

ประสิทธิภาพเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบจากมะละกอเพื่อการผลิตโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต

กิตติ เมืองคุ้ม^{1*} และธัญลักษณ์ คำหวาน¹

¹หลักสูตรชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ อ.เมือง จ.อุดรดิตถ์ 53000

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนถั่วลิสงของสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนจากส่วนต่าง ๆ ของมะละกอ โดยการสกัดสารสกัดหยาบจากลำต้นส่วนยอด เปลือกผล และเมล็ดมะละกอแช่ดอง แล้วหาปริมาณสารสกัดหยาบ ต่อน้ำหนักของส่วนที่เหลือใช้ ความเป็นกรดต่าง ปริมาณเอนไซม์ปาเปนในสารสกัดหยาบ และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนโปรตีนถั่วลิสงด้านปริมาณกรดกลูตามิก พบว่าปริมาณสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนจากลำต้นส่วนยอด เปลือกผล ดิบ และเมล็ดมะละกอ เท่ากับ 7.54 กรัม 6.12 กรัม และ 13.44 กรัมต่อ 100 กรัมของตัวอย่างตามลำดับ มีค่าความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 5.7, 5.2 และ 5.8 ตามลำดับ มีปริมาณเอนไซม์ปาเปนในสารสกัดหยาบเท่ากับ 152.55, 148.38 และ 174.21 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากเมล็ดมะละกอ มาหาสภาวะที่เหมาะสม พบว่า ความเป็นกรดต่างที่ 7.0 มีค่าระดับร้อยละการย่อยสลาย (%DH) สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 76.86 และร้อยละผลผลิตสูงสุดที่สุด ที่ร้อยละ 65.75 เมื่อทำปฏิกิริยาที่ อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในส่วนของปริมาณโปรตีน และโปรไฟล์กรดอะมิโน เมื่อเทียบกับการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N พบว่าโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 32.69 และมีโปรไฟล์กรดอะมิโนในกลุ่ม Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Threonine, Glycine และ Alanine ที่มีค่าสูงกว่า การย่อยด้วยกรด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นวัตถุดิบทดแทนถั่วเหลือง เพื่อพัฒนาต่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรสต่อไปได้

*ผู้เขียนหลัก: kitti.mue@uru.ac.th

คำสำคัญ: เอนไซม์ปาเปน, มะละกอ, โปรตีนไฮโดรไลเซต, ถั่วลิสง, สารปรุงแต่งกลิ่นรส

SCIENCE AND TECHNOLOGY
UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

Efficiency of Crude Papain Enzyme Extraction from Papaya for Hydrolysate Peanut Protein Production

Kitti Mueangtoom^{1*} and Thanyalak Khomwhan¹

¹Biology Program, Faculty of Science and technology, Uttaradit Rajabhat University, Uttaradit Province, 53000

Abstract

The efficacy of peanut protein digestion of papain enzyme crude extracts from different regions of papaya was examined in this research, which used peanuts as a raw material to replace soybeans in order to further develop them as a biological taste enhancer. It extracted crude extracts from the papaya's stems, tops, raw fruit peels and seeds and used pH to calculate the amount of crude extracts per weight of the remaining section. The quantity of crude enzyme extracts observed per 100 grams of remaining material was 7.54 grams, 6.12 grams, and 13.44 grams, respectively. The pH levels were found to be 5.7, 5.2, and 5.8, respectively. The quantity of enzyme papain in the crude extracts was found to be 152.55 mg, 148.38 mg, and 174.21 mg per ml, respectively. The crude papain enzyme extracts from papaya seeds were studied after finding acceptable conditions. it was found the results of pH 7.0 showed the highest degree of hydrolysis (%DH) was 76.86%, and the highest yield was 65.75% when the reaction was carried out at a temperature of 70 °C for 12 hours. In terms of the quantity of protein and amino profile compared to 6 N hydrochloric acid digestion, it was found that the hydrolysate peanut protein had a protein content of 32.69 % and a higher amount of Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Threonine, Glycine and Alanine than the 6N hydrochloric acid digestion. As a result, hydrolysate peanut protein is well suited for future development into flavorful products.

*Corresponding Author: kitti.mue@uru.ac.th

Keywords: Papain Enzyme, Papaya, Hydrolysate Protein, Peanut, Flavoring Agent

SCIENCE AND TECHNOLOGY
UTTARADIT RAJABHAT UNIVERSITY

1. บทนำ

ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) เป็นอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูงและให้พลังงานมาก โดยมีโปรตีนอยู่ระหว่างร้อยละ 25 – 36 ไขมันร้อยละ 35 – 54 คาร์โบไฮเดรตร้อยละ 15 – 20 และพลังงาน 560 – 580 แคลอรีต่อ 100 กรัม หน่วยย่อยของโปรตีนประเภทกรดอะมิโนที่มีอยู่มากในถั่วลิสงและมีความโดดเด่นกว่าถั่วอื่น ๆ คือ กรดแอสพาทิก และกรดกลูตามิก ที่นิยมนำมาประกอบในเครื่องปรุงรสเพื่อเพิ่มรสชาติให้อาหารโดยเฉพาะผงปรุงรสหรือซอสปรุงรส^[1] แต่ปัจจุบันนิยมใช้ถั่วเหลืองเนื่องจากมีการนำเข้าและย่อยสลายง่าย โดยนำมาย่อยเป็นโปรตีนถั่วไฮโดรไลเซต (Hydrolyzed Vegetable Protein, HVP) ในอุตสาหกรรมซอสปรุงรส ซึ่งผ่านกระบวนการย่อยโปรตีนในถั่วด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งในกระบวนการผลิตจะเกิดสาร monochloropropanols, dichloropropanols และ monochloropropanediols ซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง^[2] และเนื่องจากสารปรุงแต่งกลิ่นรสที่มีคุณภาพจะมีราคาแพงและต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพจากพืชพื้นถิ่น และเพื่อเป็นแนวทางในการลดการนำเข้าโปรตีนไฮโดรไลเซต ซึ่งในแต่ละปีประเทศไทยนำเข้าโปรตีนไฮโดรไลเซตในปริมาณมากเพื่อนำมาใช้เป็นสารแต่งกลิ่นรสและเพิ่มกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ที่ให้กลิ่นรสเนื้อสัตว์ ปัจจุบันมีการใช้สารให้กลิ่นรสในอุตสาหกรรมอาหารเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากกระบวนการผลิตและการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารจะเกิดการสูญเสียสารให้กลิ่นรส ซึ่งการสูญเสียนี้สามารถทดแทนได้โดยการเติมสารให้กลิ่นรสเลียนแบบธรรมชาติหรือสารให้กลิ่นรสสังเคราะห์ลงในผลิตภัณฑ์^[3]

ในปัจจุบันการย่อยสลายโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสจากแหล่งต่างๆ กำลังได้รับความสนใจมากเนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสจะให้โปรตีนที่มีเปปไทด์ขนาดเล็กและกรดอะมิโนอิสระในปริมาณสูงสุด เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น และความเป็นกรดต่างที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจึงสามารถเลือกใช้ชนิดของเอนไซม์และภาวะการย่อยสลายได้ตามความเหมาะสมเพื่อให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ตามต้องการ^[4] โดยผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตได้จากกระบวนการผลิตที่ใช้กรดการใช้เอนไซม์จากพืชก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้กันเพื่อช่วยในการย่อยสลายโปรตีนในระดับอุตสาหกรรม โดยพืชพื้นถิ่นที่นำมาใช้ในการวิจัยคือถั่วลิสงมาศึกษากระบวนการย่อยด้วยกรด Hydrochloric acid และเอนไซม์จากธรรมชาติเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตมาใช้ในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส โดยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์จากธรรมชาติ จะใช้เอนไซม์จากพืชที่ผู้บริโภคยอมรับมากกว่าเอนไซม์จากสัตว์และจุลินทรีย์^[5] ได้แก่ เอนไซม์ปาเปนจากมะละกอ ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มของซิสเตอีนโปรติเอสที่สกัดได้จากยางและเนื้อเยื่อพืชในมะละกอผลดิบ มีความเสถียรที่อุณหภูมิช่วง 30 – 40 องศาเซลเซียส และจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น โดยความเสถียรขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และชนิดของเอนไซม์ สำหรับสภาวะความเป็นกรดต่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์จะอยู่ในช่วง 5 – 9 ซึ่งส่วนใหญ่แล้วมีความเสถียรที่สภาวะเป็นกลาง^[6] โดยมีการใช้เอนไซม์ปาเปนบริสุทธิ์ผลิตเครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เนื้อเปื่อย และหนังสัตว์ เป็นต้น มีกระบวนการสกัดที่ยุงยาก ใช้ต้นทุนสูงและราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นการสกัดหยาบเอนไซม์จึงเป็นวิธีหนึ่งที่มีกระบวนการสกัดง่าย สะดวก ปลอดภัย และใช้ต้นทุนค่อนข้างต่ำ เนื่องจากสกัดได้จากมะละกอ ซึ่งเป็นพืชที่ปลูกได้ทั่วประเทศ และโตเร็วให้ผลผลิตเยอะ โดยมะละกอ (*Carica papaya* L.) เป็นผลไม้เขตร้อนมีน้ำยางอยู่ทุกส่วนของลำต้น แต่จะมีมากในส่วนของใบ ลำต้น และผลดิบ ส่วนใหญ่มีการสกัดเอนไซม์ปาเปนจากทุกส่วนของมะละกอ สำหรับสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนที่มีปริมาณมากที่สุดได้มาจากส่วนของยางมะละกอผลดิบโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายในการสกัด^[7] สารสกัดเอนไซม์ปาเปนที่สกัดได้มีความแตกต่างกันไปตามส่วนต่างๆ ของพืช โดยได้จากส่วนของผลดิบ และเมล็ดมากที่สุดและจากใบน้อยที่สุด^[8]

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบที่สกัดได้จากเปลือกลำต้นส่วนยอด เปลือกผลดิบ และเมล็ดมะละกอเพื่อเปรียบเทียบปริมาณและประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบต่อการผลิตเอนไซม์ปาเปน และศึกษาสภาวะการใช้

สารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากส่วนของมะละกอที่มีปริมาณเอนไซม์สูงสุดต่อการย่อยถั่วลิสงในการผลิตโปรตีนถั่วไฮโดรไลเซตที่มีกรดอะมิโนที่เหมาะสมสำหรับนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรส

2. วิธีการดำเนินการ

2.1 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบปาเปนจากเปลือกลำต้นส่วนยอด เปลือกมะละกอดิบ และเมล็ด

2.1.1 การเตรียมสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนจากส่วนที่เหลือใช้ของมะละกอ

สารสกัดหยาบจากเมล็ดมะละกอ โดยนำเมล็ดของมะละกอพันธุ์แขกดำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นให้ละเอียดกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2:1 กรองเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวแล้วนำไปเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารสกัดหยาบที่เป็นสารละลายใสอยู่ด้านบน เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส สารสกัดหยาบจากเปลือกส่วนยอดของลำต้น และเปลือกของมะละกอ โดยการใช้มีดตัดส่วนเปลือกของลำต้นในช่วงใบที่ 2 – 5 จากส่วนยอดของลำต้นมะละกอ และตัดส่วนเปลือกผลมะละกอดิบ แล้วนำมาเตรียมสารสกัดหยาบเช่นเดียวกันกับเมล็ดมะละกอ โดยนำสารสกัดหยาบที่เป็นสารละลายส่วนที่ใสไว้ในขวดแก้วและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้ต่อไป และคำนวณ ปริมาณสารสกัดหยาบต่อน้ำหนักของเปลือกส่วนยอดของลำต้น เปลือกมะละกอดิบ และเมล็ดมะละกอ มีหน่วยเป็นกรัมต่อ 100 กรัมของส่วนของมะละกอ

2.1.2 ตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ปาเปน

ตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ปาเปนโดยวิธี Bradford Protein Assay^[9] โดยการสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสง กับระดับความเข้มข้นของสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ใช้ความเข้มข้นที่ 200, 400, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เติมสารละลาย Bio - Rad 5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไป ใส่ในเครื่องหมุนผสมเป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำสารละลาย BSA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาว คลื่น 595 นาโนเมตร และนำมาสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน สำหรับใช้ในการคำนวณปริมาณเอนไซม์ต่อไป

การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ปาเปนในสารสกัดหยาบจากส่วนต่างๆ ของมะละกอที่เตรียมจากข้อ 2.1.1 โดยนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ระดับการเจือจาง 10^{-1} แล้วนำสารละลายสารสกัดหยาบ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Bio - Rad 5 มิลลิลิตร นำไปใส่ลงในเครื่องหมุนผสม 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร จากนั้นจึงนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณปริมาณเอนไซม์เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย BSA

2.1.3 วัดความเป็นกรดต่างของสารสกัดหยาบจากเปลือกและเมล็ดมะละกอ ด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดต่าง

2.1.4 คัดเลือกสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากส่วนของมะละกอที่ให้ค่าปริมาณเอนไซม์สูงสุดไปศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซตต่อไป

2.2 การศึกษาสภาวะของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนถั่วไฮโดรไลเซต

2.2.1 เตรียมโปรตีนสกัดจากถั่วลิสง โดยการแกะเปลือก นำเมล็ดถั่วลิสงชาน้ำที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

แล้วทำการลอกเยื่อหุ้มเมล็ดถั่วออก ล้างน้ำเปล่าให้สะอาด ผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง แล้วนำมาปั่นให้ละเอียด นำเข้า ตู้อบลมร้อนควบคุมอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อบจนอุณหภูมิคงที่ นำผงถั่วลิสงที่ได้ร่อนผ่านตะแกรง และเก็บใส่ถุงเพื่อรอการนำไปทดลองขั้นต่อไป

2.2.2 ละลายโปรตีนถั่วลิสงสกัดในน้ำกลั่น (5 กรัม/100 มิลลิลิตร) และปรับความเป็นกรดต่างที่ 5.0, 6.0 และ 7.0 เพื่อหาค่าความเป็นกรดต่างที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นใส่เอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบที่ได้จากข้อ 2.1.4 ให้มีปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นที่ร้อยละ 0.75 ต่อน้ำหนักของผงโปรตีนถั่วลิสง^[10] นำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

2.2.3 ตั้งเวลาทำปฏิกิริยาย่อยสลายโปรตีนเป็นระยะเวลา 10, 12 และ 15 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาโดยให้

ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำส่วนที่ได้จากการกรอง นำส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าร้อยละการย่อยสลาย และร้อยละผลผลิต

2.2.4 การวิเคราะห์ค่าร้อยละการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis, %DH) โดยนำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.215 M (pH 8.2) และ Trinitrobenzene sulfonic acid เข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม Hydrochloric acid เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร โดยใช้ Glycine เป็นสารมาตรฐาน^[11] และวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (% yield) โดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายแบบหมุน^[12]

2.2.5 ผลิตโปรตีนถั่วลันเตาไฮโดรไลเซตจากสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบ ภายใต้สภาวะที่ให้ค่า %DH และ %yield สูงสุด แล้วนำไปศึกษาปริมาณโปรตีน และกรดอะมิโนในขั้นตอนต่อไป

2.2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

2.3 การศึกษาปริมาณโปรตีน และวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

2.3.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

นำโปรตีนถั่วลันเตาไฮโดรไลเซตจากสภาวะการผลิตข้อ 2.2.5 มาอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำผงโปรตีนถั่วลันเตาไฮโดรไลเซตที่บดละเอียดจำนวน 200 มิลลิกรัม วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method^[9]

2.3.2 การวิเคราะห์โปรไฟล์อะมิโน

นำตัวอย่างโปรตีนถั่วลันเตาไฮโดรไลเซตจากสภาวะการผลิตข้อ 2.2.5 และโปรตีนถั่วลันเตาไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยกรด Hydrochloric acid 6 N ปรับความเป็นกรดต่างให้เป็น 7 แล้วนำไปอบแห้งด้วยกระบวนการเดียวกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ ส่งทั้ง 2 ตัวอย่างวิเคราะห์โปรไฟล์อะมิโนตามวิธี In-house method WI-TMC-06 ที่สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนที่ได้หลังการย่อย

3. ผลการวิจัย และอภิปรายผล

3.1 ผลการสกัดสารสกัดหยาบเอนไซม์

สารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากส่วนต่างๆ ของมะละกอ ได้แก่ เปลือกลำต้น เปลือกผลดิบ และเมล็ดของมะละกอพันธุ์แขกดำมีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวใสและสารละลายสีเขียวยาว มีปริมาณเอนไซม์ 7.54 กรัมต่อ 100 กรัมของเปลือกลำต้น 6.12 กรัมต่อ 100 กรัมของเปลือกผลดิบ และ 13.44 กรัมต่อ 100 กรัมของเมล็ด ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งปริมาณสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปน จากเมล็ดมะละกามีปริมาณมากกว่าจากเปลือกของลำต้นและเปลือกของผลมะละกอ เนื่องจากภายในเมล็ดมีปริมาณของน้ำอย่างมากกว่าในเปลือกมะละกอ เมื่อนำมาตรวจสอบปริมาณเอนไซม์ปาเปนด้วยวิธี Bradford Protein Assay พบว่าปริมาณเอนไซม์ปาเปนในสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนจากส่วนเมล็ดมะละกามีปริมาณมากกว่าจากส่วนเปลือกลำต้น และเปลือกผลมะละกอ โดยมีปริมาณของเอนไซม์ปาเปนเท่ากับ 174.21, 152.55 และ 148.38 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วงกรดอ่อน มีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.2 – 5.8 ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งจากการทดลองในส่วนของการเลือกมะละกอจะมีปริมาณน้ำน้อยกว่าเนื่องจากเกิดการสูญเสียไประหว่างการปอกเปลือก มีสอดคล้องกับงานวิจัยของ Anson (1938)^[13] ที่รายงานว่าเอนไซม์ปาเปนมีอยู่มากในน้ำยางของส่วนต่างๆ ของมะละกอ ดังนั้นส่วนของมะละกอที่สามารถสกัดน้ำยางออกมาได้มากจะพบปริมาณของเอนไซม์ปาเปนได้มากเช่นกัน โดยในการศึกษาสภาวะที่

เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ปาเปนจะใช้สารกัตเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาดจากเมล็ดมะละกอ เนื่องจากให้ค่าปริมาณ สารสกัด และค่าปริมาณเอนไซม์ในปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนอื่นๆ

ตารางที่ 1 ผลการสกัดสารสกัดหยาดปาเปนจากเปลือกลำต้นส่วนยอด เปลือกผลมะละกอดิบ และเมล็ด

ค่าวิเคราะห์	ส่วนของมะละกอ		
	เปลือกลำต้นส่วนยอด*	เปลือกผลมะละกอดิบ*	เมล็ดมะละกอ*
ปริมาณสารสกัดหยาด (กรัมต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง)	7.54±0.14 ^b	6.12±0.08 ^b	13.44±0.20 ^a
ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	152.55±1.24 ^b	148.38±1.18 ^b	174.21±2.51 ^a
ความเป็นกรดต่าง (pH)	5.70±0.20 ^a	5.20±0.10 ^a	5.80±0.20 ^a

*หมายเหตุ: ตัวอักษร a – b ในแนวแถว แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ปาเปน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาดจากเมล็ดมะละกอ โดยแปรเปลี่ยนปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเป็นกรดต่าง และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อย พบว่ามีระดับการย่อยสลายในการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ต่างกัน จากการเปรียบเทียบระดับการย่อยสลาย (%DH) จากกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนจากเมล็ดมะละกอร้อยละ 0.75 ต่อผงโปรตีนถั่วลิสง อุณหภูมิที่ใช้อยู่คือ 70 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมงจะให้ค่า %DH และ %yield สูงที่สุดที่ร้อยละ 86.25 และร้อยละ 46.12 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) จากสภาวะการย่อยที่ 80 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อยที่ 15 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และระยะเวลา 12 ชั่วโมงนั้น เป็นอุณหภูมิและระยะเวลาที่ประหยัดต้นทุนมากกว่าการย่อยที่อุณหภูมิสูง และระยะเวลานานขึ้น (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับงานวิจัยของ ปิยนุช (2556)^[14] ที่พบว่าระยะเวลา 12 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเซต จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ Collupulin MG ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ เป็น 318.25 หน่วยต่อกรัมโปรตีน ช่วงความเป็นกรดต่างที่ 5.0 - 6.5 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในขณะที่ผลการวิจัยของมัลลิกา (2552)^[15] ที่ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ปาเปนที่มีความสามารถในการย่อยสลายสูงสุดที่สภาวะการใช้เอนไซม์ร้อยละ 15 นาน 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ให้ค่า %DH สูงสุด เท่ากับ 79.0 ซึ่งมีค่ามากกว่าการใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N ย่อยที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาสภาวะของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนถั่วไฮโดรไลเซต

สภาวะการผลิต	ร้อยละการย่อย (%DH)*			ร้อยละผลผลิต (% Yield)*		
	ที่อุณหภูมิ	ที่อุณหภูมิ	ที่อุณหภูมิ	ที่อุณหภูมิ	ที่อุณหภูมิ	ที่อุณหภูมิ
	60 °C	70 °C	80 °C	60 °C	70 °C	80 °C
ระยะเวลาการย่อย 10 ชั่วโมง						
pH 5	60.52 ^l	79.42 ^e	80.19 ^d	18.67 ^o	25.24 ^k	26.14 ^j
pH 6	62.38 ^l	79.12 ^e	80.32 ^d	20.22 ⁿ	30.17 ^h	35.55 ^e
pH 7	71.17 ^h	82.46 ^c	84.57 ^b	23.14 ^m	38.75 ^d	39.55 ^c

สภาวะการผลิต	ร้อยละการย่อย (%DH)*			ร้อยละผลผลิต (% Yield)*		
	ที่อุณหภูมิ 60 °C	ที่อุณหภูมิ 70 °C	ที่อุณหภูมิ 80 °C	ที่อุณหภูมิ 60 °C	ที่อุณหภูมิ 70 °C	ที่อุณหภูมิ 80 °C
ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง						
pH 5	65.37 ^k	80.84 ^d	81.67 ^c	24.55 ^l	29.67 ^h	30.25 ^{gh}
pH 6	68.17 ^j	81.13 ^c	83.24 ^b	26.14 ⁱ	35.46 ^e	39.64 ^c
pH 7	75.32 ^g	86.25 ^a	86.12 ^a	35.27 ^e	46.12 ^a	46.24 ^a
ระยะเวลาการย่อย 15 ชั่วโมง						
pH 5	69.64 ⁱ	81.71 ^c	83.92 ^b	26.32 ^j	31.36 ^g	32.14 ^f
pH 6	70.21 ^h	81.67 ^c	83.59 ^b	28.53 ⁱ	37.43 ^{de}	41.76 ^b
pH 7	77.98 ^f	86.31 ^a	86.34 ^a	39.65 ^c	46.30 ^a	46.72 ^a

*หมายเหตุ: ตัวอักษร a – l ในคอลัมน์ร้อยละการย่อย (%DH) และ ตัวอักษร a – o ในคอลัมน์ร้อยละผลผลิต (% Yield) แสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ($p \leq 0.05$) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตามวิธีของ Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

3.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

3.3.1 ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

จากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมด หลังการย่อยถั่วลิสงด้วยเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบจากเมล็ดมะละกอที่สภาวะการย่อยอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่ความเป็นกรดต่าง 7.0 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณโปรตีนหลังการย่อยร้อยละ 32.69 คิดเป็นโปรตีนเพิ่มขึ้น ร้อยละ 12.51 สูงกว่าการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N ที่มีโปรตีนเพิ่มขึ้นร้อยละ 7.66 (ตารางที่ 3) ซึ่งให้ผลที่ดีกว่าการย่อยถั่วลิสงด้วยเอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรีย ที่มีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้น 0.1 เปอร์เซ็นต์^[16] เนื่องจากโครงสร้างโปรตีนในถั่วลิสงจะสามารถย่อยสลายได้ดีด้วยเอนไซม์หลายชนิดร่วมกัน^[17] ซึ่งสภาวะการผลิตนี้มีอัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับการย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมีที่ใช้กรดและด่าง^[18]

ตารางที่ 3 ร้อยละปริมาณโปรตีนในถั่วลิสงที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและย่อยด้วยกรด

ตัวอย่าง	ร้อยละปริมาณโปรตีน ต่อน้ำหนักตัวอย่าง
ผงโปรตีนถั่วลิสงสกัด	28.60
โปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต	32.69
ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบ	
โปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต	30.97
ที่ผ่านการย่อยด้วย 6 N Hydrochloric acid	

3.3.2 ผลการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน

จากการวิเคราะห์โปรไฟล์กรดอะมิโน พบว่า โปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบจากเมล็ดมะละกอ มีปริมาณกรดอะมิโนที่ให้รสชาติเปรี้ยวและหวานทุกชนิดเพิ่มสูงกว่าโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วย 6 N Hydrochloric acid ได้แก่ Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Threonine, Glycine และ Alanine

ในขณะที่กรดอะมิโนที่ให้รสชาติขมมีปริมาณน้อยกว่าการย่อยด้วย 6 N Hydrochloric acid ได้แก่ Arginine, Tyrosine, Valine, Methionine, Cystine, Isoleucine, Phenylalanine, Tryptophan, Leucine และ Lysine เป็นต้น เมื่อนำมาผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบให้รสชาติที่ใกล้เคียงเนื้อสัตว์มากกว่า การย่อยด้วยกรดไฮโดร- คลอริกเข้มข้น 6 N ที่ทำให้เกิดรสขมในผลิตภัณฑ์^[19] (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 โปรไฟล์กรดอะมิโนของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซตที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและย่อยด้วยกรด 6 N Hydrochloric acid

กรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัวอย่างแห้ง)	
	โปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการย่อยด้วย กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N	โปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต ที่ผ่านการย่อยด้วย เอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบ
Aspartic acid	2506.68	2987
Glutamic acid	2725	5540
Serine	1283	1373
Threonine	927.73	834
Histidine	1299	784
Glycine	1358	1442
Alanine	1013	2037
Arginine	3607	1785
Tyrosine	2004	1366
Valine	1833	1388
Methionine	1004	243
Cystine	2657	338
Isoleucine	1494	823
Phenylalanine	1718	1343
Tryptophan	1547	308
Leucine	1992	1694
Lysine	1330	1311
Proline	1433	1182

จากตารางที่ 4 ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณของกรดอะมิโนในถั่วลิสง ขึ้นอยู่กับการเรียงตัวของกรดอะมิโน และหมู่ฟังก์ชันไม่มีขั้วและไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ได้แก่ Glycine Alanine Valine Leucine Isoleucine และ Proline เป็นจำนวนมาก ก็จะทำให้ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปาเปนสกัดหยาบจากเมล็ดมะละกอได้ดีกว่าถั่วลิสงไฮโดรไลเซตที่ผ่านการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N ซึ่งการย่อยด้วยกรดส่งผลให้ถั่วลิสงที่มีไขมันสูงมีการเพิ่มขึ้นของกรดอะมิโนที่มีรสขมในขณะเดียวกัน บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ก็มีผลเฉพาะเจาะจงกับสับสเตรท ทำให้เกิดการแยกตัวของกรดอะมิโนอิสระได้มากกว่า^[17] ซึ่งกรดอะมิโนที่กล่าวมาข้างต้นพบว่ามีปริมาณที่สูงขึ้นโดยเฉพาะ Aspartic acid และ Glutamic acid ที่ให้รสชาติ อูมามิ และมีศักยภาพในการนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสได้^[20]

4. สรุปผลการวิจัย

การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากส่วนต่างๆ ของมะละกอ ได้แก่ เปลือก ลำต้น เปลือกผลดิบ และเมล็ดของมะละกอพันธุ์แขกดำ สารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากเมล็ดมะละกอ ให้ค่าปริมาณสารสกัดหยาบและปริมาณเอนไซม์ที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับส่วนของเปลือกลำต้น และเปลือกของผลดิบ 13.44 ± 0.20 กรัมต่อ 100 กรัมของตัวอย่าง และ 174.21 ± 2.51 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 5.8 และเมื่อนำสารสกัดเอนไซม์ปาเปนอย่างหยาบจากเมล็ดมะละกอ มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนถั่วลิสง พบว่า สภาวะการย่อยที่มีปริมาณเอนไซม์เริ่มต้นร้อยละ 0.75 ต่อผงโปรตีนถั่วลิสง อุณหภูมิที่ใช้ย่อยคือ 70 องศาเซลเซียส และระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมงจะให้ค่า %DH และ %yield สูงที่สุด ที่ร้อยละ 86.25 และร้อยละ 46.12 ตามลำดับ และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และโปรไฟล์กรดอะมิโนของโปรตีนถั่วลิสงไฮโดรไลเซต เทียบกับการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N พบว่าปริมาณโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นโดยมีปริมาณโปรตีนหลังการย่อยร้อยละ 32.69 คิดเป็นโปรตีนเพิ่มขึ้น ร้อยละ 12.51 สูงกว่าการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N และมีอะมิโนในกลุ่ม Aspartic acid และ Glutamic acid ที่ให้รสชาติอูมามีปริมาณที่สูงขึ้น ทำให้สามารถพัฒนาเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสได้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์ สนับสนุนด้านวัสดุอุปกรณ์ และสถานที่ดำเนินงานวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- [1] W.Y. Cobb and B.R. Johnson, Physicochemical Properties of Peanuts. Chap. 6 in “Peanuts-Culture and Uses”. American Peanut Research and Education Association, Inc. Stone Printing Co., Roanoke, Va. 1973.
- [2] คงศักดิ์ สหะศักดิ์มนตรี. การพัฒนากรรมวิธีการผลิตซอสปรุงรสโดยใช้เอนไซม์เพื่อลดสาร 3-MCPD. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพัฒนาผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2544.
- [3] H. Olsman, Hydrolyzed and autolyzed vegetable protein as functional food ingredients. Journal of the American Oil Chemists' Society. no. 56(3). pp. 375-376. 1979.
- [4] รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตไขมันต่ำ จากของเหลืออุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์วท.ม., มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 2545.
- [5] L. You, M. Zhao, R.H. Liu and J.M. Regenstein, “Antioxidant and antiproliferative activities of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion,”. Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 14, pp. 7948-7953, 2010.
- [6] K. Konno, C. Hirayama, M. Nakamura, K. Tateshi, Y. Tamura, M. Hattori and K. Kohno, “Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex,” The Plant Journal, vol. 37, pp. 370-378, 2004.
- [7] อาภัสสร ศิริจริยวัตร และ กาญจนพร นนทะสุน. กิจกรรมการย่อยโปรตีนของสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของสับปะรดและมะละกอ. แก่นเกษตร. ปีที่ 48 ฉบับที่ suppl. 1. หน้า 1087-1092. 2563.
- [8] ดวงทิพย์ ไขแก้ว, ดวงฤทัย อารังโชติ และวิภาวัน จุลยา. การเปรียบเทียบปริมาณสารสกัดหยาบเอนไซม์ปาเปนในส่วนเปลือกและเมล็ดของมะละกอผลดิบ. วารสารมหาวิทยาลัยเอเชียอาคเนย์ สายวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 8(1) หน้า 1-9. 2565.

- [9] G.W. Latimer, Official methods of analysis of AOAC International. (19th edition). Gaithersburg, Maryland. AOAC International. 2012.
- [10] ณัฐวุฒิ ส่งแสง. การผลิตสารปรุงแต่งกลิ่นรสทะเลจากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่วเขียวโดยเอนไซม์โปรติเอส. วิทยานิพนธ์ วท.ม., มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ. 2550.
- [11] P.M. Nielsen, D. Petersen, and C. Dambmann, Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Chemistry and Toxicology. no. 665, pp. 642-646. 2001.
- [12] C. Sonklin, N. Laohakunjit, and O. Kerchoechuen, Physicochemical and flavor characteristics of flavoring agent from mungbean protein hydrolyzed by bromelain. Journal of Agricultural and Food Chemistry. no.59, pp. 8475-8483. 2011.
- [13] M.L. Anson, Estimation of pepsin, papain and cathepsin with hemoglobin. Journal of General Physiology, no. 22, pp. 77-89. 1938.
- [14] ปิยนุช ไพโรจน์กัลยา. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพืชโดยการย่อยด้วยเอนไซม์. การค้นคว้าอิสระ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร, มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2556.
- [15] มัลลิกา อนุสนธิ์. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเห็ดโดยใช้เอนไซม์ปาเปนเพื่อเป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพฯ. 2552.
- [16] กิตติ เมืองดุ่ม. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากถั่ว ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า, วารสารวิจัยราชภัฏพระนคร สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 17 ฉบับที่ 2 หน้า 39 – 50. 2565.
- [17] L. Zhang, X. Sun, X. Lu, S. Wei, O. Sun, L. Jin, G. Song, J. You, and F. Li, Characterization of peanut protein hydrolysate and structural identification of umami-enhancing peptides. Molecules, 27, 2853. <https://doi.org/10.3390/molecules27092853>. 2022.
- [18] L. López-Barrios, J.A. Gutiérrez-Urbe, and S.O. Serna-Saldívar, Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. Journal of Food Science, no. 79(3), pp. 273-283. 2014.
- [19] E. Chukeatirote, S. In-khian, K. Dajanta, K., and A. Apichartsrangkoon, Thua Nao – An indigenous fermented soybean of Thailand. Srinakharinwirot Science Journal, no. 27(1), pp. 197-213. 2011.
- [20] Y.F. Wu, H.H. Baek, P.D. Gerard, and K.R. Cadwallader, K.R. Development of a meat-like process flavoring from soybean-based enzyme-hydrolyzed vegetable protein (E-HVP). Journal of Food Science, no. 65(7), pp. 1220-1227. 2000.