



สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณโปรตีนสูง  
จากหอยตลับ (*Meretrix casta*) โดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง  
Optimization of High Protein Content Protein Hydrolysate  
Extraction from Hard Clam (*Meretrix casta*)  
Using Response Surface Methodology

นพรัตน์ มะเห<sup>1\*</sup> ดาริกา อวะภาค<sup>2</sup> และ ดลฤดี พิชัยรัตน์<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณโปรตีนสูงจากหอยตลับโดยใช้วิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วยอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากไอออน ความเข้มข้นของเอนไซม์ protamex และระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex การศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ กำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ทำการผลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับและตรวจสอบปริมาณโปรตีน ผลการทดสอบทางสถิติพบว่า ตัวแปรอิสระสองตัวแปรคือ อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากไอออน ( $X_1$ ) และ ปริมาณของเอนไซม์ protamex ( $X_2$ ) มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสต ( $Y$ ) จากหอยตลับ ( $p < 0.05$ ) สำหรับเทอมเชิงเส้น สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงคือ อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากไอออน เท่ากับ 1:8 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ปริมาณของเอนไซม์ Protamex ร้อยละ 1.5 และ ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex เท่ากับ 5.5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 84.97 มิลลิกรัมอัลบูมิน/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสต

<sup>1</sup>ภาควิชาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

<sup>2</sup>ภาควิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 92150

\*Corresponding Author, E-mail: mnopparat@hotmail.com

## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the optimum condition for high protein content protein hydrolysate extraction from hard clam using Response Surface Methodology. Three independent variables were ratio of water to hard clam meat, enzyme (protamex) concentration and extraction time. Box-Behnken design was used for experimental design. After protein hydrolysate production from hard clam, protein content was evaluated. The statistical analysis indicated two variables, linear of ratio of water to hard clam meat ( $X_1$ ) and enzyme (protamex) concentration ( $X_2$ ) had significant effects on protein content of protein hydrolysate ( $p < 0.05$ ). The optimum condition for high protein content protein hydrolysate ( $Y$ ) were: ratio of water to hard clam meat was 1:8, enzyme (protamex) concentration was 1.5% and extraction time was 5.5 hours. Under these conditions, the predicted protein of protein hydrolysate was 84.97 mg albumin / ml protein hydrolysate.

**คำสำคัญ:** วิธีการพื้นผิวตอบสนอง หอยตลับ โปรตีนไฮโดรไลเสต

**Keywords:** Response surface methodology, Hard clam, Protein hydrolysate

## บทนำ

หอยตลับ หรือ Hard clam (*Meretrix casta*) มีชื่อเรียกตามท้องถิ่นต่าง ๆ แตกต่างกันไป เช่น หอยปากหนา หอยปะ เป็นต้น เป็นหอยทะเลที่พบได้ในบางพื้นที่บริเวณชายฝั่งของจังหวัดตรัง โดยจะพบมากในอำเภอกันตัง และอำเภอยะเผลย จังหวัดตรัง หอยตลับถือเป็นหอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของจังหวัดตรัง จึงมีการนำหอยตลับมาใช้ประโยชน์ค่อนข้างสูง โดยชาวประมงจะนำหอยตลับมาจำหน่ายใน 2 รูปแบบคือ หอยสดทั้งตัว และหอยแกะเนื้อ ในราคาที่ไม่สูงมาก การนำเนื้อหอยมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อใช้ประโยชน์ต่อด้านต่าง ๆ เช่น นำมาผลิตเป็นซอสหอยแทนหอยนางรม จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับหอยตลับ และสร้างผลิตภัณฑ์ใหม่จากหอยตลับ

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์น้ำในระยะแรก ส่วนใหญ่เป็นการย่อยด้วยวิธีการทางเคมี

ซึ่งให้ผลที่ไม่ค่อยดีในแง่ของ คุณค่าทางโภชนาการ โปรตีน และกรดอะมิโน (Shahidi et al., 1999) ต่อมากระบวนการผลิตได้มีการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตแทน (Nilsang et al., 2005; Guerard et al., 2007) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์นั้น โปรตีนที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทำให้โนโตรเจนสามารถละลายได้มากกว่า และส่งผลต่อกรดอะมิโนอิสระ ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้เป็นแหล่งที่ดีของกรดอะมิโน (Espe et al., 1989; Vidotti et al., 2003) การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์น้ำมีการศึกษาอย่างกว้างขวาง (Thiansilakul et al., 2007; Nalinanon et al., 2011; Benhabiles et al., 2012; Nazeer et al., 2012) สำหรับการศึกษาโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยนั้น จากการศึกษาของ Wang et al. (2008) ซึ่งเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยการย่อยหอยนางรม (*Crassostrea talienwhanensis* Crosse) ด้วย

เอนไซม์เปปซิน และเมื่อทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลสเลพบว่าเป็นเปปไทด์ซึ่งมีลำดับเป็น Val-Val-Tyr-Pro-Trp-Thr-Gln-Arg-Phe มีคุณสมบัติในการยับยั้ง ACE ได้ โดย ACE inhibitors คือ ตัวยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ติง เอนไซม์ (angiotensin-converting enzyme) เป็นกลุ่มยาที่ใช้รักษาเบื้องต้นใน โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) และหัวใจล้มเหลวแบบเลือดคั่ง (congestive heart failure)) โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 66 ไมโครโมล/ลิตร และเปปไทด์ดังกล่าวยังมีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิต เมื่อศึกษาในหนูทดลองที่ระดับ 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม การทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลสเลจากหอยนางรมเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการลดความดันโลหิตได้ นอกจากนั้นโปรตีนไฮโดรไลสเลจากสัตว์น้ำยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ โดย Wang et al. (2014) พบว่าเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลสเลจากหอยนางรม (*Crassostrea talienwhanensis*) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 518 และ 440 Da มีลำดับของกรดอะมิโนเป็น proline-valine-methionine-glycine-aspartic acid (PVMGA) และ glutamine-histidine-glycine-valine (QHGV) ตามลำดับ มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง ส่วนโปรตีนไฮโดรไลสเลจากปลา นั้น จากการศึกษาของ Nazeer et al. (2012) พบว่าเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสเลของปลา croaker (*Otolithes ruber*) ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 861.6 Da และมีลำดับกรดอะมิโนเป็น Lys-Thr-Phe-Cys-Gly-Arg-His มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาการสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเลจากหอยตลับในครั้งนี้เลือกใช้ เอนไซม์ Protamex ซึ่งเป็น serine endoprotease ในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเล เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีข้อดีคือสามารถใช้กับสัตว์น้ำและอาหารทะเล

ทุกชนิด เพื่อผลิตสารสกัดโปรตีนจากสัตว์น้ำ (fish protein extract) ซึ่งสารสกัดโปรตีนที่ได้ จะมีการดอะมิโนสูง ไขมันต่ำ สามารถใช้ในการผลิตอาหารสัตว์หรือเป็นส่วนผสมในอาหารได้ (Novozymes, 2015)

วิธีการพื้นผิวตอบสนอง (response surface methodology: RSM) เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพในการหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต RSM เป็นการใช้เทคนิคทางสถิติและคณิตศาสตร์ที่ค่อนข้างประสบความสำเร็จในการวัดผลของหลายๆปัจจัย เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมของกระบวนการผลิต (Atkinson and Donev, 1992) มีการนำ RSM มาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยหลายด้าน เช่น ด้านอาหารและทางด้านเภสัช (Ibanoglu and Ainsworth, 2004; Varnalis et al., 2004) เป็นต้น ข้อดีที่สำคัญของ RSM คือ ช่วยลดจำนวนชุดทดลอง ที่ใช้ในการประเมินตัวแปรหลายตัว รวมทั้งปฏิสัมพันธ์ของตัวแปรเหล่านั้น ดังนั้นการใช้ RSM จึงช่วยประหยัดแรงงาน และเวลา กว่าวิธีการอื่นๆที่ต้องการหาสภาวะที่เหมาะสม (Giovanni, 1983) การทดลองครั้งนี้ออกแบบการทดลองแบบบ็อกซ์-เบนเคนเคน (Box Benken Design: BBD) ซึ่งข้อดีของ BBD คือ ต้องการชุดการทดลองที่น้อยเมื่อเทียบกับ fractional factorial design (FFD) หรือ central composite design: CCD) กรณีจำนวนปัจจัย (factor) เท่ากัน นอกจากนั้น BBD ยังสามารถมองได้ภาพกว้าง (Rotatable) เมื่อไม่สนใจจำนวนของปัจจัยภายใต้สภาวะที่ศึกษา (Ray et al., 2010)

การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลสเลให้มีปริมาณโปรตีนสูงด้วยเทคนิคพื้นผิวตอบสนอง (RSM) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลสเลที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ในงาน

ต่าง ๆ ได้อย่างมากมาย โดยเฉพาะในวงการอุตสาหกรรมอาหาร

## วิธีการทดลอง

### 1. การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตและสารสกัดด้วยน้ำจากหอยตลับ

เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยดัดแปลงวิธีการของ Tsai et al. (2008) นำหอยตลับทั้งตัวที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้วมาเติมน้ำอัตราส่วน 1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 40 นาที เนื้อหอยที่ได้นำมาทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) นำเนื้อหอยที่ผ่านการทำแห้งมาบดให้ละเอียด แล้วผสมน้ำปราศจากอ็อกซิเจนปริมาณ 10 เท่าของปริมาณผงหอย ปั่นเป็นเวลา 2 นาที แล้วต้มเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมเอนไซม์ protamex ความเข้มข้นร้อยละ 0.5, 1 และ 1.5 (อัตราส่วนเอนไซม์ต่อเนื้อหอยตลับเท่ากับ 1 : 100) ลงในเนื้อหอยบดที่มีสัดส่วนของผงเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจนเท่ากับ 1:8, 1:10 และ 1:12 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4.5, 5 และ 5.5 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ แยกส่วนที่ไม่ละลายออกโดยการนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9000 rpm เป็นเวลา 20 นาที นำสารละลายส่วนบนมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 สารละลายที่ได้คือโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์ต่อไป

### 2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับ

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับ โดยการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้จากเนื้อหอยตลับ ออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่

มี 3 ปัจจัย คือ อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน ( $X_1$ ) ความเข้มข้นของเอนไซม์ protamex ( $X_2$ ) และระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex ( $X_3$ ) ซึ่งมีขั้นตอนในการดำเนินการ ดังนี้

#### 2.1 การทดลองเพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยจากแบบจำลอง

##### 2.1.1 การกำหนดระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

การกำหนดระดับของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย โดยพิจารณาจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง การทดลองเบื้องต้น และข้อจำกัดของเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลองมี 3 ระดับ คือ ระดับต่ำ (-1) ระดับกลาง (0) และระดับสูง (1) ดังแสดงในตารางที่ 1

##### 2.1.2 การออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน

ในการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับ ได้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Minitab กำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย แต่ละปัจจัยมี 3 ระดับ และมีการทำซ้ำ 5 ครั้ง (repeat) ดังนั้นจึงมีจำนวนหน่วยการทดลองทั้งหมด 17 หน่วยการทดลอง ดังตารางที่ 2

##### 2.1.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับ

ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับตามลำดับการทดลองที่กำหนดไว้ในข้อ 2.1.2 โดยทำการผลิตตามวิธีการในข้อ 1

##### 2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ

นำผลผลิตที่ได้จากข้อ 2.1.3 มาหาปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ โดยวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Folin-Lowry method

(Lowry, et al., 1951; Cooper, 1977) เตรียม ตัวอย่างโดยนำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางด้วยความ Reagent A โดยใช้สารละลาย สารละลาย Sodium เข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับ carbonate  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ร้อยละ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน สารละลาย alkaline-copper reagent (Reagent C) Sodium Hydroxide ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที Reagent B โดยใช้ สารละลาย Copper sulphate จากนั้นเติม Folin-Ciocalteu's phenol reagent  $\text{CUSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  ร้อยละ 0.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งสารละลายไว้ sodium tartarate ความเข้มข้นร้อยละ 1 จากนั้น เป็นเวลา 30 นาที (เกิดสีน้ำเงิน) วัดค่าการดูดกลืน เตรียม Reagent C หรือสารละลาย Alkaline copper แสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ปริมาณของ โดยผสม Reagent A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ โปรตีนที่ละลายได้คำนวณโดยใช้ bovine serum Reagent B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ albumin เป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ 1 ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ		
	-1	0	1
$X_1$ : อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากไอออน (น้ำหนัก/น้ำหนัก)	1:8	1:10	1:12
$X_2$ : ความเข้มข้นของเอนไซม์ Protamex (ร้อยละ)	0.5	1	1.5
$X_3$ : ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex (ชั่วโมง)	4.5	5	5.5

ตารางที่ 2 ลำดับการทดลองของการออกแบบการทดลองแบบบล็อกซ์-เบห์นเคน ที่มี 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ และมีการทำซ้ำ 5 ครั้ง

StdOrder	RunOrder	PtType	Blocks	$X_1$	$X_2$	$X_3$
8	1	2	1	1	0	1
1	2	2	1	-1	-1	0
12	3	2	1	0	1	1
4	4	2	1	1	1	0
15	5	0	1	0	0	0
17	6	0	1	0	0	0
3	7	2	1	-1	1	0
13	8	0	1	0	0	0
6	9	2	1	1	0	-1
14	10	0	1	0	0	0
11	11	2	1	0	-1	1
2	12	2	1	1	-1	0
5	13	2	1	-1	0	-1
16	14	0	1	0	0	0
7	15	2	1	-1	0	1
10	16	2	1	0	1	-1
9	17	2	1	0	-1	-1

## 2.2 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

### 2.2.1 ตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

2.2.1.1 ตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจงของส่วนตกค้าง

2.2.1.2 ตรวจสอบความเป็นอิสระของส่วนตกค้าง

2.2.1.3 ตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวนของส่วนตกค้าง

2.2.2 วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-Square: R-Sq)

2.2.3 วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)

2.2.4 สร้างสมการทำนาย

2.2.5 สร้างพื้นผิวตอบสนอง

2.2.6 หาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

## ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

### 1 ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากเนื้อหอยตลับ

จากการศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีน ทั้ง 17 หน่วยการทดลอง ผลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับของแต่ละหน่วยการทดลอง

ลำดับการทดลอง	อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกโซน ( $X_1$ ) (กรัม/กรัม)	ปัจจัยที่ศึกษา		ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมอัลบูมิน/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสต)
		ปริมาณของเอนไซม์ protamex ( $X_2$ ) (%)	ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex ( $X_3$ ) (ชั่วโมง)	
1	1:12	1	5.5	32.03
2	1:8	0.5	5	54.53
3	1:10	1.5	5.5	71.23
4	1:12	1.5	5	49.93
5	1:10	1	5	63.78
6	1:10	1	5	66.48
7	1:8	1.5	5	81.88
8	1:10	1	5	62.93
9	1:12	1	4.5	44.43
10	1:10	1	5	53.83
11	1:10	0.5	5.5	50.38
12	1:12	0.5	5	32.68
13	1:8	1	4.5	68.78
14	1:10	1	5	42.53
15	1:8	1	5.5	67.63
16	1:10	1.5	4.5	67.58
17	1:10	0.5	4.5	53.88

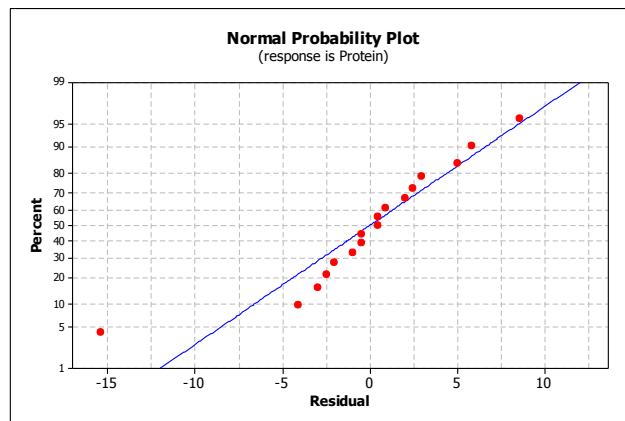
## 2. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

### 2.1 การตรวจสอบความถูกต้องของแบบจำลอง

จากการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 17 หน่วยทดลอง และนำผลการทดลองที่ได้มาตรวจสอบคุณภาพของข้อมูลว่ามีความเหมาะสมหรือไม่ด้วยการวิเคราะห์ความถูกต้องของแบบจำลอง หากข้อมูลมีความเหมาะสมจึงนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจ (R-square: R-Sq) และวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) การตรวจสอบคุณภาพข้อมูลมี 3 ขั้นตอนคือ (1) การตรวจสอบการกระจายแบบแจกแจง

ปกติ (2) การตรวจสอบความเป็นอิสระของข้อมูล (3) การตรวจสอบความเสถียรของความแปรปรวน

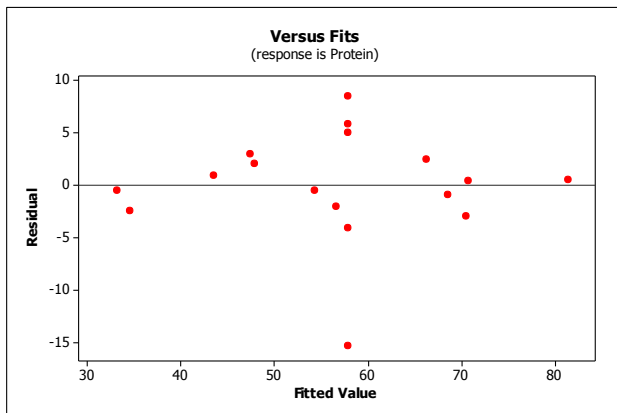
จากการตรวจสอบความถูกต้องของรูปแบบการทดลองพบว่า ค่าส่วนตกค้างของข้อมูลที่ได้จากการทดลองเป็นไปตามสมมติฐานทั้ง 3 ข้อ คือ (1) ส่วนตกค้างมีการแจกแจงแบบปกติ (2) ค่าส่วนตกค้างมีความเป็นอิสระต่อกัน และ (3) ค่าความแปรปรวนมีเสถียรภาพ จึงสรุปได้ว่าข้อมูลที่ได้จากการทดลองชุดนี้มีความถูกต้องและเหมาะสมสำหรับการนำไปวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ของการตัดสินใจและวิเคราะห์ความแปรปรวน ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1-3



รูปที่ 1 กราฟความน่าจะเป็นแบบปกติของส่วนตกค้าง



รูปที่ 2 แผนภูมิการกระจายของส่วนตกค้างกับลำดับของข้อมูล



รูปที่ 3 แผนภูมิการกระจายส่วนตกค้างในแต่ละระดับของปัจจัย

2.2 การสร้างสมการทำนายปริมาณโปรตีน

ในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับ

จากการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์ของสมการถดถอยของปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับพบว่า ค่า R-Sq มีค่าเท่ากับ 86.03% แสดงว่า อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิจีน ปริมาณของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex สามารถอธิบายความผันแปรหรือการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนได้ร้อยละ 86.03 โดยอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิจีน และปริมาณของเอนไซม์มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับ (p<0.05) และสามารถนำไปสร้างสมการทำนายเพื่อหาค่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับได้ ดังนี้

$$\begin{aligned}
 Y = & 57.9050 - 14.2187 X_1 + 9.8938 X_2 - \\
 & 1.6750 X_3 - 5.3525 X_1^2 + 2.1975 X_2^2 \\
 & + 0.6600 X_3^2 - 2.5250 X_1 X_2 - 2.8125 \\
 & X_1 X_3 + 1.7875 X_2 X_3 \quad (1)
 \end{aligned}$$

เมื่อ Y = ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับ (มิลลิกรัมอัล-บูมิน/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลส)

$X_1$  = อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำ

ปราศจากอ็อกซิจีน (Ratio = 1:8 – 1:12)

$X_2$  = ปริมาณของเอนไซม์ protamex

(%Enzyme = 0.5 – 1.5)

$X_3$  = ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์

protamex (Time = 4.5-5.5 ชั่วโมง)

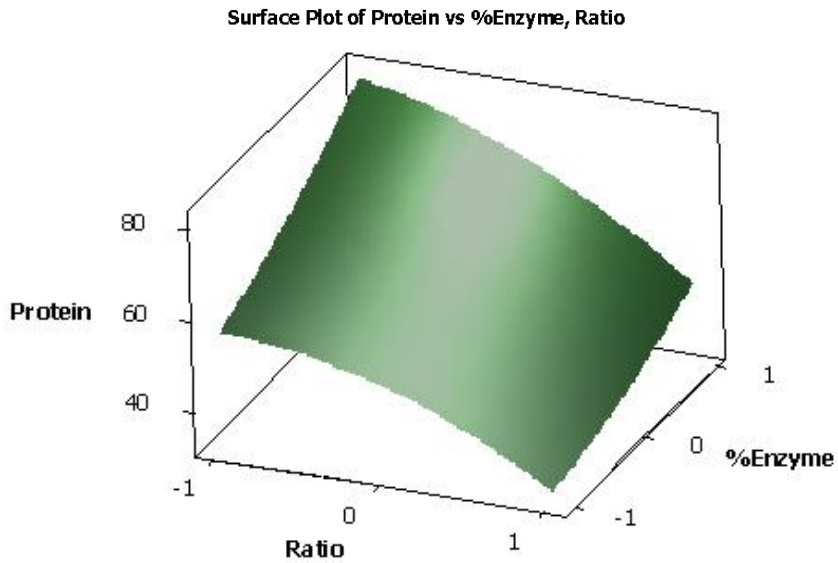
เมื่อพิจารณาการขาดความเหมาะสมของสมการ (lack of fit) พบว่าค่า P-value ของ lack of fit มีค่าเท่ากับ 0.930 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ทำให้สามารถสรุปได้ว่า แบบจำลองนี้มีความพอเพียงของตัวแปรในสมการ ดังนั้นจึงสามารถนำสมการข้างต้นมาใช้ในการทำนายปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับได้

2.3 การสร้างพื้นผิวตอบสนองของปริมาณ

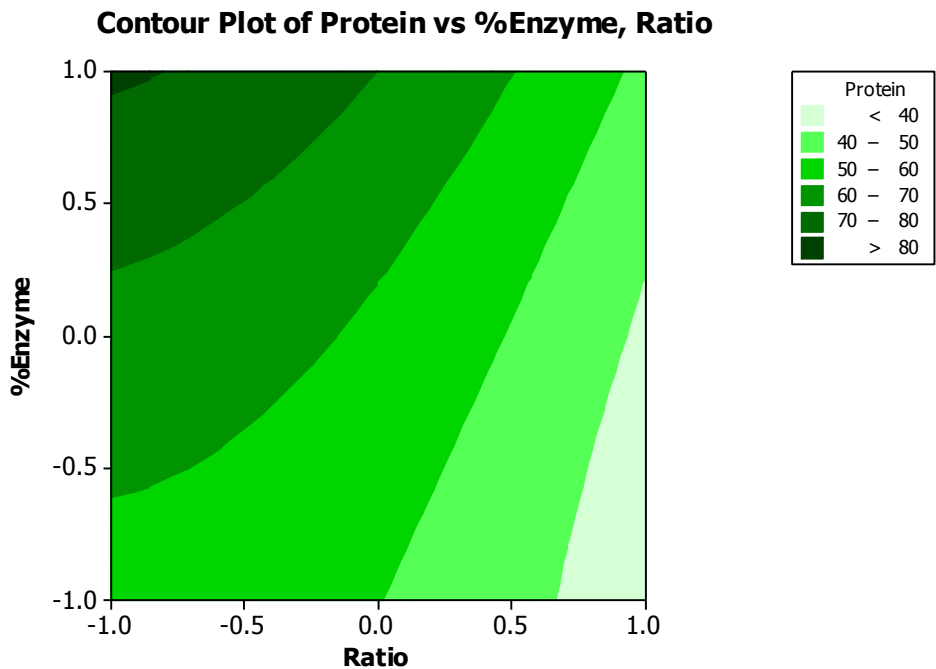
โปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับ

แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ หรือสมการสำหรับทำนายปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับที่ได้ สามารถนำมาสร้างกราฟพื้นผิวผลตอบโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลสได้จากหอยตลับและกราฟโครงร่างได้ดังรูปที่ 4-9

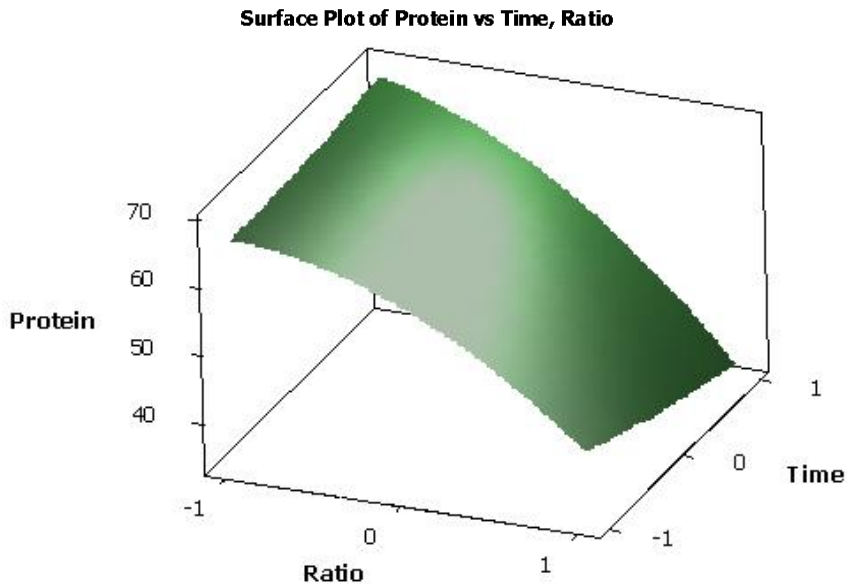




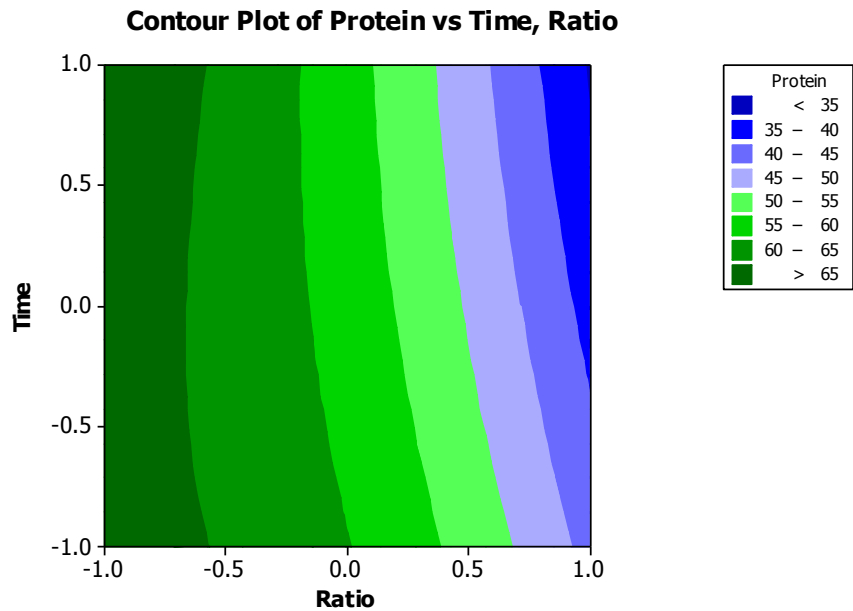
**รูปที่ 4** พื้นผิวผลตอบปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกอน และปริมาณของเอนไซม์ protamex



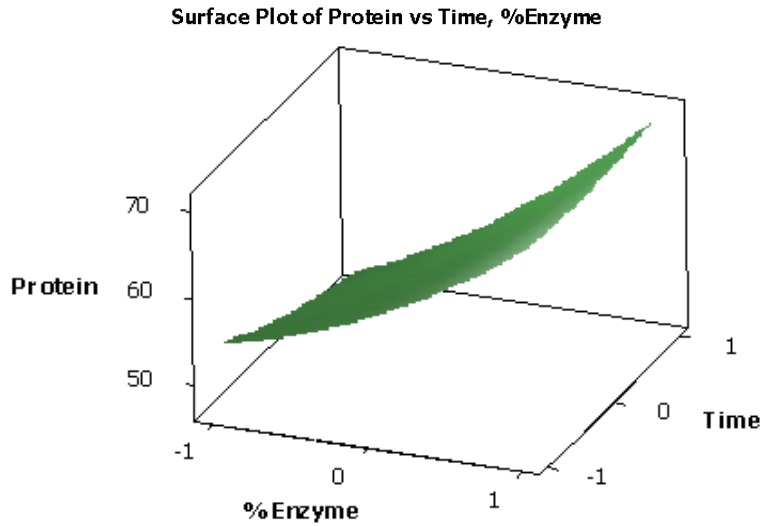
**รูปที่ 5** กราฟโครงร่างปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกอน และปริมาณของเอนไซม์ protamex



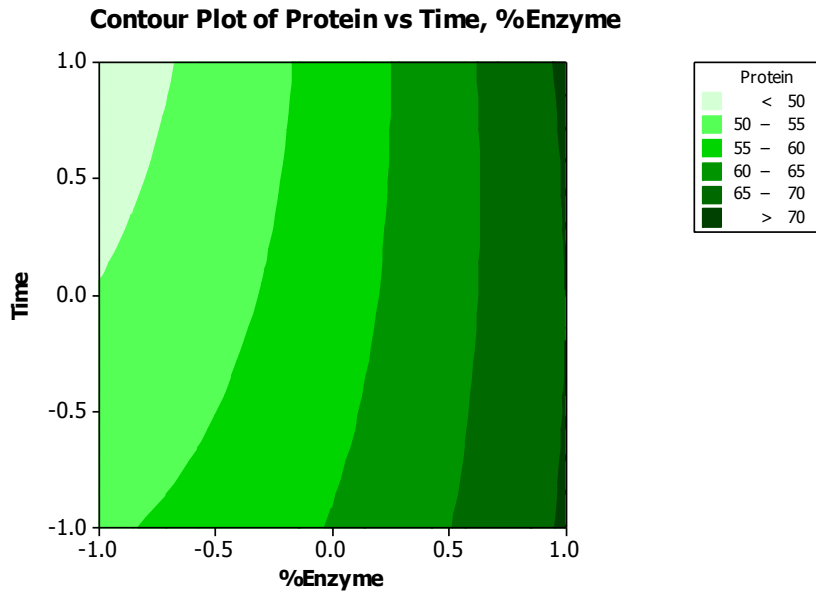
รูปที่ 6 พื้นผิวผลตอบปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้ง ต่อระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex



รูปที่ 7 กราฟโครงร่างปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้ง ต่อระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex



รูปที่ 8 พื้นผิวผลตอบปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างปริมาณของเอนไซม์ protamex ต่อระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex



รูปที่ 9 กราฟโครงร่างปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตระหว่างปริมาณของเอนไซม์ protame ต่อระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex

จากกราฟแสดงพื้นผิวผลตอบ (รูปที่ 4) และกราฟโครงร่าง (รูปที่ 5) ของปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ ระหว่างอัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกอน และปริมาณของเอนไซม์ Protamex โดยกำหนดให้ระยะเวลาในการ

ย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex อยู่ที่ระดับกลาง พบว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกอนลดลง (หรือตัวอย่างมีปริมาณน้ำน้อยลง ปริมาณเนื้อหอยมากขึ้น) และปริมาณของ

เอนไซม์ Protamex เพิ่มขึ้น แสดงว่า ถ้าต้องการผลิต โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณโปรตีนสูง ต้องใช้อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน (หรือตัวอย่างที่มีปริมาณน้ำน้อยลง ปริมาณเนื้อหอยมากขึ้น) และใช้เอนไซม์ที่มีความเข้มข้นสูง

ส่วนรูปที่ 6-9 แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยในเรื่อง อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ ในขณะที่ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ และรูปที่ 8-9 แสดงให้เห็นว่า ปัจจัยในเรื่อง ปริมาณของเอนไซม์ Protamex มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ ในขณะที่ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex ไม่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากหอยตลับ สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น ประกอบด้วย 1) ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate concentration) 2) ความเข้มข้นของเอนไซม์ 3) ผลของพีเอช 4) ผลของอุณหภูมิ 5) ความเข้มข้น และ กิจกรรม ของ น้ำ (Water activity/concentration) 6) ผลของตัวเร่ง (Catalyze) (Whitaker, 1996) จากการศึกษาครั้งนี้ ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเสตคือ อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน และ ปริมาณของเอนไซม์ Protamex ซึ่งคือ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ตามลำดับ

เมื่อไม่นานมานี้ความสนใจเกี่ยวกับเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptides) จากสัตว์ทะเลได้รับความสนใจกว้างขวางขึ้น (Harnedy and Fitzgerald, 2012; Kim and Wijesekara, 2010) โดยการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการผลิต bioactive

peptides จากแหล่งของโปรตีน (Bernardini et al., 2011; Thiansilakul et al., 2007) ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสตจึงถือเป็นแหล่งของ เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Je et al., 2005; Qian et al., 2008) การศึกษาสภาวะในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตในครั้งนี้ จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อใช้ในการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

## 2.4 การหาปัจจัยที่เหมาะสมที่สุด

การหาค่าปัจจัยที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนจากหอยตลับมากที่สุด โดยใช้ฟังก์ชัน response optimizer ในโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ และวัดความพึงพอใจโดยรวมของผลตอบ (composite Desirability: D) ซึ่งค่าความพึงพอใจของผลตอบมีค่าเท่ากับ 1 หมายถึงผลตอบนั้นได้รับความพึงพอใจอย่างสมบูรณ์ ผลการทดสอบมีดังนี้

- $X_1$  : อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน (น้ำหนัก/น้ำหนัก) เท่ากับ 1:8
- $X_2$  : ปริมาณของเอนไซม์ Protamex (ร้อยละ) เท่ากับ 1.5
- $X_3$  : ระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Protamex (ชั่วโมง) เท่ากับ 5.5

โดยได้โปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 84.97 (มิลลิกรัมอัลบูมิน/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสต)

## สรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณโปรตีนสูงจากหอยตลับ ด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง โดยการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยต่าง ๆ กำหนดลำดับการทดลองและออกแบบการทดลองแบบ บ็อกซ์-เบห์นเคน พบว่า สภาวะที่

เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ให้ปริมาณโปรตีนสูงคือ อัตราส่วนของเนื้อหอยแห้งต่อน้ำปราศจากอ็อกซิเจน เท่ากับ 1:8 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ปริมาณของเอนไซม์ protamex ร้อยละ 1.5 และระยะเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ protamex เท่ากับ 5.5 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะดังกล่าวสามารถโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีโปรตีนสูงสุด เท่ากับ 84.97 มิลลิกรัมอัลบูมิน/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเสต สภาวะที่ได้จากการศึกษานี้ก็นำไปใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เพื่อใช้ในการผลิตซอสหอย ทดแทนหอยนางรม อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สามารถนำไปประยุกต์ในงานต่าง ๆ ได้อย่างมากมาย โดยเฉพาะในวงการอุตสาหกรรมอาหาร

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย สำหรับทุนอุดหนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

ประไพศรี สุทัศน์ ณ อยุธยา และ พงศ์ชนัน เหลืองไพบุลย์. (2551). การออกแบบและการวิเคราะห์การทดลอง. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ท็อป. หน้า 277-280.

Atkinson, A. C. and Donev, A. N. (1992). Optimum experimental designs. Oxford: Oxford University Press. pp. 132-189.

Benhabiles, M. S., Abdi, N., Drouiche, N., Lounici, H., Pauss, A., Goosen, M.F.A. and Mameri, N. (2012). Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. Materials Science and Engineering C 32: 922-928.

Bernardini, R. D., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M. and Maria, H. (2011). Antioxidant and antimicrobial

peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chemistry. 124: 1296-1307.

Cooper, T.G. (1977). The Tools of Biochemistry. New York: Wiley, J. and Sons Inc.

Espe, M., Raa, J. and Njaa, L.R. (1989). Nutritional value of stored fish silage as protein source of young rats. Journal of the Science of Food and Agriculture. 49: 259-270.

Giovanni, M. (1983). Response surface methodology and product optimization. Food Technology. 37: 41-45.

Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufossé, L. (2007). Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. Process Biochemistry 42: 1486 - 1491.

Harnedy, P.A. and Fitzgerald, R.J. (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods 4: 6-24.

Ibanoglu, S., and Ainsworth, P. (2004). Effect of canning on the starch gelatinization and protein in vitro digestibility of tarhana, a wheat flour-based mixture. Journal of Food Process Engineering 64: 243-247.

Je, J. Y., Park, P. J., and Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from a laska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Research International 38: 45-50.

Kim, S.K. and Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. Journal of Functional Foods 2: 1-9.

- Lowry, O.H., Resebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265–75.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry* 124: 1354–1362.
- Nazeer, R.A., Sampath Kumar, N.S. and Ganesh, R. J. (2012). In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides* 35: 261–268.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A. (2005). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Fish Soluble Concentrate by Commercial Proteases. *Journal of Food Engineering* 70(4): 571-578.
- Novozymes. (2015). Protamex® Fresh thinking for fish processing. Available Source: <http://www.novozymes.com/en/solutions/food-and-beverages/meat-processing/Protamex/Pages/default.aspx>, January 25, 2015
- Qian, Z. J., Jung, W. K., Byun, H. G. and Kim, S. (2008). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technology* 99: 3365–3371.
- Ray, S., Reaume, S.J. and Lalman, J.A. (2010). Developing a statistical model to predict hydrogen production by a mixed anaerobic mesophilic culture. *International Journal of Hydrogen Energy* 35: 5332–5342.
- Shahidi, F., Arachchi, J.K.V., Jeon, Y.J. (1999). Food applications of chitin and chitosans. *Trends in Food Science and Technology* 10: 37–51.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry* 103:1385-1394.
- Tsai, J. S., Chen, J. L. and Pan, B.S. (2008). ACE-inhibitory peptides identified from the muscle protein hydrolysate of hard clam (*Meretrix lusoria*). *Process Biochemistry* 43: 743–747.
- Varnalis, A. I., Brennan, J. G., MacDougall, D. B. and Gilmour, S. G. (2004). Optimisation of high temperature puffing potato cubes using response surface methodology. *Journal of Food Process Engineering* 61: 153–163.
- Vidotti, R.M., Viegas, E.M.M. and Careiro, D.J. (2003). Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology* 105: 199-204.
- Wang, J., Hu, J., Cui, J., Bai, X., Dua, Y., Miyaguchi, Y. and Lin, B. (2008). Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rat. *Food Chemistry* 111: 302–308.
- Wang, Q., Li, W., He, Y., Ren, D., Kow, F., Song, L. and Yu, X. (2014). Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chemistry* 145: 991–996.
- Whitaker, J.R. (1996). Enzyme. pp 431-530. In Fennema, O.R., ed. *Food Chemistry* 3<sup>rd</sup> ed. New York: Marcel Dekker, Inc.

