

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดทองแดงลาย
(*Archeta domestica*) ที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส
Functional Properties of Hydrolysate Protein from House Cricket
(*Archeta domestica*) extracted by Alcalase

ธนาวุฒิ จิโน และสุทนต์ สุระวัง^{1*}
Thanawut Jino¹ and Suthat Surawang^{1*}

สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 50100
Division of Product Development Technology, Faculty of Agro Industry, Chiang Mai University 50100

* Corresponding author e-mail: ssurawang@gmail.com

(Received: July 10, 2020; Revised: Feb 9, 2021; Accepted: Feb 18, 2021)

บทคัดย่อ

ในสถานการณ์ปัจจุบันที่ประชากรของโลกเพิ่มขึ้น ทำให้การผลิตอาหารกลุ่มโปรตีนจากพืชหรือเนื้อสัตว์มีไม่เพียงพอ และต้นทุนในการผลิตสูง แผลงกันได้จึงเป็นทางเลือกของแหล่งอาหารกลุ่มโปรตีน จึงทำการวิจัยโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดทองแดงลาย (*Archeta domestica*) โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้นที่ต่างกัน ร้อยละ 1, 3 และ 5 ต่อปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวิจัย พบว่าการใช้การใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 80 และได้ผลผลิตเฉลี่ยร้อยละ 21 (เทียบจากร้อยละของโปรตีนที่ละลายน้ำ) โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากสภาวะดังกล่าว มีปริมาณกรดแอมิโนกลูตามิก และวาเลีน 16.28 และ 13.07 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ มีสมบัติการละลายร้อยละ 96.97 ที่พีเอช 12 และความสามารถในการละลาย ร้อยละ 53.75 ที่พีเอช 4 มีความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม ที่พีเอช 12 ร้อยละ 96.80 และร้อยละ 150 ตามลำดับ มีค่าดัชนีการเกิดอิมัลชันในช่วงพีเอช 2-12 อยู่ระหว่าง 13.52 – 18.13 m²/g กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH 17.45 mg TE/g sample โมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีขนาด ลดลงจาก 15-250 kDa ได้เป็นขนาดเล็กกว่า 10 kDa การสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดทองแดงลายด้วย เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ได้ระดับการย่อยสลายและร้อยละของผลผลิตสูงที่สุดซึ่งสามารถนำไป ประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

คำสำคัญ : จิ้งหรีดทองแดงลาย โปรตีนไฮโดรไลเซต ระดับการย่อยสลาย เอนไซม์อัลคาเลส *Archeta domestica*

Abstract

In the present, the world population is increasing. The protein production from vegetable and livestock are inadequate and high production cost. Edible insects are the alternative of protein sources. The objective of this research was to studies the extraction and functional properties of hydrolysate protein from the House cricket (*Archeta domestica*) by Alcalase[®] at different concentrations (1, 3 and 5% w/w) for 24 h of hydrolysis time. The results showed that hydrolysis with 3% Alcalase[®] for 6 hr gave 80% degree of hydrolysis (DH) and 21% of yield extraction (base on soluble protein). Glutamic acid and valine contents were found 16.28 and 13.07 g/100 g sample, respectively. The solubility of hydrolysate protein at pH 12 was 96.97% and 53.75% at pH 4. Foaming ability and stability at pH 12 were 96.80% and 150%, respectively. Emulsifying index was similar in pH range 2 – 12 (13.52-18.13 m²/g). DPPH antioxidant activity was 17.45 mgTE /g sample. After hydrolysis, the size of hydrolysate protein molecules was decreased from 15-250 kDa to smaller than 10 kDa. It was suggested that hydrolysate protein from House cricket prepared by the 3% Alcalase[®] for 6 hr of hydrolysis gave the high contents of the extracted yield and the DH which can be further developed as a food supplement.

Keywords: House cricket, Hydrolysate protein, Degree of hydrolysis, Alcalase, *Archeta domestica*

บทนำ

โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นผลผลิตที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาของโปรตีน โดยการตัดพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่ต่อกันเป็นสายยาว ได้เป็นกรดแอมิโนอิสระหรือสายเปปไทด์ที่สั้นลงโดยการเร่งการเกิดปฏิกิริยาได้ด้วยการควบคุมพีเอช หรือปริมาณเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นให้เหมาะสม การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ นิยมใช้เอนไซม์กลุ่มโปรตีเอส ซึ่งเอนไซม์โปรตีเอสจะทำหน้าที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนทำให้สามารถกำหนดขนาดและลำดับกรดแอมิโนได้ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์จะมีสมบัติการละลายที่ดีขึ้น (Sillero *et al.*, 2018, p. 118) อีกทั้งยังสามารถควบคุมคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซตให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสมบัติเชิงหน้าที่ที่ต้องการได้ด้วย โดยปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์นั้นมีหลากหลายปัจจัย เช่น พีเอช อุณหภูมิ เวลา และความเข้มข้นของเอนไซม์ ปัจจัยที่กล่าวมาจะส่งผลโดยตรงต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อย และสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้โดยตรง (Ha *et al.*, 2019, p. 99)

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากแมลงกินได้ ได้รับความนิยมในการศึกษามากยิ่งขึ้นเนื่องจากในปัจจุบัน เนื่องจากแมลงเป็นแหล่งโปรตีนสูงที่สามารถผลิตได้ง่าย ใช้เวลาน้อยและต้นทุนต่ำ Hall (2017, p. 84) ได้ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดสายพันธุ์ *Grylloides sigillatus* โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส (เอนไซม์โปรตีเอสจาก *Bacillus licheniformis*) โดยได้ระดับการย่อยสลายสูงที่สุดร้อยละ 52.4 เมื่อทำการย่อยเป็นเวลา 90 นาที ความเข้มข้นร้อยละ 3 ต่อ น้ำหนักตัวอย่าง สามารถปรับปรุงสมบัติของโปรตีนที่ย่อยได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ซึ่งการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส (Proteas) เช่น เอนไซม์อัลคาเลส เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อสัตว์ ซึ่ง Purschke *et al.* (2017, p.1004) แสดงผลการทดลองการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากตั๊กแตนสายพันธุ์ *Locusta migratoria L.* โดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอส 4 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์ฟลาโวไซม์ เอนไซม์นิวเทรส และเอนไซม์ปาเปน ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1440 นาที ผลการวิจัยพบว่าการใช้เอนไซม์อัลคาเลสจะให้ระดับการย่อยสลายสูงที่สุด ร้อยละ 31.1 และเอนไซม์ปาเปนจะให้ระดับการย่อยสลายน้อยที่สุด ร้อยละ 20.6

จิ้งหรีดทองแดงลายหรือแมงสะดั่ง (House cricket) มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Acheta domestica* เป็นแมลงกินได้ที่นิยมเลี้ยงเพื่อจำหน่ายและบริโภคที่นิยมในประเทศไทย จิ้งหรีดมีช่วงชีวิตประมาณ 73–96 วัน โดยมีระยะไข่ 7–9 วัน ตัวอ่อนวัยหนึ่ง 6–8 วัน ตัวอ่อนวัยสอง 6–8 วัน ตัวอ่อนวัยสาม 6–8 วัน ตัวอ่อนวัยสี่ 6–10 วัน และตัวเต็มวัยอายุ 42–53 วัน จิ้งหรีดนับเป็นแมลงที่มีวงจรชีวิตสั้น ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 31–43 วัน ก็จะสามารถนำมาบริโภคและแปรรูปได้ จิ้งหรีดจึงเป็นแมลงที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และสร้างเป็นอาชีพได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้กลุ่มเกษตรกรที่ประกอบอาชีพเลี้ยงแมลงกินได้ในประเทศไทยเพาะพันธุ์และจำหน่ายจิ้งหรีดทองแดงลายอย่างแพร่หลาย จากการวิเคราะห์ พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงกว่าแมลงกินนม แมลงตับเต่า แมลงกระซอน แม่เป้ง แมงดานา มดแดง แมลงแคง และดักแด้ไหม มีปริมาณโปรตีนเฉลี่ยร้อยละ 21.5 มีกรดแอมิโนจำเป็น 392 มิลลิกรัม ต่อ 1 กรัมโปรตีน (Yi *et al.*, 2013, p. 3344)

จากศักยภาพทางด้านคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนจากจิ้งหรีดทองแดงลายและการเปลี่ยนแปลงสมบัติของโปรตีนที่ถูกไฮโดรไลซ์ รวมไปถึงการเพาะเลี้ยงแมลงกินได้ที่ใช้ทรัพยากรในการผลิตไม่มาก มีกระบวนการเลี้ยงและการเก็บเกี่ยวที่สะอาด สามารถควบคุมการปนเปื้อนได้ จากงานวิจัยของ Wegier *et al.* (2017, p. 89) คาดการณ์ถึงการลดการผลิตเนื้อสัตว์ลงครึ่งหนึ่งแล้วใช้แมลงกินได้ทดแทน จะสามารถลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังลดปัญหามลพิษจากการใช้ยาฆ่าแมลงได้ โดยในปัจจุบันงานวิจัยเชิงลึกเกี่ยวกับแมลงกินได้มีขอบเขตที่ยังไม่กว้าง แมลงกินได้จึงได้ถูกระบุให้เป็นแหล่งโปรตีนใหม่ที่องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) แนะนำ โดยเกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงเป็นอาชีพเสริมได้ การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดทองแดงลายจึงเป็นการศึกษาที่มีประโยชน์ในเชิงวิชาการและอุตสาหกรรม งานวิจัยนี้จึงเป็นแนวโน้มในการสร้างผลิตภัณฑ์อาหารโปรตีนใหม่ เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์แปรรูปจากแมลงกินได้และเพิ่มมูลค่าของธุรกิจของภาคอุตสาหกรรมส่งผลให้เศรษฐกิจโดยรวมของประเทศดีขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากจิ้งหรีดทองแดงลาย (*Acheta domestica*) ที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างจิ้งหรีดทองแดงลายอบแห้ง

จิ้งหรีดทองแดงลายตัวเต็มวัยอายุ 45 วัน ถูกเลี้ยงในระบบฟาร์มปิด ที่ให้อาหารด้วย แครอท ผักกาด และเกล็ดข้าวโพด จากภาคิณฟาร์ม อำเภอบ้านฝาง จังหวัดลำพูน มาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ แล้วนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส อบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนมีความชื้นร้อยละ 10 จากนั้นจึงทำการบดเป็นผงละเอียดด้วยเครื่องบดตัวอย่าง (IKA, Germany) และร่อนด้วยตะแกรงขนาด 16 mesh (Endecotts, England) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในถุงพอลิเอทิลีนเพื่อเตรียมการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไป

2. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ชั่งจิ้งหรีดทองแดงลายผงอบแห้งน้ำหนัก 10 กรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ พีเอช 2-12 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (RCI Labscan, USA) เติมนอนโซมอัลคาเลส (Sigma, USA, 2.4U/g) ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ร้อยละโดยน้ำหนัก 1, 3 และ 5 ต่อปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง) ที่พีเอช 8 แล้วทำการไฮโดรไลซิสในอ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าอย่างต่อเนื่อง (Memmert, Germany) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ เวลา 0, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 120, 180, 240, 360 และ 720 นาที แล้วหยุดการย่อยโดยให้ความร้อนแก่ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลาย ไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (Hermle, Germany) เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (supernatant) ไปแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์คุณภาพ และสมบัติเชิงหน้าที่ต่อไป (ดัดแปลงวิธีจาก Klompong *et al.*, 2008, p. 1020)

3. ระดับการย่อยสลายและร้อยละผลผลิต

ร้อยละของผลผลิตที่สกัดได้ สามารถคำนวณจากปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำในตัวอย่างจิ้งหรีดทองแดงลายอบแห้งเริ่มต้นและตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซตส่วนใสจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่ผ่านการย่อยสลายในช่วงเวลา 0-12 ชั่วโมงตามสมการที่ (1)

$$\text{Extracted yield (\%)} = \frac{\text{Total nitrogen in supernatant of protein hydrolysate}}{\text{Total nitrogen in cricket dried powder soluble protein}} \times 100 \quad (1)$$

ระดับการย่อยสลาย ตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่แอลฟา-แอมิโน โดยละลายโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เป็นส่วนใส (supernatant) ในน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 125 ไมโครลิตร เติมนอนโซมอัลคาเลส (Sigma, USA, 2.4U/g) ความเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ พีเอช 8.2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติมนสารละลาย TNBS (Trinitrobenzenesulfonic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมนสารละลายโซเดียมซัลไฟต์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร (Thermo Fisher Scientific, USA) (Benjakul & Morrissey, 1997, p. 3424) เปรียบเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เตรียมได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์ โดยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7 (L_{max}) ก่อนนำมาวิเคราะห์หาหมู่แอลฟา-แอมิโน เพื่อใช้คำนวณระดับการย่อยสลายดังสมการที่ (2)

$$DH (\%) = \frac{L_t - L_0}{L_{max} - L_0} \times 100 \quad (2)$$

โดยที่ $DH (\%)$ = ร้อยละของระดับการย่อยสลาย

L_t = ปริมาณหมู่แอลฟา-แอมิโนที่ระยะเวลาการย่อยต่าง ๆ ของโปรตีนไฮโดรไลเซต

L_0 = ปริมาณหมู่แอลฟา-แอมิโนที่เวลาเริ่มต้นของของผสมระหว่างจิ้งหรีดทองแดงลายอบแห้งและฟอสเฟตบัฟเฟอร์

L_{max} = ปริมาณหมู่แอลฟา-แอมิโนที่เกิดขึ้นหลังจากการย่อยสลาย

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายส่วนใส ที่มีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด จะถูกนำไปอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ก่อนนำไปวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทในขั้นตอนถัดไป

4. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอมิโน

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มาตรวจวิเคราะห์ปริมาณกรดแอมิโน โดยส่งตรวจวิเคราะห์ที่ บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด ด้วยวิธี In-house method based ตามมาตรฐาน AOAC Official Method 994.12.988.15 (2000). ตรวจทดสอบปริมาณกรดแอมิโนโดยใช้ GC-MS (Agilent technologies Model 6890 N, Germany-Agilent technologies Model 5973 inert, USA) equipped with Phenomenex Zebron ZB-AAA 10 m x 0.25 mm, 0.25 µfilm thickness, USA. โดยรายงานผลในรูป กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

5. สมบัติการละลายของโปรตีน

ทำการละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จำนวน 0.1 กรัม ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที (Hermle, Germany) เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl method และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 M (ดัดแปลงจาก Chobert *et al.*, 1988, p. 884) แล้วคำนวณการละลายของโปรตีนตามสมการที่ (3)

$$\text{Protein solubility (\%)} = \frac{\text{Protein content in supernatant}}{\text{Total protein content in sample}} \times 100 \quad (3)$$

6. ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการอบแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออนให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ที่ละลายในฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอช 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ไปผสมด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์ ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (IKA, USA) ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อให้เกิดฟอง เป็นเวลา 2 นาที ถ่ายฟองที่เกิดขึ้นลงในกระบอกตวง 25 มิลลิลิตร แล้ววัดปริมาตรของฟอง (ดัดแปลงจาก Purschke *et al.*, 2017, p. 1003) คำนวณความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming ability) (สมการที่ 4) และความคงตัวของโฟม (Foaming stability) ที่เวลา 3 นาที จากสมการที่ 5 (ดัดแปลงจาก Pearce and Kinsella, 1978)

$$\text{Foaming ability (\%)} = \frac{\text{Volume after whipping at 0min (mL)} - \text{Volume before whipping (mL)}}{\text{Volume before whipping (mL)}} \times 100 \quad (4)$$

$$\text{Foam stability (\%)} = \frac{\text{Volume at 3 min (mL)} - \text{Volume before whipping (mL)}}{\text{Volume before whipping (mL)}} \times 100 \quad (5)$$

7. ดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน

ดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชัน (EAI) และความคงตัวของอิมัลชัน (ESI) วิเคราะห์โดยเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัดได้ ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในฟอสเฟสบัฟเฟอร์พีเอชต่างกัน (2 - 12) ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ผสมในน้ำมันพืช 10 มิลลิลิตร นำมาโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที (IKA, USA) เป็นเวลา 1 นาที นำส่วนของอิมัลชันจากกันหลอดที่เวลา 0 และ 10 นาที หลังจากโฮโมจีไนซ์ 50 ไมโครลิตร ผสมกับ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (ดัดแปลงจาก Pearce & Kinsella, 1978, p. 721) คำนวณดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชัน ตามสมการที่ (6) และความคงตัวของอิมัลชัน ตามสมการที่ (7)

$$\text{EAI} \left(\frac{\text{m}^2}{\text{g}} \right) = \frac{2 \times 2.303 \times \text{DL} \times A_{500}}{l \times \phi \times C} \quad (6)$$

$$\text{ESI (\%)} = \frac{\text{absorbance before emulsion activity} \times 10}{(\text{absorbance at time 0} - \text{absorbance at time 10})} \quad (7)$$

โดยที่ DL = จำนวนเท่าที่ใช้เจือจางอิมัลชันเพื่อให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้
 A_{500} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร
 L = Light path length (เมตร)
 D = สัดส่วนของน้ำมันที่ใช้ในการทำให้เกิดอิมัลชัน
 C = ปริมาณโปรตีน (กรัมต่อลูกบาศก์เมตร)

8. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

นำโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัดได้ที่มีระดับการย่อยสลายและร้อยละของผลิตภัณฑ์สูงสุด มาละลายด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ดังนี้

- DPPH radical scavenging activity (ตัดแปลงจาก Klompong *et al.*, 2008, p. 1021)
- ABTS⁺ radical scavenging activity (ตัดแปลงจาก Binsan *et al.*, 2008, p. 102)
- Ferric reducing antioxidant power (FRAP) (ตัดแปลงจาก Benzie & Strain, 1996, p. 71)

โดยใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน โดยวิธี DPPH และ ABTS⁺ รายงานในรูปแบบลิกรัมสมมูลของ Trolox ต่อกรัมตัวอย่าง (mg TE/g sample) และในรูปแบบลิกรัมของ ferrous sulfate ต่อกรัมตัวอย่าง (mgFe²⁺/g sample) สำหรับกิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP

9. การหาน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยการทำเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE)

ละลายโปรตีนจากจังหวัดทองแดงลายอบแห้ง และโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัดได้ ให้มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมโปรตีนต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลาย 2-เมอร์แคปโทเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1 สารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 1 และสารละลายโบรมอีนอลบลู ร้อยละ 0.01 ในสารละลายทริสไฮโดรคลอไรด์ บัฟเฟอร์ 0.5 โมลาร์ (พีเอช 6.8) จากนั้นทำการให้ความร้อนแก่สารละลายผสมเป็นเวลา 5 นาที ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยโพลีอะครีลาไมด์เจลความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ย้อมสีเจลด้วยสารละลายคูเมสซีบิลเลียนบลูอาร์-250 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่ละลายในเมทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 30 และกรดแอสติค ความเข้มข้นร้อยละ 10 แล้วทำการล้างออกด้วยเมทานอลความเข้มข้นร้อยละ 30 ที่ผสมกับ กรดแอสติค ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยการเทียบกับโปรตีนมาตรฐานที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 10-250 kDa (All Blue Prestained Protein Standards, BIO-RAD, CA, USA) ในสภาวะ reducing (ตัดแปลงวิธีจาก Laemmli, 1970)

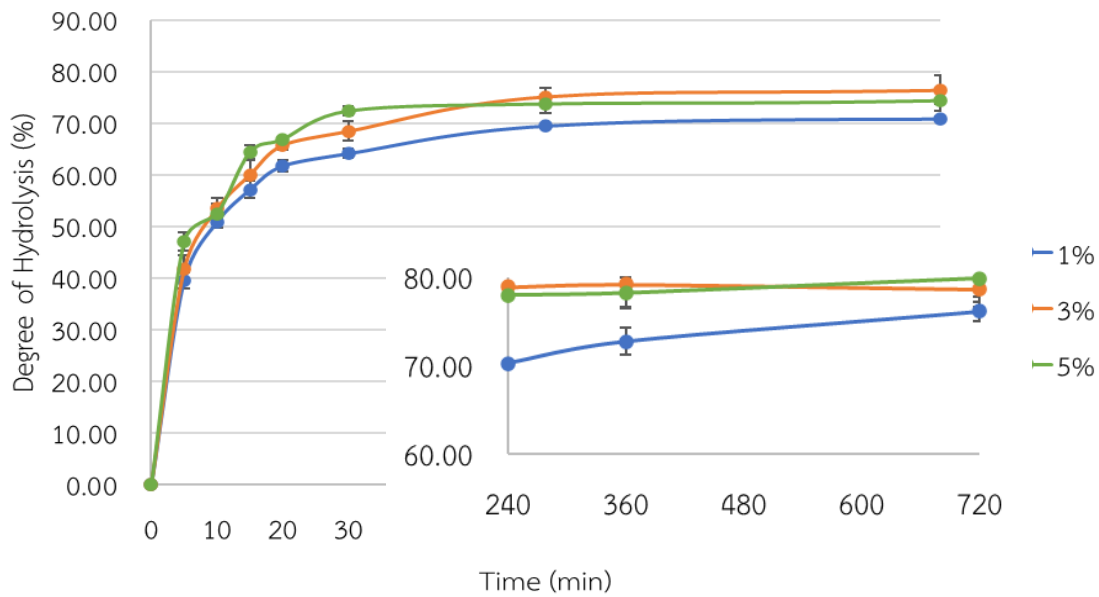
10. การวิเคราะห์สถิติ

ในการทดลองที่ 2-3 วางแผนการทดลองแบบ Randomize complete block design การทดลองที่ 5-7 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design หน่วยทดลองจะถูกทำซ้ำ จำนวน 3 ซ้ำ และทำการวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป Minitab 16 (Minitab Inc. State College, PA, USA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

1. ระดับการย่อยสลายและร้อยละของผลผลิต

ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนจากจังหวัดทองแดงลาย โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส พบว่า การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 1, 3 และ 5 โดยน้ำหนัก ให้ระดับการย่อยสลายที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่า ระดับการย่อยสลาย เมื่อใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 1 จะเริ่มคั่งที่ เมื่อเวลาผ่านไป 720 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 76.66 ในขณะที่ การใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 จะเริ่มคั่งที่เมื่อเวลาผ่านไป 360 นาที ได้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 78.48 และการใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 5 จะเริ่มคั่งที่เมื่อเวลาผ่านไป 360 นาที (ระดับการย่อยสลายร้อยละ 79.50) ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส

2. องค์ประกอบของกรดแอมิโน

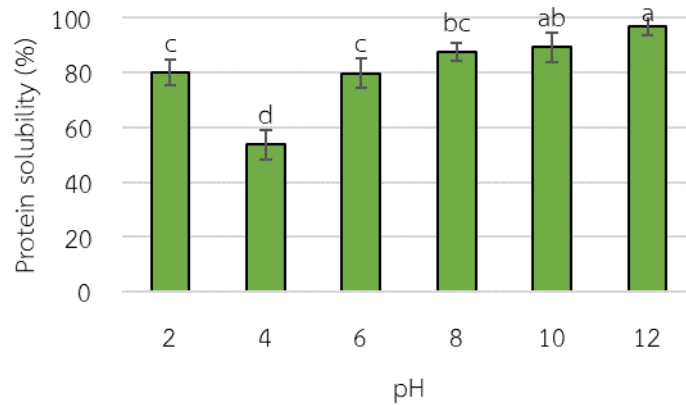
ปริมาณกรดแอมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลาย เมื่อทำการย่อยโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร เป็นเวลา 360 นาที พบว่า กรดแอมิโนกลูตามิกมีปริมาณสูงที่สุด เท่ากับ 16.28 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ปริมาณวาเลีน ไลซีน และกรดแอสพาทิก เท่ากับ 13.07, 10.73 และ 8.27 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีปริมาณกรดแอมิโนจำเป็น 48.95 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง และกรดแอมิโนไม่จำเป็น 51.05 กรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณกรดแอมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลาย

Amino acids	(g/100g sample)	Amino acids	(g/100g sample)
Alanine	7.79	Methionine	1.54
Aspartic acid	8.27	Phenylalanine	3.52
Cysteine	0.89	Proline	5.67
Glutamic acid	16.28	Serine	4.80
Glycine	4.87	Threonine	3.06
Histidine	1.33	Tryptophan	0.84
Isoleucine	7.45	Tyrosine	2.48
Leucine	7.40	Valine	13.07
Lysine	10.73		
Essential amino acid (EAA)	48.95	Non-Essential amino acid (NEAA)	51.05

3. สมบัติการละลายของโปรตีน

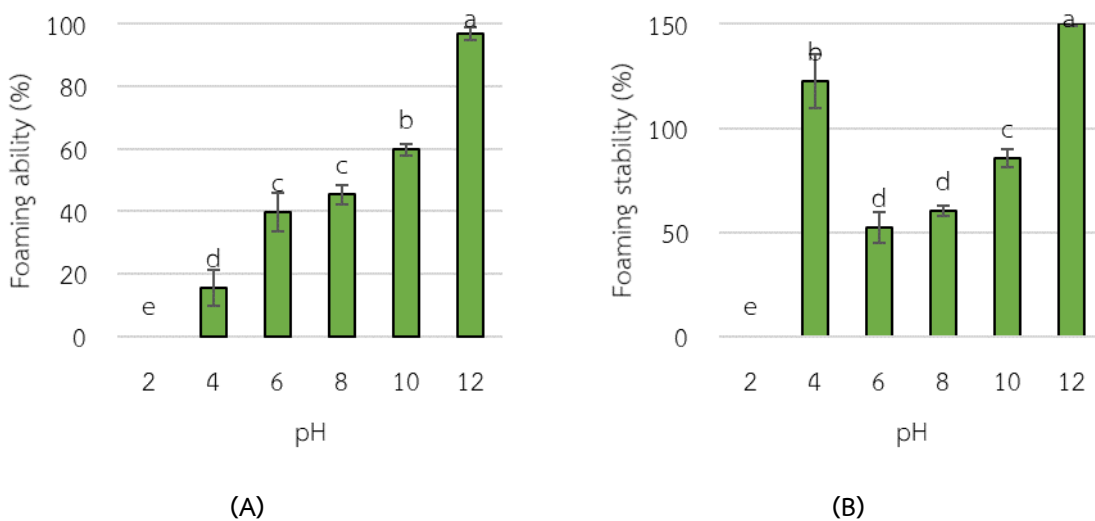
สมบัติของโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อน้ำหนักโมเลกุลหรือขนาดของสายเปปไทด์มีการเปลี่ยนแปลง เช่น สมบัติการละลายน้ำ การเกิดโฟม หรือการเป็นอิมัลชัน ภาพที่ 2 แสดงถึงร้อยละของการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที ผลการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่าจุดตกตะกอนโปรตีน (Isoelectric point, pI) ที่พีเอช 4



ภาพที่ 2 ร้อยละของการละลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที

4. ความสามารถในการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟม

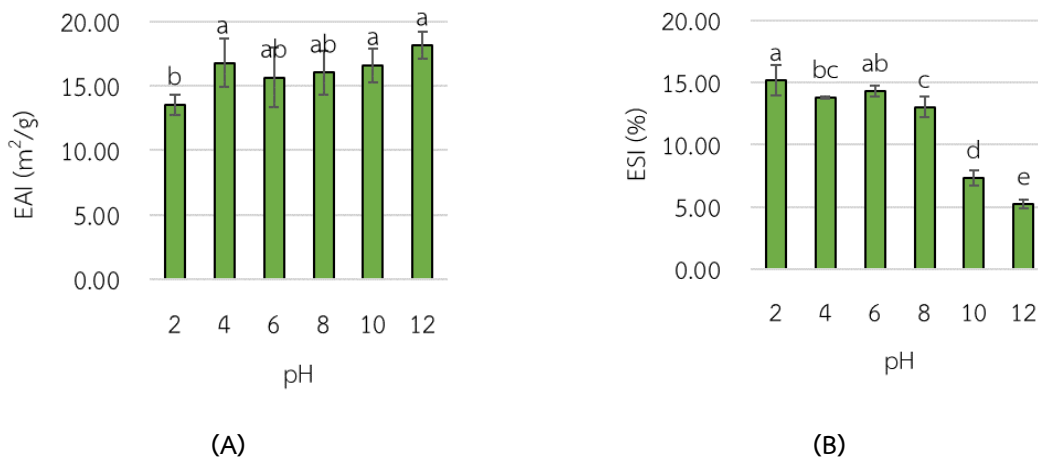
ความสามารถในการเกิดโฟม (Foaming ability) และความคงตัวของโฟม (Foaming stability) แสดงใน ภาพที่ 3 (A) และ (B) ความสามารถในการเกิดโฟมจะสูงขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น โดยที่พีเอช 12 จะทำให้ความสามารถในการเกิดโฟมสูงสุด ร้อยละ 96.80 และความคงตัวของโฟมเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาที มีค่าสูงสุดร้อยละ 150 ที่พีเอช 12 และไม่มีการเกิดโฟมที่พีเอช 2



ภาพที่ 3 ความสามารถในการเกิดโฟม (A) และความคงตัวของโฟม (B) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลาย ที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที

5. ดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชันและความคงตัวของอิมัลชัน

ดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชัน (Emulsifying activity index, EAI) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (Emulsifying stability index, ESI) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายเมื่อทำการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้น ร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที พบว่า ค่าดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชันที่พีเอช 2-12 มีความใกล้เคียงกัน โดยมีค่าอยู่ในช่วง 13.52-18.13 m^2/g ภาพที่ 4 (A) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชันจะลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น โดยจะลดลงจากร้อยละ 15.19 ที่พีเอช 2 ลดลงเหลือร้อยละ 5.22 ที่พีเอช 12 ภาพที่ 4 (B)



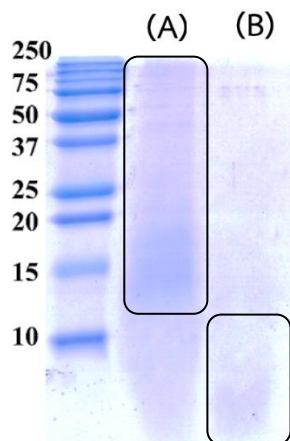
ภาพที่ 4 ดัชนีชี้วัดการเกิดอิมัลชัน (A) และดัชนีความคงตัวของอิมัลชัน (B) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที

6. การวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ร้อยละ 3 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยวิธี DPPH radical scavenging activity มีค่าเท่ากับ 17.45 mgTE/g sample กิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี ABTS⁺ radical scavenging มีค่าเท่ากับ 27.85 mgTE/g sample และกิจกรรมการต้านออกซิเดชันด้วยวิธี FRAP radical scavenging เท่ากับ 2.08 mgFe²⁺/g sample

7. น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนจากจิ้งหรีดทองแดงลายอบแห้ง (ภาพที่ 5 A) มีขนาดตั้งแต่ 15 - 250 kDa เมื่อทำการไฮยอลิซายแล้ว พบว่า น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายจะมีขนาดน้อยกว่า 10 kDa (ภาพที่ 5 B)



ภาพที่ 5 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสของโปรตีนจากจิ้งหรีดทองแดงลายอบแห้ง (A) และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลาย (B)

อภิปรายผลการวิจัย

การสกัดโปรตีนโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลาย โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 360 นาที ให้ระดับการย่อยสลายร้อยละ 79.20 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hall *et al.* (2018, p. 40) พบว่าการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีด (*Grylodes sigillatus*) โดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 มีระดับการย่อยสลายสูงสุดที่ร้อยละ 84.6 จากการทดลองของ Hall (2017, p. 54) ได้ทำการย่อยโปรตีนจากจิ้งหรีด (*Grylodes sigillatus*) พบว่าปริมาณกรดกลูตามิกเพิ่มขึ้นจาก 2.16 กรัม เป็น 2.78 กรัม ต่อ 100 กรัมตัวอย่าง เมื่อใช้เอนไซม์อัลคาเลสที่ย่อยที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 เป็นเวลา 90 นาที ปริมาณกรดแอมิโนกลุ่มรสม ได้แก่ ฮิสทิดีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโตนิน และไทโรซีน ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายมีปริมาณลดลง แต่ก็ยังมีรสมอยู่ เนื่องจากปริมาณกรดแอมิโนรสมยังมีมากเกินกว่าระดับความรู้สึกที่รับรู้ได้ (threshold) รสมจากโปรตีนไฮโดรไลเซทเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนขนาดเล็กที่ถูกย่อยแล้วเกิดเป็นกรดแอมิโนไม่มีขั้ว (Hydrophobic amino acid) รสมที่เกิดขึ้นสามารถกำจัดออกได้โดยใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobacillus* แต่จะให้ระดับการย่อยสลายและร้อยละของผลผลิตน้อยกว่าการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacillus* (Bao *et al.*, 2018, p. 65)

สมบัติของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อพีเอชแตกต่างกันพบว่า จุดที่โปรตีนตกตะกอนจะสอดคล้องกับรายงานของ Zhao *et al.* (2016, p. 11) ได้ทำการตกตะกอนโปรตีนของหนอนนก (*Tenebrio molitor*) ด้วยกรดพบว่าช่วงพีเอชที่ตกตะกอนของโปรตีนจากหนอนนกออยู่ในช่วงพีเอช 4–5.5 ในขณะที่จุดตกตะกอนของโปรตีนจากแมลงกินได้บางชนิด ได้แก่ ปลวก ผึ้ง ตัวอ่อนและดักแด้ของหนอนไหม และตัวอ่อนของด้วงค่อมทอง อยู่ในช่วงพีเอชเฉลี่ย 5.13–5.81 (Ademola *et al.*, 2017, p. 31) ซึ่งเป็นจุดที่ทำให้การละลายของโปรตีนต่ำที่สุด โดยโปรตีนจะละลายได้ดีในช่วงพีเอช 10–12 ความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้นในช่วงพีเอชที่สูงหรือต่ำนั้น เป็นผลมาจากโครงสร้างของกลุ่มโปรตีนที่คลายตัวออก มีผลทำให้กลุ่มโปรตีนที่ชอบน้ำ ละลายได้มากขึ้น นอกจากนั้นการย่อยสลายของพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ทำให้กรดแอมิโนแสดงความเป็นขั้วลบมากขึ้น ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับกับน้ำได้ดีขึ้น และทำให้ละลายน้ำได้มากขึ้น (Yu *et al.*, 2015, p. 176) ดัชนีชี้วัดความคงตัวของอิมัลชันจะมีความคงตัวสูง เมื่อพีเอชลดลง เนื่องจากประจุบนโมเลกุลของเปปไทด์จะแสดงประจุลบในสถานะที่เป็นด่าง ทำให้เกิดการคลายตัวของสายเปปไทด์ และเกิดการผลักกันระหว่างโมเลกุล ทำให้โมเลกุลเปปไทด์บนผิวหน้าของน้ำมันเคลื่อนที่ได้ดี โดยกลไกทั้งหมดนี้จะเพิ่มประสิทธิภาพของการชอบน้ำและไม่ชอบน้ำของเปปไทด์ ทำให้เสริมการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเม็ดไขมันกับน้ำบริเวณผิวหน้าของโปรตีน (Agugliaro *et al.*, 2012, p. 134) สายเปปไทด์ที่สั้นทำให้โมเลกุลของโปรตีนจะเคลื่อนที่ได้เร็วและดูดซับผิวไขมันได้ดี (Moreno *et al.*, 2016, p. 131) โดยความสามารถในการเกิดโฟมที่พีเอช 4 ที่มีการเกิดโฟมน้อย แต่มีความคงตัวของโฟมสูง สามารถอธิบายได้จากงานวิจัยของ Eldridge *et al.* (1963, p. 1954) ที่ความสามารถในการเกิดฟองจะมีค่าต่ำที่จุดตกตะกอนโปรตีน (Isoelectric point) และสนับสนุนงานวิจัยของ Munialo *et al.* (2015, p. 107) ที่รายงานว่าความคงตัวของโฟมจะเปลี่ยนไปเมื่อพีเอชมีการเปลี่ยนแปลง งานวิจัยที่สนับสนุนทฤษฎีนี้ คืองานวิจัยของ Adebowale *et al.*, (2005, p. 275) ที่ทำการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดสายพันธุ์ *Gryllidae sp.* แล้วความสามารถในการเกิดโฟมมีค่าเพียงร้อยละ 6 ที่พีเอช 4 โดยความคงตัวของโฟมที่พีเอช 4 ที่มีค่าสูงนั้นเกิดจากโปรตีนที่สามารถละลายน้ำ ที่มีความยืดหยุ่นของโครงสร้างโปรตีน แล้วเกิดปฏิกิริยาสร้างฟิล์มรอบอากาศทำให้ฟองสามารถคงตัวได้ (Razali *et al.* 2015, p. 657) ดังนั้นสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดได้ จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์เป็นตัวทำอิมัลชัน (Emulsifier) และสารทำฟอง (Foaming agent) ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีกรดต่ำบางประเภทได้

กิจกรรมการต้านออกซิเดชันที่วิเคราะห์ได้มีค่าสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนอนนก ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 360 นาที โดยมีค่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH, ABTS⁺ และ FRAP radical scavenging เท่ากับ 15.59 mgTE/g sample, 19.65 mgTE/g sample และ 1.25 mgFe²⁺/g sample ตามลำดับ (Jino *et al.*, 2020, p. 69) เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซทประกอบด้วยเปปไทด์ที่สามารถให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ แล้วเปลี่ยนกลุ่มของอนุมูลอิสระให้อยู่ในสถานะที่เสถียรและสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Ketnawa *et al.*, 2018, p. 388)

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่สกัดโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 360 นาที ได้ระดับการย่อยสลายสูงสุด ร้อยละ 80 และได้ผลผลิตร้อยละ 4.5 โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีสมบัติการละลายสูงสุดที่พีเอช 12 (ร้อยละ 96.97) มีความสามารถการเกิดโฟมและความคงตัวของโฟมสูงสุดที่พีเอช 12 เท่ากับร้อยละ 96.80 และร้อยละ 50 ตามลำดับ มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH 17.45 mg TE/g sample โปรตีนไฮโดรไลเซทจากจิ้งหรีดทองแดงลายที่ผลิตได้สามารถนำไปพัฒนาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร และสามารถนำไปประยุกต์เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นรส รวมถึงเป็นแหล่งโปรตีนใหม่ เพื่อสร้างคุณค่าให้ผลิตภัณฑ์แมลงกินได้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากโครงการการสร้างภาคีในการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท-เอก ระหว่างสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) กับสถาบันการศึกษา และทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เอกสารอ้างอิง

- Adebowale, Y. A., Adebowale, K. O., & Oguntokun, M. O. 2005. Evaluation of nutritive properties of the large African cricket (*Gryllidae sp.*). *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 48(4), 274-278.
- Ademola, O., A., Omolara, A., H. & Abioye, O. R. (2017). Amino acids profile of Bee brood, Soldier termite, Snout beetle larva, Silkworm larva and pupa: Nutritional Implications. *Advances in Analytical Chemistry*, 7(2), 31-38.
- Agugliaro, F.M., Muros, M.J.S., Barroso, F.G., Sánchez, A.M., Rojo, S. and Bañón, C.P. (2012). Insects for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 16(6), 3744-3753.
- Bao, J., Zhang, X., Zheng, H.H., Ren, D.F. & Lu, J. (2018). Mixed Fermentation of *Spirulina platensis* with *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* by Random-centroid Optimization. *Food Chemistry*, 264, 64-72.
- Benjakul, S. & Morrissey, M. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3423-3430.
- Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Faithong, N., Tanaka, M. & Kishimura, H. (2008). Composition, Antioxidative and Oxidative Stability of Mungoong, A Shrimp Extract Paste, From the Cephalothorax of White Shrimp. *Journal of Food Lipids*, 15, 97-118.
- Chobert, J. M., Bertrand-Harb. C. & Nicolas, M. G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey protein modified enzymatically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 674-677.
- Eldridge A.D., Wolf W.J. and Hall P.K. (1963). Stable foams from unhydrolyzed soybean protein. *Food Technology*. 17: 1592-1595.
- Ha, N., Jesus, G., Gonçalves, A., Oliveira, N., Sugai, J., Pessatti, N., Mouriño, J. & Fabregat, T. (2019). Sardine (*Sardinella spp.*) protein hydrolysate as growth promoter in South American catfish (*Rhamdia quelen*) feeding: Productive performance, digestive enzymes activity, morphometry and intestinal microbiology. *Aquaculture*, 500, 99-106.



- Hall, F. (2017). *Functional properties of whole tropical banded cricket (Grylloides sigillatus) protein hydrolysates*. A thesis submitted to the Faculty of Purdue University in Partial Fulfillment of the Requirements for the degree of Master of Science. Department of Food Science, West Lafayette, Indiana, USA.
- Hall, F., Johnson, P.E. & Liceaga, A. (2018). Effect of enzymatic hydrolysis on bioactive properties and allergenicity of cricket (*Grylloides sigillatus*) protein, *Food Chemistry*, 262: 39–47.
- Jino, T., Siriworn, T., Laokuldilok, T. & Surawang, S. (2020). The Optimum Condition of Protein Hydrolysate Extraction from Mealworm (*Tenebrio molitor*). In *The international conference on Food and applied bioscience 2020*. 6th–7th February 2020. Chiang Mai, Chiang Mai University.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Alvarez, O. & Rawdkuen, S. (2018). Fish Skin Gelatin Hydrolysates Produced by Visceral Peptidase and Bovine Trypsin: Bioactivity and Stability. *Food Chemistry*, 215, 383-390.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K.D. & Shahidi, F. (2008). Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 43, 1019–1026.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Moreno, P., Guadix, A., Guadix, E. & Jacobsen, C. (2016). Physical and Oxidative Stability of Fish Oil-in-water Emulsions Stabilized with Fish Protein Hydrolysates. *Food Chemistry*, 203, 124-135.
- Munialo, C.D., Van der Linden, E., Akt, K. and de Jongh, H.H.J. (2015). Quantitative analysis of the network structure that underlines the transitioning in mechanical responses of pea protein gels. *Food Hydrocolloids*. 49: 104–117.
- Pearce, K.N. & Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 26(3), 716–723.
- Purschke, B., Meinschmidt, P., Horn, C., Rieder, O. & Jager, H. (2017). Improvement of techno-functional properties of edible insect protein from migratory locust by enzymatic hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 244, 999–1013.
- Razali, A.N., Sarbon, N.M. and Amin, A.M. (2015). Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*. 22(2): 651–660.
- Sillero, J., Gharsallaoui, A. & Prentice, C. (2018). Peptides from Fish By-product Protein Hydrolysates and Its Functional Properties: an Overview. *Marine Biotechnology*, 20, 118-130.
- Wegier, A., Alavez, V., López, J.P., Calzada, L. and Cerritos, R. (2017). Beef or grasshopper hamburgers: The ecological implications of choosing one over the other. *Basic and Applied Ecology*. 26: 89-100.
- Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A. & van Boekel, M.J.A.S. (2013). Extraction and Characterization of Protein Fractions from Five Insect Species. *Food Chemistry*, 141, 3341–3348.
- Yu, L., Yang, W., Sun, J., Zhang, C., Bi, J. & Yang, Q. (2015). Preparation, Characterisation and Physicochemical Properties of the Phosphate Modified Peanut Protein Obtained from *Arachin Conarachin L*. *Food Chemistry*, 170, 169-179.
- Zhao, X., Vázquez-Gutiérrez, J.L., Johansson, D.P., Landberg, R. & Langton, M. (2016). Yellow Mealworm Protein for Food Purposes – Extraction and Functional Properties. *PLoS ONE Journal*, 11(2), e0147791.