตารางที่ 9 แผนผังการทดลอง 3.3.2

สิ่งทดลอง	ปริมาณเอนไซม์ (% ปริมาตร/น้ำหนัก)	เวลาในการย่อย (นาที)
1	0.1	60
2	0.1	90
3	0.1	120
4	0.1	150
5	0.5	60
6	0.5	90
7	0.5	120
8	0.5	150
9	1.0	60
10	1.0	90
11	1.0	120
12	1.0	150

3.3.3 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกใช้ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 3.3.1 และ 3.3.2 ผันแปรค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา วางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 factorial in completely randomized design (CRD) มี

ปัจจัยที่ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3 ระดับ คือ 7.5, 8.5 และ 9.5 ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 50, 55 และ 55 °C มีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 9 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 10) นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 3.3.1 วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 (quadratic model)

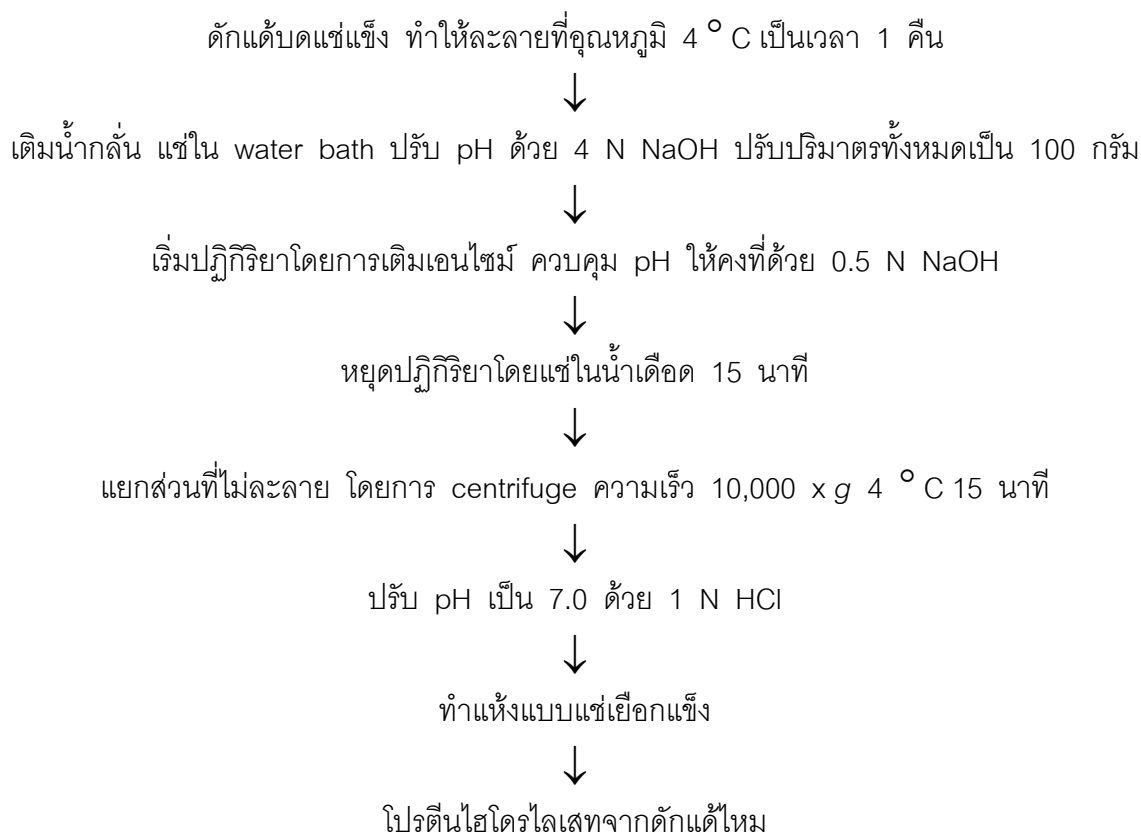
ตารางที่ 10 แผนผังการทดลอง 3.3.3

สิ่งทดลอง	PH	อุณหภูมิ (°C)
1	7.5	50
2	7.5	55
3	7.5	60
4	8.5	50
5	8.5	55
6	8.5	60
7	9.5	50
8	9.5	55
9	9.5	60

4. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากดักแด้ไหมอีรีโดยใช้เอนไซม์

4.1 ขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากดักแด้ไหม

นำดักแด้บดที่แช่แข็งมาทำให้ละลาย ผสมน้ำให้ได้สัดส่วนโปรตีนที่เหมาะสม น้ำหนักรวม 100 กรัม ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ด้วย 4 N NaOH เติมเอนไซม์ปริมาณที่เหมาะสม บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Stirring motor (CAT; R 17) กวนผสมตลอดเวลาในการทำปฏิกิริยา และควบคุมเวลาในการย่อย ควบคุมระดับ pH ให้คงที่ด้วย 0.5 N NaOH หยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนที่เป็นสารละลายออกจากส่วนที่ไม่ละลายโดยนำไปหมุนเหวี่ยงด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge (Tomy; GRX-200) ความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C (Chang-Kee *et al.*, 2002) ปรับ pH เป็น 7.0 ด้วย 1 N HCl แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 กรรมวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากดักแด้นี้ใหม่

4.1 การหาสถานะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์

4.2.1 ศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่เหมาะสม

ทำการคัดเลือกชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสมในการย่อยสลายดักแด้นี้ใหม่ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design เลือกใช้เอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ 1) ไม่ใช้เอนไซม์ (ควบคุม) 2) เอนไซม์อัลคาเลส 3) เอนไซม์นิเทรส และ 4) เอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ โดยในแต่ละสิ่งทดลองกำหนดปริมาณเอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก ปริมาณสับสเตรทโปรตีน 6 % เวลาในการย่อย 90 นาที ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 7.0 และ 50°C ยกเว้นการใช้เอนไซม์อัลคาเลสใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ 9.5 และ 60°C (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 แผนผังการทดลองที่ 4.2.1

สิ่ง ทดลอง	ชนิดเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ (% ปริมาตร/นน.)	ปริมาณสับสเตรท (% โปรตีน)	เวลา (นาที)	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)
1	ไม่ใช้เอนไซม์	-	6	90	7.0	50
2	อัลคาเลส	0.5	6	90	9.5	60
3	นิเวรส	0.5	6	90	7.0	50
4	เฟเวอร์ไซม์	0.5	6	90	7.0	50

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลาย ตามวิธีในข้อ 3.3.1 และนำมาหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 10 % วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Mew Multiple Range Test (DMRT)

4.2.2 ศึกษาปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

คัดเลือกชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.2.1 ผันแปรปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) มีปัจจัยที่ทำการศึกษา 3 ปัจจัย ๆ ละ 5 ระดับ ($-\infty, -1, 0, 1, \infty$) ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ปริมาณสับสเตรท โปรตีนเท่ากับ 4.6, 6, 8, 10 และ 11.4 % โดยน้ำหนัก ปัจจัยที่ 2 ปริมาณเอนไซม์ เท่ากับ 0, 0.2, 0.5, 0.8 และ 1 % ปริมาตร/น้ำหนัก ปัจจัยที่ 3 เวลาในการย่อย เท่ากับ 70, 90, 120, 150 และ 170 นาที (ตารางที่ 12) มีจำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 17 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 13) โดยในแต่ละสิ่งทดลองกำหนดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ 9.5 และ 60 °C

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 3.3.1 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (% nitrogen recovery; NR) คำนวณจาก

$$\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในไฮโดรไลเซส} \times \text{นน.ไฮโดรไลเซส} \times 100}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ} \times \text{นน.ของวัตถุดิบ}}$$

และหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้ความเข้มข้นของ Acrylamide 10 % วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 (quadratic model)

ตารางที่ 12 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 4.2.2

ปัจจัย	ระดับ				
	$-\infty$ (-1.682)	-1	0	+1	$+\infty$ (+1.682)
สับสเตรท (%โปรตีนโดยนน.) (x_1)	4.6	6	8	10	11.4
เอนไซม์ (%ปริมาตร/นน.) (x_2)	0	0.2	0.5	0.8	1.0
เวลา (นาที) (x_3)	70	90	120	150	170

ตารางที่ 13 แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 4.2.2

สิ่งทดลอง	ค่ารหัสของปัจจัย			ค่าจริงของปัจจัย		
	สับสเตรท (% โปรตีน)	เอนไซม์ (%ปริมาตร/นน.)	เวลา (นาที)	สับสเตรท (% โปรตีน)	เอนไซม์ (%ปริมาตร/นน.)	เวลา (นาที)
1	-1	-1	-1	6	0.2	90
2	-1	-1	+1	6	0.2	150
3	-1	+1	-1	6	0.8	90
4	-1	+1	+1	6	0.8	150
5	+1	-1	-1	10	0.2	90
6	+1	-1	+1	10	0.2	150
7	+1	+1	-1	10	0.8	90
8	+1	+1	+1	10	0.8	150
9	$-\infty$	0	0	4.6	0.5	120
10	0	0	0	8	0.5	120
11	$+\infty$	0	0	11.4	0.5	120
12	0	$-\infty$	0	8	0	120
13	0	0	0	8	0.5	120
14	0	$+\infty$	0	8	1.0	120
15	0	0	$-\infty$	8	0.5	70
16	0	0	0	8	0.5	120
17	0	0	$+\infty$	8	0.5	170

4.2.3 ศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกใช้ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า ปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 4.2.1 และ 4.2.2 ผันแปรค่าความเป็นกรด-ด่าง และ อุณหภูมิในการทำปฏิกิริยา วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) มีปัจจัยที่ ทำการศึกษา 2 ปัจจัย ๆ ละ 5 ระดับ ($-\infty$, -1, 0, 1, $+\infty$) ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0, 7.5, 8.5, 9.5 และ 10.0 ปัจจัยที่ 2 อุณหภูมิ เท่ากับ 48, 50, 55, 60 และ 62 °C (ตารางที่ 14) จะได้จำนวนสิ่งทดลองทั้งหมด 11 สิ่งทดลอง (ตารางที่ 15)

นำสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ในแต่ละสิ่งทดลองมาวิเคราะห์หาค่าระดับการย่อยสลายตามวิธีในข้อ 3.3.1 ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ตามวิธีในข้อ 4.2.2 และหาขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยใช้ Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ใช้

ความเข้มข้นของ Acrylamide 10 % วิเคราะห์ผลทางสถิติวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวิธี response surface methodology (RSM) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 (quadratic model)

ตารางที่ 14 ปัจจัยและระดับที่ใช้ในการทดลองที่ 4.2.3

ปัจจัย	ระดับ				
	$-\infty$ (-1.414)	-1	0	+1	$+\infty$ (+1.414)
pH (x_2)	7.0	7.5	8.5	9.5	10.0
อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) (x_1)	48	50	55	60	62

ตารางที่ 15 แผนผังการทดลองในการทดลองที่ 4.2.3

สิ่งทดลอง	ค่ารหัสของปัจจัย		ค่าจริงของปัจจัย	
	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)
1	-1	-1	7.5	50
2	+1	-1	9.5	50
3	0	0	8.5	55
4	-1	+1	7.5	60
5	+1	+1	9.5	60
6	$-\infty$	0	7.0	55
7	0	0	8.5	55
8	$+\infty$	0	10.0	55
9	0	$-\infty$	8.5	48
10	0	0	8.5	55
11	0	$+\infty$	8.5	62

4.3 การลดสีในผลิตภัณฑ์

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากดักแด้ใหม่ที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีดำ จึงศึกษาวิธีการลดสีในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยศึกษาวิธีการลดสี 2 วิธี ได้แก่

4.3.1 การใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ก่อนการย่อยสลายให้เป็นไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์

นำดักแด้บดเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณ 0, 0.02, 0.06, 0.1, 0.5 และ 1.0 % โดยน้ำหนัก จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ตามสภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 4.2 วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มาวัดค่าสี $L^* a^* b^*$ เปรียบเทียบวิธีที่ให้โปรตีนไฮโดรไลเซตมีสีอ่อนที่สุด

4.3.2 การใช้ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) หลังการย่อยสลายให้เป็นไฮโดรไลเสทด้วย เอนไซม์

ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทดักแด้ไหมตามสภาวะที่คัดเลือกได้จากการทดลองที่ 4.2 แต่ก่อนนำไปทำแห้งให้ลดสีโดยการเติมถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ปริมาณ 10 และ 15 % โดยน้ำหนัก กวนผสมเป็นเวลา 15, 30 และ 45 นาที วางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 factorial in completely randomized design (CRD) นำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้มาวัดค่าสี $L^* a^* b^*$ เปรียบเทียบวิธีที่ให้โปรตีนไฮโดรไลเสทมีสีอ่อนที่สุด

5. การวิเคราะห์คุณภาพของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสท

นำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้จากรังไหมและดักแด้ไหมไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธีการของ AOAC (2000) ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ ตามวิธีของ AccQ. Tag Amino acid analysis method (1993) และคุณภาพทางจุลินทรีย์ ตามวิธีการของ AOAC (2000)

6. การคำนวณต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสท

คำนวณต้นทุนการผลิตผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมและดักแด้ไหมออร์ที่การผลิตระดับห้องปฏิบัติการ จากสูตรของจิรพรรณ และคณะ (2525) ดังนี้

ต้นทุนทั้งหมด = ต้นทุนวัตถุดิบ + ต้นทุนแรงงาน + ต้นทุนค่าใช้จ่ายอื่น ๆ

โดยที่ ต้นทุนวัตถุดิบ = $0.52 \times$ ต้นทุนทั้งหมด

ต้นทุนแรงงาน = $0.32 \times$ ต้นทุนทั้งหมด

ต้นทุนค่าใช้จ่ายอื่น ๆ = $0.16 \times$ ต้นทุนทั้งหมด

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. คุณสมบัติของวัตถุดิบ

องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมอื้อ พบว่า ส่วนใหญ่คือ โปรตีน มีปริมาณ 96.32 % นอกจากนั้นเป็น เถ้า 3.22 % ความชื้น 4.26 % และไขมัน 1.55 % โดยน้ำหนักสด ส่วนองค์ประกอบทางเคมีของดักแด้ไหมอื้อ พบว่า ส่วนใหญ่คือ ความชื้น 74.66 % นอกนั้นเป็นโปรตีน 18.44 % ไขมัน 4.24 % และเถ้า 1.58 % โดยน้ำหนักสด (ตารางที่ 16)

ปริมาณกรดอะมิโนในรังไหมอื้อ พบว่า กรดอะมิโนที่พบมากที่สุด คือ อะลานีน 30.329 % รองลงมาคือ กลูตามิก 22.065 % ทัยโรซีน 8.363 % ซีรีน 7.653 % กรดแอสพาทิก 4.912 % อาร์จินีน 3.244 % กรดกลูตามิก 1.411 % ส่วนกรดอะมิโนที่ไม่พบในรังไหมอื้อ ได้แก่ ซิสทีน และ เมทไทโอนีน ในดักแด้ไหมอื้อ กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคือ กรดกลูตามิก 1.408 % รองลงมาคือ กรดแอสพาทิก 1.001 % ลูซีน 0.892 % อะลานีน 0.871 % ไลซีน 0.820 % และอาร์จินีน 0.806 % โดยน้ำหนักสด (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมและดักแด้ไหมอื้อเมื่อคิดเป็นน้ำหนักสด

รายการ	ปริมาณ (% โดยน้ำหนักสด)					
	รังไหมอื้อ ^{1/}	รังไหมหม่อน ^{2/}	รังไหมป่า ^{2/}	ดักแด้ไหมอื้อ ^{1/}	ดักแด้ไหมหม่อน ^{3/}	ดักแด้ไหมป่า ^{3/}
		<i>Bombyx mori</i>	<i>Samia cynthia ricini</i>		<i>Bombyx mori</i>	<i>Attacus ricinii</i>
ความชื้น	4.26	10.76	9.81	74.66	65.13	70.14
เถ้า	3.22	0.92	1.71	1.58	0.79	1.36
โปรตีน	96.32	96.72	97.49	18.44	11.99	15.97
ไขมัน	1.55	-	-	4.24	20.10	11.09

หมายเหตุ ^{1/}ที่มา: จากการวิเคราะห์

^{2/}ที่มา: เข็มชัย (2530)

^{3/}ที่มา: Mishra *et al.* (2003)

ตารางที่ 17 องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมและดักแด้ไหมอื้อเมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้ง

รายการ	ปริมาณ (% โดยน้ำหนักแห้ง)					
	รังไหมอื้อ ^{1/}	รังไหมหม่อน ^{2/}	รังไหมป่า ^{2/}	ดักแด้ไหมอื้อ ^{1/}	ดักแด้ไหมหม่อน ^{3/}	ดักแด้ไหมป่า ^{3/}
		<i>Bombyx mori</i>	<i>Samia cynthia ricini</i>		<i>Bombyx mori</i>	<i>Attacus ricinii</i>
เถ้า	3.36	1.03	1.90	6.24	2.27	4.55
โปรตีน	100.61	108.38	108.09	72.77	34.38	53.48
ไขมัน	1.62	-	-	16.73	57.64	37.14

หมายเหตุ ^{1/}ที่มา: จากการวิเคราะห์

^{2/}ที่มา: เข็มชัย (2530)

^{3/}ที่มา: Mishra *et al.* (2003)

ตารางที่ 18 ปริมาณกรดอะมิโนในรังไหมอื้อ

กรดอะมิโน	จำนวนกรัมกรดอะมิโนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง			
	รังไหมอื้อ ^{1/}	ดักแด้ไหมอื้อ ^{1/}	รังไหมหม่อน <i>Bombyx mori</i> ^{2/}	รังไหมป่า <i>Samia cynthia ricini</i> ^{2/}
กรดแอสพาทิก	4.912	1.001	4.607	5.809
ซีรีน	7.653	0.633	16.142	8.391
กรดกลูตามิก	1.411	1.408	2.277	1.768
กลัยซีน	22.065	0.615	32.140	23.963
ฮิสติดีน	2.625	0.433	0.447	1.556
อาร์จีนีน	3.244	0.806	2.071	3.339
ทรีโอนีน	0.819	0.445	2.351	1.359
อะลานีน	30.329	0.871	21.887	45.538
โพรลีน	0.518	0.457	0.157	0.395
ซีสตีล	-	0.055	0.048	-
ไทโรซีน	8.363	0.715	9.042	9.834
วาลีน	0.445	0.674	2.665	0.502
เมทไทโอนีน	-	0.304	-	-
ไลซีน	0.708	0.820	1.302	0.909
ไอโซลิวซีน	0.529	0.555	0.408	0.786
ลูซีน	0.388	0.892	0.476	0.451
เฟนิลอะลานีน	0.407	0.539	0.542	0.237

หมายเหตุ ^{1/}ที่มา: จากการวิเคราะห์

^{2/}ที่มา: เข็มชัย (2530)

เมื่อพิจารณาค่าโปรตีนในรังไหมอื้อ (ตารางที่ 16 และ 17) จะเห็นว่าปริมาณใกล้เคียงกับค่าโปรตีนของรังไหมหม่อนและรังไหมป่า และพบในปริมาณมากกว่า 95 % เมื่อคิดเป็นน้ำหนักสด รังไหมจึงน่าจะเป็นแหล่งโปรตีนที่ดีได้ อย่างไรก็ตามตารางที่ 18 แสดงให้เห็นว่าถึงแม้ว่าปริมาณโปรตีนในรังไหมทั้ง 3 ชนิดจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณของกรดอะมิโนบางชนิดในรังไหมทั้งสามชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมากโดยพบว่าชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนในรังไหมอื้อและรังไหมป่ามีค่าใกล้เคียง

กันมากกว่าในรังไหมหม่อน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากรังไหมอูรีและรังไหมป่ามีความใกล้เคียงกันทางสายพันธุ์มากกว่า เนื่องจากเป็นไหมพันธุ์ป่าเหมือนกัน ชนิดของกรดอะมิโนในรังไหมทั้งสามที่มีความแตกต่างด้านปริมาณอย่างชัดเจนมี 5 ชนิด ได้แก่ กลัยซีน อะลานีน วาลีน (กลุ่ม non polar) ซีรีน (กลุ่ม oxy) และฮีสติดีน (กลุ่ม basic) ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันดังกล่าวอาจมีผลต่อกรรมวิธีในการย่อยโปรตีนระหว่างไหมหม่อนและไหมอูรี

เมื่อพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีของดักแด้ไหมอูรีที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่า ส่วนใหญ่เป็นความชื้นถึง 74.66 % แสดงให้เห็นว่าส่วนประกอบหลักของดักแด้ไหมเป็นของเหลว องค์ประกอบทางเคมีรองลงมาคือ โปรตีน 18.44 % ซึ่งเมื่อคิดเป็นน้ำหนักแห้งพบว่ามีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากที่สุด แต่ยังมีปริมาณน้อยกว่าในรังไหมอูรีอยู่มาก อย่างไรก็ตามอาจนำโปรตีนในดักแด้ไหมอูรีมาใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้มากขึ้นได้ เพื่อเป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่ผู้ผลิตไหมอูรี เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีของดักแด้ไหมป่า (*Attacus ricinii*) พบว่ามีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยดักแด้ไหมอูรีที่ใช้ในการทดลองนี้มีค่าปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าเล็กน้อย แต่มีปริมาณไขมันที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับดักแด้ไหมหม่อน (*Bombyx mori*) พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างไปจากไหมอูรี โดยในดักแด้ไหมหม่อนมีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าดักแด้ไหมอูรี แต่มีปริมาณไขมันค่อนข้างสูงและมากกว่าปริมาณโปรตีนถึง 2 เท่า แสดงให้เห็นว่าในดักแด้ไหมอูรีมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงกว่าดักแด้ไหมหม่อนสามารถนำมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งโปรตีนได้

2. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอูรีโดยใช้เอนไซม์วิธีที่ 1

2.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

2.1.1 ขนาดของรังไหมบดที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีน

จากการศึกษาขนาดของรังไหมบดที่เหมาะสมได้ผลการทดลองดังตารางที่ 19 พบว่าการบดไหมให้มีขนาด 40 และ 70 mesh ก่อนแล้วจึงนำไปย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงที่สุด (15.68 และ 15.64 % ตามลำดับ) โดยทั้ง 2 สิ่งทดลองนี้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนไหมที่ไม่ผ่านการบดได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้น้อยที่สุด (8.99 %) ดังนั้นการบดไหมให้มีขนาดเล็กลงจึงช่วยทำให้การย่อยไหมด้วยเอนไซม์มีประสิทธิภาพดีขึ้น เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวของรังไหมซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์ จึงช่วยให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับอนุภาคของไหมได้ดีขึ้น จึงเลือกไหมบดขนาด 40 mesh มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 2.1.2

ตารางที่ 19 ผลของขนาดวัตถุดิบต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (% nitrogen recovery)

สิ่งทดลอง	กรรมวิธี	nitrogen recovery (%)
1	ไม่ผ่านการบด (ควบคุม)	8.99 c
2	โหมบดหยาบ	12.07 b
3	โหมบดขนาด 40 mesh	15.68 a
4	โหมบดขนาด 70 mesh	15.64 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากการทดสอบ

ด้วยวิธี DMRT

2.1.2 การเตรียมวัตถุดิบโดยวิธีทางกายภาพร่วมกับวิธีทางเคมี

จากการศึกษาวิธีการเตรียมวัตถุดิบก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยวิธีทางเคมีร่วมกับกายภาพ ได้ผลดังตารางที่ 20 พบว่า การแช่ผงโหมด้วย NaOH 0.1 N ที่อุณหภูมิ 121°C โดยการ autoclave ได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงที่สุด (31.84 %) ซึ่งสามารถสกัดโปรตีนได้เพิ่มขึ้นประมาณ 1 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับโหมบดที่ไม่ผ่านกรรมวิธีใด ๆ ซึ่งได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เท่ากับ 15.64 % ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากต่างเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนโหมที่บริเวณพื้นผิวของอนุภาค ทำให้โครงสร้างของโปรตีนโหมหลวมขึ้น เมื่อนำไปไฮโดรไลซ์ต่อย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์จึงสามารถไฮโดรไลซ์โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้วิธีการ autoclave ในต่างเป็นการ pretreatment ก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์

ตารางที่ 20 ผลของกรรมวิธีการเตรียมวัตถุดิบต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (% nitrogen recovery)

สิ่งทดลอง	กรรมวิธี	อุณหภูมิ	nitrogen recovery (%)
1	แช่ในน้ำกลั่น	ห้อง	15.74 c
2	แช่ใน NaOH 0.1 N	ห้อง	19.13 b
3	แช่ใน HCl 0.1 N	ห้อง	16.14 c
4	แช่ในน้ำกลั่น	121°C ด้วย autoclave	16.96 c
5	แช่ใน NaOH 0.1 N	121°C ด้วย autoclave	31.84 a
6	แช่ใน HCl 0.1 N	121°C ด้วย autoclave	17.58 bc

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งหมายถึงแตกต่างกันทางสถิติ ($p \leq 0.05$) จากการทดสอบด้วย

วิธี DMRT

2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์

2.2.1 ปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 2.2.1 แสดงดังตารางที่ 21

ตารางที่ 21 ผลของปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ			ตัวแปรตาม
	สับสเตรท	เอนไซม์	เวลา	ระดับการย่อยสลาย
	(%โปรตีน)	(%ปริมาตร/นน.)	(นาที)	(%)
1	2	0.8	90	6.61
2	2	0.8	150	8.72
3	2	3.2	90	11.42
4	2	3.2	150	12.63
5	4	0.8	90	4.95
6	4	0.8	150	5.10
7	4	3.2	90	6.15
8	4	3.2	150	6.45
9	1.3	2.0	120	16.67
10	3	2.0	120	7.99
11	4.7	2.0	120	11.62
12	3	0.0	120	4.17
13	3	2.0	120	7.59
14	3	4.0	120	11.59
15	3	2.0	70	6.40
16	3	2.0	120	8.19
17	3	2.0	170	8.39

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลา) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลาย) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 > 0.75$ (ตารางที่ 22) แสดงว่าสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตามได้ จึงนำไปสร้างกราฟ response surface เพื่อหาระดับปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาที่ทำให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด

ตารางที่ 22 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม

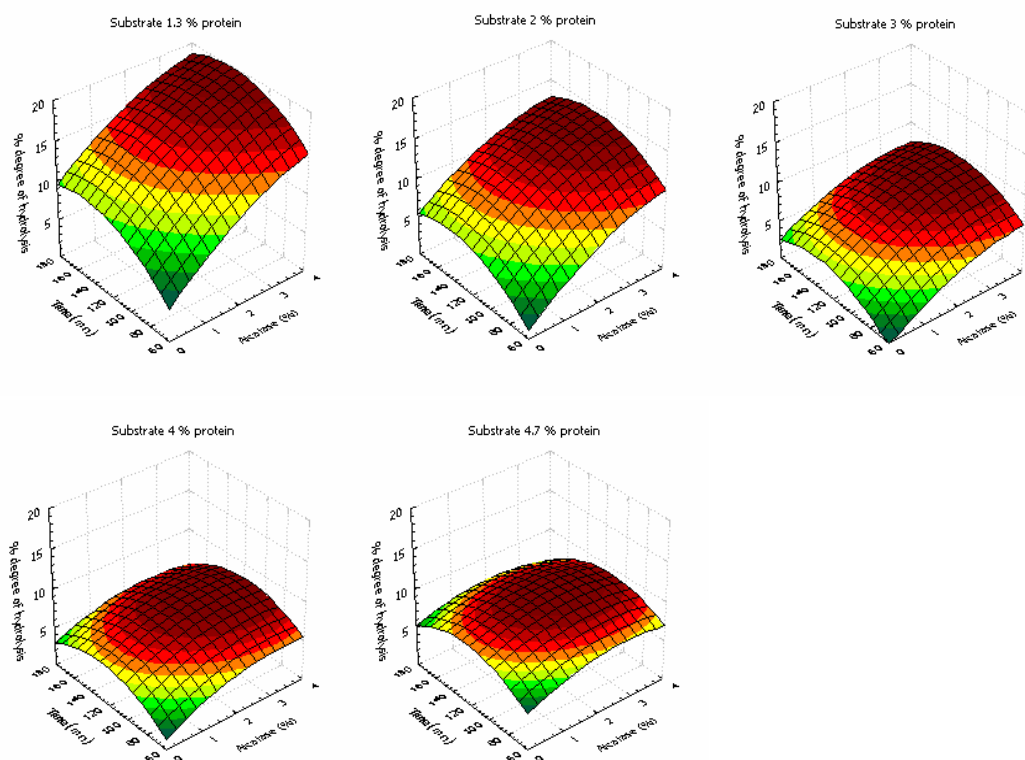
ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R ²	Model sig.
% DH (y)	$2.54 - 9.321x_1 + 5.264x_2 + 0.243x_3 + 1.688x_1^2 -$ $0.377x_2^2 - 0.0007673x_3^2 - 0.631x_1x_2 - 0.01143x_1x_3 -$ $0.003599x_2x_3$	0.895	0.010*

หมายเหตุ x_1 = ปริมาณสับสเตรท (% protein)

x_2 = ปริมาณเอนไซม์ Alcalase (%)

x_3 = เวลา (นาที)

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 5 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อระดับการย่อยสลาย

จากภาพที่ 5 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่า ปริมาณสับสเตรท และ ปริมาณเอนไซม์ มีผลต่อระดับการย่อยสลายมากกว่าเวลาในการทำปฏิกิริยา เมื่อพิจารณาจากปริมาณ สับสเตรท พบว่า เมื่อเพิ่มปริมาณสับสเตรทมากขึ้น (1.3 – 4.7 % โปรตีน) ระดับการย่อยสลายมี แนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสับสเตรทที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงเกินกว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง การเพิ่มปริมาณสับสเตรทในปฏิกิริยาจะทำให้เอนไซม์ในปฏิกิริยา

เข้าจับกับสับสเตรทได้ไม่สะดวก จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไม่เต็มที่เท่าที่ควร เมื่อพิจารณาตามปริมาณเอนไซม์ พบว่า การใช้ปริมาณเอนไซม์ เพิ่มขึ้น (0 – 4 %) มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นภายในปฏิกิริยา จึงสามารถเข้าจับกับสับสเตรท และทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการย่อยได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาตามเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย พบว่า เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้น (70 – 170 นาที) ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย เนื่องจากในช่วงเวลาดังกล่าว ความเร็วการเกิดปฏิกิริยาเริ่มคงที่ ทำให้การย่อยสลายเริ่มคงที่ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า ที่ปริมาณสับสเตรท 1.3 % โปรตีนให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด จึงใช้เป็นเกณฑ์ในการเลือกระดับปริมาณเอนไซม์และเวลา ที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด โดยพิจารณาจากจุดที่มีในการทดลอง พบว่า ที่ปริมาณเอนไซม์ 2 % และที่เวลา 120 นาที (สิ่งทดลองที่ 9) ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด ดังนั้น การเลือกสัดส่วนระหว่างสับสเตรทกับเอนไซม์จึงมีความสำคัญอย่างมากในการทำงานของเอนไซม์

2.2.2 ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 2.2.2 แสดงดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม
	ความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	ระดับการย่อยสลาย (%)
1	7.5	50	4.51
2	9.5	50	21.65
3	8.5	55	12.33
4	7.5	60	7.52
5	9.5	60	22.55
6	7.0	55	0.60
7	8.5	55	14.43
8	10.0	55	27.96
9	8.5	48	12.03
10	8.5	55	12.33
11	8.5	62	11.73

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลาย) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 > 0.75$ (ตารางที่ 24) แสดงว่าสามารถใช้อธิบาย

ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตามได้ จึงนำไปสร้างกราฟ response surface เพื่อคัดเลือกความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด

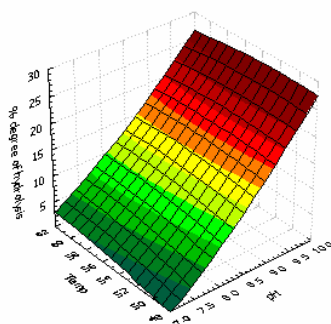
ตารางที่ 24 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระกับตัวแปรตาม

ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	Model sig.
% DH (y)	$-97.788 + 1.517x_1 + 2.377x_2 + 0.759x_1^2 - 0.01266x_2^2 - 0.106x_1x_2$	0.984	0.000*

หมายเหตุ x_1 = pH

x_2 = อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 6 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pH และอุณหภูมิ ต่อระดับการย่อยสลาย

จากภาพที่ 6 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อระดับการย่อยสลายมากกว่าอุณหภูมิ โดยเมื่อค่าความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น (7 – 10) ระดับการย่อยสลายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีผลต่อการแตกตัวของไฮออนของหมู่โปรโทเทอฟิกที่อยู่ในบริเวณแรงของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา การแตกตัวของไฮออนของผลผลิตเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน แต่จะมีช่วงความเป็นกรด-ด่างหนึ่งที่เอนไซม์จะมีกิจกรรมการทำงานสูงสุด เอนไซม์อัลคาเลสมีค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 8.0 – 9.5 ทำให้เกิดการย่อยสลายสูงในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างดังกล่าว เมื่อพิจารณาอุณหภูมิพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิเพิ่มขึ้น (48 – 62 $^{\circ}\text{C}$) ค่าระดับการย่อยสลายมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เนื่องจากเอนไซม์อัลคาเลสมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ที่ 55 – 60 $^{\circ}\text{C}$ อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาจากกราฟ contour plot พบว่า สภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดคือที่ pH 9.5 และที่อุณหภูมิ 60 $^{\circ}\text{C}$ (สังเกตตอนที่ 4)

3. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีโดยใช้เอนไซม์วิธีที่ 2

3.1 การเตรียมตัวอย่างรังไหมก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์โดยการละลายด้วยเกลือ

3.1.1 ชนิดของตัวทำละลายที่เหมาะสมในการทำรังไหมละลาย

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ เพียงชนิดเดียวที่สามารถละลายรังไหมอิตาลีได้ โดยเมื่อรังไหมละลายได้หมดแล้ว สารละลายโปรตีนไหมที่ได้มีลักษณะขุ่นเหนียวจึงต้องเติมน้ำเพื่อให้สะดวกต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นต่อไป อย่างไรก็ตามควรทิ้งให้สารละลายรังไหมเย็นลงก่อนจึงค่อยเติมน้ำ ถ้าเติมน้ำในขณะที่สารละลายยังร้อนอยู่โปรตีนจะเกิดการตกตะกอน นอกจากนี้ในขณะเติมน้ำและกวนให้สารละลายเจือจางลงต้องใช้เวลาเร็วไม่มาก ถ้าใช้ความเร็วในการกวนมากจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอนได้เช่นกัน

3.1.2 อัตราส่วนของเกลือที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่า อัตราส่วนของ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ต่ำสุดที่สามารถละลายรังไหมอิตาลีได้คือ 0.6 โมล ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราส่วน $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 0.6 โมลในการละลายรังไหมอิตาลี

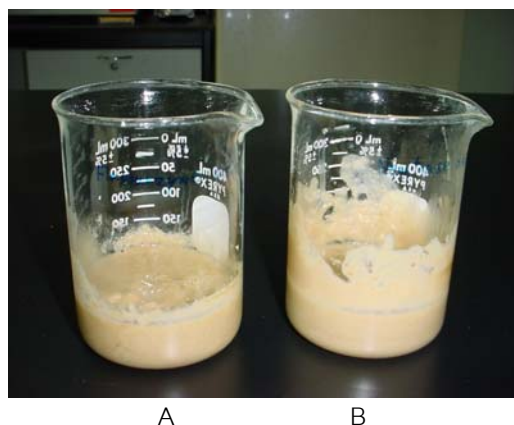
3.1.3 สัดส่วนของรังไหมต่อสารละลายที่เหมาะสม

จากการทดลองพบว่า สัดส่วนของรังไหมสูงสุดที่สามารถละลายได้ใน $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ คือ 6 % ส่วนการใช้สัดส่วนรังไหม 8 และ 10 % ไม่สามารถละลายได้

3.2 สภาพที่เหมาะสมในการย่อยด้วยเอนไซม์

3.2.1 ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนไหม

จากการศึกษาชนิดของเอนไซม์โปรติเอสเพื่อคัดเลือกชนิดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด พบว่า การย่อยโดยไม่ใช้เอนไซม์ การย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรล และการย่อยด้วยเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ เมื่อเริ่มปฏิกิริยาไปได้ประมาณ 20 นาที โปรตีนจะเกิดการตกตะกอน ทำให้ไม่สามารถย่อยต่อไปได้ (ภาพที่ 7) ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสสามารถย่อยโปรตีนไหมได้ ดังนั้นจึงเลือกใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยโปรตีนไหมเนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยสลายและไม่ทำให้โปรตีนตกตะกอน



ภาพที่ 7 ลักษณะการตกตะกอนของโปรตีนเมื่อใช้เอนไซม์เฟเวอร์ไซม์(A)และเอนไซม์นิวเทรล(B)ในการย่อย

3.2.2 ปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 3.2.2 แสดงดังตารางที่ 25

ตารางที่ 25 ผลของปริมาณเอนไซม์และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม
	ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลา (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%)
1	0.1	60	48.23
2	0.1	90	45.12
3	0.1	120	48.09
4	0.1	150	50.41
5	0.5	60	54.41
6	0.5	90	51.28
7	0.5	120	51.23
8	0.5	150	53.11
9	1.0	60	57.96
10	1.0	90	62.51
11	1.0	120	56.26
12	1.0	150	56.80

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ปริมาณเอนไซม์ และเวลา) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลาย) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 > 0.75$ (ตารางที่ 26) แสดงว่าสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามได้ จึงนำไปสร้างกราฟ response surface เพื่อหาสภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด

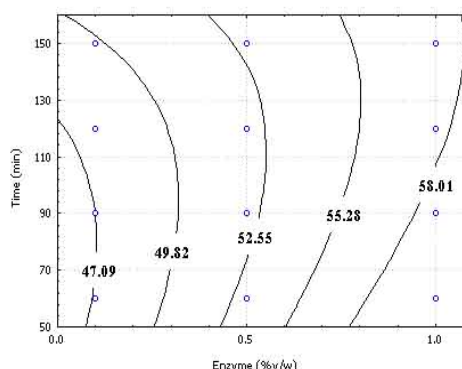
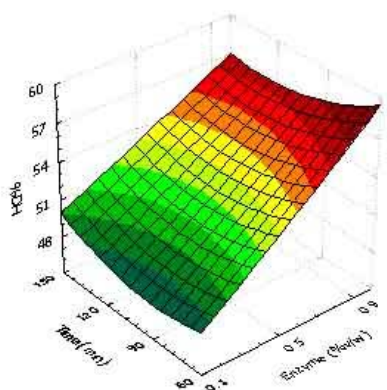
ตารางที่ 26 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	Model sig.
% DH (y)	$48.354 + 18.628x_1 - 0.07328x_2 + 0.892x_1^2 + 0.0005106x_2^2 - 0.07385x_1x_2$	0.784	0.000*

หมายเหตุ x_1 = ปริมาณเอนไซม์ (% ปริมาตร/น้ำหนัก)

x_2 = เวลา (นาที)

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95



0.05)

ภาพที่ 8 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย

จากภาพที่ 8 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่า ปริมาณเอนไซม์มีผลต่อระดับการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ (0.1 – 1.0 %) มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นภายในปฏิกิริยา จึงสามารถเข้าจับกับสับสเตรทและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการย่อยได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาเวลาในการย่อยพบว่า ไม่มีผลต่อระดับการย่อยสลายทั้งนี้เนื่องจากที่ช่วงเวลาดังกล่าว (60 – 150 นาที) ความเร็วการเกิดปฏิกิริยาเริ่มคงที่ทำให้การย่อยสลายเริ่มคงที่ ดังนั้นจึงเลือกใช้เวลาในการย่อยที่ 60 นาที เพื่อเป็นการประหยัดเวลา ส่วนปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมคือใช้เอนไซม์ปริมาณ 1 % เนื่องจากให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด

3.2.3 ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการย่อยที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 3.2.3 แสดงดังตารางที่ 27

ตารางที่ 27 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม
	ความเป็นกรด-ด่าง	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)	ระดับการย่อยสลาย (%)
1	7.5	50	75.08
2	8.5	50	63.27
3	9.5	50	61.09
4	7.5	55	60.78
5	8.5	55	56.96
6	9.5	55	59.68
7	7.5	60	83.78

8	8.5	60	73.46
9	9.5	60	73.06

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลาย) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 > 0.75$ (ตารางที่ 28) แสดงว่าสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามได้ จึงนำไปสร้างกราฟ response surface เพื่อหาสภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด

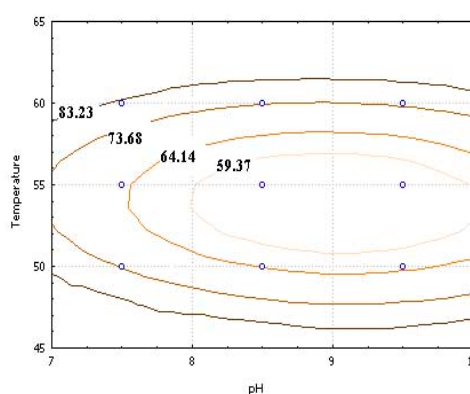
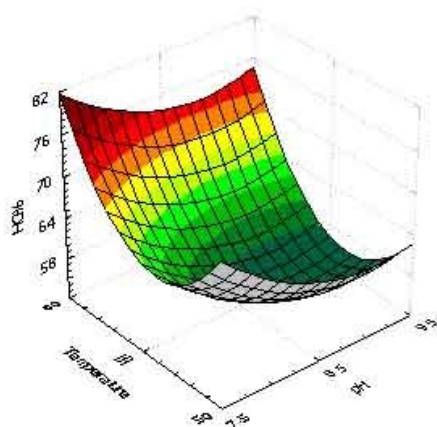
ตารางที่ 28 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	Model sig.
% DH (y)	$1937.47 - 87.256x_1 - 55.288x_2 + 4.351x_1^2 + 0.499x_2^2 + 0.163x_1x_2$	0.923	0.000*

หมายเหตุ x_1 = ค่า pH

x_2 = อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)

* หมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 9 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย

จากภาพที่ 9 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิมีผลต่อระดับการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างในการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น (7.5 – 9.5) ระดับการย่อยสลายมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อปรับให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงทำให้โปรตีนไหม้อีบบางส่วนเกิดการตกตะกอน ทำให้ได้โปรตีนที่ละลายได้ลดลง มี

ผลทำให้ระดับการย่อยสลายลดลง ค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกตัวของไฮดรอกไซด์ของหมู่โปรตีนที่อยู๋ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้เกิดการเร่งปฏิกิริยา การแตกตัวของไฮดรอกไซด์ของผลผลิตเอนไซม์จะมีประสิทธิภาพการเร่งปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน ณ ระดับความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน แต่จะมีช่วงความเป็นกรด-ด่างหนึ่งที่เอนไซม์จะมีกิจกรรมการทำงานสูงสุด การเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อการแตกตัวของหมู่แขนงข้างของกรดอะมิโนที่อยู๋บริเวณแอคทีฟของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เมื่อพิจารณาจากกราฟพื้นผิวตอบสนองพบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในการทำปฏิกิริยาที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดคือ ที่ 7.5 และอุณหภูมิ 60 °C

4. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากดักแด้ไหมอีรีโดยใช้เอนไซม์

4.1 สภาวะในการย่อยด้วยเอนไซม์

4.1.1 ชนิดของเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าที่เหมาะสม

จากการศึกษาชนิดของเอนไซม์โปรติเอสเพื่อคัดเลือกชนิดเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด พบว่า เอนไซม์อัลคาเลสให้ระดับการย่อยสลายสูงสุด รองลงมาคือเอนไซม์นิวเทรส และเฟเวอร์ไซม์ ส่วนการไม่ใช้เอนไซม์มีระดับการย่อยสลายน้อยที่สุด (ตารางที่ 29)

ตารางที่ 29 ผลของชนิดเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าต่อระดับการย่อยสลาย

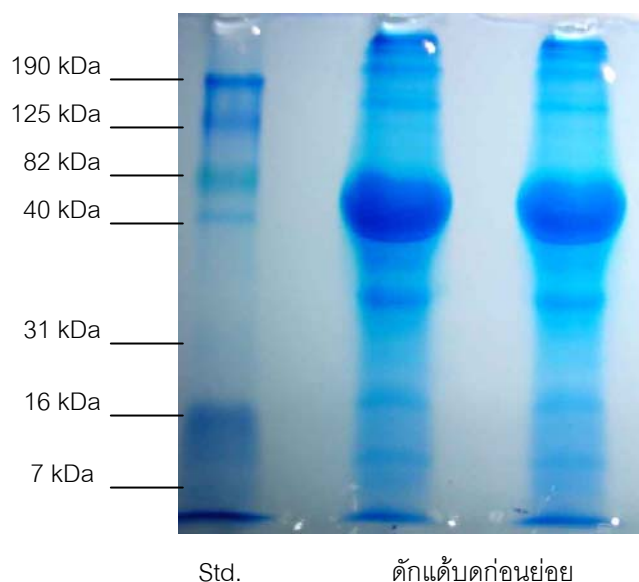
Tr.	ชนิดเอนไซม์	ปริมาณเอนไซม์ (%ปริมาตร/นน.)	ปริมาณสับสเตรท (% โปรตีน)	เวลา (นาท)	pH	อุณหภูมิ (°C)	ระดับการย่อย สลาย (%)
1	ไม่ใช้เอนไซม์	0	6	90	7.0	50	13.93 d
2	อัลคาเลส	0.5	6	90	9.5	55	52.39 a
3	นิวเทรส	0.5	6	90	7.0	50	39.29 b
4	เฟเวอร์ไซม์	0.5	6	90	7.0	50	23.96 c

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น

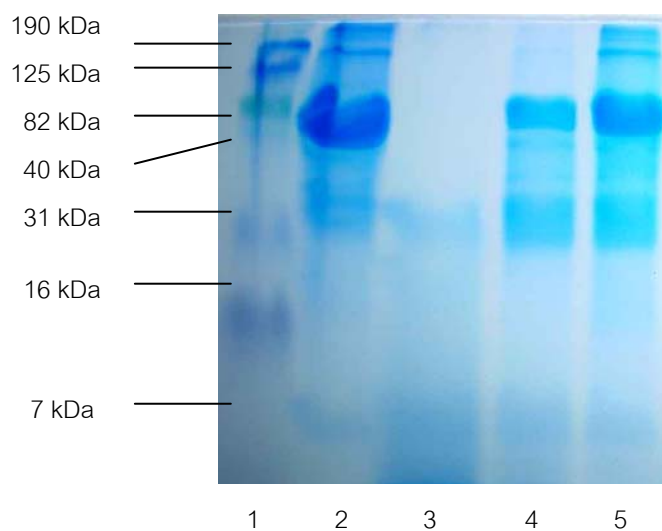
ร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนดังภาพที่ 10 และ 11 พบว่า ดักแด้บดก่อนการย่อยสลายประกอบด้วยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 190, 190, 125, 82, 40, 31, 16 และ 7 กิโลดาลตัน และมีความเข้มของแถบโปรตีนมาก โดยแถบโปรตีนขนาด 82 และ 40 กิโลดาลตันมีความเข้มมากที่สุด เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยสลาย พบว่า การย่อยโดยไม่ใช้เอนไซม์มีแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลเหมือนกับดักแด้บดก่อนการย่อย โดยประกอบด้วยแถบโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่มากกว่า 190, 190, 82, 40, 31 และ 7 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่าการย่อยโดยไม่เติมเอนไซม์เกิดการย่อยสลายเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ จะได้แถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่าและมีความเข้มของแถบโปรตีนไม่มากในช่วงมวลโมเลกุลที่อยู๋บนเจล โดยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีขนาดโมเลกุลของโปรตีนประมาณ 31 กิโลดาลตัน และเป็นแถบสเมียร์ในช่วง

โมเลกุลโปรตีนขนาด 7-16 กิโลดาลตัน โดยไม่พบแถบโปรตีนขนาดโมเลกุลมากกว่า 31 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่เกิดการย่อยสลายไปเป็นโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลง การย่อยด้วย เอนไซม์นิวเทรลและเฟเวอร์ไซม์มีแถบโมเลกุลโปรตีนที่คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างไปจากการย่อยด้วย เอนไซม์อัลคาเลสอย่างเห็นได้ชัด กล่าวคือ การย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรลและเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ยังพบ ขนาดโมเลกุลของโปรตีนในช่วงมากกว่า 31 กิโลดาลตัน และมีความเข้มของแถบโปรตีนขนาดโมเลกุล 31 กิโลดาลตันมากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการย่อยด้วยเอนไซม์ นิวเทรลและเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์ พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์มีความเข้มของแถบโปรตีนขนาด โมเลกุล 82 กิโลดาลตันมากกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรลเล็กน้อย และยังคงมีแถบโปรตีนขนาด โมเลกุลในช่วงมากกว่า 92 กิโลดาลตัน จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมี ประสิทธิภาพสูงสุดทั้งจากค่าระดับการย่อยสลาย (52.39 %) และขนาดโมเลกุลของโปรตีน ดังนั้นจึง เลือกใช้เอนไซม์อัลคาเลสในการย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 10 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐานและดักแต่บดก่อนย่อย



ภาพที่ 11 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ 1) โปรตีนมาตรฐาน 2) ย่อยโดยไม่ใช้เอนไซม์ 3) ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส 4) ย่อยด้วยเอนไซม์นิวเทรส 5) ย่อยด้วยเอนไซม์เฟเวอร์ไซม์

4.1.2 ปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 4.1.2 แสดงดังตารางที่ 30

ตารางที่ 30 ผลของปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ			ตัวแปรตาม	
	สับสเตรท (%โปรตีน)	เอนไซม์ (% v/w)	เวลา (นาทีก)	ระดับการย่อยสลาย (%)	ปริมาณไนโตรเจน ที่ผลิตได้ (%)
1	6	0.2	90	35.33	33.75
2	6	0.2	150	54.79	24.13
3	6	0.8	90	66.42	67.28
4	6	0.8	150	71.07	62.69
5	10	0.2	90	29.17	20.25
6	10	0.2	150	35.38	11.15
7	10	0.8	90	54.80	40.19
8	10	0.8	150	55.93	52.85
9	4.6	0.5	120	60.65	76.98
10	8.0	0.5	120	59.29	46.86
11	11.4	0.5	120	47.71	41.64
12	8	0	120	21.08	20.86
13	8	0.5	120	61.50	45.15
14	8	1.0	120	62.51	47.84
15	8	0.5	70	47.32	34.80
16	8	0.5	120	63.59	47.21
17	8	0.5	170	63.40	46.21

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลา) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองทั้งสองสมการมีระดับความเชื่อมั่นมากกว่าร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$) และค่า $R^2 > 0.75$ (ตารางที่ 31) แสดงว่าสามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามได้ จึงนำไปสร้างกราฟ response surface เพื่อหาสภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณโปรตีนที่ผลิตได้สูงสุด

ตารางที่ 31 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

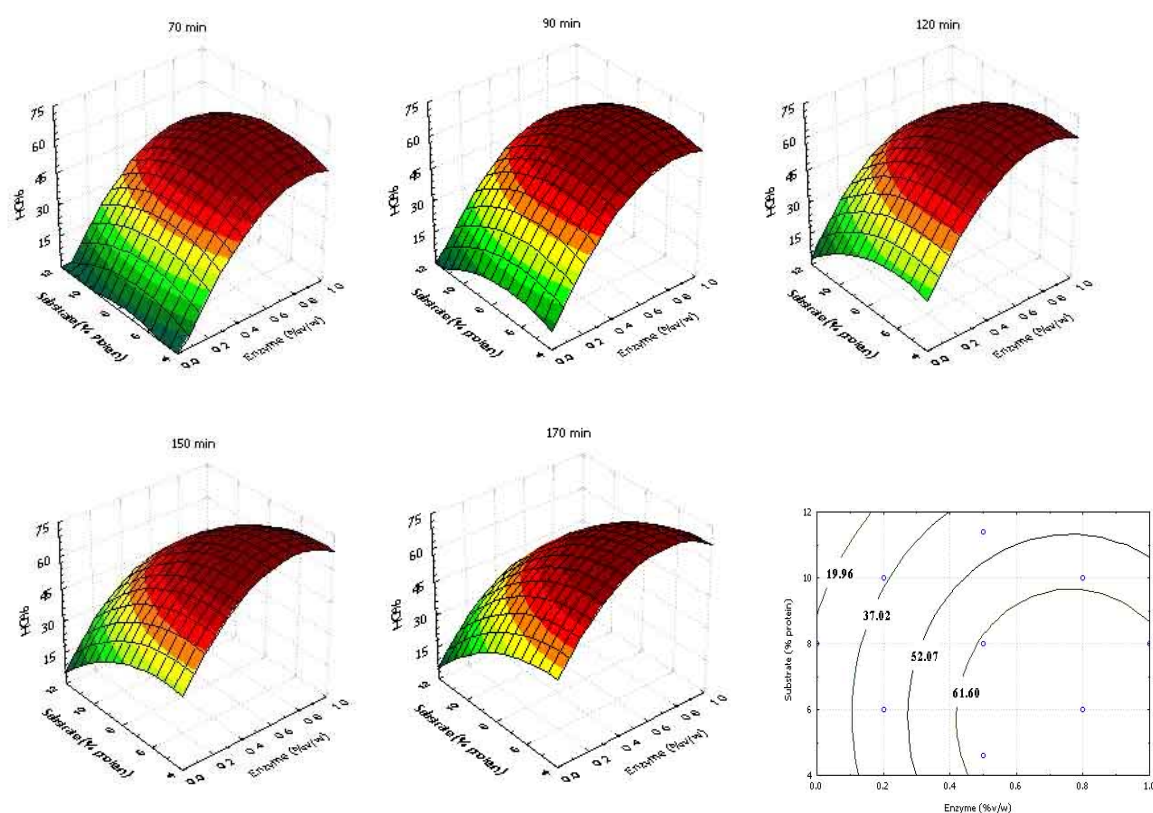
ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	Model sig.
% DH (y_1)	$-95.021 + 11.101x_1 + 151.998x_2 + 1.104x_3 - 0.593x_1^2 - 76.881x_2^2 - 0.002262x_3^2 - 0.248x_1x_2 - 0.03494x_1x_3 - 0.276x_2x_3$	0.984	0.000*
% NR (y_2)	$91.164 - 21.106x_1 + 78.671x_2 + 0.435x_3 + 0.829x_1^2 - 61.692x_2^2 - 0.003734x_3^2 - 2.177x_1x_2 + 0.03702x_1x_3 + 0.372x_2x_3$	0.903	0.008*

หมายเหตุ x_1 = ปริมาณสับสเตรท (% โปรตีนโดยน้ำหนัก)

x_2 = ปริมาณเอนไซม์ (% ปริมาตร/น้ำหนัก)

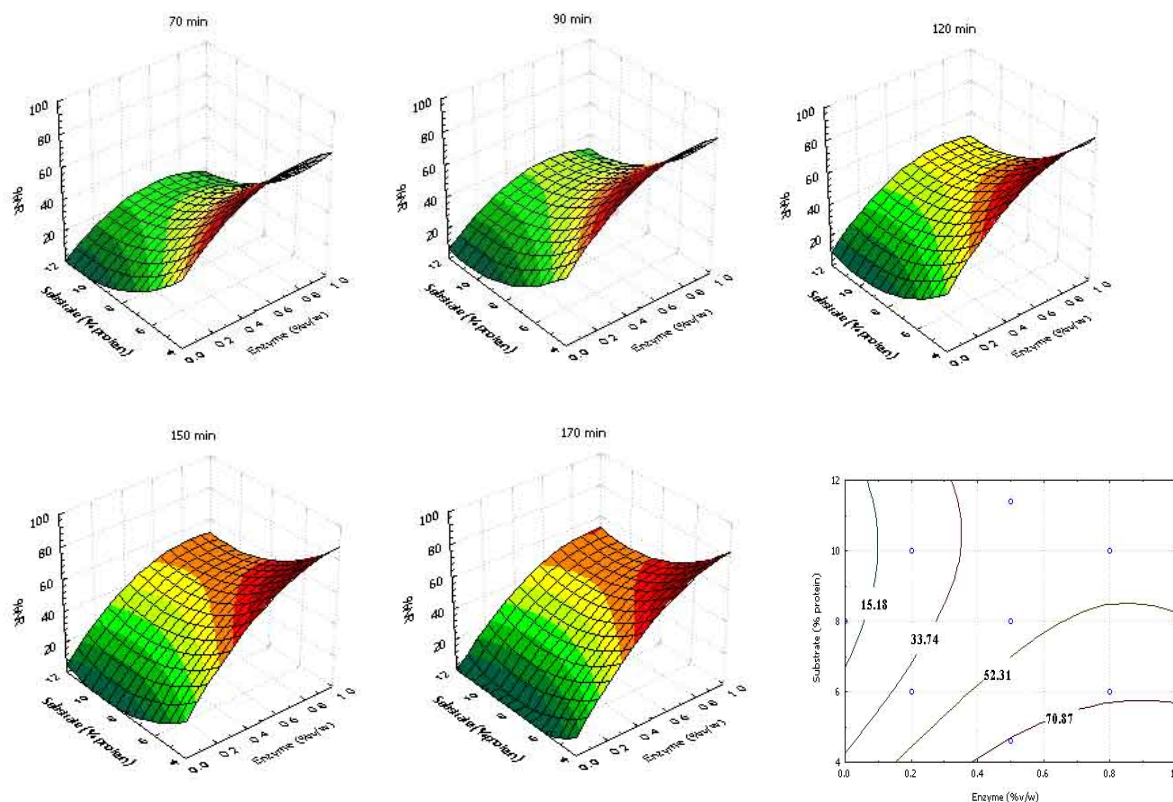
x_3 = เวลา (นาที)

* หมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 12 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อระดับการย่อยสลาย

จากภาพที่ 12 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่า ปริมาณสับสเตรท ปริมาณ เอนไซม์ และเวลาในการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยสลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โดยเวลาในการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยสลายเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสับสเตรทและปริมาณ เอนไซม์ ซึ่งมีผลต่อระดับการย่อยสลายมากกว่า ระดับการย่อยสลายคือเปอร์เซ็นต์พันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เทียบกับพันธะเปปไทด์เริ่มต้นในวัตถุดิบ เป็นการแสดงถึงจำนวนพันธะที่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ระหว่างการทำปฏิกิริยา ถ้าค่าระดับการย่อยสลายสูงแสดงว่าโปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก โดยผลของปริมาณสับสเตรทต่อระดับการย่อยสลายพบว่า เมื่อใช้ปริมาณสับสเตรทมากขึ้น (4.6 – 11.4 % โปรตีน) ระดับการย่อยสลายมีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณสับสเตรทที่เพิ่มขึ้นมีค่าสูงเกินกว่าค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ในช่วงความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลอง การเพิ่มปริมาณสับสเตรทในปฏิกิริยาจะทำให้เอนไซม์ในปฏิกิริยาเข้าจับกับสับสเตรทได้ไม่สะดวก จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ไม่เต็มที่เท่าที่ควร เมื่อพิจารณาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลาย พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น (0 – 1 %) มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีปริมาณเอนไซม์เพิ่มมากขึ้นภายในปฏิกิริยา จึงสามารถเข้าจับกับสับสเตรทและทำให้เกิดผลิตภัณฑ์จากการย่อยได้มากขึ้น เมื่อพิจารณาผลของเวลาในการย่อย (70 – 170 นาที) พบว่า มีผลต่อระดับการย่อยสลายเพียงเล็กน้อย เนื่องจากที่ช่วงเวลาดังกล่าวความเร็วการเกิดปฏิกิริยาเริ่มคงที่ทำให้การย่อยสลายเริ่มคงที่ จากผลการทดลองที่ได้ พบว่า การใช้ปริมาณสับสเตรท 4.6 และ 8 % โปรตีนโดยน้ำหนัก ปริมาณเอนไซม์ 0.5 % เวลา 120 นาที และการใช้ปริมาณสับสเตรท 6 % โปรตีนโดยน้ำหนัก ปริมาณเอนไซม์ 0.8 % เวลา 90 และ 150 นาที เป็นสภาวะให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุด (60.65, 59.29, 61.50, 63.59, 66.42 และ 71.07 % ตามลำดับ)

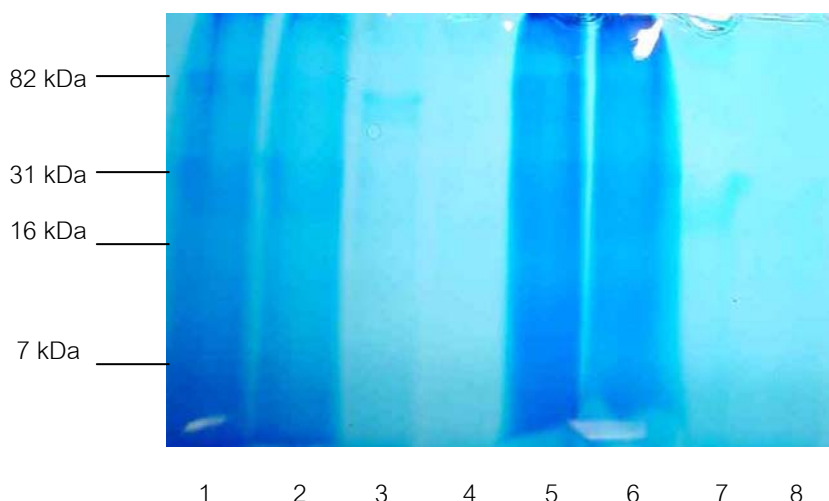


ภาพที่ 13 กราฟพื้นผิวตอบสนอง (response surface) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสับสเตรท, ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้

จากภาพที่ 13 และแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ พบว่า ปริมาณสับสเตรท ปริมาณเอนไซม์ มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ส่วนเวลาในการย่อยไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยผลของปริมาณสับสเตรทต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ พบว่า เมื่อใช้ปริมาณสับสเตรทมากขึ้น (4.6 – 11.4 % โปรตีน) ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลง เมื่อพิจารณาผลของปริมาณเอนไซม์ต่อปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ พบว่า เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้น (0 – 1 %) ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น ซึ่งจากผลจากทดลองพบว่า ที่ปริมาณสับสเตรท 4.6 % โปรตีน ปริมาณเอนไซม์ 0.5 % และเวลาในการย่อย 120 นาที เป็นสภาวะที่ได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงสุดคือ 76.98 %

เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่สภาวะต่าง ๆ ดังภาพที่ 14 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุล 40 กิโลดาลตัน โดยที่ระดับปริมาณสับสเตรท 6 % โปรตีน เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0.2 เป็น 0.8 % ปริมาตรน้ำหมัก ความเข้มข้นของแถบโปรตีนลดลง แสดงถึง

ระดับการย่อยสลายที่เพิ่มขึ้นและมีผลทำให้โปรตีนที่มีขนาดใหญ่มีขนาดเล็กลง และอาจมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 7 กิโลดาลตัน เนื่องจากไม่สามารถเห็นได้ในช่วงบนเจลดังภาพ และเมื่อใช้เวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นจาก 90 เป็น 150 นาที มีขนาดโมเลกุลและความเข้มของแถบโปรตีนที่ไม่ต่างกัน ที่ระดับปริมาณสับสเตรท 10 % โปรตีนมีขนาดโมเลกุลที่เหมือนกับการใช้ปริมาณสับสเตรท 6 % โปรตีน แต่จะมีความเข้มของแถบโปรตีนที่มากกว่าการใช้ปริมาณสับสเตรท 6 % โปรตีน

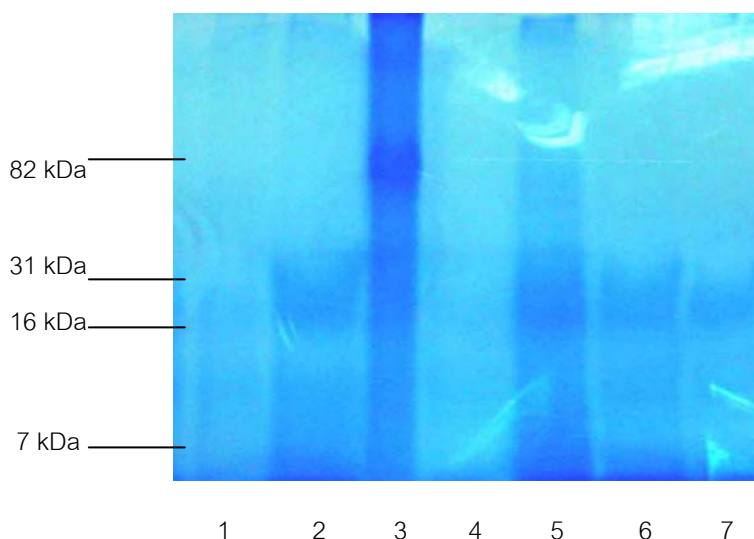


ภาพที่ 14 SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายสภาวะต่าง ๆ

- หมายเหตุ 1) สับสเตรท 6 % โปรตีน เอนไซม์ 0.2 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 90 นาที
 2) สับสเตรท 6 % โปรตีน เอนไซม์ 0.2 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 150 นาที
 3) สับสเตรท 6 % โปรตีน เอนไซม์ 0.8 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 90 นาที
 4) สับสเตรท 6 % โปรตีน เอนไซม์ 0.8 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 150 นาที
 5) สับสเตรท 10 % โปรตีน เอนไซม์ 0.2 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 90 นาที
 6) สับสเตรท 10 % โปรตีน เอนไซม์ 0.2 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 150 นาที
 7) สับสเตรท 10 % โปรตีน เอนไซม์ 0.8 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 90 นาที
 8) สับสเตรท 10 % โปรตีน เอนไซม์ 0.8 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 150 นาที

จากภาพที่ 15 พบว่าเมื่อใช้ปริมาณสับสเตรทเพิ่มขึ้นจาก 4.6 เป็น 8 และ 11.4 % โปรตีน โดยใช้ปริมาณเอนไซม์และเวลาเท่ากันคือ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก และ 120 นาที พบว่า มีความเข้มของแถบโปรตีนเพิ่มขึ้น เมื่อใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 0.5 และ 1.0 % ปริมาตร/น้ำหนัก โดยใช้ปริมาณสับสเตรทและเวลาเท่ากันคือ 8 % โปรตีนและ 120 นาที พบว่า มีขนาดโมเลกุลและความเข้มของแถบโปรตีนลดลง ทั้งนี้เนื่องจากการใช้เอนไซม์มีผลทำให้โปรตีนขนาดใหญ่ถูกย่อยสลาย

จนเกิดเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระขึ้น ซึ่งกรดอะมิโนขนาดเล็กที่เกิดขึ้นจากการย่อยอาจจะไม่สามารถตรวจสอบได้ในการทดสอบขนาดโมเลกุลด้วย SDS-PAGE เมื่อใช้เวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นจาก 70 เป็น 120 และ 170 นาที พบว่า การใช้เวลาในการย่อย 70 นาที มีความเข้มข้นของแถบโปรตีนมากกว่า ส่วนที่เวลา 120 และ 170 นาทีที่มีความเข้มข้นของแถบโปรตีนที่ไม่ต่างกัน แสดงให้เห็นว่าเวลาในการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยสลายเล็กน้อย

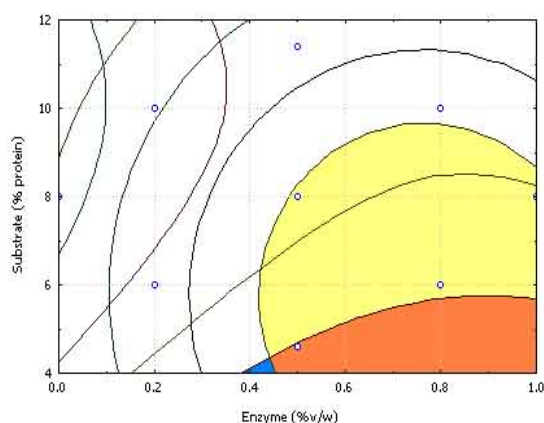


ภาพที่ 15 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยสลายสภาวะต่าง ๆ

- หมายเหตุ 1) สับสเตรท 4.6 % โปรตีน เอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 120 นาที
 2) สับสเตรท 11.4 % โปรตีน เอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 120 นาที
 3) สับสเตรท 8 % โปรตีน เอนไซม์ 0 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 120 นาที
 4) สับสเตรท 8 % โปรตีน เอนไซม์ 1.0 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 120 นาที
 5) สับสเตรท 8 % โปรตีน เอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 70 นาที
 6) สับสเตรท 8 % โปรตีน เอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 170 นาที
 7) สับสเตรท 8 % โปรตีน เอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก เวลา 120 นาที

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาค่าระดับการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ และขนาดของโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซส พบว่า เมื่อพิจารณาจากกราฟพื้นผิวตอบสนองของค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ที่นำมาซ้อนทับกัน (ภาพที่ 16) ประกอบกับการพิจารณาขนาดโมเลกุลจากแผ่นเจล SDS-PAGE พบว่า สภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณ

ไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงสุดคือ การใช้ปริมาณสับสเตรท 4.6 % โปรตีน ปริมาณเอนไซม์ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก และเวลาในการย่อย 120 นาที



ภาพที่ 16 กราฟพื้นผิวตอบสนองของค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้เมื่อนำซ้อนทับกันบริเวณพื้นที่สีส้มคือสภาวะที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้สูงสุด

4.1.3 ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่เหมาะสม

ผลการทดลองที่ 4.1.3 แสดงดังตารางที่ 32

ตารางที่ 32 ผลของความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่อระดับการย่อยสลาย

สิ่งทดลอง	ตัวแปรอิสระ		ตัวแปรตาม	
	pH	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	ระดับการย่อยสลาย (%)	ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (%)
1	7.5	50	73.27	62.26
2	9.5	50	67.29	64.45
3	8.5	55	72.73	72.38
4	7.5	60	76.02	51.20
5	9.5	60	70.88	81.95
6	7.0	55	73.31	59.68
7	8.5	55	75.05	78.44
8	10.0	55	70.71	81.84
9	8.5	48	64.29	89.28
10	8.5	55	77.54	68.00

11	8.5	62	79.13	54.06
----	-----	----	-------	-------

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์สมการถดถอยเพื่อสร้างแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระ (ความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ) กับตัวแปรตาม (ระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้) โดยใช้สมการลำดับที่ 2 พบว่า แบบจำลองมีระดับความเชื่อมั่นน้อยกว่าร้อยละ 95 ($p > 0.05$) (ตารางที่ 33) ไม่สามารถใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตามได้ แสดงว่าค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีผลต่อระดับการย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ อาจเนื่องมาจากที่ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เกิดปฏิกิริยาย่อยสลายและปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 33 แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ใช้อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระและตัวแปรตาม

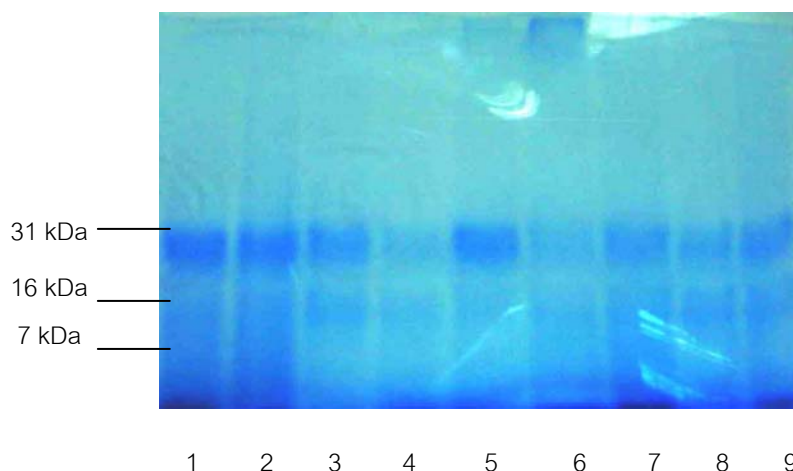
ตัวแปรตาม	แบบจำลองทางคณิตศาสตร์	R^2	Model sig.
% DH (y_1)	$-242.958 + 19.752x_1 + 8.102x_2 - 1.402x_1^2 - 0.07067x_2^2 - 0.042x_1x_2$	0.753	0.123 ^{ns}
% NR (y_2)	$108.235 - 41.029x_1 + 4.614x_2 - 1.749x_1^2 - 0.159x_2^2 - 1.428x_1x_2$	0.737	0.141 ^{ns}

หมายเหตุ x_1 = pH

x_2 = อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)

ns หมายถึงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยสลายในค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่าง ๆ ดังภาพที่ 17 พบว่า มีรูปแบบของแถบโมเลกุลโปรตีนที่เหมือนกัน ต่างกันที่ความเข้มของแถบโปรตีน โดยโปรตีนไฮโดรไลสจากการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50°C pH 7.5 และ 9.5 มีแถบโปรตีนที่เข้มกว่า ส่วนโปรตีนไฮโดรไลสจากการย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60°C pH 9.5 มีความเข้มของแถบโปรตีนน้อย จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิต่าง ๆ ไม่มีผลต่อระดับการย่อยสลาย ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ และขนาดโมเลกุล ดังนั้นจึงเลือกใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 7.5 และอุณหภูมิ 50°C เนื่องจากเป็นระดับที่มีการปรับสภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่ต่ำสุดที่มีในการทดลอง เพื่อเป็นการประหยัดพลังงานความร้อนและลดปริมาณสารที่ใช้ในการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของปฏิกิริยา



ภาพที่ 17 แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยสลายสภาวะต่าง ๆ

- หมายเหตุ 1) pH 7.5 อุณหภูมิ 50 °C
 2) pH 9.5 อุณหภูมิ 50 °C
 3) pH 7.5 อุณหภูมิ 60 °C
 4) pH 9.5 อุณหภูมิ 60 °C
 5) pH 7.0 อุณหภูมิ 55 °C
 6) pH 10.0 อุณหภูมิ 55 °C
 7) pH 8.5 อุณหภูมิ 48 °C
 8) pH 8.5 อุณหภูมิ 62 °C
 9) pH 8.5 อุณหภูมิ 55 °C

4.3 การลดสีในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซส

4.3.1 การใช้โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ก่อนการย่อยสลายให้เป็นไฮโดรไลเซส

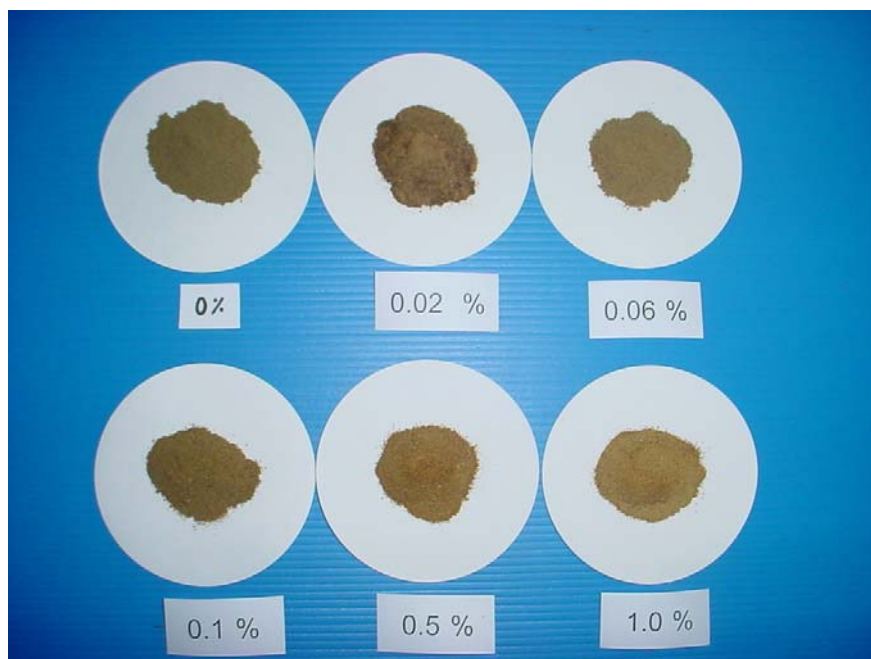
จากการศึกษาการลดสีของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซสโดยการเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ลงไปในการนำปฏิกิริยาไปย่อย เพื่อลดสีในผลิตภัณฑ์สุดท้าย และวัดค่าสี โดยค่า L^* เป็นค่าความสว่าง เริ่มจากสีขาวมีค่า L^* 100 ไปเป็นสีดำที่มีค่าเป็น 0 ค่าสี a^* เป็นค่าของสีแดงถ้าค่าเป็นบวก แต่ถ้าค่าสี a^* เป็นลบจะเป็นสีเขียว ส่วนค่าสี b^* จะเป็นค่าของสีเหลืองถ้าค่าเป็นบวก แต่ถ้าค่า b^* เป็นลบจะเป็นค่าสีน้ำเงิน ผลการทดลองดังตารางที่ 31 และภาพที่ 18 พบว่า การเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ทำให้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซสจากผักดกมีสีที่เข้มกว่าการไม่ได้เติมทุกปริมาณ การไม่เติมได้

ผลิตภัณฑ์เป็นสีน้ำตาล ส่วนการเติมที่ทุกระดับให้สีที่ไม่แตกต่างกันโดยเป็นสีน้ำตาลแดง สอดคล้องกับค่าสี L^* ซึ่งการเติมไซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ทุกปริมาณมีค่าที่น้อยกว่าการไม่ได้เติมสาร ส่วนค่า a^* ซึ่งเป็นค่าสีแดงพบว่าการไม่เติมมีค่า a^* น้อยกว่าการเติมทุกปริมาณ และการไม่เติมสารมีค่าสี b^* ซึ่งเป็นค่าความเป็นสีเหลือง มากกว่าการเติมทุกปริมาณ ดังนั้นสรุปได้ว่าการเติมสารไซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ไม่ช่วยในการลดสีของผลิตภัณฑ์ แต่กลับทำให้มีสีที่เข้มขึ้น

ตารางที่ 34 ค่าสี L^* a^* b^* ของโปรตีนไฮโดรไลเสทผักแค้ที่ได้จากการฟอกสีด้วยไซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณต่าง ๆ

สิ่งทดลอง	ปริมาณ(%โดยน้ำหนัก)	ค่าสี		
		L^*	a^*	b^*
1	0 (ควบคุม)	64.45 a	20.97 a	16.83 a
2	0.02	51.60 b	30.25 b	9.03 c
3	0.06	51.62 b	30.38 b	9.17 bc
4	0.10	51.67 b	30.26 b	9.09 c
5	0.50	51.50 b	30.60 b	9.37 b
6	1.00	51.56 b	30.38 b	9.31 b

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 18 ผงโปรตีนไฮโดรไลเสทผักแค้ที่ได้จากการฟอกสีด้วยไซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ปริมาณต่าง ๆ

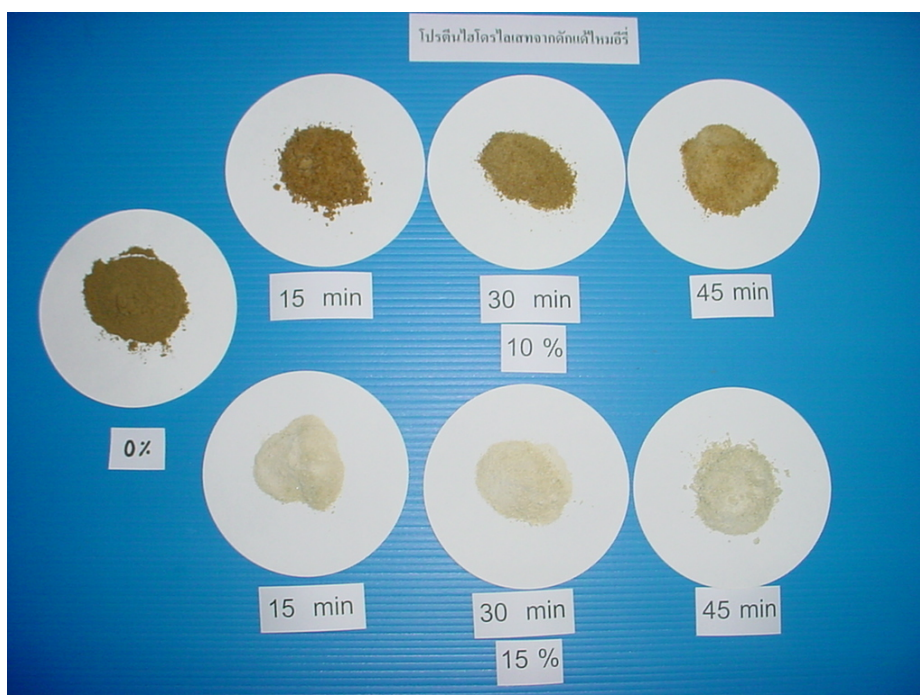
4.3.2 การลดสีโดยใช้ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) หลังการย่อย

จากการศึกษาการลดค่าสีโดยใช้ถ่านกัมมันต์ดูดซับในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท ก่อนนำไปทำแห้ง ในปริมาณ 10 และ 15 % โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 15, 30 และ 40 นาที ผลการทดลองดังตารางที่ 35 และภาพที่ 19 พบว่า การฟอกสีโดยใช้ถ่านกัมมันต์ปริมาณ 15 % เป็นเวลาต่าง ๆ สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีขาวขึ้น โดยที่เวลาต่าง ๆ มีค่าสีที่ไม่แตกต่างกัน ส่วนการฟอกสีโดยใช้ถ่านกัมมันต์ปริมาณ 10 % ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาลอ่อนไม่แตกต่างกันที่เวลาต่าง ๆ ดังนั้นปริมาณผงถ่านกัมมันต์ที่สามารถฟอกสีให้เป็นสีขาวได้คือปริมาณ 15 % เวลา 15 นาที จากการศึกษาลดสีโดยใช้ถ่านกัมมันต์พบว่าให้ปริมาณผลผลิตน้อยกว่าการไม่ฟอกสี ดังนั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการนำไปใช้ประโยชน์ หากต้องการนำผลิตภัณฑ์ไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางจำเป็นต้องทำการฟอกสี แต่ถ้านำไปใช้ผลิตภัณฑ์อื่นก็ไม่ต้องฟอกสีก็ได้

ตารางที่ 34 ค่าสี $L^* a^* b^*$ ของโปรตีนไฮโดรไลเซทผักแดงที่ได้จากการฟอกสีด้วยผงถ่านกัมมันต์ ปริมาณและเวลาต่าง ๆ

สิ่งทดลอง	ปริมาณ (%โดยนน.)	เวลา (นาที)	ค่าสี		
			L^*	a^*	b^*
1	10	15	51.82 c	30.27 a	8.90 cd
2	10	30	51.81 c	30.26 a	8.86 d
3	10	45	51.81 c	30.14 a	8.90 cd
4	15	15	59.15 b	27.62 b	9.10 bc
5	15	30	59.13 b	27.68 b	9.12 b
6	15	45	59.16 b	27.65 b	9.05 bcd
7	ไม่เติม (ควบคุม)		64.45 a	20.97 c	16.83 a

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

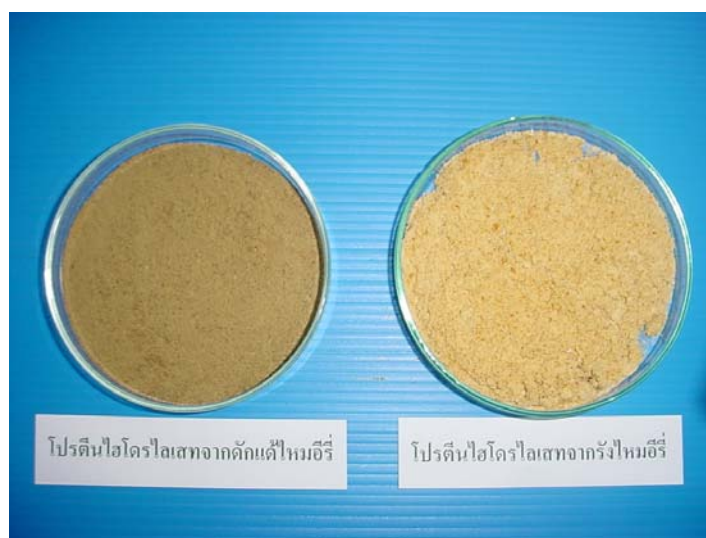


ภาพที่ 19 ผงโปรตีนไฮโดรไลสที่สกัดได้จากการฟอกสีด้วยผงถั่วเหลืองปริมาณและเวลาต่าง ๆ

5. คุณภาพของผลิตภัณฑ์

เมื่อทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองและสกัดด้วยผงถั่วเหลืองตามกรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสม แล้วนำไปทำแห้งโดยวิธีระเหยแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze dry) และบดให้ละเอียด พบว่า ผลิตภัณฑ์มีลักษณะดังภาพที่ 20 โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองมีความชื้น 7.34 % ไนโตรเจนทั้งหมด 10.08 % ไขมัน 0.62 % เถ้า 27.49 % มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองมีความชื้น 4.63 % ไนโตรเจนทั้งหมด 11.47 % ไขมัน 1.70 % เถ้า 11.97 % มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม โปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองมีปริมาณเถ้ามากกว่า เนื่องจากต้องใช้เกลือในการทำให้รั้งไหมละลายก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ จึงทำให้มีปริมาณเถ้ามากกว่าและทำให้มีสัดส่วนของปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลือง ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลืองและสกัดด้วยผงถั่วเหลืองได้ปริมาณไนโตรเจนผลิตได้ (% nitrogen recovery) 77.80 และ 62.82 % ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งสองไปทดสอบการละลายน้ำพบว่าสามารถละลายน้ำได้ดี จากการเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า "Promois®" ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นำเข้าจากประเทศญี่ปุ่น พบว่า ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้มีปริมาณ

ไนโตรเจนใกล้เคียงกับผลิตภัณฑ์ทางการค้าทั้ง 2 ชนิด แต่มีปริมาณต่ำกว่าเนื่องจากไม่ได้ทำการกำจัดเกลือออกก่อนการทำแห้ง จึงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำกว่าและมีปริมาณไนโตรเจนน้อยกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า



ภาพที่ 20 ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลสจากดักแด้ไหมและรังไหม

ตารางที่ 35 คุณภาพทางเคมี (proximate analysis) และคุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์

รายการ	โปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตได้		ผลิตภัณฑ์ทางการค้า	
			"Promois®"	
	รังไหม	ดักแด้	SILK-1000P ^{1/}	SERICIN-P ^{2/}
คุณภาพทางเคมี				
ความชื้น (%)	7.34	4.63	10.0	12.0
ไนโตรเจนทั้งหมด (%)	10.08	11.47	13.0	13.0
ไขมัน (%)	0.62	1.62	-	-
เถ้า (%)	27.49	11.97	3.0	-
คุณภาพทางจุลินทรีย์				
จุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/g)	< 100	< 100	-	-
ยีสต์และรา (CFU/g)	< 100	< 100	-	-

หมายเหตุ ^{1/} ได้จากการย่อยสลายไฟโบรอิน

^{2/} ได้จากการย่อยสลายเซรีซิน

จากการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสจากดักแด้มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระรวมมากกว่ารังไหม โดยโปรตีนไฮโดรไลสจากรังไหมมีโปรลีนมากที่สุด (1.71 %) รองลงมาคืออาร์จินีน ทรีโอนีน และซีสตี้น (0.85, 0.78 และ 0.73 % ตามลำดับ) ส่วน

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากดักแด้มียโรซีนมากที่สุด (1.77 %) รองลงมาคือฮิสติดีน เบนซิลอะลานีน ลูซีน และอาร์จินีน (1.57, 1.39, 1.33 และ 1.32 % ตามลำดับ)

ตารางที่ 36 ปริมาณกรดอะมิโนอิสระในผลิตภัณฑ์

กรดอะมิโน	จำนวนกรัมกรดอะมิโนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง	
	โปรตีนไฮโดรไลเซตทั้งหมด	โปรตีนไฮโดรไลเซตดักแด้มีย
กรดแอสพาทิก	0.02	0.76
ซีรีน	0.11	1.27
กรดกลูตามิก	0.08	1.20
กลัยซีน	0.12	0.39
ฮิสติดีน	0.58	1.57
อาร์จินีน	0.85	1.32
ทรีโอนีน	0.78	0.86
อะลานีน	1.02	1.01
โพรลีน	1.71	0.40
ซีสตีล	0.73	0.16
ทัยโรซีน	0.13	1.77
วาลีน	0.05	0.98
เมทไทโอนีน	0.05	0.57
ไลซีน	0.07	1.04
ไอโซลูซีน	0.06	0.69
ลูซีน	0.02	1.33
เพนนิลอะลานีน	0.03	1.39
รวม	6.41	16.70

6. การคำนวณต้นทุนการผลิต

6.1 ต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกุ้งไหมอีวี

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกุ้งไหมอีวีให้ได้ปริมาณ 100 g จะใช้ส่วนผสมประกอบไปด้วยกุ้งไหม 83.93 g, แคลเซียมไนเตรท 593.0 กรัม เอทานอล 385.02 กรัม เอนไซม์อัลคาเลส 14.0 ml, โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 N 302.85 ml และน้ำกลั่น 421.89 ml

6.1.1 ต้นทุนรวมของวัตถุดิบทั้งหมด

การคำนวณต้นทุนรวมของวัตถุดิบทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกุ้ง
ใหม่ 100 กรัม แสดงดังตารางที่ 37

ตารางที่ 37 ต้นทุนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกุ้งใหม่อีรี

วัตถุดิบ	ราคา	ปริมาณที่ใช้	ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท)
แคลเซียมไนเตรท	0.76 บาท/กรัม	593.0 กรัม	450.68
เอทานอล	0.0475 บาท/กรัม	385.02 กรัม	18.33
เอนไซม์อัลคาเลส	0.06 บาท/มล.	14.0 มล.	0.84
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 N	0.0106 บาท/มล.	302.85 มล.	3.21
น้ำกลั่น	0.01 บาท/มล.	421.89 มล.	4.22
ต้นทุนวัตถุดิบรวม			477.28/100 กรัม

หมายเหตุ ในการคำนวณต้นทุนวัตถุดิบไม่ได้นำค่ารังไหมอีรีมาคิดเนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์มาจาก
ภาควิชาชีววิทยา

6.1.2 การคำนวณต้นทุนทั้งหมด

$$\begin{aligned}
 \text{ต้นทุนทั้งหมด} &= \text{ต้นทุนวัตถุดิบ} + \text{ต้นทุนแรงงาน} + \text{ต้นทุนค่าใช้จ่ายอื่น ๆ} \\
 &= 477.28 + [0.32 \times (477.28/0.52)] + [0.16 \times (477.28/0.52)] \\
 &= 917.85 \text{ บาท/100 กรัม}
 \end{aligned}$$

6.2 ต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอีรี

ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอีรีให้ได้ปริมาณ 100 g จะใช้ส่วนผสมประกอบ
ไปด้วยดักแด้สด 796.53 g, เอนไซม์อัลคาเลส 11.28 ml โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 4 นอร์มัล
16.24 ml โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.5 นอร์มัล 196.48 ml และน้ำกลั่น 1,656.22 ml

6.2.1 ต้นทุนรวมของวัตถุดิบทั้งหมด

การคำนวณต้นทุนรวมของวัตถุดิบทั้งหมดที่ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกุ้ง
ใหม่ 100 กรัม แสดงดังตารางที่ 38

ตารางที่ 38 ต้นทุนวัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอีรี

วัตถุดิบ	ราคา	ปริมาณที่ใช้	ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท)
ดักแด้สด	0.04 บาท/กรัม	796.53 กรัม	31.86
เอนไซม์อัลคาเลส	0.06 บาท/มล.	11.28 มล.	0.677
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 N	0.0148 บาท/มล.	16.24 มล.	0.240
โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.5 N	0.0106 บาท/มล.	196.48 มล.	2.08
น้ำกลั่น	0.01 บาท/มล.	1656.22 มล.	16.56

ต้นทุนวัตถุดิบรวม	51.42/100 กรัม
-------------------	----------------

6.2.2 การคำนวณต้นทุนทั้งหมด

$$\begin{aligned}
 \text{ต้นทุนทั้งหมด} &= \text{ต้นทุนวัตถุดิบ} + \text{ต้นทุนแรงงาน} + \text{ต้นทุนค่าใช้จ่ายอื่น ๆ} \\
 &= 51.42 + [0.32 \times (51.42/0.52)] + [0.16 \times (51.42/0.52)] \\
 &= 98.88 \text{ บาท/100 กรัม}
 \end{aligned}$$

ตารางที่ 39 ราคาของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้เปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ทางการค้า

	ราคา (บาท/กิโลกรัม)
ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้	
โปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลี	9,178.5 ^{1/}
โปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลี	988.8 ^{1/}
ผลิตภัณฑ์ทางการค้า "Promois®" SERICIN-P	35,000 ^{2/}

หมายเหตุ^{1/}คิดจากต้นทุนทั้งหมดในการผลิตระดับห้องปฏิบัติการและสารเคมีเกรดวิเคราะห์(โดยประมาณ)

^{2/}ราคา ณ วันที่ 14 ม.ค. 2548

เมื่อเปรียบเทียบต้นทุนของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้กับราคาของผลิตภัณฑ์ทางการค้าซึ่งนำเข้ามาจากประเทศญี่ปุ่น พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีมีราคาต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้าประมาณ 4 เท่า ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีมีราคาต่ำกว่าผลิตภัณฑ์ทางการค้าประมาณ 35 เท่า

สรุปผลการวิจัย

1. องค์ประกอบทางเคมีของรังไหมอิตาลีประกอบด้วย โปรตีน 96.32 % เถ้า 3.22 % ความชื้น 4.26 % และไขมัน 1.55 % (โดยน้ำหนักสด) องค์ประกอบทางเคมีของดักแด้ไหมอิตาลี ประกอบด้วย ความชื้น 74.66 % โปรตีน 18.44 % ไขมัน 4.24 % และเถ้า 1.58 % (โดยน้ำหนักสด) ส่วนกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในรังไหมอิตาลี คือ อะลานีน 30.329 % รองลงมาคือ กลัยซีน 22.065 % ทัยโรซีน 8.363 % และซีรีน 7.653 % ในดักแด้ไหมอิตาลี กรดอะมิโนที่พบมากที่สุดคือ กรดกลูตามิก 1.408 % รองลงมาคือ กรดแอสปาร์ติก 1.001 % ลูซีน 0.892 % อะลานีน 0.871 % ไลซีน 0.820 % และ อาร์จินีน 0.806 % ซึ่งมีความใกล้เคียงกับคุณสมบัติของรังไหมป่า แต่แตกต่างจากรังไหมหม่อน

2. กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลี ได้แก่ การนำรังไหมมาละลายในสารละลาย $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ethanol/น้ำ อัตราส่วน 0.6/1/8 โมล ที่อุณหภูมิ 100°C โดยใช้สัดส่วนรังไหมต่อสารละลายเท่ากับ 6 : 100 จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 1.0 % ปริมาตร/น้ำหนัก อุณหภูมิ 60°C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เป็นเวลา 60 นาที

3. กรรมวิธีและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลี ได้แก่ การนำดักแด้ที่บดแล้วมาปรับให้มีปริมาณโปรตีน 4.6 % แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสปริมาณ 0.5 % ปริมาตร/น้ำหนัก อุณหภูมิ 50°C ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 เป็นเวลา 120 นาที

4. การลดสีในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีสามารถทำได้โดยการฟอกสีในสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเสทก่อนการทำแห้งด้วยผงถ่านกัมมันต์ปริมาณ 15 % โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 15 นาที

5. ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 10.08 % ไขมัน 0.62 % เถ้า 27.49 % ความชื้น 7.34 % จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 11.47 % ไขมัน 1.62 % เถ้า 11.97 % จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนยีสต์และราน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อกรัม ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังและดักแด้ไหมอิตาลีได้ปริมาณไนโตรเจนที่ผลิตได้ (% nitrogen recovery) 77.80 และ 62.82 % ตามลำดับ เมื่อนำผลิตภัณฑ์ทั้งสองไปทดสอบการละลายน้ำพบว่าสามารถละลายน้ำได้ดี

6. ต้นทุนการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากรังไหมอิตาลีให้ได้ปริมาณ 100 g มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 917.85 บาท ส่วนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากดักแด้ไหมอิตาลีให้ได้ปริมาณ 100 g มีต้นทุนการผลิตเท่ากับ 98.88 บาท

เอกสารอ้างอิง

- เข็มชัย เหมะจันทร์. 2530. **วิทยาการไหม เล่ม 1. คณะกรรมการส่งเสริมสินค้าไหมไทย กองอุตสาหกรรมสิ่งทอ กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ. แปลจาก ไมโตอิ มินะกาว่า.**
- พรณี ศรีบรรเทา. 2530. **เทคนิคการปลูกหม่อนเลี้ยงไหมสำหรับประเทศไทย ไหมพันธุ์ลูกผสมต่างประเทศ. คณะกรรมการส่งเสริมสินค้าไหมไทย กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม**
- พิลาณี ไวถนอมสัตย์, สุคันธรส ธาดากิตติสาร, กำพล สุขแดง, ณัฐกานต์ แซ่ไคว้, อรุณศิริ กำลิ่ง, จันทร จรัส วีรสาร, จงรักษ์ จันทรเจริญสุข และปริศนา สิริอาษา. 2546. **การวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตแลปยูอินทรีย์. การประชุมวิชาการ ประจำปี 2546 สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร**
- พิเชียร เดชเดโช และนิรมล วิลามาศ. 2532. **การปรับปรุงการลอกกาสำหรับไหมไทย. Senior Project ชั้นปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**
- _____. 2535. **เอกสารวิชาการไหมไทย. กรมวิชาการเกษตร จัดพิมพ์ชุดเกล้าฯถวายสมเด็จพระนางเจ้าสิริกิติ์พระบรมราชินีนาถ ในวโรกาสมหามงคลเฉลิมพระชนมพรรษาครบ 5 รอบ**
- Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein.** Elsevier Applied Science Publishers Ltd., London.
- AOAC. 2000. **Official Method of Analysis of AOAC International.** 17th ed. Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg, Md.
- Bjorn, L., R. Nirtvedt, E. Lied and M. Espe. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L) frames by ProtamexTM protease. **Process Biochemistry.** 37: 1263-1269.
- Chang-Kee, H., J. Yuk-Hyun, L. Sung-Hee, P. Geum-Ju, C. Deock-Hyoung. 2002. Anticancer agents containing antigenotoxic and immunostimulative peptides produced from the hydrolysate of silkworm cocoon. **Patent No. WO02076487.**
- Chen, X., D.P. Knight, Z. Shao and F. Vollrath. 2001. Regenerated Bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR. **Polymer.** 42: 9969-9974.
- Hess, S., Jacco van Beek and Pannell, L.K. 2002. Acid hydrolysis of silk fibroins and

- determination of the enrichment of isotopically labeled amino acids using precolumn derivatization and high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**. 311: 19-26
- Kato, N. et al. 1997. Silk Protein, Inhibits Lipid Peroxidation and Tyrosinase Activity. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 62(1): 145-147
- Kum-Ju Park, Hai-Hong Jin and Chang-Kee Hyun. 2002. Antigenotoxicity of peptides produced from silk fibroin. **Process Biochemistry**. 38: 411-418
- Mishra, N., N.C. Hazarika, K. Narain, J. Mahanta. 2003. Nutritive value of non-mulberry silkworm pupae and consumption pattern in Assam, India. **Nutrition Research**. 23: 1303-1311.
- Niinimäki, A., Niinimäki, M. and Mäkinen-Kiljunen, S. 1997. Contact urticaria to protein Hydrolysate. *Symposia-The Contact Urticaria Syndrome*. P S44.
- Otoi, K. and H. Matsubara. 1980. Process for producing a fine powder of silk fibroin. **US Patent 4,233,212**.
- Shahidi, F., Han, X-Q. and Synowieck, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**. 53: 285-293.
- Shanhu, T., N.S. Hettiarachchy and T.H. Shellhammer. 2002. Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. **J. Agric. Food Chem.** 50: 7444-7448.
- Wechasetanon, S. and Prokoe, M. 1991. **Recent Research of Silk**. Senior Project of Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University.
- Yamada, H., H. Nakao, Y. Takasu and K. Tsubouchi. 2001. Preparation of undegraded native molecular fibroin solution from silkworm cocoons. **Materials Science & Engineering**. 14: 41-46.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

กำลังอยู่ในขั้นตอนการขอจดสิทธิบัตรเพื่อรักษาทรัพย์สินทางปัญญา

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำโครงการไปใช้ประโยชน์

ดำเนินงานวิจัยต่อยอดจากโครงการนี้โดยการนำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ไปใช้ประโยชน์เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม (อยู่ระหว่างขั้นตอนการเขียนข้อเสนอโครงการ)

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่วางแผนและผลที่ได้รับ

แผนงาน	ผลที่ได้รับ
1. วิเคราะห์สมบัติของวัตถุดิบ (เส้นไหม และดักแด้ไหม) ที่น่าจะใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ได้แก่ -ปริมาณเถ้า โดยวิธีมาตรฐานของ AOAC 1990 -ปริมาณโปรตีน โดยวิธีมาตรฐานของ AOAC 1990 -ปริมาณไขมัน โดยวิธีมาตรฐานของ AOAC 1990 -ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดโดยเครื่อง HPLC	1. ได้สมบัติทางเคมี (ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และกรดอะมิโนอิสระ) ของวัตถุดิบที่จะใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต
2. หาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไหมอริ -กรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อย -ชนิดและปริมาณเอนไซม์ -ปริมาณสับสเตรท -อุณหภูมิ -ค่า pH -ระยะเวลาในการย่อย	2. ได้สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากไหมอริ ได้แก่ กรรมวิธีการเตรียมตัวอย่างก่อนการย่อย ชนิด ปริมาณเอนไซม์ ปริมาณสับสเตรท อุณหภูมิ ค่า pH และเวลาในการย่อยที่เหมาะสม
3. นำโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ไปทำให้แห้งหรือเข้มข้นขึ้นโดยวิธีการ freeze-drying	3. ได้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตจากไหมอริชนิดผง
4. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้ในข้อที่ 3	4. ได้สมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้และจากการค้า
5. เปรียบเทียบปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และน้ำหนักโมเลกุล ของโปรตีนไฮโดรไลเซตไหมทางการค้า กับผลิตภัณฑ์ที่ได้ในข้อ 3	5. ได้สมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตทางการค้า
6. คำนวณต้นทุนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตในระดับห้องปฏิบัติการ	6. ได้ต้นทุนในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตในระดับห้องปฏิบัติการโดยประมาณ
7. เขียนรายงานผลการทดลอง เพื่อสรุปเป็นแนวทางในการ	7. ได้สรุปและรายงานผลการทดลองฉบับสมบูรณ์ 1 ปี

ทำวิจัยต่อไปในอนาคต	
---------------------	--