Agricultural Sci. J. 39 : 3 (Suppl.) : 527-530 (2008) ว. วิทย. กษ. 39 : 3 (พิเศษ) : 527-530 (2551)

ผลของการสกัดโปรตีนจากผลิตผลพลอยได้จากการแปรรูปปลาดุกบิ๊กอุยที่สภาวะด่างต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสท

Effect of Alkali-aided Protein Extraction on Functional Properties of Protein Hydrolysates from Processed Hybrid Catfish Byproducts

ขวัญฤดี วชิรัตนพงษ์เมธี[1] ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ [1] และจิราวัฒน์ ยงสวัสดิกุล[2]

Kwanruedee Wachirattanapongmetee,[1] Supawan Thawornchinsombut [1] and Jirawat Yongsawatdigul [2]

Abstract

The effects of pH and ratios of minced hybrid catfish frame (HCF) to water on the protein extraction as well as the effects of enzymatic hydrolysis conditions on functional properties of alkali-aided protein hydrolysates were investigated. Proteins from HCF were maximally extracted at pH 11 and the ratio of 1:5 (HCF:water (w/v)). The alkali-extracted proteins were digested using a commercial proteolytic enzyme (Protex 6L) at different enzyme concentrations (0.05, 0.5, 1.5, and 3% v/w of protein) and hydrolysis time (60, 120 and 180 min). After freeze-drying, the alkali-extracted protein hydrolysate powders (APHPs) were analyzed compared to a conventional protein hydrolysate (CONTROL; HCF digested with 1.5% Protex 6L, 180 min) and commercial soy protein isolates (SPI-1 and SPI-2). An increase in degree of hydrolysis was obtained when concentration of enzyme and hydrolysis time increased ($p<0.05$). Using alkali-aided extraction prior to hydrolysis could considerably reduce fat content (~98%) in alkali-extracted protein (AP) and hydrolysis time (~3 times). Water and salt soluble proteins of all hydrolysates were markedly superior to those of AP and SPIs ($p<0.05$). Some APHPs demonstrated equal or superior functional properties such as water holding capacity, fat absorption, and emulsion activity index to the CONTROL, AP and commercial SPIs. Whereas, emulsion stability indexes of the CONTROL and APHPs with high degree of hydrolysis were higher than other samples.

Keywords: Hybrid catfish by-products, alkali-extracted protein, fish protein hydrolysates, functional properties

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาผลของ pH และอัตราส่วนโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดต่อน้ำในกระบวนการสกัดโปรตีน และผลของสภาวะในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดโดยใช้สภาวะด่าง พบว่าที่ pH 11.0 สามารถละลายโปรตีนได้สูงสุด และอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการสกัดโปรตีนของโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดต่อน้ำคือ 1:5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อนำโปรตีนสกัดที่สภาวะด่าง (AP) มาย่อยด้วยเอนไซม์เชิงการค้า (Protex 6L) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3.0 % (ปริมาตรต่อน้ำหนักของโปรตีน) และเวลาในการย่อย (60 120 และ 180 นาที) หลังจากผ่านการทำแห้งแบบระเหิดนำโปรตีนไฮโดรไลเสทผง (alkali-extracted protein hydrolysate powders; APHPs) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (CONTROL : โครงปลาดุกบิ๊กอุยบดย่อยด้วยเอนไซม์ 1.5 % นาน 180 นาที) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเชิงการค้า (SPI-1&-2) พบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) การสกัดโปรตีนที่สภาวะด่างก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์สามารถลดปริมาณไขมันลงได้ถึง 98 % และลดระยะเวลาในการย่อยได้ ~3 เท่าเมื่อเทียบกับ CONTROL ความสามารถในการละลายน้ำและสารละลายเกลือ (0.6 M NaCl) ของ APHPs มีค่าใกล้เคียงกับ CONTROL แต่สูงกว่า AP และ SPI ทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) APHPs บางหน่วยทดลองมีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ได้แก่ ความสามารถในการอุ้มน้ำ การดูดซับไขมัน และคุณสมบัติการเกิดอิมัลชัน ใกล้เคียงหรือดีกว่า CONTROL โปรตีนสกัดที่สภาวะด่าง และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเชิงการค้า ในขณะที่คุณสมบัติด้านความคงตัวของอิมัลชันของตัวอย่าง CONTROL และ APHPs ซึ่งมีระดับการย่อยสลายสูงมีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่น

คำสำคัญ : วัสดุเศษเหลือจากปลาดุกบิ๊กอุย โปรตีนสกัดด้วยด่าง โปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลา คุณสมบัติเชิงหน้าที่

---

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี / ศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

[1] Department of Food Technology, Faculty of Technology / Postharvest Technology Innovation Center, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

[2] School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University, Nakhorn Ratchasima 30000

คำนำ

ปลาเป็นแหล่งของโปรตีนที่มีคุณภาพน่าสนใจ โดยเฉพาะมีกรดอะมิโนที่จำเป็น อย่างเช่น ไลซีน และเมทไทโอนีน เป็นต้น ในกระบวนการแปรรูปปลาทูน่าก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณ 30 -35 % ซึ่งส่วนใหญ่จะนำไปผลิตเป็นอาหารสำหรับสัตว์และเศษเหลือทิ้ง ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือให้มากที่สุด แต่ยังมีข้อมูลที่จำกัดเกี่ยวกับวิธีการสกัดโปรตีนปลาที่เหมาะสมเพื่อรักษาคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน การดัดแปลงโปรตีนโดยใช้เอนไซม์เป็นทางเลือกหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสำหรับเก็บเกี่ยวโปรตีนปลาหรือวัสดุเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังสามารถปรับปรุงและเพิ่มคุณสมบัติเชิงหน้าที่ รวมไปถึงคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนได้อีกด้วย ในเร็วๆนี้ได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทปลาจากวัสดุเศษเหลือ (Šližytė *et al*., 2005) ซึ่งเปปไทด์ที่ได้มีคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟสูง เป็นที่น่าสนใจสำหรับเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ ได้มีงานวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนไฮโดรไลเสท รายงานว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาแซลมอนที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 1.5 % เพิ่มความสามารถในการอุ้มน้ำซึ่งลดการสูญเสียน้ำหลังจากการแช่แข็งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (Kristinsson and Rasco, 2000b) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถละลายน้ำได้ดีและยังมีบริเวณพื้นผิวที่เหมาะสมกับการเกิดอิมัลชัน (oil-in-water emulsions) เนื่องจากมีโปรตีนไฮโดรโฟบิกและโปรตีนไฮโดรฟิลิก ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญ (Wilding *et al*., 1984) อย่างไรก็ตาม การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัสดุเศษเหลือที่ผสมกัน (ประกอบด้วย เครื่องใน ลำไส้ และกระดูก เป็นต้น) อาจจะให้ผลผลิตน้อยเนื่องจากโปรตีนบางส่วนเกิดอิมัลชันกับไขมันในระหว่างกระบวนการผลิต ทางเลือกในการแก้ไขปัญหาดังกล่าวเพื่อเพิ่มผลผลิตและปรับปรุงคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสท ซึ่งเป็นเทคนิคใหม่ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยอาศัยการละลายของโปรตีนที่สภาวะกรดหรือด่าง หมุนเหวี่ยงเพื่อแยกส่วนที่ไม่ละลายออก ในขณะเดียวกันไขมันก็จะรวมตัวกันอยู่ส่วนบนสามารถแยกออกได้ ส่วนของโปรตีนที่ละลายได้ก็จะทำการเก็บเกี่ยวโดยตกตะกอนที่จุดไอโซอิเล็กตริค ทำให้ได้โปรตีนที่ยังคงคุณสมบัติเชิงหน้าที่หรือเป็นสารเติมแต่ง อย่างเช่น ในผลิตภัณฑ์ซูริมิ (Hultin and Kelleher, 1999; Hultin *et al*., 2000) Kristinsson and Hultin (2003) รายงานว่า โปรตีนไมโอซินและโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์จากปลาคอดที่ใช้สภาวะกรดหรือด่างสามารถปรับปรุงคุณสมบัติด้านอิมัลชันได้ สมมติฐานของงานวิจัยนี้คือ การใช้วิธีการปรับ pH เพื่อละลายโปรตีนให้มากที่สุดและแยกไขมันได้ดีก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ อาจจะช่วยปรับปรุงผลผลิตและลดระยะเวลาในกระบวนการ อีกทั้งอาจจะปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนได้

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 1) เพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการสกัดโปรตีนจากโครงปลาดุกบิ๊กอุยโดยใช้สภาวะด่าง และ 2) เพื่อศึกษาผลของการใช้โปรตีนสกัดที่สภาวะด่างมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำโครงปลาดุกบิ๊กอุยมาแยกส่วนหัวออกและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นบดให้ละเอียดและผสมซูโครส 8 % โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต 0.3 % BHA : BHT (1:1) 0.01 % และ EDTA 0.02 % บรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -35 °ซ. นาน 3 ชม. และเก็บรักษาที่ -20 °ซ. จนกว่าจะดำเนินการทดลอง

2. ศึกษารูปแบบการละลายของโปรตีนของโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดที่ระดับ pH ต่าง ๆ

ทำการผสมตัวอย่างโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดต่อน้ำขจัดอิออนในอัตราส่วน 1: 50 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นปรับ pH ของส่วนผสมให้ได้ 2.0 – 12.0 นำไปหมุนเวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 x g เป็นเวลา 20 นาที อุณหภูมิ 4 °ซ. และนำส่วนสารละลายใสมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

3. ศึกษาอัตราส่วนของโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดต่อน้ำที่เหมาะสมต่อกระบวนการสกัดโปรตีนปลา

นำโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดมาผสมกับน้ำในอัตราส่วนต่างๆ(1:3 1:5 1:7 และ 1:9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นทำการปรับ pH ที่สภาวะด่างที่ให้การละลายสูงสุด (จากข้อ 2) แยกเอาเฉพาะส่วนโปรตีนที่ละลายได้มาปรับ pH เป็น 5.5 เพื่อเก็บเกี่ยวโปรตีนโดยการตกตะกอน โปรตีนที่ได้เรียกว่า โปรตีนสกัดที่สภาวะด่าง (alkali-extracted protein ; AP) นำมาผสมกับน้ำตาลซูโครส 8 % บรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 °ซ.

4. ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาที่มีต่อกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

เตรียมส่วนผสมของโปรตีนสกัดที่สภาวะด่างโดยปรับอัตราส่วนกับน้ำเป็น 1:1.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และทำการปรับ pH และควบคุมอุณหภูมิ (8.0 และ 60°ซ. ตามลำดับ) เติมเอนไซม์เชิงการค้า(Protex 6L) โดยใช้ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3.0 % (โดยปริมาตรของโปรตีน) และระยะเวลาในการย่อย(60 120 และ 180 นาที) ในระหว่างกระบวนการย่อยทำ

การติดตามการเปลี่ยนแปลงระดับการย่อยสลายของโปรตีนทุกๆ 15 นาที โดยวิธี pH-stat (Adler-Nissen, 1977) เมื่อครบระยะเวลาในการย่อยทำการยับยั้งเอนไซม์ด้วยไมโครเวฟที่ระดับความร้อนสูงสุด นาน 3 นาที นำมาหมุนเวี่ยงแยกเอาส่วนโปรตีนที่ละลายได้ไปทำแห้งแบบระเหิด ได้โปรตีนไฮโดรไลเสทผง (alkali-extracted protein hydrolysate powders ; APHPs)

5. ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีกายภาพและคุณสมบัติเชิงหน้าที่

คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ APHPs ดังนี้ ความสามารถในการละลายน้ำและสารละลายเกลือ (0.6 M NaCl) (Thawornchinsombut and Park, 2006) ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Lin and Huang, 2003) ความสามารถในการดูดซับไขมัน (Shahidi *et al*., 1995) ความสามารถในการเกิดอิมัลชันและความคงตัว (Pearce and Kinsella, 1978) โดยเปรียบเทียบกับตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโครงปลาดุกบิ๊กอุยบด (Protex 6L 1.5% นาน 180 นาที (CONTROL)) โปรตีนสกัดที่สภาวะด่าง (AP) และโปรตีนถั่วเหลืองสกัดเชิงการค้า (soy protein isolates; SPI-1 และ SPI-2)

ผลและวิจารณ์ผล

ผลของรูปแบบการละลายโปรตีนของโครงปลาดุกบิ๊กอุยบดที่ระดับ pH ต่างๆ พบว่า ที่ pH 11.0 โปรตีนสามารถละลายมากที่สุด และที่ pH 5.5 โปรตีนละลายได้น้อยสุด (Fig. 1) อัตราส่วนของโครงปลาดุกบิ๊กอุยต่อน้ำที่ต่างกันให้ปริมาณผลผลิตโปรตีนสกัดที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ($p>0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้อัตราสวนที่ 1:5 เนื่องจากที่ 1:3 ทำให้ยากต่อการกวนผสม

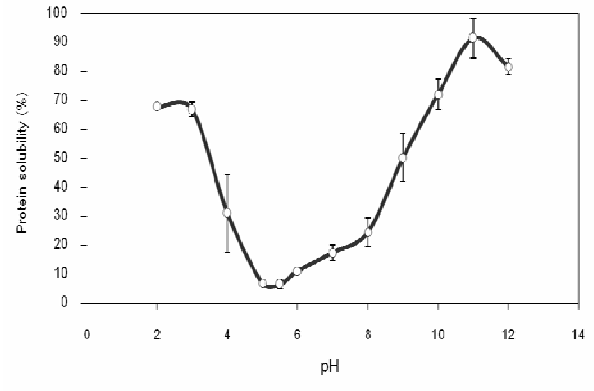

Figure 1. Effect of pH on the protein solubility minced of hybrid catfish frame.

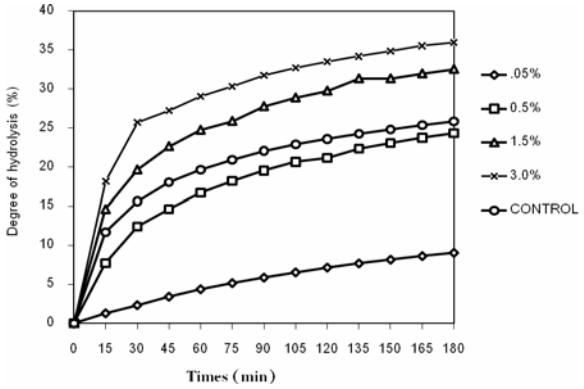

Figure 2. Enzymatic hydrolysis of alkali-extracted protein with Protex6L (0.05 %, 0.5 %, 1.5 %, and 3.0 %) and CONTROL (minced hybrid catfish frame, 1.5% Protex6L).

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยต่อกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท พบว่า ในช่วงระยะเวลา 60 นาทีแรก ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ 0.5-3.0% (มิลลิลิตรต่อ 100 กรัมโปรตีน) มีค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีน (degree of hydrolysis ; DH) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นจะทำให้ DH เพิ่มขึ้นด้วย โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นเอนไซม์ 3 % 180 นาทีให้ค่า DH สูงที่สุด (36.89%) (Fig. 2) การใช้วิธีสกัดโปรตีนที่สภาวะด่างจากโครงปลาก่อนนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทสามารถลดไขมันในโปรตีนที่สกัดได้สูงถึง ~98% และลดระยะเวลาในการย่อยโปรตีนได้ ~3 เท่า

ความสามารถในการละลายน้ำและสารละลายเกลือ (NaCl 0.6 โมลาร์) ของ APHPs มีค่าอยู่ในช่วง 56.9-70.0% และ 57.2-73.6% ซึ่งสูงกว่า AP (2.1% และ 0.1%) และ SPI ทั้ง 2 ชนิด (9.4 & 18.2% และ 5.0 & 7.5%) ตามลำดับ ($p<0.05$) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นมีผลให้โปรตีนไฮโดรไลเสท (APHPs) มีความสามารถในการอุ้มน้ำและความสามารถในการเกิดอิมัลชัน (Emulsion activity index; EAI) น้อยลงแต่ไม่มีอิทธิพลต่อค่าการดูดซับไขมัน การเติม APHPs (เอนไซม์ 1.5 %) SPI-2 และ CONTROL ทำให้เนื้อปลานิลบดมีความสามารถในการอุ้มน้ำเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) ตัวอย่าง APHPs บางหน่วยทดลองมีค่าการดูดซับไขมันสูงกว่า CONTROL AP และ SPI ทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) EAI ของ APHPs ทุกตัวอย่าง (0.32-0.68 ม^2/วินาที) มีค่าสูงกว่า CONTROL (0.14 ม^2/วินาที) ยกเว้น APHP ที่

ย่อยด้วยเอนไซม์ 3% นาน 2 และ 3 ชั่วโมง ($p<0.05$) ในขณะที่ความคงตัวของอิมัลชันของ CONTROL และ APHP ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ 3% นาน 2 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าการย่อยสลายสูง (เปปไทด์สายสั้น) มีค่าสูงที่สุด

Table 1. Parameter analysis of alkali-treated protein, alkali-treated protein hydrolysates, and conventional protein hydrolysate from hybrid catfish frame compared to commercial soy protein isolates.

Samples / Analysis	SPI-1	SPI-2	AP	CONTROL	APHPs (% Protex 6L)			
					0.05 (1-3 h)	0.5 (1-3 h)	1.5 (1-3 h)	3.0 (1-3 h)
Degree of hydrolysis (%)	-	-	-	25.8	5.0 - 8.1	17.4 - 24.9	26.0 - 33.9	30.6 - 36.9
Functional properties								
Water soluble protein (%)	9.4	18.2	2.1	60.0	58.7 - 68.1	56.9 - 64.9	59.8 - 67.3	62.2 - 70.0
Salt soluble protein (%)	5.0	7.4	0.1	43.1	57.2 - 73.6	58.8 - 62.8	60.3 - 64.6	60.6 - 71.1
Water holding capacity (mL/g sample)	0.35	0.43	0.40	0.45	0.42	0.38 - 0.40	0.44 - 0.47	0.34 - 0.36
Fat absorption (mL/g protein)	2.6	2.6	1.4	2.7	3.8 - 5.0	3.5 - 5.7	3.1 - 4.9	4.1 - 6.4
Emulsion activity index (m^2/g)	1.5	0.5	0.6	0.1	0.5 - 0.7	0.3 - 0.5	0.4	0.1 - 0.4
Emulsion stability index (min)	26.7	19.0	37.3	52.2	20.9 - 26.0	24.7 - 33.6	28.2 - 34.8	29.6 - 51.6

SPI-1 and SPI-2 = commercial soy protein isolates; AP = alkali-treated protein, CONTROL = conventional protein hydrolysate, and APHPs = alkali-treated protein hydrolysates from hybrid catfish frame.

สรุป

การใช้ด่างร่วมกับกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัสดุเศษเหลือโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนสามารถลดระยะเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ได้ และยังปรับปรุงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารเติมแต่งอาหารได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนงานวิจัยมา ณ โอกาสนี้ ได้แก่ ทุนจากศูนย์นวัตกรรมเทคโนโลยีหลังการเก็บเกี่ยว : หน่วยงานร่วมมหาวิทยาลัยขอนแก่น ทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว.

เอกสารอ้างอิง

Adler-Nissen, J. 1977. *Process Biochem* 12 (32) : 18 - 23.

Hultin, H.O., and Kelleher, S.D. 1999. Process for Isolating a Protein Composition from a Muscle Source and Protein Composition. U.S. Patent No. 6,005,073.

Hultin, H.O., Kelleher, S.D., Feng, Y., Kristinsson, H.G., Richards, M.P., Undeland, I.A., and Ke. S. 2000. High effeiciency alkaline protein extraction. U.S. Patent Application No. 60/230,397.

Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. *J Agric Food Chem* 48 : 657 – 66.

Kristinsson, H.G., and Hultin, H.O. 2003. *J Agric Food Chem* 51 : 5103 - 5110.

Lin, K.W., and Huang, H.Y. 2003. *Meat Sci*. 65(2): 749 -755.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. *J Biol Chem* 193: 265 - 275.

Pearce, K., and Kinsella, J.E. 1978. *J Agric Food Chem* 26 : 716 - 723.

Shahidi, F. 1994. Seafood : Chemistry , processing technology, and quality. London, U.K.: Blackie Academic & Professional.

Shahidi, F., Han, X.Q., and Synowiecki. 1995. *Food Chem* 53 : 285 - 93.

Šliž**ytė** R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., and Rustad, T. 2005. *Process Biochem* 40: 2021 – 2033.

Thawornchinsombut, S., and Park, J.W. 2006. *J Food Biochem* 31 : 427 - 455.

Wilding, P., Lilliford, P.J., and Regenstein, J.M. 1984. *J Chem Technol Biotechnol* 34B:182-189.