

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และปลากะพง :
สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอชอี

นางสาวปิยะนันท์ ชี้อเสียง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

PROTEIN HYDROLYSATE FROM TILAPIA AND PERCH FRAME:
ANTIOXIDANT AND ACE - INHIBITOR PROPERTIES

Miss Piyanan Chuesiang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และปลากระพง : สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ของเอชอีอี
โดย	นางสาวปิยะนันท์ ชื้อเสียง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเจียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมณี สงวนดีกุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนบุญชูร)

ปิยะนันท์ ชื่อเสียง : โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และปลากะพง : สมบัติการ
ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอซีอี. (PROTEIN HYDROLYSATE FROM
TILAPIA AND PERCH FRAME : ANTIOXIDANT AND ACE - INHIBITOR
PROPERTIES) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ. ดร. รมณี สงวนดีกุล, 163 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครง ปลานิล
และโครงปลากะพง ให้มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วิเคราะห์ โดยวิธี DPPH, metal chelating activity และ
วิธี TBA) และยับยั้งการทำงานของ ACE (% ACE inhibition) โดยย่อยสลายโปรตีนจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง
บด ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ในปริมาณ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 0, 1, 2 และ
3 ชั่วโมงตามลำดับ ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยส่งผลให้ % DPPH radical
scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่า
เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากสภาวะที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการ
ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล คือ สภาวะที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง
เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA
activity ratio และ % ACE inhibition เท่ากับ 90.38, 91.80, 70.54 และ 81.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่สภาวะที่
เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง คือสภาวะที่ย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 3
เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, %
TBA activity ratio และ % ACE inhibition เท่ากับ 96.80, 92.54, 90.12 และ 92.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้น
เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสภาวะที่คัดเลือกสำหรับโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลและโครงปลากะพงด้วยการ
ทำแห้งแบบพ่นกระจาย บรรจุถุงลามิเนตชนิด PP/ AL/ PE เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วัน และติดตามการ
เปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครง
ปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงโปรตีน
ไฮโดรไลเซทโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
ผลการศึกษาพบว่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE
inhibition มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้น โดยสมบัติในการเป็นสาร
ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE จะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 15 วัน และ 60 วัน
ตามลำดับ

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา2554.....

5272427823 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : PROTEIN HYDROLYSATE / TILAPIA FRAME / PERCH FRAME

PIYANAN CHUESIANG : PROTEIN HYDROLYSATE FROM TILAPIA AND PERCH

FRAME : ANTIOXIDANT AND ACE INHIBITOR PROPERTIES. ADVISOR: ASSOC.

PROF. ROMANEE SANGUANDEEKUL, Ph.D., 163 pp.

The optimum condition to produce protein hydrolysate from tilapia and perch frame with antioxidant (analyzed by DPPH method, metal chelating activity method and TBA assay) and ACE inhibitory properties were investigated. Minced fish frame was enzymatically hydrolyzed by using Flavourzyme[®] 1000 L at different concentration (0, 1, 2 and 3 % w/w) and hydrolysis time (0, 1, 2 and 3 hrs). The results showed that enzyme concentration and hydrolysis time affected the % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio and % ACE inhibition significantly ($P \leq 0.05$). Tilapia frame protein hydrolysate obtained by using 2 % Flavourzyme[®] 1000 L hydrolyzed for 1 hour and perch frame protein hydrolysate obtained by using 3 % Flavourzyme[®] 1000 L for 2 hours were the selected conditions due to the high value of % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio and % ACE inhibition which were 90.38, 91.80, 70.54 and 81.90 % for the selected tilapia frame protein hydrolysate, respectively. And % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio and % ACE inhibition were 96.80, 92.54, 90.12 and 92.59 % for the selected perch frame protein hydrolysate, respectively. Spray-dried of the selected protein hydrolysates from tilapia and perch frame were made. The powder protein hydrolysate were stored in laminated PP / Al / PE at room temperature for 90 days. The results showed that storage time significantly ($p \leq 0.05$) affected the decreasing of % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio and % ACE inhibition of spray dried tilapia and perch frame protein hydrolysate. Antioxidant and ACE inhibitor properties decreased 50% when stored for 15 days and 60 days, respectively.

Department :FOOD TECHNOLOGY..... Student's Signature

Field of Study :FOOD TECHNOLOGY... Advisor's Signature

Academic Year :2012.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รมนี สงวนดีกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาใช้เวลาอันมีค่าเพื่อให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนความเอาใจใส่ดูแลในทุกๆด้าน อย่างใกล้ชิดมาโดยตลอด รวมถึงกรุณาช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกียรติศักดิ์ ดวงมาลัย และ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนบุญชู กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เป็นอย่างสูง ที่กรุณาชี้แนะแนวทาง ให้คำแนะนำในการปรับปรุงและตรวจสอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งมีความสมบูรณ์ตามหลักสูตรปริญญา มหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณมูลนิธิชัยพัฒนา รุ่น 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บริษัท Brenntag Ingredients (Thailand) Public Co.,Ltd. และ บริษัท ทิพย์วันชัยซีฟู้ด จำกัด สำหรับความอนุเคราะห์ทางด้านเงินทุน วัสดุดิบ และความช่วยเหลือสนับสนุนในด้านต่างๆ ของการทำงานวิจัย

ขอบคุณพี่น้องและเพื่อนๆภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยสำหรับกำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่มีให้ตลอดการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือ และ อำนวยความสะดวกในทุกๆด้าน

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณย่า คุณพ่อ คุณแม่ คุณป้า และ พี่น้องของข้าพเจ้าที่ให้ความรัก กำลังใจ ความเอาใจใส่ และ อบรมสั่งสอนให้ข้าพเจ้ามีความอดทน พร้อมทั้งช่วยสนับสนุนในด้านทุนทรัพย์ให้แก่ข้าพเจ้าเสมอมา จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญกราฟ.....	ต
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 ปลานิล.....	3
2.2 ปลากะพง.....	4
2.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	4
2.4 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน.....	6
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์.....	11
2.6 ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH).....	14
2.7 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	17
2.8 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	17
2.9 สมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE.....	24
2.10 กระบวนการทำแห้ง.....	27
2.11 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์.....	29

บทที่	หน้า
3 อุปกรณ์และขั้นตอนวิธีการดำเนินงานวิจัย.....	31
3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิล และโครงปลากะพง ก่อนการย่อยสลาย.....	34
3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง.....	34
3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	35
3.2.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน.....	35
3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ โปรตีนไฮโดรไลเซต.....	36
3.3.1 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH.....	36
3.3.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Metal chelating activity.....	37
3.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของระบบที่มีไขมันเป็น องค์ประกอบ วิเคราะห์การเกิด lipid oxidation ด้วยการทดสอบกับ TBA.....	37
3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE.....	38
3.5 การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง ที่ถูกคัดเลือก.....	39
3.6 การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง ที่ถูกคัดเลือก.....	40
3.7 การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย.....	40
3.8 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACEของผง โปรตีนไฮโดรไลเซต.....	40
4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	41

บทที่	หน้า
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	103
รายการอ้างอิง.....	106
ภาคผนวก.....	115
ภาคผนวก ก. ตารางผลการทดลอง.....	116
ภาคผนวก ข. ตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติ.....	136
ภาคผนวก ค. วิธีวิเคราะห์ทางเคมี.....	145
ภาคผนวก ง. โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ชนิด และปริมาณ กรดอะมิโนอิสระ.....	151
ภาคผนวก จ. องค์ประกอบทางเคมีที่พบในเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L.....	161
ภาคผนวก ฉ. ตารางค่าคงที่ α , β และ h_{tot} ของวัตถุดิบโปรตีนชนิดต่างๆ.....	162
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	163

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่พบในอาหารโปรตีนชนิดต่างๆ (mg/g nitrogen).....	13
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิล.....	42
4.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับ ชนิด และปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในส่วนใสของโครง ปลานิลบดเจือจาง.....	57
4.3 % yield ของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....	65
4.4 ค่าสีในระบบ L* a* b* ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....	66
4.5 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....	67
4.6 องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลากะพง.....	76
4.7 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชนิดและ ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในส่วนใสของโครงปลา กะพงบดเจือจาง.....	88
4.8 % yield ของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง.....	94
4.9 ค่าสีในระบบ L* a* b* ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง.....	95
4.10 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครง ปลากะพง.....	95
ก.1 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล (%).....	116

ตารางที่	หน้า
ก.2	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิล.....117
ก.3	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิล.....118
ก.4	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิล.....119
ก.5	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....120
ก.6	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....121
ก.7	การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90 วัน.....122

ตารางที่	หน้า	
ก.8	การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงส่วนใสของ โครงปลานิลบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	122
ก.9	การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90 วัน.....	123
ก.10	การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงส่วนใสของ โครงปลานิลบดเจือจางเมื่อผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90 วัน.....	123
ก.11	การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท จากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน....	124
ก.12	การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของ โครงปลานิลบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	124
ก.13	การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibitionของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครง ปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน....	125
ก.14	การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibitionของผงโครงส่วนใสของ ปลานิลบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	125
ก.15	อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซท จากโครงปลากะพง (%).....	126

ตารางที่	หน้า
ก.16 ผลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ต่อค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	127
ก.17 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	128
ก.18 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	129
ก.19 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	130
ก.20 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	131
ก.21 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90 วัน.....	132
ก.22 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงส่วนใสของ โครงปลากะพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	132

ตารางที่	หน้า
ก.23 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	133
ก.24 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	133
ก.25 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	134
ก.26 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	134
ก.27 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	135
ก.28 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	135
ข.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยที่ระดับต่างๆ.....	136
ข.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล.....	136
ข.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี DPPH.....	137

ตารางที่	หน้า
ข.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี metal chelating Activity.....	137
ข.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี TBA.....	137
ข.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล.....	138
ข.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	138
ข.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	138
ข.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	139
ข.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	139
ข.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	139

ตารางที่	หน้า
ข.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% ACE inhibition ของผงส่วนใสของ โครงปลานิลบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	140
ข.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวน ของปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง.....	140
ข.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยสลายโปรตีน ในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง.....	140
ข.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี DPPH.....	141
ข.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี metal chelating activity.....	141
ข.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี TBA.....	141
ข.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง.....	142
ข.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการที่ผ่านการ ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	142
ข.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ผ่านการ เก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	142
ข.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % metal chelating activity ของผงส่วนใสของ โครงปลากะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	143

ตารางที่	หน้า
ข.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90 วัน.....	143
ข.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโครงปลา กะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	143
ข.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % ACE inhibition ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ผ่านการเก็บรักษา เป็นเวลา 90วัน.....	144
ข.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % ACE inhibition ของผงส่วนใสของโครงปลา กะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน.....	144

สารบัญญักรภาพ

กราฟที่	หน้า
2.1 ปฏิกริยาระหว่างสาร OPA (aromatic compound) และ primary amino group (H_2N-R_2) ในภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT : $HS-R_1$).....	15
4.1 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง.....	44
4.2 ระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ที่ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง.....	45
4.3 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH• ของโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิล.....	48
4.4 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก โครงปลานิล.....	50
4.5 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....	52
4.6 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล.....	54

กราฟที่	หน้า
4.7 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C) เปรียบเทียบ กับขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโครงปลานิลบดเจือจาง (B) และ สารละลาย CCA อิมมัลชันที่ใช้เป็น matrix สำหรับทดสอบ (A).....	61
4.8 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 400 - 1800 Da.....	62
4.9 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	68
4.10 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	71
4.11 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ ผงส่วนใสของโครงปลานิล บดเจือจาง.....	73
4.12 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและ ผงส่วนใสของโครงปลานิล บดเจือจาง.....	74

กราฟที่	หน้า
4.13 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก โครงปลากะพง เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อยเป็น 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง.....	78
4.14 ระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ที่ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง.....	79
4.15 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	81
4.16 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก โครงปลากะพง.....	83
4.17 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	85
4.18 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme [®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง.....	86

กราฟที่	หน้า
4.19 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (C) เปรียบเทียบ กับขนาดของเปปไทด์ในส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง (B) และ สารละลาย CCA อิมัตวที่ใช้เป็น matrix สำหรับทดสอบ (A).....	92
4.20 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ 2 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 400 - 1800 Da.....	93
4.21 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง.....	97
4.22 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผงส่วนใส ของโครงปลากะพงบดเจือจาง.....	99
4.23 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท จากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลากะพง บดเจือจาง.....	100
4.24 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท จากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เฟอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลากะพง บดเจือจาง.....	102

กราฟที่	หน้า
ง.1 โคโรมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล สภาวะที่ผ่านการย่อยสลายด้วย เอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโน มาตรฐาน (A).....	151
ง.2 โคโรมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบใน โครงปลานิลบดเจือจาง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับ โคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน (A).....	152
ง.3 โคโรมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน(A).....	153
ง.4 โคโรมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ในโครงปลากะพงบดเจือจาง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับ โคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน (A).....	154
ง.5 โคโรมาโตแกรมแสดงปริมาณกรดอะมิโน proline ที่เป็นองค์ประกอบ โครงปลานิลบดเจือจาง และโครงปลากะพงบดเจือจาง(B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโน proline มาตรฐาน (A).....	155
ง.6 โคโรมาโตแกรมแสดงปริมาณกรดอะมิโน proline ที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ในโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโคโรมาโตแกรมของกรดอะมิโน proline มาตรฐาน (A).....	156

กราฟที่	หน้า
ง.7 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 – 6000 Da.....	157
ง.8 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da.....	158
ง.9 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da.....	159
ง.10 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da.....	160

บทที่ 1

บทนำ

ผลิตภัณฑ์จากปลานิลและปลากะพงเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้นในประเทศแถบทวีปเอเชีย อาทิเช่น ประเทศจีน อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ ไต้หวัน และประเทศไทย โดยมีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นจาก 383,654 เมตริกตันในปี ค.ศ. 1990 เป็น 1,505,804 เมตริกตันในปี ค.ศ. 2002 (Yang และคณะ, 2009) เนื่องจากเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง และสามารถหาได้ง่ายภายในท้องถิ่นของประเทศไทย แต่เนื่องจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆจะรับซื้อปลานิลและปลากะพงคุณภาพดีที่มีน้ำหนักและมาตรฐานตามที่กำหนดเพื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง แต่สำหรับส่วนของปลานิลและปลากะพงที่เหลือจากการตัดแต่งในโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจะถูกนำมาขายในราคาถูกหรือนำมาขายเป็นอาหารสัตว์ทั้งที่ยังคงมีสารอาหารจำพวกโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก (Je และคณะ, 2009) ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ จึงน่าจะนำส่วนที่เหลือจากการตัดแต่งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารทางเลือก และ อาหารเพื่อสุขภาพที่มีคุณค่าทางโภชนาการ มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ และช่วยเพิ่มหรือปรับปรุงกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ (Je และคณะ, 2009)

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากการย่อยสลายโปรตีนในระดับที่เหมาะสม เกิดเป็นกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเจริญของจุลินทรีย์ และมีส่วนช่วยในการควบคุมความดันโลหิต การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาเพื่อให้ได้กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น แหล่งของโปรตีนตั้งต้นเพื่อเตรียมทำโปรตีนไฮโดรไลเซต ชนิดและภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลาย และระดับของการย่อยสลาย เป็นต้น

จากปัจจัยดังกล่าวทำให้มีความสนใจศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลาเพื่อเป็นการเพิ่มคุณค่าของวัตถุดิบที่มีอยู่ภายในประเทศให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และสามารถตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคได้เป็นอย่างดี โดยมีแนวคิดในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจากโครงปลาเพื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ การเป็นสารยับยั้งการทำงานของ Angiotensin I-converting enzyme (ACE) เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ

สมมติฐานงานวิจัย

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลา เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนในโครงปลา ให้เป็นกรดอะมิโน และ เปปไทด์ ซึ่งมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE

วัตถุประสงค์งานวิจัย

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และ โครงปลากระพง ให้มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากระพง (จากสภาวะที่ถูกคัดเลือก)

ขอบเขตงานวิจัย

1. ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากระพง ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ในปริมาณ และเวลาในการย่อยที่แตกต่างกัน โดยวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 3 วิธี คือ วิธี DPPH, วิธี metal chelating activity และ วิธี TBA ตามลำดับ และวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ในรูปของ % ACE inhibition
2. ติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากระพง ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบ spray dry ซึ่งบรรจุใน laminated aluminium foil ปิดที่อุณหภูมิห้อง ทุกๆ 15 วัน เป็นเวลา 90 วัน

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 ปลานิล

ปลานิล (tilapia, nile) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Tilapia nilotica* เป็นปลาที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย เลี้ยงง่าย โตเร็ว และมีรสชาติดี ปลานิลมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา และถูกนำเข้าสู่ประเทศไทยโดยประเทศญี่ปุ่น ปลานิลมีลักษณะคล้ายปลามอไทย แต่มีลักษณะที่พิเศษคือ มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน มีเกล็ด 47 แถวที่บริเวณแก้ม และตามลำตัวมีลายขวางจำนวน 9-10 แถบ (อุดม เรื่องนพคุณ, 2547)

ปลานิลเป็นปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจต่อประเทศไทย โดยมีรายงานว่าในปี พ.ศ. 2548 ประเทศไทยสามารถผลิตปลานิลคุณภาพดี (น้ำหนักมากกว่า 650 กรัมต่อตัว) 68,000 ตัน และปลานิลคุณภาพต่ำ 115,000 ตัน ผลผลิตที่ได้จากการแล่นเนื้อปลานิลขนาด 750 กรัม จะประกอบด้วย เนื้อปลา 39.16 เปอร์เซ็นต์ เศษเนื้อปลา 2.84 เปอร์เซ็นต์ หนังปลา 6.48 เปอร์เซ็นต์ หัวและก้างปลา 43.48 เปอร์เซ็นต์ และไส้และอวัยวะภายในของปลา 8.04 เปอร์เซ็นต์ (เลิศชัย พัฒนวิจิตร, 2548) สำหรับราคาจำหน่ายปลานิลนั้นขึ้นอยู่กับขนาดหรือน้ำหนักของปลา โดยพบว่าราคาขายส่งเฉลี่ย ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2552 ณ ตลาดไท อยู่ที่ 53.27 บาท ต่อกิโลกรัม สำหรับปลานิลขนาดใหญ่ (ไม่ระบุน้ำหนัก) รองลงมาคือ 42.82 บาท ต่อกิโลกรัม และ 32.06 บาท ต่อกิโลกรัม สำหรับปลานิลขนาดกลาง และขนาดเล็ก (ไม่ระบุน้ำหนัก) ตามลำดับ (กรมประมง, 2554) ในขณะที่ปลานิล (แล่นเฉพาะเนื้อ) จะมีราคาอยู่ระหว่าง 170-190 บาทต่อกิโลกรัม

ในกระบวนการอุตสาหกรรมแปรรูปปลานิลจะมีเศษปลาที่เหลือจากการตัดแต่ง หรือเศษปลาเหลือทิ้งจากขั้นตอนการแล่นเนื้อปลาประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเปียก ซึ่งเศษปลาเหล่านี้ยังคงอุดมไปด้วยสารอาหารจำพวกโปรตีน การศึกษาเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในเนื้อปลาคอด (cod) แล่น กับผลพลอยได้จากการแล่น พบว่าเนื้อปลาคอดแล่นมีปริมาณโปรตีน 14.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเปียก และ ผลพลอยได้จากการแล่น มีปริมาณโปรตีน 17.3 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักเปียก ตามลำดับ (Shahidi, 1994) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์จากปลาจะมีสารที่มีคุณสมบัติ

ในการเสริมกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ เช่น inosine-5'-monophosphate, glutamate และ กรดอะมิโนบางชนิดอีกด้วย (Nilsang และคณะ, 2006)

2.2 ปลากระพง

ปลากระพง (perch) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* เป็นปลาน้ำจืดขนาดใหญ่อาศัยอยู่ในเขตร้อนตามลำน้ำที่ติดต่อกับฝั่งทะเลของประเทศต่างๆ ในแถบตะวันออกเฉียงใต้และตะวันออกเฉียงไกล ตั้งแต่บริเวณตอนใต้ของจีนจนถึงอ่าวเปอร์เซีย (ปัญญา สุวรรณสมุท, 2545) สำหรับประเทศไทยนั้นปลากระพงจะอาศัยอยู่บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ฝั่งตะวันตก และมีอยู่ทั่วไปตามฝั่งมหาสมุทรอินเดีย เช่น ระยอง ชลบุรี และสมุทรสาคร เป็นต้น ปลากระพงเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ให้ผลผลิตสูง นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย และเป็นที่ต้องการของตลาด

ลักษณะโดยทั่วไปของปลากระพง มีลำตัวค่อนข้างยาว หนา และแบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่โค้งมน ส่วนท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน เส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวเส้นหลัง มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-61 เกล็ด (ประจितร วงศ์รัตน์ และคณะ, 2531)

2.3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

โปรตีนไฮโดรไลเซต คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนโดยอาศัยสมบัติของ กรดต่าง หรือเอนไซม์ ในการตัดสายโพลีเปปไทด์ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระ หรือ เปปไทด์สายสั้น เพื่อปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร โดยทั่วไปแล้วขั้นตอนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจะเริ่มจากการบดหรือสับวัตถุดิบให้ละเอียด เติมน้ำและสารเคมี(หรือเอนไซม์) ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปย่อยสลายในภาวะที่เหมาะสม จากนั้นยับยั้งการทำงานของสารเคมี(หรือเอนไซม์) และปั่นเหวี่ยงสารผสมเพื่อเก็บสารละลายส่วนใสไปทำแห้ง และวิเคราะห์สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อไป (Asbjorn, 1993)

2.3.1 วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต สามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่

2.3.1.1 การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรด เป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนในการผลิตค่อนข้างต่ำ สามารถย่อยสลายโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว แต่ทำให้ tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนจำเป็นถูกทำลาย และอาจมีกลิ่นรสของกรดตกค้างอยู่ในผลิตภัณฑ์ได้ สารละลายกรดที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีนได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก โดยทั่วไปนิยมใช้กรดไฮโดรคลอริก เนื่องจากมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าในการสลายพันธะเปปไทด์ และโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยสารละลายกรดจะมีเกลือ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการทำให้เป็นกลาง (neutralization) เกิดขึ้น การย่อยโปรตีนด้วยกรดซัลฟูริกจะเกิดเกลือแคลเซียมซัลเฟต ในขณะที่การย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกจะเกิดเกลือโซเดียมคลอไรด์ หรือโพแทสเซียมคลอไรด์ ซึ่งสามารถใช้ได้ในอาหารทั่วไป และไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อผลิตภัณฑ์ (Kristinsson และ Rasco, 2000)

2.3.1.2 การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบส

การย่อยโปรตีนด้วยสารละลายเบสนิยมใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ หรือ แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ในภาวะการย่อยที่ค่อนข้างรุนแรง (ใช้สารละลายเบสความเข้มข้น 4-5 M ที่อุณหภูมิสูง) ซึ่งอาจทำให้กรดอะมิโนบางชนิดเกิดปฏิกิริยา racemization เปลี่ยนจาก L-form เป็น D-form ที่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ (Kristinsson และ Rasco, 2000)

2.3.1.3 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นการใช้เอนไซม์โปรติเอสเพื่อตัดพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ เนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อสารตั้งต้น จึงไม่จำเป็นต้องใช้

เอนไซม์ในปริมาณมาก และไม่ต้องใช้ภาวะในการย่อยสลายที่รุนแรง การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จะให้อัตราการย่อยสลายค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับ การย่อยสลายด้วยกรดหรือเบส มีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตและปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ แต่อาจทำให้เกิดสารประกอบรสขม เนื่องจากหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic group) ในโมเลกุลของโปรตีนอาจเผยตัว (reveal) ออกมา แต่เมื่อมีการควบคุมระดับการย่อยสลายโปรตีน จะสามารถควบคุมไม่ให้เกิดรสขมได้ (Kristinsson และ Rasco, 2000)

2.4 การใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยสลายโปรตีน

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการตัดพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีนให้เป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระ โดยอาศัยน้ำเข้าร่วมปฏิกิริยา (ปราณี อานเป็รื่อง, 2547) สามารถแบ่งเอนไซม์โปรติเอสเป็นประเภทต่างๆ ได้ดังนี้

2.4.1 แบ่งตามตำแหน่งการตัดพันธะเปปไทด์ในสายโปรตีน เป็น 2 ประเภท คือ

2.4.1.1 **เอกซ์โซเพปติเดส** คือเอนไซม์ที่ตัดพันธะเปปไทด์ตรงปลายสายของโมเลกุลโปรตีน หากตัดทางปลายสายด้านหมู่อะมิโน (N-terminal) จะเรียกว่า aminopeptidase หากตัดทางปลายสายด้านหมู่คาร์บอกซิล (C-terminal) จะเรียกว่า carboxypeptidase

2.4.1.2 **เอนโดเพปติเดส** คือเอนไซม์ที่ตัดพันธะเปปไทด์อย่างอิสระในสายโปรตีน จนกระทั่งได้เปปไทด์สายสั้น เอนไซม์ประเภทนี้ จะมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นโปรตีนหลายชนิด จึงสามารถย่อยโปรตีนได้อย่างรวดเร็ว

2.4.2 แบ่งตามชนิดของสารที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เป็น 4 ประเภท คือ

2.4.2.1 Serine protease

เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์เอนโดเพปติเดสที่มีกรดอะมิโน serine อยู่ที่บริเวณเร่ง ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 7-11 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60°C มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 25000-30000 Da เอนไซม์ชนิดนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยสาร di-isopropyl-fluorophosphate (DFP) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น trypsin, thrombin, subtilisin และ elastase เป็นต้น (Whitaker, 1994)

2.4.2.2 Neutral protease (Metal-containing protease)

เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์เอกซ์โซเพปติเดสที่มีอะตอมของโลหะ เช่น สังกะสี เป็นหมู่ prosthetic มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 7-8 (แต่เอนไซม์จะมีความเสถียรอยู่ในช่วง pH 5-10) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 60°C ความเสถียรในการทำงานของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในภาวะที่มี calcium ion เป็นองค์ประกอบ เอนไซม์ประเภทนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยสารจับโลหะ(metal chelating agent) เช่น EDTA , 1-10 phenanthroline เป็นต้น ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น thermolysin, carboxypeptidase A และ carboxypeptidase B เป็นต้น (Whitaker, 1994)

2.4.2.3 Aspartic protease

เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น carboxyl protease และ acid protease มีกรดอะมิโน aspartic acid อยู่ที่บริเวณเร่ง มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 30000-40000 Da ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 3-4 มีความคงทนต่อสาร di-isopropyl-fluorophosphate (DFP) แต่ถูกยับยั้ง

ได้ด้วยสารประกอบ diazopeptones ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น pepsin และ renin เป็นต้น (Whitaker, 1994)

2.4.2.4 Cysteine peptase

เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ประเภทเอนโดเพปติเดสที่มีกรดอะมิโน cysteine อยู่ทีบริเวณเร่ง ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 6.0-7.5 เอนไซม์กลุ่มนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยสารที่มีหมู่ sulfhydryl เป็นองค์ประกอบ ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ เช่น papain และ bromelain เป็นต้น (Whitaker, 1994)

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ทางการค้าหลายชนิดที่นิยมใช้ย่อยโปรตีนในระบบอุตสาหกรรม เอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่ได้มาจากจุลินทรีย์ มีความจำเพาะในช่วงกว้าง และมีประสิทธิภาพสูงในการย่อยโปรตีน เอนไซม์เหล่านี้จะมีคุณสมบัติ และภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานแตกต่างกัน ตัวอย่างเอนไซม์ทางการค้าที่นิยมใช้เพื่อย่อยสลายโปรตีน มีดังนี้

1. Flavourzyme®

เป็นเอนไซม์ที่ได้จากเชื้อราชนิด *Aspergillus oryzae* เป็นเอนไซม์ผสมที่มีทั้งเอนโดเพปติเดส และ เอกซีโซเพปติเดส มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5-7 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 50 °C เอนไซม์ชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ลดความขมของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซท เมื่อย่อยสลายโปรตีนที่ระดับการย่อยสลายต่ำ

Nilsang และคณะ (2005) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 50 LAPU/g protein แปรความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ระยะเวลาในการย่อย 1-6 ชั่วโมง อุณหภูมิในการย่อย 45, 50, 55 และ 60°C พบว่า ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 50 LAPU/g protein คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) อุณหภูมิ 45°C และเวลาในการย่อยสลายเป็น 6 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีระดับการย่อยสลาย

โปรตีน 62 เปอร์เซ็นต์ และมี tryptophan ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสขม ในปริมาณต่ำ (ประมาณ 0.17 กรัมต่อลิตร) โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนปลาด้วย เอนไซม์ Flavourzyme® จึงไม่มีรสขม

Khantaphant, Benjakul และ Kishimura (2011) ศึกษาสมบัติในการเป็น สารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก brown stripe red snapper โดยใช้ เอนไซม์ Flavourzyme® 500 L ย่อยสลายที่อุณหภูมิ 50°C pH 7 ระยะเวลาในการย่อย สลาย 2 ชั่วโมง แปรระดับการย่อยสลายเป็น 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ผลการศึกษา พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกัน โดยมีค่า DPPH radical scavenging activity ประมาณ 10 mg Trolox ต่อ g protein ทุก ระดับการย่อยสลาย ในขณะที่เมื่อวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ โดยวิธี metal chelating activity พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีค่า Ferrous chelating activity ลดลงเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ โปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาสีกุนข้างเหลือง (yellow stripe trevally หรือ *Selaroides leptolepis*) เมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 500 L เปรียบเทียบกับการใช้ เอนไซม์ Alcalase 2.4 L พบว่า ที่ระดับการย่อยสลายเท่ากัน โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จาก การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 500 L มีค่า chelating activity สูงกว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Alcalase และโปรตีนไฮโดรไล เซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดจะมีค่า chelating activity สูงขึ้นเมื่อระดับ การย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น

Dekker และคณะ (2011) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต(ระดับการย่อยสลายโปรตีน เป็น 13 เปอร์เซ็นต์) จากโปรตีนไอโซเลทของปลานิล (tilapia protein isolate) โดยใช้ เอนไซม์ Flavourzyme® (ไม่ระบุความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้) ปริมาณ 2.5 เปอร์เซ็นต์ v/v

สำหรับเคลือบ mahimahi red muscle โดยศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซทในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน เพื่อพิจารณาอายุการเก็บรักษาของ mahimahi red muscle แปรระยะเวลาในการเคลือบเป็น 2 นาที และ 4 นาที ผลการศึกษาพบว่า เวลาที่ใช้ในการเคลือบ mahimahi red muscle ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนไฮโดรไลเซทของปลานิลไม่ส่งผลกระทบต่อสมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ($p \geq 0.05$) เมื่อวิเคราะห์สมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันพบว่า mahimahi red muscle มีค่า lipid hydroperoxides value เพิ่มขึ้นที่เวลาในการเก็บรักษาเป็น 67 ชั่วโมง และมีค่าสูงสุดที่เวลา 88 ชั่วโมง นอกจากนี้เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Thiobarbituric acid (TBA) พบว่า การเคลือบ mahimahi red muscle ด้วยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนไฮโดรไลเซทของปลานิลส่งผลการลดลงของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Thiobarbituric acid reactive substance : TBARS) เมื่อเทียบกับ mahimahi red muscle ที่ไม่ได้เคลือบ

2. Neutrase[®]

เป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิด *Bacillus licheniformis* หรือ *Bacillus amyloliquefaciens* เป็นเอนไซม์ชนิดเอนโดเพปติเดส มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 5.5-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 45-55 °C

3. Alcalase[®]

เป็นเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรียชนิด *Bacillus licheniformis* เป็นเอนโดเพปติเดส มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 8-8.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานคือ 55-60 °C

นอกจากชนิดของเอนไซม์แล้ว กิจกรรมของเอนไซม์ยังส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนด้วย กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญต่างๆ คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา ภาวะที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา (pH, อุณหภูมิ และ เวลา)

ชนิดของโปรตีนตั้งต้น (substrate) การเตรียมโปรตีนตั้งต้น และสารยับยั้ง ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

2.5.1 ปริมาณเอนไซม์ และสารตั้งต้น

ในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์นั้น ต้องอาศัยการจับกันของเอนไซม์และสารตั้งต้น อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะขึ้นอยู่กับจำนวนการชนกันของโมเลกุลทั้งสอง โดยในระยะแรกของปฏิกิริยา อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของสารตั้งต้น และเมื่อสารตั้งต้นเริ่มหมดไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาจะเริ่มลดลง และเข้าสู่ช่วงคงที่

2.5.2 ภาวะในการทำปฏิกิริยา

2.5.2.1 ผลของ pH ต่อการทำงานของเอนไซม์

โดยปกติแล้วเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน ช่วง pH ที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดี (optimum pH) ซึ่งสามารถพิจารณาได้จาก pH activity profile ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า pH และ relative activity ของเอนไซม์ ควบคู่ไปกับการคำนึงถึงเสถียรภาพในการทำงานของเอนไซม์ ในช่วงความเป็นกรดด่างนั้นๆ โดยสามารถสร้าง pH stability profile ได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง incubation pH และ กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (enzyme residual activity) (Adler-Nissen, 1986)

2.5.2.2 ผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์

เอนไซม์มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน อุณหภูมิจึงมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ อุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เกิดการเสียสภาพ และสูญเสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา เช่นเดียวกับความ

เป็นกรดต่าง เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) แตกต่างกัน และการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์นั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงเสถียรภาพของเอนไซม์ซึ่งสามารถพิจารณาได้จาก temperature stability profile ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง อุณหภูมิ และ กิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลืออยู่ (Adler-Nissen, 1986)

2.5.2.3 ผลของระยะเวลาในการย่อยโปรตีนต่อความสามารถของเอนไซม์

ระยะเวลาในการย่อยโปรตีน ส่งผลต่ออัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ในช่วงแรกของการย่อย เอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับโปรตีนตั้งต้นอย่างรวดเร็ว จนเกิดเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระ แต่เมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายมากขึ้นอัตราเร็วในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเริ่มคงที่ (Adler-Nissen, 1986)

2.5.3 ชนิดของโปรตีนตั้งต้น (substrate)

แหล่งโปรตีนตั้งต้น คือวัตถุดิบโปรตีนที่ใช้เป็น substrate ในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์เพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยปกติแล้วโปรตีนตั้งต้นเหล่านี้จะมีความแตกต่างกันในด้านของชนิดของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในสายโปรตีน ความแตกต่างนี้จะส่งผลต่อความจำเพาะในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์

สัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน โดยองค์ประกอบทางเคมีจะเปลี่ยนแปลงไปตาม ชนิด ช่วงอายุ และสภาวะต่างๆของสัตว์น้ำ กรดอะมิโนที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำจะมีปริมาณใกล้เคียงกับสัตว์อื่น แต่จะมีปริมาณ lysine, histidine และ arginine สูงกว่าสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (นฤมล อิศวเกศมณี, 2541)

McCance และ Widdowson (1978) รายงานปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น (ในหน่วย mg/g nitrogen) ที่พบในอาหารจำพวกโปรตีน ได้แก่ เนื้อปลา เนื้อสัตว์ นม และไข่ ตามตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นที่พบในอาหารโปรตีนชนิดต่างๆ (mg/g nitrogen)

กรดอะมิโน	ปลา	เนื้อสัตว์	นม	ไข่
Cysteine	70	80	60	110
Isoleucine	330	320	350	350
Leucine	530	500	640	520
Lysine	610	570	510	390
Methionine	180	170	180	200
Phenylalanine	260	280	340	320
Threonine	300	290	310	320
Tryptophan	70	80	90	110
Tyrosine	220	240	280	250
Valine	360	300	460	250
Total	2930	2830	3220	2820

ที่มา : McCance และ Widdowson (1978)

2.5.4 การเตรียมโปรตีนตั้งต้น

การเตรียมโปรตีนตั้งต้นให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ นิยมใช้การบดลดขนาดวัตถุดิบ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำปฏิกิริยาและเปลี่ยนโปรตีนในวัตถุดิบให้อยู่ในสภาพที่สามารถเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ได้ง่ายขึ้น การใช้ความร้อน และการสกัดไขมันออกจากวัตถุดิบ อาจทำให้เกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และส่งผลต่อการลดลงของอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์(เลิศชัย พัฒนวิจิตร, 2548)

2.6 ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยสลายโปรตีน คือ ดัชนีที่ใช้อธิบายปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ การติดตามระดับการย่อยสลายโปรตีนสามารถทำได้ 3 วิธี คือ การวัดปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ การวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้น และการไตเตรตปริมาณโปรตอนที่ถูกปลดปล่อย (Silvestre, 1997)

2.6.1 การวัดปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่

การวัดปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ อาศัยหลักการที่ว่า ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์จะทำให้ได้เปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระเพิ่มขึ้น ในขณะที่ปริมาณโปรตีนจะลดลง การติดตามปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ สามารถทำได้หลายวิธี เช่น วิธี Kjeldhal, การวัดค่าการดูดกลืนแสง, Folin-Lowry Color Development และวิธี Coomassie Brilliant G 240 เป็นต้น และสามารถคำนวณระดับการย่อยสลายโปรตีนได้จากสมการ (1)

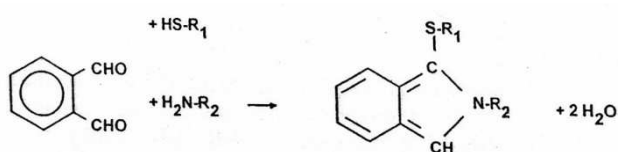
$$DH = \frac{\text{ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่}}{\text{ปริมาณโปรตีนทั้งหมด}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

2.6.2 การวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้น

การวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้นส่วนใหญ่จะใช้วิธีการทำให้เกิดสี โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาเฉพาะระหว่างสารเคมีบางชนิดกับหมู่อะมิโน ปฏิกิริยาที่รู้จักกันดีได้แก่ colorimetric ninhydrin reaction, trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) และ ortho-phthaldehyde (OPA) เป็นต้น สำหรับ colorimetric ninhydrin reaction เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร ninhydrin และ กรดอะมิโน เกิดสารประกอบสีน้ำเงินเข้ม วิธีนี้เป็นวิธีการเก่าแก่ที่มีความไวสูง แต่ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และปฏิกิริยาถูกรบกวนได้ง่ายจากแก๊ซออกซิเจนและแอมโมเนีย (Moore และ Stein, 1948) วิธี TNBS เป็นการใส่สาร TNBS ซึ่งทำปฏิกิริยาจำเพาะต่อ primary amino group เกิดเป็นสารประกอบสีเหลือง และสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร วิธี TNBS นี้มีข้อเสีย

คือ สาร TNBS เป็นสารไม่เสถียร สารละลายที่เตรียมเพื่อวิเคราะห์ต้องเก็บห่างจากแสง ใช้เวลาในการวิเคราะห์นาน และสารเคมีที่ใช้อาจปนเปื้อนด้วย picric acid ทำให้ค่า blank มีค่าสูง นอกจากนี้ TNBS ไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ proline และ hydroxyproline แต่สามารถเกิดปฏิกิริยากับ ϵ - amino group ของ lysine ได้ (Adler-Nissen, 1979) วิธี OPA เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยการทำปฏิกิริยากับ primary amino group เช่นเดียวกับวิธี TNBS แต่มีข้อดีกว่าตรงที่วิธี OPA นั้นเป็นวิธีที่ง่าย มีความถูกต้องสูง และใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยาเพียงแค่ 2 นาทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสง ทำให้สามารถติดตามค่า DH ในระหว่างการย่อยสลายโปรตีนได้อย่างต่อเนื่อง (Nielsen, Peterson และ Dambmann, 2001)

Nielsen, Peterson และ Dambmann (2001) อธิบายว่า การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธี OPA จะอาศัยการทำปฏิกิริยาของ OPA กับ primary amino group ในสภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT) ซึ่งมีหมู่ซัลไฟดริล (SH-compound) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ทำให้เกิดสารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรได้ ดังแสดงในรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ปฏิกิริยาระหว่างสาร OPA (aromatic compound) และ primary amino group (H_2N-R_2) ในสภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT: $HS-R_1$)

ที่มา : Nielsen, Peterson และ Dambmann (2001)

การคำนวณระดับการย่อยสลายโปรตีนโดยการวัดปริมาณกรดอะมิโนที่เพิ่มขึ้น สามารถหาได้จากสมการ (2)

$$DH = \frac{Lt-L0}{Lmax-L0} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

เมื่อ	Lt	= ปริมาณ α -amino acid ที่เวลา t
	L0	= ปริมาณ α -amino acid เริ่มต้น
	Lmax	= ปริมาณ α -amino acid หลังจากย่อยโปรตีนเสร็จแล้ว

2.6.3 การไตเตรตปริมาณโปรตรอนที่ถูกปลดปล่อย

การไตเตรตปริมาณโปรตรอนที่ถูกปลดปล่อยหรือเทคนิค pH-stat เป็นการวัดปริมาณเบสที่ใช้เพื่อรักษาระดับ pH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทในระหว่างการย่อยโปรตีน วิธีการนี้อาศัยหลักการคือ ในระหว่างการย่อยสลายโปรตีนไปเป็นเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระ ในภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นเบสเล็กน้อย หมู่ amino ที่ N-terminal จะรับโปรตรอนได้น้อยลง ในขณะที่หมู่ carboxyl ของ C-terminal จะปลดปล่อยโปรตรอนออกมา ภาวะเช่นนี้ส่งผลให้ค่า pH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทลดลง ดังนั้นเพื่อรักษาระดับ pH ให้คงที่จึงต้องมีการเติมสารละลายเบสอย่างต่อเนื่อง โดยทั่วไปแล้วสารละลายเบสที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือ สารละลายแคลเซียมไฮดรอกไซด์ วิธีการนี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน แต่ค่าระดับการย่อยโปรตีนที่ได้จะอยู่ในลักษณะของค่าสัมพัทธ์ การคำนวณระดับการย่อยสลายโปรตีนสามารถหาได้จากสมการ (3)

$$DH = B \times \frac{Nb}{Mb} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100 \dots \dots \dots (3)$$

เมื่อ	B	=	ปริมาณเบสที่ใช้ (มิลลิลิตร)
	Nb	=	ความเข้มข้นของเบสที่ใช้ (N)
	Mb	=	มวลของโปรตีน (กรัม)
	$\frac{1}{\alpha}$	=	ค่า calibration สำหรับ pH-stat ที่ pH 8.5 อุณหภูมิ 50-55 °C มีค่าเท่ากับ 1.04
	h tot	=	จำนวนพันธะเปปไทด์ในโปรตีนซึ่งมีค่าเท่ากับ 8.3 สมมูลต่อกิโลกรัมโปรตีน

2.7 สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท หมายถึง สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของโปรตีน ซึ่งมีผลต่อพฤติกรรมของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างการแปรรูป เก็บรักษา ตลอดจนการบริโภค สมบัติเชิงหน้าที่เหล่านี้เป็นผลมาจากองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดอะมิโนที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์ สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการอุ้มน้ำ สมบัติการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ สมบัติการเกิดโฟม สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เป็นต้น (Jamdar และคณะ, 2010) สำหรับงานวิจัยนี้จะมุ่งศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท คือ สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และ สมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

2.8 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant)

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุล หรือสารที่ประกอบด้วยอะตอมซึ่งมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยว (unpaired electron) เป็นองค์ประกอบ อนุมูลอิสระเหล่านี้ไม่เสถียร และมีพลังงานสูง จึงมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่นๆ (Aruoma, 1994) ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะเรียกว่า ปฏิกิริยาออกซิเดชัน ซึ่งมีการสูญเสียอิเล็กตรอนของสารให้กับอนุมูลอิสระ และเกิดอนุมูลอิสระชนิดใหม่ขึ้นในปฏิกิริยา อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับแก๊ซออกซิเจน เกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ซึ่งมีความสำคัญต่อการเสื่อมโทรมของเซลล์ต่างๆในร่างกาย

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารประกอบที่สามารถชะลอ หรือ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Halliwell, 1997) กลไกในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารต้านอนุมูลอิสระ แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน เช่น สารประกอบฟีนอลิกและ สารประกอบ aromatic amine จะกำจัดอนุมูลอิสระออกจากปฏิกิริยาลูกโซ่ (free radical scavenging antioxidant) ในขณะที่ คาโรทีนอยด์ จะทำหน้าที่ในการกำจัด singlet oxygen เป็นต้น (Niki, 2010) จากข้อมูลดังกล่าว ทำให้ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์จากสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ทั้งในแง่ของการเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางค์ เพื่อชะลอการเสื่อมสภาพของเซลล์ผิว และใช้เป็นส่วนผสมในอาหารเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้น

สำหรับสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกรดอะมิโน เปปไทด์ และโปรตีนไฮโดรไลเซตนั้น พบว่า สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้โดยการทำปฏิกิริยากับโลหะหนัก และ กำจัดอนุมูลอิสระออกจากระบบ เปปไทด์ส่วนใหญ่ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ มักจะประกอบด้วยกรดอะมิโน คือ histidine, tyrosine, methionine, tryptophan และ lysine เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล ชนิดของกรดอะมิโน และลำดับของกรดอะมิโน ล้วนส่งผลต่อสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์ (Pena-Ramos และ Xiong, 2001)

Wu, Chen และ Shiao (2003) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาแมคเคอเรล (*Scomber austriasicus*) ด้วยกระบวนการ autolysis เปรียบเทียบกับการใช้เอนไซม์ Protease N ในการย่อยสลาย โดยศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ เปปไทด์ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการย่อยสลาย ผลการทดลองพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Protease-N มีกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์เป็นองค์ประกอบในปริมาณมากกว่าที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากกระบวนการ autolysis โดยระบุว่า ปริมาณกรดอะมิโนอิสระ และ เปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นนี้ส่งผลโดยตรงต่อการเพิ่มขึ้นของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซต นอกจากนี้ ได้มีการศึกษาขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาแมคเคอเรลที่ผลิตได้ โดยพบว่า ขนาดของเปปไทด์ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 1400 Da มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 900 Da และ 200 Da ตามลำดับ

2.8.1 วิธีวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

2.8.1.1 วิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิธี DPPH เป็นวิธีวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอาศัยการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวจากสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่อนุมูล DPPH• ซึ่งมีสีม่วง เกิดการรีดิวซ์อนุมูล DPPH• ไปเป็นสารประกอบ DPPHn ซึ่งมีสีเหลือง และวัดการลดลงของสีโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทร-

โฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร วิธี DPPH นี้มีข้อดีคือ เป็นวิธีวิเคราะห์ที่ง่าย รวดเร็ว และไม่ต้องใช้เครื่องมือมาก แต่ปฏิกิริยาอาจถูกรบกวนได้ง่ายจากแสง แก๊ซออกซิเจน และสารรีดิวซ์ (Bernadini และคณะ, 2011) อนุมูล DPPH มีโครงสร้างที่เสถียรหากในระบบมีอนุมูลบางชนิดที่ว่องไวมากกว่า เช่น peroxy radical เป็นต้น สารต้านอนุมูลอิสระที่ต้องการทดสอบอาจทำปฏิกิริยากับอนุมูลว่องไวเหล่านั้น ทำให้ค่าความสามารถที่คำนวณได้ผิดพลาดไปจากความเป็นจริง (Prior, Wu และ Schaich, 2005) การคำนวณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH นั้น จะคำนวณออกมาในรูปของ % DPPH radical scavenging โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในสารละลายควบคุม ตามสมการ (4)

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = \frac{A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ sample}}}{A_{517 \text{ control}}} \times 100 \quad (4)$$

Jun, Jung และ Kim (2004) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครง yellowfin sole (*Limanda aspera*) โดยใช้เอนไซม์เปปซิน พบว่า ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นคือ RPDFDLEPPY มีขนาดโมเลกุล 13 kDa ซึ่งมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH

Klompong และคณะ (2007) ศึกษาอิทธิพลของชนิดของเอนไซม์ และระดับการย่อยสลายที่มีต่อสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง โดยวิธี DPPH พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) ทั้งที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] และ Alcalase ซึ่งมีระดับการย่อยสลาย 5เปอร์เซ็นต์มีค่า % DPPH radical scavenging activity สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลาย

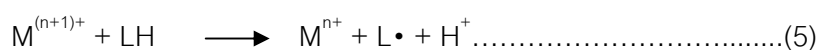
จนกระทั่งมีระดับการย่อยสลายเป็น 15 และ 25เปอร์เซ็นต์ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi (2007) ศึกษาองค์ประกอบและสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาทูแวก (round scad) (*Decapterus maruads*) ที่มีระดับการย่อยสลาย 60 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 500 L ในการย่อยสลาย เมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีค่า % radical scavenging activity เท่ากับ 59.9 เปอร์เซ็นต์

Wu, Chen และ Shiau (2003) รายงานว่า สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาแมคเคอเรล (*Scomber austriasicus*) ที่ใช้เอนไซม์ protease N ในการย่อยสลาย มีค่า % scavenging effect สูงกว่าในโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยสลายด้วยกระบวนการ autolysis โดยพบว่า % scavenging effect ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จะมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 5 ชั่วโมงแรกของการย่อย และจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาในการย่อยนานขึ้น

2.8.1.2 วิธี Metal chelating activity

เนื่องจากไอออนของโลหะหนัก เช่น Fe^{2+} , Cu^{2+} และ Co^{2+} เป็นต้น สามารถเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยเฉพาะ Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศเกิดเป็นสาร Superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆต่อไป ไอออนของโลหะเหล่านี้ยังสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนเข้าทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Sarkar, 1987) เกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีความว่องไวต่อการทำปฏิกิริยา ดังสมการที่ 5



นอกจากนี้ไอออนของโลหะหนักยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารบางชนิด เช่น ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) เกิดผลิตภัณฑ์คืออนุมูลอิสระที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดังสมการที่ 6 และ 7 ตามลำดับ



อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเหล่านี้สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารเสื่อมเสียได้ง่าย การเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่มีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักลงในผลิตภัณฑ์อาหารจึงสามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (Klompong และคณะ, 2007) การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการทำปฏิกิริยาไอออนของโลหะหนักนี้สามารถทำได้โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย $FeCl_2$ โดยมีสารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) ทำให้เกิดสีม่วงของ ferrozine- Fe^{2+} complex และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เช่นเดียวกับวิธี DPPH การคำนวณความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี metal chelating activity นั้น จะคำนวณออกมาในรูปของ % metal chelating activity โดยใช้ น้ำกลั่นแทนตัวอย่างในสารละลายควบคุม ตามสมการ 8

$$\% \text{ Metal chelating activity} = \frac{A_{562} \text{ control} - A_{562} \text{ sample}}{A_{562} \text{ control}} \times 100 \dots\dots\dots(8)$$

Dong และคณะ (2008) ศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากปลา Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) โดยวิธี metal chelating activity เปรียบเทียบอิทธิพลของชนิดของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยสลายที่มีต่อสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ

โปรตีนไฮโดรไลเซท พบว่าค่า % relative chelating activity มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายยาวนานขึ้น โดยอธิบายว่าเมื่อระยะเวลาในการย่อยสลายยาวนานขึ้น โปรตีนจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนและ เปปไทด์ขนาดเล็กที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะได้ ทำให้สามารถชะลอการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้

Klompong และคณะ (2007) รายงานสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี metal chelating activity ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 500 L มีค่า % metal chelating activity สูงกว่าในโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ใช้เอนไซม์ Alcalase ในการย่อยสลาย และยังกล่าวว่า ค่า % metal chelating activity นี้จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นโดยจะมีค่าประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์, 90 เปอร์เซ็นต์ และ 93 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 500 L ในการย่อยสลาย ที่ระดับการย่อยสลาย 5 เปอร์เซ็นต์, 15 เปอร์เซ็นต์ และ 25 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.8.1.3 วิธี TBA (Thiobarbituric acid)

ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid roxidation) เป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของแก๊ซออกซิเจนตรงบริเวณพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร ก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ คือ สารไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นๆ (เช่น malonaldehyde เป็นต้น) ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีกลิ่นหืนได้ต่อไป ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ปฏิกิริยาเริ่มต้น เป็นการเกิดอนุมูลอิสระของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร



2. ปฏิกิริยาไพโรพอกซัน เป็นการทำปฏิกิริยาของออกซิเจนกับอนุมูลอิสระจากปฏิกิริยาเริ่มต้น เกิดเป็นสาร lipid peroxy radical (LOO•)



3. ปฏิกิริยาเทอร์มินอล เป็นการผลิตสารไฮโดรเปอร์ออกไซด์จากการทำปฏิกิริยาของ lipid peroxy radical และ H•



สารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยไอออนของโลหะ หรือ ความร้อน จะแตกตัวไปเป็นสารระเหยโมเลกุลเล็ก ที่ทำให้เกิดกลิ่นรสไม่ดีในผลิตภัณฑ์อาหารได้ต่อไป (Fernandez, Perez-Alvarez และ Fernandez-Lopez, 1996)

การทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี TBA นั้นอาศัยหลักการวัดสีชมพูของสารประกอบเชิงซ้อน TBARS ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสาร TBA และ malonaldehyde ที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร และสามารถคำนวณ % TBA activity ได้จากสมการ 12

$$\% \text{ TBA} = \frac{A_{535} \text{ control} - A_{535} \text{ sample}}{A_{535} \text{ control}} \times 100 \dots\dots\dots (12)$$

Dong และคณะ (2008) กล่าวถึง สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา silver carp ที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavozyme® 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ว่า % inhibiting lipid oxidation ของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงที่สุดเมื่อใช้เวลาในการย่อยสลายเป็น 4 ชั่วโมง และจะเริ่มคงที่เมื่อเพิ่มเวลาในการย่อยสลายเป็น 5 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยรายงานว่าความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาในการย่อยสลายต่อค่า % inhibiting lipid oxidation ในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง ทั้งนี้ Pihlanto (2006) อธิบายว่า

องค์ประกอบต่างๆ ในโปรตีนไฮโดรไลเซท เช่น prooxidative agent และ สารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนซึ่งอาจเกิดขึ้นในระหว่างการย่อยสลาย เป็นต้น อาจ ส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าลดลง

Jeon, Byun และ Kim (1999) ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลาคอด โดยใช้เอนไซม์ที่สกัดได้จากทางเดินอาหารของปลา tuna และใช้เทคนิค ultrafiltration membrane เพื่อคัดแยกขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบใน โปรตีนไฮโดรไลเซท โดยใช้เยื่อคัดแยก 4 ขนาด คือ 30 KDa, 10 KDa, 5 KDa และ 3 KDa พบว่า ขนาดของเปปไทด์ส่งผลต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่ต่างกัน โปรตีน ไฮโดรไลเซทที่มีเปปไทด์ขนาด 10 K เป็นองค์ประกอบ มีความสามารถในการต้าน อนุมูลอิสระใกล้เคียงกับสาร α -tocopherol ที่ใช้เป็นสารละลายควบคุม เมื่อวิเคราะห์โดยวิธี TBA

2.9 สมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของACE (Angiotensin I converting enzyme inhibitor)

ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension) คือ ภาวะที่บุคคลมีระดับความดันโลหิต systolic และ/ หรือ diastolic ตั้งแต่ 140/90 mm Hg ขึ้นไป (Well และคณะ, 2009) ซึ่งภาวะ ความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยการศึกษาถึง ความสัมพันธ์ของระดับความดันโลหิตต่ออัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดของ บุคคลที่ช่วงอายุต่างๆ พบว่า อัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ ภาวะหัวใจ ขาดเลือด (Ischemic heart disease) และ โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) มีความสัมพันธ์แบบ แปรผันตรงกับระดับความดันโลหิต ในทุกช่วงอายุของกลุ่มผู้ทดสอบ (40-89 ปี)

กลไกการควบคุมระดับความดันโลหิตในร่างกายสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามระดับความเร็วในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิต คือ early response, intermediate response และ late response ตามลำดับ early response เป็นการตอบสนองอย่าง รวดเร็ว(ในระดับวินาที) ภายใต้การควบคุมของระบบประสาทอัตโนมัติ (sympathetic และ

parasympathetic) ส่งผลต่อการลดอัตราการเต้นของหัวใจ และทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดแดง และหลอดเลือดดำ ในขณะที่ intermediate response จะเป็นการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงความดันโลหิตโดยใช้เวลาในระดับ นาที หรือชั่วโมง ภายใต้การควบคุมของ renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) เมื่อความดันโลหิตในร่างกายลดลง ไตจะถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสาร renin เพิ่มขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการเปลี่ยน Angiotensinogen ไปเป็น Angiotensin I ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับ Angiotensin I converting enzyme ให้ผลิตภัณฑ์เป็นสาร Angiotensin II ที่สามารถก่อให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด และกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน antidiuretic (ADH) จากไฮโปทาลามัส และฮอร์โมน aldosterone จากต่อมหมวกไตทำให้การดูดซึมน้ำกลับของน้ำและเกลือจากท่อไตเข้าสู่หลอดเลือดเพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้นได้ สำหรับ late response นั้น จะเป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นโดยใช้เวลาเป็นวัน หรือสัปดาห์ โดยเมื่อความดันโลหิตในร่างกายสูงขึ้น ไตจะทำหน้าที่ในการเพิ่มการขับน้ำและเกลือออกจากร่างกาย (Chobanian, 2003)

Angiotensin I converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) เป็นเอนไซม์ประเภท zinc metalloproteinase ที่ทำหน้าที่ในการควบคุมความดันโลหิตของร่างกาย โดยตัดพันธะเปปไทด์ของสาร Angiotensin I (deca-peptide) จากปลาย carboxyl (C-terminal) ไปเป็นสาร Angiotensin II (octa-peptide) ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด ส่งผลให้ระดับความดันโลหิตในร่างกายเพิ่มขึ้น (Raghavan และ Kristinsson, 2009) สารบางชนิด เช่น เปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซต เป็นต้น และยาสังเคราะห์บางประเภท เช่น Captopril® และ Enalapril® เป็นต้น มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ ACE ตรงบริเวณเร่งของเอนไซม์ ทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์หยุดชะงัก ส่งผลให้การสังเคราะห์สาร Angiotensin II หยุดลง จึงสามารถรักษาระดับความดันโลหิตในร่างกายได้ โดยการควบคุมปริมาณสาร Angiotensin II (Murray, Walsh และ FitzGerald, 2004)

ชนิดและขนาดของเปปไทด์เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ขนาดของเปปไทด์ที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 2 ถึง 12 โมเลกุลกรดอะมิโน (Hernandez-Ledesma, Contreras และ Recio, 2011) โดย Natesh และคณะ (2003) อธิบายว่าบริเวณเร่งของเอนไซม์ Angiotensin I ไม่สามารถทำปฏิกิริยาเชิงซ้อนกับเปปไทด์ที่มี

โมเลกุลขนาดใหญ่ได้ แต่จะทำปฏิกิริยาได้ดีกับสารประกอบไตรเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำเป็นองค์ประกอบ ตรงบริเวณปลาย carboxyl กรดอะมิโนที่มีประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE คือ tyrosine, tryptophan, phenylalanine, proline, leucine, isoleucine, valine, lysine และ alanine (Gomez-Ruiz, Ramos และ Recio, 2004)

Nakajima, Yoshie-Stark และ Ogushi (2009) ศึกษาความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา 4 ชนิด คือ Atlantic salmon, Coho salmon, Alaska Pollack และ Southern blue whiting เปรียบเทียบอิทธิพลของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ pancreatin และ เอนไซม์ pepsin ในการย่อยสลายโปรตีน พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาทั้ง 4 ชนิดที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ pepsin ไม่แสดงความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ในขณะที่เมื่อใช้เอนไซม์ pancreatin ในการย่อยสลาย พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายปลา Alaska Pollack มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE สูงที่สุด แต่เมื่อศึกษาความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE โดยเปรียบเทียบอิทธิพลของพันธุ์ปลาแซลมอน 2 สายพันธุ์ คือ Atlantic salmon และ Coho salmon โดยใช้เอนไซม์ thermolysin ในการย่อยสลาย พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลา Coho salmon มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายปลา Atlantic salmon โดยมีกรดอะมิโนชนิดไม่ชอบน้ำ คือ valine, methionine, isoleucine, leucine และ phenylalanine เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE

Tsai, Chen และ Pan (2008) ศึกษาคุณสมบัติของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก hard clam (*Meretrix lusoria*) ซึ่งใช้เอนไซม์ Protamex สำหรับย่อยสลายโปรตีน ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง พบว่า สารประกอบไดเปปไทด์ คือ Tyr-Asn และสารประกอบไตรเปปไทด์ คือ Val-Arg-Lys มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 51 μ M และ 700 μ M ตามลำดับ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE สามารถทำได้ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น คือ hippuryl-L-histidyl-L-leucine ในขณะที่มีสารยับยั้งร่วมในปฏิกิริยา และวัดปริมาณ hippuric acid ที่เกิดขึ้น โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228 นาโนเมตร และเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งกับสารมาตรฐาน Captopril® (1-(3-mercapto-2-D-methyl-1-oxopropyl)-1-proline) ซึ่งเป็นยาสังเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพในการลดความดันโลหิต จากนั้นรายงานผลการวิเคราะห์ด้วยค่า % ACE inhibition หรือ IC₅₀ (Crushman และ Cheung, 1971)

2.10 กระบวนการทำแห้ง

กระบวนการทำแห้ง มีวัตถุประสงค์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยการถ่ายโอนโมเลกุลของน้ำออกจากโมเลกุลของอาหารทำให้ปริมาณน้ำอิสระในอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ และชะลอปฏิกิริยาเคมีต่างๆที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ การทำแห้งสามารถทำได้หลายวิธีเช่น การทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจาย (spray dry) การทำแห้งแบบลมร้อน หรือการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นต้น การทำแห้งด้วยวิธีพ่นกระจายเหมาะสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์รูปแบบผง การใช้ลมร้อนอุณหภูมิสูงเพื่อทำแห้งโดยวิธีนี้อาจทำให้เกิดการสูญเสียกลิ่นรสและสมบัติในการไหลของผลิตภัณฑ์ แต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะยังคงมีสารประกอบให้กลิ่นหลงเหลืออยู่ และสามารถคืนสภาพได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับการทำแห้งโดยวิธีอื่นๆ (Kumar และ Mishira, 2004)

2.10.1 การทำแห้งแบบพ่นกระจาย

การทำแห้งแบบพ่นกระจายเป็นวิธีทำแห้งที่นิยมใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ในรูปแบบผง โดยโมเลกุลอาหารจะเคลื่อนที่ผ่านหัวฉีด (atomizer) กลายเป็นหยดละอองเล็กๆภายในเครื่องอบแห้ง และเกิดการระเหยน้ำออกจากโมเลกุลอย่างรวดเร็วเมื่อถูกพัดผ่านด้วยลมร้อนอุณหภูมิสูง ผงผลิตภัณฑ์ที่ได้จะตกลงสู่ด้านล่างของ drying chamber และเคลื่อนที่เข้าสู่ cyclone ที่ใช้เก็บผงผลิตภัณฑ์ การอบแห้งแบบพ่นกระจายมีข้อดีคือ เป็นการทำแห้งในระบบปิดจึงมีการปนเปื้อน

น้อย มีประสิทธิภาพสูง อัตราการแลกเปลี่ยนความร้อนสูง และใช้เวลารวดเร็วในการทำแห้ง อย่างไรก็ตามกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายก็มีข้อเสียคือ หากโมเลกุลอาหารมีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส กาแลกโตส และซูโครส เป็นต้น เมื่อถูกความร้อนโมเลกุลจะเกิดการพองตัวและเก็บกักน้ำไว้ภายในโมเลกุล ทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนความร้อนลดลง ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะ เหนียว และเกาะกันเป็นก้อน (Bhandari, Datta และ Howes, 1997) การเติมสารช่วยทำแห้งจำพวก มอลโทเดกซ์ทริน จะมีส่วนช่วยในการลดค่า stickiness ของผลิตภัณฑ์ได้

มอลโทเดกซ์ทริน คือ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยกรด หรือ เอนไซม์ ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการเพิ่มความคงตัวของผลิตภัณฑ์อาหารในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายโมเลกุลของมอลโทเดกซ์ทริน ประกอบด้วยน้ำตาล D-glucose เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic และมีค่า dextrose equivalent (DE) ไม่เกิน 20 (ค่า dextrose equivalent คือ ค่าที่แสดงจำนวนแป้งที่ถูกไฮโดรไลซ์ หรือ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์) สมบัติเชิงหน้าที่ของมอลโทเดกซ์ทรินจะแตกต่างกันไปตามค่า DE โดยสมบัติเชิงหน้าที่สำคัญของมอลโทเดกซ์ทริน เช่น bulking ความสามารถในการละลาย กระจายตัว และความสามารถในการดูดซับความชื้น เป็นต้น

Silalai และ Roos (2011) พบว่าการเติมมอลโทเดกซ์ทรินที่มีค่า DE ระดับต่ำ (DE 9) จะช่วยลดค่า stickiness ของนมผงที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย ได้ดีกว่าการเติมมอลโทเดกซ์ทรินที่มีค่า DE ระดับสูง (DE 17)

Abdul-Hamid, Bakar และ Bee (2002) ศึกษาคุณค่าทางโภชนาการของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) โดยเปรียบเทียบอิทธิพลของอุณหภูมิความร้อนที่ใช้ในการทำแห้งเป็น 2 ระดับ คือ $150^{\circ}\text{C}/76^{\circ}\text{C}$ และ

180°C/90°C ตามลำดับ ซึ่งมีการผสมมอลโทเดกซ์ทริน ปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ต่อ ปริมาตรตัวอย่าง (ไม่ระบุค่า % DE ของมอลโทเดกซ์ทริน) ผลการศึกษาพบว่า ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการทำแห้งในแต่ละอุณหภูมิ มีกรดอะมิโน คือ aspartic acid, glutamic acid, serine, arginine, threonine, alanine, proline, tyrosine, valine, methionine, isoleucine, leucine, phenylalanine และ lysine เป็น องค์ประกอบ การทำแห้งโดยใช้อุณหภูมิสูงส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ต่อการ ลดลงของปริมาณกรดอะมิโนเหล่านี้ แต่คุณภาพโปรตีนของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ มีค่าสูง โดยพบว่าผงโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการทำแห้งที่อุณหภูมิ 150°C/76°C มี ค่า protein digestibility และ ค่า protein digestibility corrected amino acid score เป็น 92% และ 0.82 ตามลำดับ ในขณะที่ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการทำแห้งที่ อุณหภูมิ 180°C/90°C มีค่า protein digestibility และ ค่า protein digestibility corrected amino acid score เป็น 88.4% และ 0.34 ตามลำดับ

2.11 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

ในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ และ สมบัติเชิง หน้าที่ต่างๆ การพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา จะช่วยให้ สามารถกำหนดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารได้ อายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์คือ ระยะเวลา ที่ผลิตภัณฑ์อาหารยังคงสภาพเดิมและมีความปลอดภัยต่อการบริโภคภายใต้สภาวะการเก็บรักษา ที่เหมาะสม (Vankerschaver และคณะ, 1996) โดยทั่วไปแล้วผู้บริโภคจะนิยมใช้ลักษณะภายนอก ของผลิตภัณฑ์ เช่น สี ลักษณะเนื้อสัมผัส การเกิดการแยกตัวกันของอาหาร หรือ กลิ่น ในการ ประเมินคุณภาพของผลิตภัณฑ์ แต่ลักษณะภายนอกเหล่านี้ไม่สามารถบ่งบอกถึงคุณภาพทาง จุลินทรีย์คุณค่าทางโภชนาการ และ สมบัติทางเคมีของผลิตภัณฑ์ได้ (Lopez-Duarte และ Vidal-Quintanar, 2009) การศึกษาอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์จึงมีความสำคัญที่จะช่วยยืนยันถึง ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ คุณภาพทางประสาทสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการที่ยังคงอยู่ใน ผลิตภัณฑ์เหล่านั้นก่อนที่จะเกิดการเสื่อมเสีย

อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบใน ผลิตภัณฑ์ การเปลี่ยนแปลงทางเคมี และ การเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ใน

ระหว่างการแปรรูป และการเก็บรักษา รวมถึงปริมาณความชื้น และ คุณหมุมิในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วย เนื่องจากอาหารสดส่วนใหญ่จะมีอายุในการเก็บรักษาน้อยกว่าอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปเช่น การแช่แข็ง การทำให้เข้มข้น และ การทำให้แห้ง เป็นต้น กระบวนการเหล่านี้มีวัตถุประสงค์เพื่อลดปริมาณน้ำอิสระที่มีอยู่ในอาหาร จึงสามารถลดอัตรา การเจริญของจุลินทรีย์และ อัตราการเกิดปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้จึงมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน นอกจากกระบวนการทำแห้งต่างๆที่ได้กล่าวข้างต้น การเลือกบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้ยาวนานขึ้นโดยบรรจุภัณฑ์จะทำหน้าที่เสมือนเป็นกำแพงในการป้องกันผลิตภัณฑ์อาหารจากสภาวะภายนอก (Cruz, Faria และ Van Dender, 2007) ดังนั้นบรรจุภัณฑ์จึงไม่ใช่เพียงแค่บรรจุผลิตภัณฑ์อาหาร แต่ควรจะป้องกัน และ เสริมคุณค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Roberston, 1993)

ในปัจจุบันมีการพัฒนาชนิดของบรรจุภัณฑ์ต่างๆ ในหลายรูปแบบโดยบรรจุภัณฑ์ส่วนใหญ่จะผ่านกระบวนการลามิเนต (laminated) ซึ่งเป็นการเคลือบติดฟิล์มพลาสติกหลายๆ ชั้นเข้าด้วยกันจนกลายเป็นฟิล์มแผ่นเดียวหรือ เป็นการเคลือบฟิล์มพลาสติกเข้ากับวัสดุอื่น เช่น กระดาษ หรือ ฟอยด์โลหะ เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มความคงทนให้กับบรรจุภัณฑ์ และสามารถป้องกันการซึมผ่านของแก๊ส ความชื้น หรือ สารเคมีจากภายนอกเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ บรรจุภัณฑ์แต่ละชนิด จะเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่แตกต่างกัน สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้บรรจุภัณฑ์ชนิด aluminium foil ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซต เพื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา โดย aluminium foil มีคุณสมบัติในการป้องกันการซึมผ่านของก๊าซ น้ำ กลิ่น น้ำมัน และแสง ได้ดี ทำให้สามารถปกป้องและถนอมผลิตภัณฑ์ที่บรรจุอยู่ภายในได้ยาวนานกว่าฟิล์มชนิดอื่นๆ (Jena และ Das, 2012) อลูมิเนียมฟอยด์ สามารถใช้เป็นบรรจุภัณฑ์สำหรับ อาหารและยาที่ต้องการคงคุณค่าของสมบัติต่างๆ ภายในผลิตภัณฑ์

บทที่ 3 อุปกรณ์และขั้นตอนวิธีดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ

โครงปลานิล ได้มาจากปลานิลคุณภาพดี มีน้ำหนักต่อตัวมากกว่า 800 กรัม ซึ่งผ่านการแล่เนื้อปลา
ออกแล้ว จาก บริษัท ทิพย์วันชัยซีฟู้ด จำกัด จังหวัดชลบุรี

โครงปลากะพง ได้มาจากปลากะพงคุณภาพดี มีน้ำหนักต่อตัว ประมาณ 400 – 800 กรัม
ได้รับความอนุเคราะห์จาก มูลนิธิชัยพัฒนา ปลากะพงที่ได้มานั้น เป็นปลากะพงทั้งตัว จึง
ต้องนำมาแล่เนื้อออก ก่อนที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับงานวิจัย

เอนไซม์ Flavourzyme[®] 1000 L ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Brenntag Ingredients
(Thailand) Public Co.,Ltd.

ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์	รุ่นที่ผลิต	ตราสินค้า/ประเทศผู้ผลิต
- UV- spectrophotometer	Genesys 10 UV	Thermospectronic / U.S.A.
- Vortex	VTX-3000L	UZUSIO / Japan
- เครื่องบด(mincer)	KM 800	Kenwood / England
- Water bath shaker	GFL 1092	GFL / Singapore
- pH meter	Cyberscan 1000	Singapore
- Freezer -20°C	SF-C95	Sanyo / Japan
- Centrifuge	Rotanta 460R	Hettich / U.K.
- Oven	model 600	Memmert / Germany
- Soxhlet system	EV-16	Gerhardt / U.S.A.
- Kjeldahl system		
- Digestion unit	K - 424	BuCHI / Switzerland
- Scrubber unit	B - 141	BuCHI / Switzerland
- Distillation unit	B- 324	BuCHI / Switzerland
- Rotary evaporator	Aspirator A-35	EYELA / Japan
- Furnace	CWF 1200	Carbolite / England
- Spray dryer	B-290	BuCHI / Switzerland

- | | | |
|--------------------------------|---------------|---------------------|
| - เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง | BP 2105 | Sartorius / Germany |
| - เครื่องวัดสี | CR 300 series | Minolta / Japan |

เคมีภัณฑ์

สำหรับวิเคราะห์ proximate analysis

วิเคราะห์โปรตีน(Kjeldahl method)

- | | | |
|--------------------------------|--------|------------|
| - Selenium and Copper catalyst | Merck | A.R. grade |
| - Sulfuric acid | QReC | A.R. grade |
| - Sodium hydroxide | Rankem | A.R. grade |
| - Boric acid | QReC | A.R. grade |
| - Methyl red | QReC | A.R. grade |
| - Bromocresol green | QReC | A.R. grade |
| - Hydrochloric acid | QReC | A.R. grade |

วิเคราะห์ไขมัน

- | | | |
|-------------------|------|------------|
| - Petroleum ether | QReC | A.R. grade |
|-------------------|------|------------|

วิเคราะห์เยื่อใย

- | | | |
|---------------------|--------|------------|
| - Sulfuric acid | QReC | A.R. grade |
| - Sodium hydroxide | Rankem | A.R. grade |
| - Hydrochloric acid | QReC | A.R. grade |
| - Ethanol | QReC | A.R. grade |

สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

- | | | |
|-----------------------------------|-----------------------|------------|
| - Flavourzyme [®] 1000 L | Novozyme [®] | A.R. grade |
| - Sodium hydroxide | Rankem | A.R. grade |

สำหรับวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis : DH)

- | | | |
|------------------------------------|--------|------------|
| - Disodium tetraborate decahydrate | UNIVAR | A.R. grade |
|------------------------------------|--------|------------|

- Sodium dodecyl sulfate	Ajax finechem	A.R. grade
- <i>o</i> -Phthaldialdehyde	Fluka	A.R. grade
- Ethanol	QReC	A.R. grade
- Dithiothreitol	Fluka	A.R. grade
- Serine	Fisher Scientific	A.R. grade

สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับวิธี DPPH

- DPPH	Fluka	A.R. grade
- Absolute ethanol	QReC	A.R. grade
- BHA (Butylate hydroxylanisole)	ACROS ORGANICS	A.R. grade

สำหรับวิธี Metal chelating activity

- Ferrous chloride	QReC	A.R. grade
- Ferrozine (3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine)	QReC	A.R. grade

สำหรับวิธี TBA

- Soy bean oil		
- Absolute ethanol	QReC	A.R. grade
- Sodium dihydrogen phosphate	QReC	A.R. grade
- Disodium hydrogen phosphate	QReC	A.R. grade
- Sodium dodecyl sulfate	Ajax finechem	A.R. grade
- Glacial acetic acid	QReC	A.R. grade
- Sodium hydroxide	Rankem	A.R. grade
- TBA (Thiobarbituric acid)	Fluka	A.R. grade
- α -Tocopherol	Sigma	A.R. grade
- BHA (Butylate hydroxylanisole)	ACROS ORGANICS	A.R. grade

สำหรับวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE (ACE-inhibitor)

- | | | |
|-----------------------------------|---------------|------------|
| - Angiotensin I converting enzyme | Sigma | A.R. grade |
| - Hippuryl-L-histidyl-L-leucine | Sigma | A.R. grade |
| - Hydrochloric acid | Ajax finechem | A.R. grade |
| - Ethyl acetate | QReC | A.R. grade |
| - Captopril® | Fluka | A.R. grade |

สำหรับกระบวนการทำแห้ง

- Maltodextrin (10% DE) จากบริษัท เบอรัลลี่ ยูเคเกอร์ สเปเชียลตี้ส์ Food grade

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิลและโครงปลากะพงก่อนการย่อยสลาย

ในการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของโครงปลานิล และ โครงปลากะพง ก่อนการย่อยสลาย จะใช้โครงปลานิล หรือโครงปลากะพงซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C และผ่านการบดด้วยเครื่องบด (Kenwood KM 800) โดยจะวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เยื่อใย และ เถ้าที่เป็นองค์ประกอบในโครงปลานิล และ โครงปลากะพงเริ่มต้น (ภาคผนวก ค.) โดยอ้างอิงวิธีวิเคราะห์จาก AOAC (2000)

3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง

บดโครงปลานิล ด้วยเครื่องบด (Kenwood KM 800) แบ่งตัวอย่าง 5 กรัม ผสมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L เป็น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 50°C pH 7 เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นลงทันที และนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที เก็บสารละลายส่วนใสที่อุณหภูมิ -20°C จนกระทั่งนำไปใช้วิเคราะห์ในส่วนต่อไป ดำเนินการทดลองผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงเช่นเดียวกับในกรณีของโครงปลานิล

คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลา

กะพง โดยพิจารณาจากความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE (ซึ่งจะกล่าวถึงในหัวข้อต่อไป) โดยวางแผนการทดลองแบบ 4×4 factorial in CRD และวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยใช้ Duncan's new multiple range test ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซต

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และปลากะพงด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) ทดลอง 3 ซ้ำ

3.2.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (Degree of hydrolysis)

(Nielsen, Peterson และ Dambmann 2001)

เตรียมสารละลาย o-phthalaldehyde (OPA reagent) ด้วยการผสม di-sodium tetraborate decahydrate 7.620 กรัม และ sodium dodecyl sulfate 200 มิลลิกรัม ละลายในน้ำ deionized (DI) 150 มิลลิลิตร จนกระทั่งสารเคมีละลายหมด จากนั้นผสม dithiothreitol (DTT) 99 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.176 กรัม และสารละลาย OPA (ละลาย OPA 0.160 กรัม ใน ethanol 4 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรด้วยน้ำ deionized จนเป็น 200 มิลลิลิตร และปิเปตใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร และเตรียมสารละลายมาตรฐาน serine 0.050 กรัม ในน้ำ deionized 500 มิลลิลิตร

ซึ่งนำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 4 กรัม ละลายในน้ำ deionized 100 มิลลิลิตร ปิเปตใส่สารละลาย 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด OPA reagent เขย่าด้วย vortex เป็นเวลา 5 วินาที ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า degree of hydrolysis ดังนี้

$$\text{Serine-NH}_2 = \frac{\text{OD}_{\text{sample}} - \text{OD}_{\text{blank}}}{\text{OD}_{\text{standard}} - \text{OD}_{\text{blank}}} \times 0.9516 \times 0.1 \times 100$$

X × P

เมื่อ	Serine-NH ₂	=	meqv serine NH ₂ / g protein
	X		คือ น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
	P		คือ เปอร์เซ็นต์โปรตีนของตัวอย่าง

0.1 คือ ปริมาตรของตัวอย่าง (ลิตร)

$$h = (\text{Serine-NH}_2 - \beta) / \alpha \text{ meqv / g protein}$$

เมื่อค่า $\alpha = 1.00$, $\beta = 0.40$ และ $h_{\text{tot}} = 8.6$ (ภาคผนวก ด)

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{h}{h_{\text{tot}}} \times 100$$

3.3 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีน-ไฮโดรไลเซต

3.3.1 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

(Yang และคณะ, 2009)

เตรียมสารละลาย DPPH (ละลาย DPPH 0.0098 กรัม ใน Absolute ethanol 250 มิลลิลิตร) ปิเปตต์สารละลาย DPPH ใส่หลอดทดลอง หลอดละ 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล หรือ โครงปลากระพง ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร (มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) เขย่าด้วย vortex 10 วินาที และตั้งทิ้งไว้ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร ใช้สารละลาย BHA ความเข้มข้น 10 ppm เป็นสารละลายเปรียบเทียบ ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณค่า % DPPH radical scavenging ดังนี้

$$\% \text{ DPPH radical scavenging} = \frac{A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ sample}}}{A_{517 \text{ control}}}$$

เมื่อ	A 517 control	คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่น ในปริมาตรเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง
	A 517 sample	คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.3.2 ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี metal chelating activity (Klompong และคณะ, 2007)

การวัดความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี metal chelating activity นั้น ดัดแปลงจากวิธีของ Klompong และคณะ (2007) โดยผสมน้ำกลั่น 4.7 มิลลิลิตร และตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (กำหนดปริมาณโปรตีนเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex 10 วินาที จากนั้นผสมสารละลาย ferrous chloride (FeCl_2) ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และ สารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และเขย่าด้วย vortex อีกครั้งเป็นเวลา 10 วินาที ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ % metal chelating activity ดังนี้

$$\% \text{ metal chelating activity} = \frac{A_{562} \text{ control} - A_{562} \text{ sample}}{A_{562} \text{ control}}$$

เมื่อ	A 562 control	คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่น ในปริมาณเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง
	A 562 sample	คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ วิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบกับ TBA (Jeon, Byun และ Kim, 1999)

ผสมน้ำมันถั่วเหลือง ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ในสารละลาย absolute ethanol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ สารละลาย phosphate buffer pH 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และเติมตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (กำหนดปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ลงในสารผสม และ

เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 25 มิลลิลิตร บ่มสารละลายผสมที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 7 วัน

เตรียม TBA reagent โดยผสมน้ำกลั่น 0.8 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลายโซเดียมไดโครเมต ซัลเฟต ความเข้มข้น 8.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร และสารละลายกรดอะซิติก 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH เป็น 3.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 10 นอร์มอล จากนั้นเติมสารละลาย TBA ความเข้มข้น 0.8 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้น ปิเปตต์สารผสมของน้ำมันถั่วเหลือง และตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน TBA reagent บ่มที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร ใช้สารละลาย BHA ความเข้มข้น 10 ppm และสารละลาย α -tocopherol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารละลายเปรียบเทียบ ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ % TBA activity ratio ดังนี้

$$\% \text{ TBA activity ratio} = \frac{A_{535} \text{ control} - A_{535} \text{ sample}}{A_{535} \text{ control}}$$

เมื่อ A 535 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่น ในปริมาตรเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง
A 535 sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

(Crushman และ Cheung, 1971)

ผสมตัวอย่าง ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (มีปริมาณโปรตีน 0.006 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) เข้ากับ Angiotensin I converting enzyme (25 munit / ml) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองเขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำออกมาเติมสารละลาย hippuryl-L-histidyl-leucine ความเข้มข้น 8.3 มิลลิโมลาร์ (ในสารละลาย sodium-borate buffer pH 8.3) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37°C

เป็นเวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลาย hydrochloric acid ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลาย ethyl acetate ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เขย่าสารละลายด้วย vortex เป็นเวลา 10 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที ปิดเปิดเฉพาะสารละลายส่วนใสด้านบน ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง แล้วนำเข้าสู่ vacuum dryer เพื่อระเหยสารละลาย ethyl acetate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปิดน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง และนำไปวิเคราะห์ค่าการดูดกลืนแสงของสารที่ความยาวคลื่น 228 นาโนเมตร ใช้สารละลาย captopril® ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารเปรียบเทียบ ทดลอง 3 ซ้ำ และคำนวณ % ACE inhibition ดังนี้

$$\% \text{ ACE inhibition} = \frac{\text{A 228 control} - \text{A 228 sample}}{\text{A 228 control}}$$

เมื่อ A 228 control คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม ซึ่งใช้น้ำกลั่น ในปริมาตรเท่ากันแทนที่ตัวอย่าง

A 228 sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

3.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน

ไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงที่ถูกคัดเลือก

วิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) ตามวิธี inhouse method base on Journal of Chromatography A (2002), 961: 9-21 (ภาคผนวกที่ ค 5)

3.6 การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงที่ถูกคัดเลือก

วิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงด้วยเทคนิค Matrix assisted laser desorbition/ ionization (MALDI-tof) ตามวิธีของ Boontha และคณะ (2008) (ภาคผนวกที่ ค 6)

3.7 การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย

(Abdul-Hamid, Bakar และ Bee, 2002)

ละลายผงมอลโทเดริกซ์ทรีน (10% DE) 88 กรัม ลงในโปรตีนไฮโดรไลเซต (จากสภาวะที่ถูกคัดเลือก 4 สภาวะ ซึ่งได้กล่าวไว้ในหัวข้อ 3.2) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร แล้วป้อนเข้าสู่เครื่องทำแห้งแบบพ่นกระจาย (BuCHI Mini Spray Dryer B290) อัตราเร็ว 7 มิลลิลิตร ต่อนาที (30% feed rate) ใช้อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 150°C อุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 80-100°C จากนั้นคำนวณ % yield ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต ดังนี้

$$\% \text{ yield} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างสุดท้าย} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น}}$$

3.8 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (วิเคราะห์โดยวิธี DPPH, metal chelating activity และวิธี TBA) และความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และ โครงปลากะพง ซึ่งบรรจุในถุง laminated aluminium foil ปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง ทุกๆ 15 วัน เป็นระยะเวลา 90 วัน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และ โครงปลากระพง สำหรับงานวิจัยนี้ จะใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L เพื่อย่อยสลายโปรตีนในโครงปลา โดยแปร ปริมาณเอนไซม์ (0 , 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) และ เวลาในการย่อย (0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง) เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และ โครงปลากระพงไปใช้ประโยชน์ในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ยับยั้งการทำงานของ ACE ในการรายงานผลการทดลองนั้น จะรายงานในส่วนของการโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลเป็นอันดับแรก แล้วจึงตามด้วยผลการทดลองในส่วนของการโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากระพง โดยจะเริ่มรายงานจากการพิจารณาองค์ประกอบทางเคมีเริ่มต้นของโครงปลานิล ที่นำมาใช้เป็นแหล่งของโปรตีนตั้งต้นเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิล ก่อนการย่อยสลาย

โครงปลานิล ได้รับวัตถุดิบในลักษณะโครงปลา ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากกระบวนการผลิตโดยได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ทีพีวันชัยซีฟู้ด จำกัด เริ่มต้นเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยการบดโครงปลานิลด้วยเครื่องบด (Kenwood KM 800) โครงปลานิลที่ได้ จะมีลักษณะเหลว และ ประกอบด้วยกระดูกขนาดเล็ก จากนั้นจะวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิลก่อนการย่อยสลาย เพื่อเป็นการพิจารณาคุณภาพของวัตถุดิบเริ่มต้น โดยจะวิเคราะห์ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้าที่เป็นองค์ประกอบในโครงปลานิล ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิลเริ่มต้น แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิล

องค์ประกอบทางเคมี	โครงปลานิล (เปอร์เซ็นต์)	
	น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง
ความชื้น	65.34	-
โปรตีน	17.52	50.55
ไขมัน	10.61	30.61
คาร์โบไฮเดรต	1.24	3.58
เถ้า	5.29	15.26

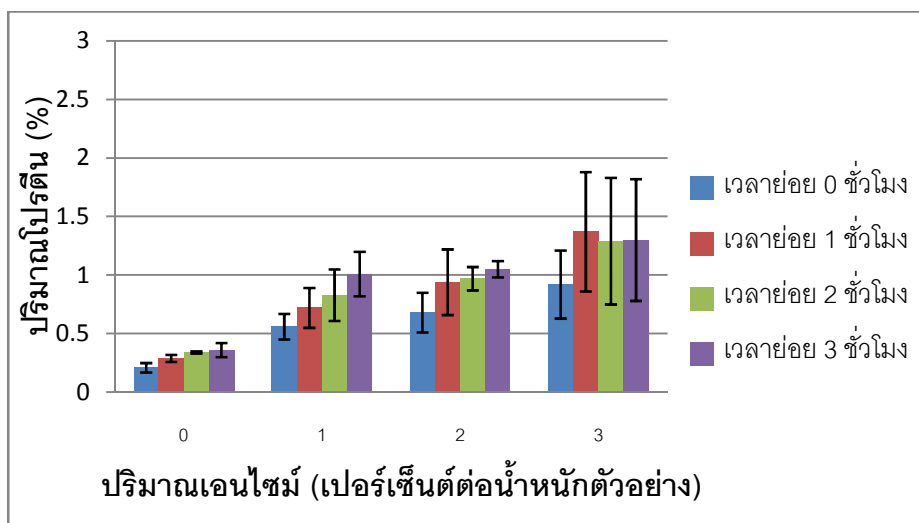
จากตารางที่ 4.1 โครงปลานิลมีองค์ประกอบทางเคมี คือ ความชื้น 65.34 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) มีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และเถ้า เท่ากับ 50.55, 30.61, 3.58 และ 15.26 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ องค์ประกอบทางเคมีที่วิเคราะห์ได้นี้มีค่าใกล้เคียงกับ องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่ง เลิศชัย พัฒนวิจิตร (2548) รายงานว่ามีความชื้นเป็นองค์ประกอบ 63.60 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) มีโปรตีน ไขมัน และ เถ้า เท่ากับ 34.62, 47.18 และ 12.45 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ ในขณะที่เมื่อ เปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลานิลสด ซึ่งมีปริมาณโปรตีน ไขมัน และเถ้า เท่ากับ 67.7, 16.8 และ 10.8 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับ (Steiner-Asiedu, Julshamn และ Lie, 1990) จะพบว่า โครงปลานิลมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่น้อยกว่าปริมาณโปรตีน ในเนื้อปลานิลสด แต่มีปริมาณไขมัน และ เถ้า เป็นองค์ประกอบมากกว่าที่พบในเนื้อปลานิลสด เนื่องจากองค์ประกอบของโครงสร้างส่วนใหญ่ คือ โครงกระดูก ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม เป็นต้น เป็นองค์ประกอบ (Wu, Stine และ Bechtel, 2011) ดังนั้นปริมาณเถ้าที่ วิเคราะห์ได้จากโครงปลานิลจะสูงกว่าที่พบในเนื้อปลานิลสด นอกจากนี้ส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโครงปลานิล ก็ส่งผลต่อการวิเคราะห์ปริมาณไขมันได้ เนื่องจากเนื้อเยื่อ เกี่ยวพันเหล่านี้จะมีเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก

4.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล สำหรับงานวิจัยนี้จะใช้ Flavourzyme[®] 1000 L เป็นเอนไซม์ในการย่อยสลาย โดยแปรปริมาณเอนไซม์ และ ระยะเวลาในการย่อยสลาย เป็น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์(ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C pH 7 เขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที เก็บเฉพาะสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (degree of hydrolysis : DH) และ ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

4.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านการวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนจะถูกนำมาวิเคราะห์ ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ โดยใช้วิธี Kjeldahl ซึ่งอาศัยหลักการวัดปริมาณไนโตรเจนที่เป็น องค์ประกอบในตัวอย่าง และเปลี่ยนเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้ conversion factor เท่ากับ 6.25 (Marco และคณะ, 2002) ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.1 (ตารางภาคผนวกที่ ก.1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สภาวะในการย่อยสลาย (ปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย) ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีปริมาณโปรตีน เริ่มต้น 0.21 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการย่อยสลาย ด้วยเอนไซม์ในปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และจะเพิ่มขึ้น จนกระทั่งมีค่าสูงที่สุด คือ 1.37 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อ น้ำหนักตัวอย่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณโปรตีนจะเริ่มมีค่าคงที่ ($p > 0.05$) เมื่อเพิ่ม ระยะเวลาในการย่อยให้ยาวนานขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากระยะเวลาในการย่อยที่มากขึ้น ทำให้ เอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้สมบูรณ์ จนกระทั่งสารตั้งต้นของเอนไซม์ถูกย่อยสลาย จนหมด ทำให้ปริมาณโปรตีนซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยามีค่าคงที่



รูปที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

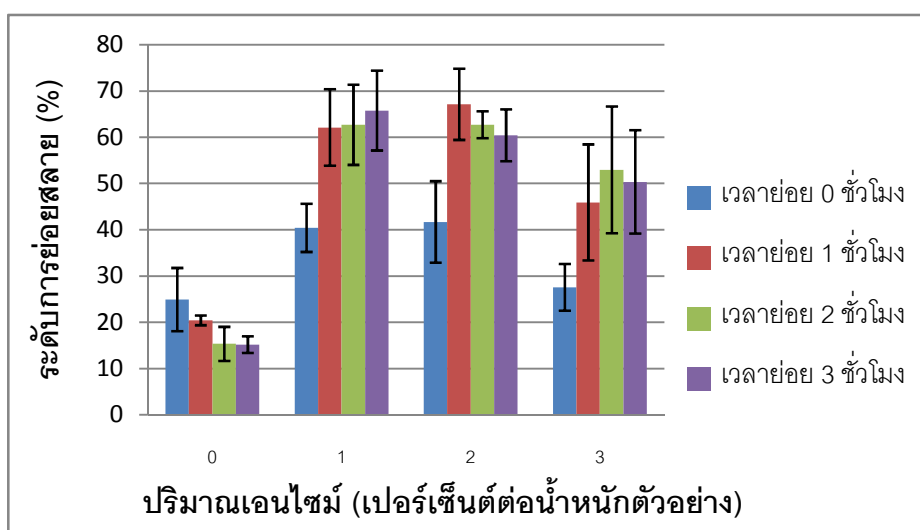
เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนในโครงปลานิลเริ่มต้น จะพบว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลนั้น มีน้อยกว่าในโครงปลานิลเริ่มต้น โดยเป็นผลมาจากโปรตีนส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนตะกอนโครงปลา (residue) ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง

4.2.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนจะใช้วิธี OPA ซึ่งเป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร OPA และ primary amino group ในสภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT) เป็นองค์ประกอบ (Nielsen, Peterson และ Dambmann, 2001) วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นที่มีความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร และคำนวณระดับการย่อยสลายของโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 (ตารางภาคผนวกที่ ก.2)

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง (ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์) ที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล มีระดับการย่อยสลายเริ่มต้น 24.90 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้น

อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในปริมาณ 1 เเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง โดยจะมีค่าสูงที่สุด คือ 67.10 เเปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ในปริมาณ 2 เเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นระดับการย่อยสลายจะมีค่าคงที่ ($p > 0.05$) แม้จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยให้มากขึ้น



รูปที่ 4.2 ระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เเปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

เมื่อพิจารณาเฉพาะการเพิ่มขึ้นของปริมาณเอนไซม์ ที่เวลาในการย่อยเป็น 0 ชั่วโมง จะพบว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์เพียงอย่างเดียว จะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากในกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากงานวิจัยนี้ จะผสมโครงปลานิลบดเจือจาง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร กับเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ในขวดรูปชมพู่ และมีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยการเพิ่มอุณหภูมิจาก 50°C ถึง 75 °C จะใช้เวลาประมาณ 5 นาที จึงอาจส่งผลให้โปรตีนบางส่วนเกิดการย่อยสลายโดย proteolytic enzyme ในโครงปลานิล และเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ที่เติมลงไปก่อนที่เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L จะถูกยับยั้งการทำงาน จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.2) สามารถกล่าวได้ว่า ปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มระดับการ

ย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ (ดวงใจ ลากยีนยง, 2548; ธีรพร จันทน์แสนโรจน์, 2550; Jamdar และคณะ, 2010) การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธี OPA นั้นจะอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร OPA กับ primary amino group ซึ่งการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ กรดอะมิโน และเปปไทด์ขนาดเล็ก จึงสามารถทำปฏิกิริยากับสาร OPA ได้ดีขึ้น การที่ระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล มีลักษณะเพิ่มขึ้นในช่วงแรก และเริ่มคงที่ในช่วงหลังของการย่อยสลายนั้น สามารถอธิบายได้โดยอาศัยพื้นฐานทางด้านการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น คือ เมื่อสารตั้งต้นเริ่มหมดไป อัตราเร็วของปฏิกิริยาการย่อยสลายสารตั้งต้นด้วยเอนไซม์จะลดลงและคงที่ ทำให้อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลดลงและคงที่เช่นกัน ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Batista และคณะ (2010) ที่ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา black scabbard ด้วยเอนไซม์ protamexTM โดยแปรความเข้มข้นของเอนไซม์เป็น 0.5, 1, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง ย่อยสลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธี OPA พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทมีระดับการย่อยสลายน้อยที่สุด คือ 24 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เอนไซม์ protamexTM ปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ ระดับการย่อยสลายจะมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 56.8 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นระดับการย่อยสลายนี้จะมีค่าคงที่ แม้จะเพิ่มปริมาณเอนไซม์เป็น 4 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง นอกจากนี้งานวิจัยของ ดวงใจ ลากยีนยง (2548) ซึ่งผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเครื่องในหอยเป่าฮื้อ โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme[®] 500 L ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักหอย ที่อุณหภูมิ 60°C pH 6 แปรระยะเวลาในการย่อยเป็น 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ตามลำดับ พบว่า เวลาในการย่อยมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายโปรตีนจากเครื่องในหอยเป่าฮื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีระดับการย่อยสลายสูงที่สุดคือ 52.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายเป็นเวลา 180 นาที โดยอธิบายว่า เวลาในการย่อยที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้มากยิ่งขึ้น

ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล จะไปใช้เป็นข้อมูลในการใช้กำหนดปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทแต่ละสภาวะให้

เท่ากับ คือ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ในกรณีของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ) และ 0.006 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร (ในกรณีของสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE) การทดลองในส่วนถัดไปจะเป็นการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เพื่อพิจารณาสมรรถภาพที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหาร

4.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

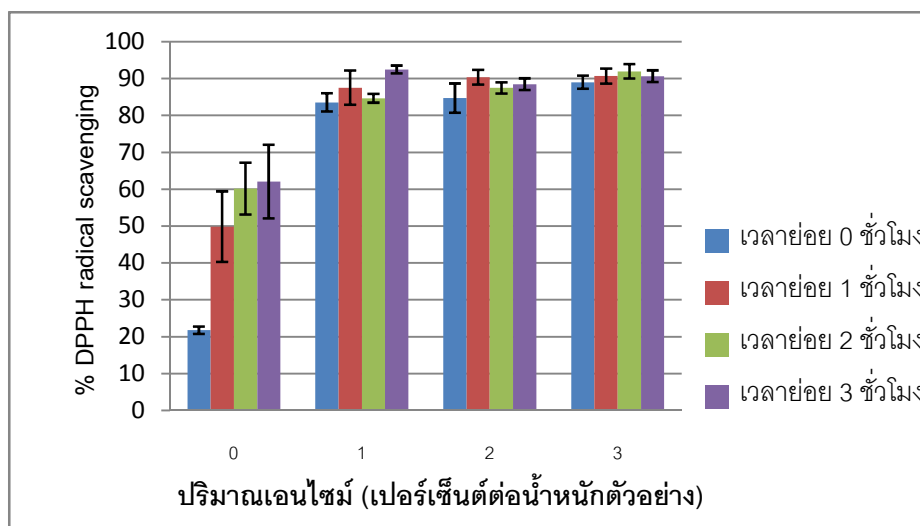
ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล 3 วิธี คือ วิธี DPPH, วิธี Metal chelating activity และ วิธี TBA โดยใช้ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลเท่ากับ 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งวิธีทดสอบทั้งสามวิธี จะมีหลักการวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของสารต้านอนุมูลอิสระแต่ละชนิด

เนื่องจากการวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทในปัจจุบัน ยังไม่มีวิธีในการวิเคราะห์ที่แน่นอน และเฉพาะเจาะจง การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพียงวิธีเดียว จึงไม่เพียงพอที่จะอธิบายกลไกในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทได้อย่างครอบคลุม ดังนั้นจึงควรวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยอาศัยการวิเคราะห์ที่มีหลักการแตกต่างกัน (Zulueta, Esteve และ Frivola, 2009) งานวิจัยนี้เลือกใช้การวิเคราะห์ 3 วิธี คือ วิธี DPPH, วิธี metal chelating activity และ วิธี TBA เพื่อพิจารณาความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้ครบถ้วน และครอบคลุม

4.3.1 วิธี DPPH

วิธี DPPH เป็นวิธีทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารต่างๆ โดยอาศัยการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวจากสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่อนุมูล DPPH• ซึ่งมีสีม่วง ที่ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เพื่อให้เกิดการรีดิวซ์อนุมูล DPPH• ไปเป็นสารประกอบ DPPHn ที่มีสีเหลือง

(Yang และคณะ, 2009) และติดตามการลดลงของสีจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร รูปที่ 4.3 (ตารางภาคผนวกที่ ก.3) แสดงความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH• ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล



รูปที่ 4.3 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH• ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.3) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ เวลาในการย่อย และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า % DPPH radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยรูปที่ 4.3 แสดงว่า ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังการปั่นเหวี่ยง มีค่า % DPPH radical scavenging เริ่มต้น เท่ากับ 21.78 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้น ($p \leq 0.05$) จนกระทั่งสูงที่สุด 92.47 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พิจารณาเปรียบเทียบค่า % DPPH radical scavenging ของ BHA ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ ที่ใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบสำหรับงานวิจัยนี้ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีปริมาณโปรตีน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวิเคราะห์ด้วย

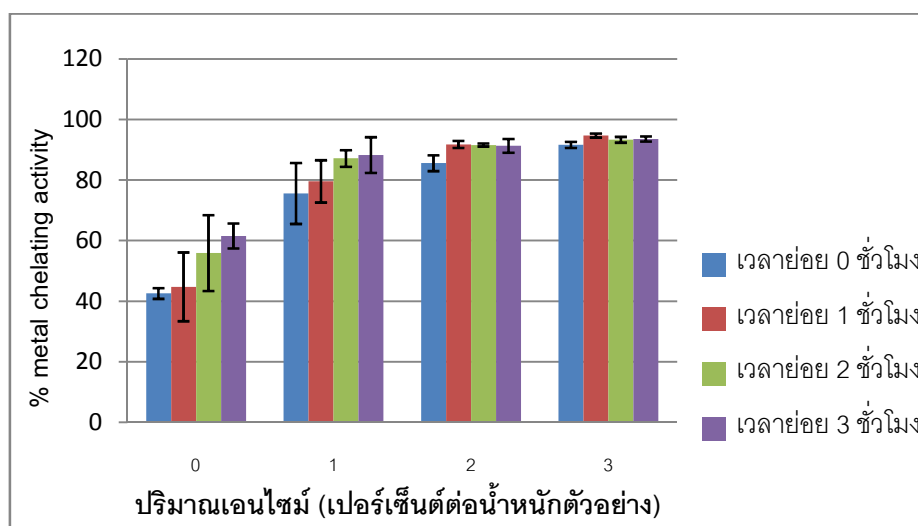
วิธี DPPH มากกว่าสารละลาย BHA ความเข้มข้น 10 ppm ซึ่งมีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 87.08 เปอร์เซ็นต์ (ไม่ได้แสดงผลการทดลองในรูปภาพ)

สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท จะขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ และขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซท (Pena-Ramos และ Xiong, 2001) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงในระหว่างกระบวนการย่อยสลาย กรดอะมิโนบางชนิด เช่น histidine, tyrosine, tryptophan และ phenylalanine เป็นต้น มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระออกจากระบบ ในขณะที่เปปไทด์ที่มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระนั้น จะต้องมีความยาวที่เหมาะสมอยู่ในช่วงประมาณ 1300-1400 Da (Wu, Chen และ Shiau, 2003 ; Jun, Jung และ Kim, 2004) จึงสามารถอธิบายผลการทดลองได้ว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อยสลาย จะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายโปรตีน ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสมในการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยงานวิจัยของ Wu, Chen และ Shiau (2003) ซึ่งศึกษาขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาแมคเคอเรล พบว่า ขนาดของเปปไทด์ ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 1400 Da มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 900 Da และ 200 Da ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Jun, Jung และ Kim (2004) ที่ย่อยสลายโครงปลา yellowfin sole ด้วยเอนไซม์เปปซิน พบว่า ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้นคือ RPDFDLEPPY มีขนาดโมเลกุล 1300 Da มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH

4.3.2 วิธี metal chelating activity

วิธี metal chelating activity เป็นการวัดความสามารถของสารในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ โดยอาศัยการทำปฏิกิริยาของสารต้านอนุมูลอิสระกับสารละลาย $FeCl_2$ เพื่อให้เกิดการจับกันของสารต้านอนุมูลอิสระ และ Fe^{2+} ก่อนที่จะเติมสารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) ซึ่งจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับ Fe^{2+} อิสระ เกิด Fe^{2+} - ferrozine complex ซึ่งมีสีม่วง ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที และวัดการลดลงของสี

ม่งงโดยอาศัยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร (Klompong และคณะ, 2007) รูปที่ 4.4 (ตารางภาคผนวกที่ ก.4) แสดงค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล



รูปที่ 4.4 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme[®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.4) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่าง ปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยกลับไม่ส่งผลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล จากรูปที่ 4.4 สามารถอธิบายผลการทดลองได้ว่า % metal chelating activity ของส่วนเสของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังการบั่นเหวียง มีค่าเริ่มต้น 42.59 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้นจนกระทั่งสูงที่สุดในช่วง 85.59 – 94.72 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ซึ่งส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้น โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ขนาดเล็ก ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้ (Dong และคณะ, 2008)

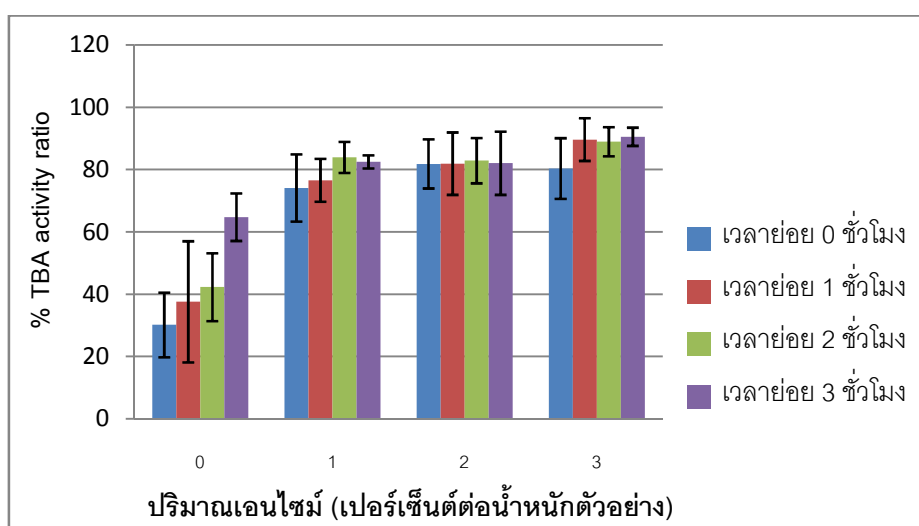
ทำให้ % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลมีค่าเพิ่มขึ้น กรดอะมิโนบางชนิด เช่น lysine, arginine, aspartic acid, glutamic acid และ histidine เป็นต้น สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้ ในขณะที่เปปไทด์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้นั้น มักจะมีหมู่อะมิโน และ/หรือ หมู่คาร์บอกซิล ที่บริเวณ side chain ของ กรดอะมิโนที่มีความเป็นกรด และ/หรือ มีความเป็นเบสอยู่มาก นอกจากนี้ตำแหน่งของกรดอะมิโนในสาย เปปไทด์ก็ส่งผลต่อความสามารถในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักเช่นกัน โดยพบว่าเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน histidine ที่ตำแหน่ง N-terminal จะมีความสามารถในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้ดีกว่าเมื่อมี histidine ที่ตำแหน่ง C-terminal (Arcan และ Yemenicioglu, 2007; Saiga, Tanabe และ Nishimura, 2003; Suetsuna, Ukeda และ Ochi, 2000) ผลการทดลองในส่วนของ % metal chelating activity นี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ซึ่งผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® ในการย่อยสลาย และพบว่า % metal chelating activity มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มระดับการย่อยสลายจาก 5 เป็น 15 เปอร์เซ็นต์ และจากนั้น % metal chelating activity จะมีค่าคงที่ แม้ระดับการย่อยสลายโปรตีนจะเพิ่มขึ้นเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ โดยกล่าวว่าเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง จะทำหน้าที่เป็น primary และ secondary antioxidant ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้

4.3.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ วิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบกับ TBA

สำหรับผลิตภัณฑ์อาหารซึ่งมีไขมันเป็นองค์ประกอบ เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษา ยาวนานขึ้น จะเกิดการเสื่อมคุณภาพเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านั้นไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค การเติมสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน จึงอาจมีส่วนช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารให้ยาวนานขึ้น งานวิจัยนี้จึงเลือกวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล โดยการวัดการเกิด lipid peroxidation โดยใช้น้ำมันถั่วเหลืองเป็น

ตัวแทนของไขมันที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหาร และจะทำการวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation ด้วยวิธี TBA ซึ่งเป็นการวัดความสามารถของสารในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ การทดสอบโดยวิธีนี้จะเริ่มต้นจากการผสมน้ำมันถั่วเหลืองและผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้ากับสารละลาย เอทานอลและ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 7 วัน นำมาทำปฏิกิริยากับสาร TBA วิเคราะห์ค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากการติดตามค่าการดูดกลืนแสงของสารสีชมพูที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร รูปที่ 4.5 (ตารางภาคผนวกที่ ก.5) แสดงค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.5) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยไม่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)



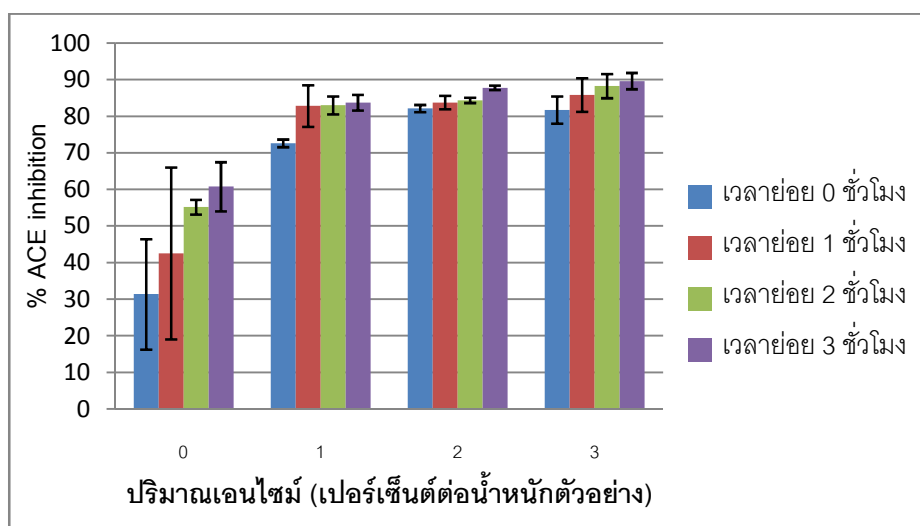
รูปที่ 4.5 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อ น้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

จากรูป 4.5 จะเห็นว่าส่วนไอโซของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังการปั่นเหวี่ยงมีค่า % TBA activity ratio เริ่มต้น 30.18 เปอร์เซ็นต์ และจะเพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 90.54 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างเป็นเวลา 3 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลสำหรับงานวิจัยนี้ประกอบด้วยปริมาณโปรตีน 3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการต้านการเกิด lipid peroxidation เมื่อพิจารณาในรูป % TBA activity ratio ที่มากกว่าสารละลาย α -tocopherol ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย BHA ความเข้มข้น 10 ppm ที่ใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (80.73 และ 80.49 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) การวิเคราะห์ค่า % TBA activity ratio นั้นเป็นการวัดความสามารถของสาร (ในที่นี้คือโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล) ในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในอาหาร และใช้สาร TBA ทำปฏิกิริยากับผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการสลายตัวของ hydroperoxide (ซึ่งสาร hydroperoxide เป็นสาร intermediate จากปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน) ดังนั้นการที่ค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลซึ่งผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์มีค่าค่อนข้างสูง อาจมีสาเหตุมาจากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล สามารถต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัวในน้ำมันถั่วเหลืองได้ ทำให้สาร hydroperoxide เกิดขึ้นได้น้อย และทำให้ผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสาร hydroperoxide เกิดขึ้นได้น้อยเช่นเดียวกัน โดยสันนิษฐานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำในปริมาณมากจึงละลายในไขมันได้ดี และ ทำให้สามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ดี (Dong และคณะ, 2008 ; Rajapakse และคณะ, 2005)

4.4 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

สารที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE คือสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับ ACE ตรงบริเวณเร่ง ส่งผลให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์หยุดชะงัก และทำให้การสังเคราะห์สาร Angiotensin II หยุดลง ดังนั้นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ จึงสามารถควบคุมความดันโลหิตในร่างกายได้ โดยการควบคุมปริมาณสาร Angiotensin II (Murray, Walsh และ

FitzGerald, 2004) การวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE สามารถทำได้ตามวิธีของ Crushman และ Cheung (1971) ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ Angiotensin I และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลา (ในที่นี้ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้ง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสาร hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของเอนไซม์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และ สกัดสาร hippuric acid (ผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา) ที่เกิดขึ้นด้วยสารละลายเอทิลอะซีเตต รูปที่ 4.6 (ตารางภาคผนวกที่ ก.6) แสดงค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล



รูปที่ 4.6 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.6) พบว่าปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ไม่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ($p > 0.05$) ซึ่ง % ACE inhibition ของส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีค่าเริ่มต้น คือ 31.37 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการย่อยสลาย

ด้วยเอนไซม์ ที่เวลาต่างๆ จนกระทั่งมีค่าสูงที่สุด คือ 89.63 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล(ประกอบด้วยโปรตีน 0.06 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) มีค่า % ACE inhibition มากกว่าสารละลาย Captopril® ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ (79.12 เปอร์เซ็นต์) ที่ใช้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ Captopril® เป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีระดับความดันโลหิตสูง โดยจะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของ ACE ด้วยพันธะไฮโดรเจน 6 พันธะ ทำให้เกิดการจับกันของ Captopril® และกรดอะมิโนของเอนไซม์อย่างแข็งแรง จึงสามารถยับยั้งการสังเคราะห์สาร Angiotensin II ได้อย่างสมบูรณ์ แต่ในกรณีของปฏิกิริยาระหว่างเปปไทด์กับกรดอะมิโนที่บริเวณเร่งของ ACE นั้นจะเกิดขึ้นผ่านอันตรกิริยาต่างๆ เช่น electrostatic repulsion, hydrophobic interaction และ พันธะไฮโดรเจน เป็นต้น ซึ่งอันตรกิริยาเหล่านี้จะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อเปปไทด์นั้นมีชนิดของกรดอะมิโนที่เหมาะสม อยู่ที่ตำแหน่งที่ถูกต้อง จึงจะสามารถทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในบริเวณเร่งของ ACE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhan-li และคณะ, 2011) กรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine, proline, leucine, isoleucine, valine, lysine และ alanine เป็นต้น (Gomez-Ruiz, Ramos และ Recio, 2004) จะสามารถเกิดอันตรกิริยากับบริเวณเร่งของ ACE ได้ด้วย electrostatic repulsion หรือ hydrophobic interaction ทำให้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนเหล่านี้เป็นองค์ประกอบ สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ดี ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อพิจารณาในส่วนของโครงปลานิลบดเจือจางที่ผ่านการย่อยสลายด้วยน้ำร้อนเพียงอย่างเดียว พบว่า เวลาในการย่อยสลายด้วยน้ำร้อนส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ % ACE inhibition ของส่วนของโครงปลานิลบดเจือจางได้เช่นกัน โดยการย่อยสลายด้วยน้ำร้อนอาจทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนจากโครงปลานิลได้บางส่วน จึงเกิดผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโน และ เปปไทด์ที่มีสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ (Tsia, Chen และ Pan, 2008) นอกจากนี้ ขนาดของเปปไทด์ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE โดยเปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสม ควรจะเป็นเปปไทด์ขนาดเล็กอยู่ในช่วง 2-12 โมเลกุลกรดอะมิโน ซึ่งเปปไทด์ขนาดเล็กเหล่านี้จะสามารถทำปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Hernandez-Ledesma, Contreras และ Recio, 2011) ซึ่ง Raghavan และ Kristinsson (2009) ทำการคัดแยกขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลานิล(มีระดับการย่อยสลายโปรตีน 7.5 เปอร์เซ็นต์) ออกเป็น 3 ขนาด คือ น้อยกว่า 10 kDa, อยู่ในช่วง 10 - 30 kDa

และมากกว่า 30 kDa ตามลำดับ พบว่า เปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 10 kDa มีค่า % ACE inhibitory activity มากที่สุด และจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปปไทด์มีขนาดใหญ่ขึ้น ในขณะที่เมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้นเป็น 25 เปอร์เซ็นต์ ขนาดของเปปไทด์กลับไม่มีผล ($p > 0.05$) ต่อ การเพิ่มขึ้นของค่า % ACE inhibitory activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาชนิด เนื่องจากเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบมีขนาดใกล้เคียงกัน

เมื่อทดสอบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลแล้ว การทดลองในส่วนต่อไปจะเป็นการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เพื่อนำไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล สภาวะนั้นๆ

4.5 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ในสภาวะที่ถูกคัดเลือก

งานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค HPLC ในการวิเคราะห์ ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสภาวะที่ได้คัดเลือกแล้ว เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE โดยจะทำการย่อยตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทด้วยสารละลายกรด และต่าง ในขั้นตอนของการคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสม จึงพิจารณาสมบัติในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท ด้วยวิธี DPPH, วิธี metal chelating activity, และ วิธี TBA รวมไปถึงการพิจารณา % ACE inhibition ด้วยจากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE โดยเป็นสภาวะการย่อยสลายที่ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลมีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ที่ค่อนข้างสูง กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลในสภาวะที่ถูกคัดเลือก จะช่วยอธิบายถึงคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ดังนั้นงานวิจัยนี้จะวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครง

ปลานิลสดเจือจางที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ซึ่งแยกได้จากการปั่นเหวี่ยง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจาง

ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม)	
	ส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจางซึ่งแยกได้จากการปั่นเหวี่ยง	โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
alanine	13	58
arginine	14	65
glutamic acid	16	120
glycine	10	58
histidine	1	7
isoleucine*	2	18
leucine*	6	49
lysine*	1	15
methionine*	1	25
phenylalanine*	1	13
cysteine	1	11
aspartic acid	6	75
tyrosine	1	20
proline	14	68

serine	4	29
threonine*	2	21
tryptophan*	0	2
valine*	4	43
total	97	697

*กรดอะมิโนจำเป็น

การย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์ ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย ส่งผลให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนสูงขึ้น ทำให้โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นเปปไทด์ และ กรดอะมิโนอิสระในปริมาณมากขึ้น จากตารางที่ 4.2 เมื่อพิจารณาสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine และ cysteine เป็นต้น (Arcan และ Yemenicioglu, 2007; Pena-Ramos และ Xiong, 2001) ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยปริมาณเอนไซม์ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด เท่ากับ 0.08 ซึ่งเพิ่มขึ้นจากที่พบในส่วนของโครงปลานิลบดเฉื่อยที่ได้ภายหลังจากการบั่นเหวียง (0.04) กรดอะมิโนเหล่านี้จะประกอบด้วยวงแหวนอะโรมาติก (aromatic ring) ซัลเฟอร์ (ในกรณีของ cysteine) และ วงแหวนอิมิดาโซล (imidazole ring) (ในกรณีของ histidine) เป็นองค์ประกอบในโมเลกุล จึงสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้โดยการส่งผ่านอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระ (Arcan และ Yemenicioglu, 2007; Rajapakse และคณะ, 2005) การเพิ่มขึ้นของสัดส่วนของกรดอะมิโนเหล่านี้ จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยปริมาณเอนไซม์ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ มากกว่าในส่วนของโครงปลานิลบดเฉื่อยที่ได้ภายหลังจากการบั่นเหวียง (ซึ่งมีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 21.78 เฟอร์เซ็นต์ ดังที่แสดงในรูปที่ 4.3) และหากพิจารณาสัดส่วนของกรดอะมิโนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนัก เช่น lysine, arginine, aspartic acid, glutamic acid และ histidine เป็นต้น (Arcan และ

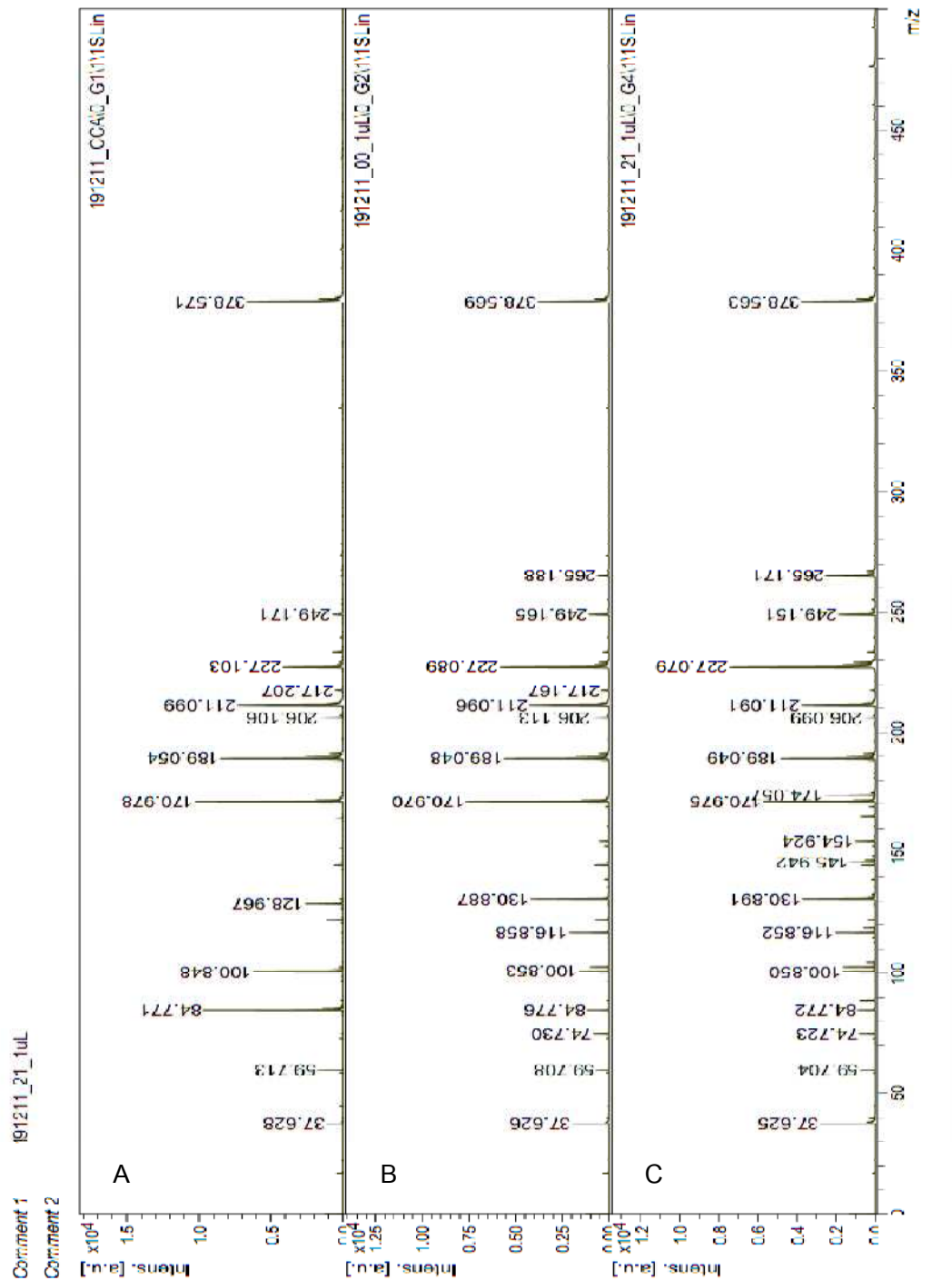
Yemenicioglu, 2007) ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด จะพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ส่วนนៃของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้เป็น 0.40 และ 0.39 ปฏิกิริยาระหว่างกรดอะมิโนเหล่านี้กับไอออนของโลหะหนักจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน ที่เป็นองค์ประกอบบริเวณ side chain ของกรดอะมิโน (Dong และคณะ, 2008 ; Arcan และ Yemenicioglu, 2007) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาสัดส่วนกรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น glycine, methionine, lysine, tryptophan, alanine, histidine, valine และ proline เป็นต้น (Pena-Ramos และ Xiong, 2001; Zhu, Zhou และ Qian, 2006) กรดอะมิโนเหล่านี้ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ โดยพบว่า สัดส่วนของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำต่อกรดอะมิโนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลจากสภาวะที่คัดเลือก มีค่าเท่ากับ 0.40 ซึ่งใกล้เคียงกับสัดส่วนในส่วนนៃของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง (0.45) จึงน่าจะส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลสภาวะที่คัดเลือก และส่วนนៃของโครงปลานิลบดเจือจางมีค่า % TBA activity ratio ใกล้เคียงกัน แต่จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.5) จะพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลสภาวะที่คัดเลือกมีค่า % TBA activity ratio สูงกว่าในส่วนนៃของโครงปลานิลบดเจือจางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ แต่จะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ เป็นต้น ข้อมูลของสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระต่อกรดอะมิโนทั้งหมด จึงไม่เพียงพอที่จะบอกถึงประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท สำหรับการพิจารณา สัดส่วนกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine, proline, leucine, isoleucine, valine, lysine และ alanine เป็นต้น (Gomez-Ruiz, Ramos และ Recio, 2004) ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เฟอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด พบว่ามีค่า 0.41 ซึ่งใกล้เคียงกับสัดส่วนของกรดอะมิโน

เหล่านี้ต่อกรดอะมิโนทั้งหมดในส่วนไอของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากปั่นเหวี่ยง (0.43) โดยสามารถอธิบายผลการทดลองในส่วนของ % ACE inhibition (รูปที่ 4.6) ได้เช่นเดียวกับในกรณีของสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ

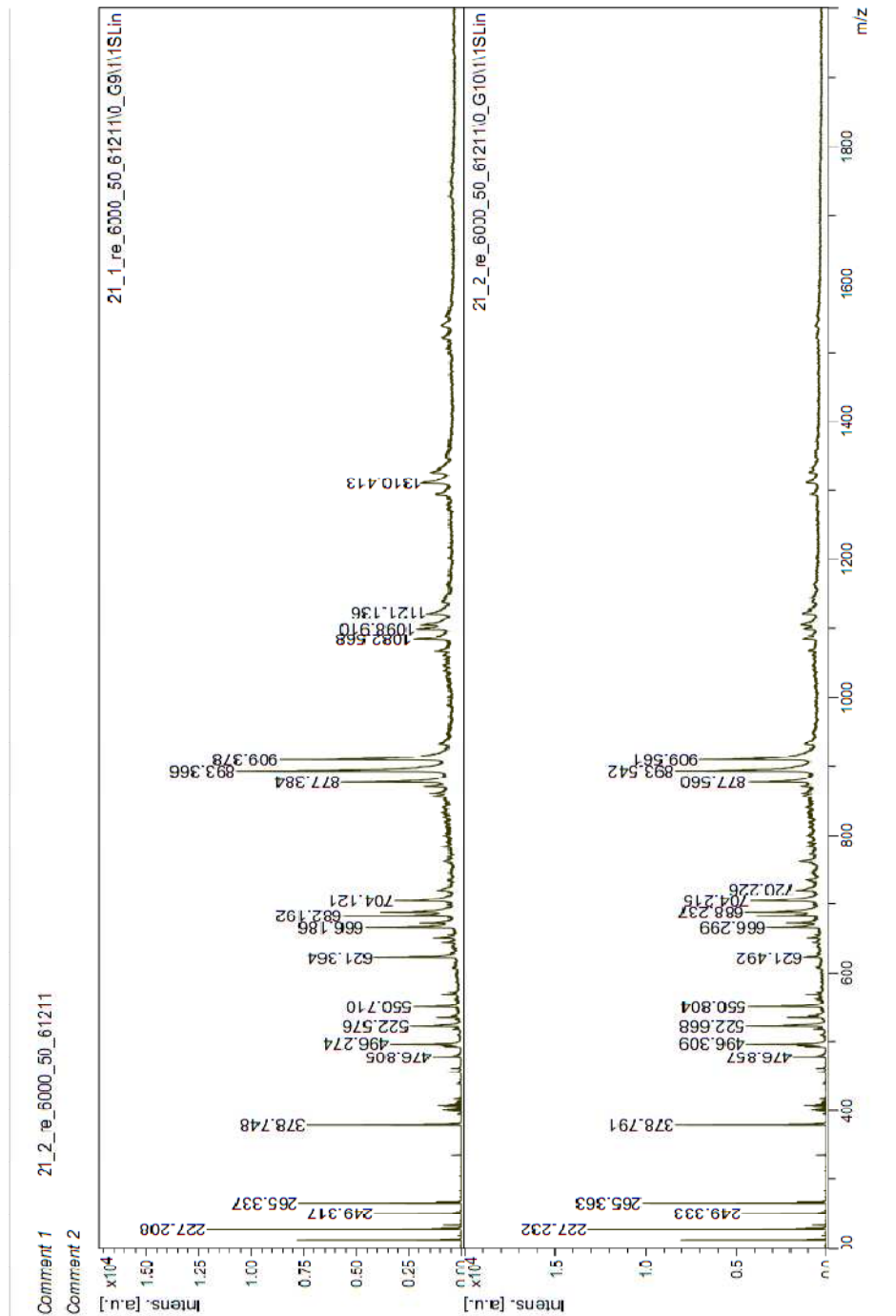
ปัจจัยสำคัญที่สามารถบ่งบอกถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล คือ ขนาดของ เปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซท ดังนั้นงานวิจัยในส่วนต่อไป จึงเป็นการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล โดยอาศัยหลักการวิเคราะห์มวลของสารด้วยเทคนิค MALDI-tof

4.6 การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์

ในการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลสำหรับงานวิจัยนี้ จะใช้เทคนิค MALDI-tof ซึ่งอาศัยหลักการวิเคราะห์มวลของสารในการประเมินขนาดของเปปไทด์ โดยจะทำการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ในช่วง 0-6000 Da การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจะเป็นส่วนช่วยอธิบายเชื่อมโยงความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ในรูปที่ 4.7 แสดง mass spectrum ขนาดของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ mass spectrum ของส่วนไอของโครงปลานิลบดเจือจางที่ไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ และ mass spectrum ของสารละลาย α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) อิมิตัวที่ใช้เป็น matrix สำหรับการทดสอบ และ รูปที่ 4.8 แสดง mass spectrum ขนาดของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเมื่อเพิ่มช่วงของการวิเคราะห์เป็น 400-1800 m/z ตามลำดับ



รูปที่ 4.7 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบ
 ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อ
 น้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (C) เปรียบเทียบกับขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบใน
 โครงปลานิลสดเฉื่อย (B) และสารละลาย CCA อิมมัวที่ใช้เป็น matrix สำหรับทดสอบ (A)



รูปที่ 4.8 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยใช้ช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 400 - 1800 Da

เมื่อพิจารณา Mass spectrum แสดงขนาดเปปไทด์ในช่วง 0-400 Da ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูป 4.7 C) จะพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดต่างๆ กันหลายขนาด ซึ่ง peak ส่วนหนึ่งของ spectrum นั้นเป็นผลมาจากการรบกวนของสารละลาย CCA อิมมัวที่ใช้เป็น matrix สำหรับการทดสอบ (รูป 4.7 A) ดังนั้นการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะต้องเทียบกับ spectrum ของสารละลาย CCA อิมมัวด้วย โดยเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบแล้วพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ประกอบด้วย เปปไทด์ที่มีขนาด 74.723, 116.852, 130.891, 145.942, 154.924, 174.057 และ 265.171 Da ร่วมกับรูปที่ 4.8 ที่แสดง Mass spectrum ขนาดของเปปไทด์ในช่วง 400-1800 Da ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่สภาวะเดียวกัน ซึ่งพบเปปไทด์ที่มีขนาด 476.805, 496.274, 522.576, 550.710, 621.364, 666.186, 682.192, 704.121, 877.384, 893.366, 909.378, 1082.568, 1098.910, 1121.136 และ 1310.413 Da สำหรับเปปไทด์ขนาดใหญ่กว่า 1800 Da นั้นจะแสดงในรูปภาคผนวกที่ ง.7 โดยพบว่าประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาด คือ 2329.374, 3797.199, 4584.567, 4657.032, 5695.355 และ 5779.008 Da ในขณะที่ส่วนใดของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง จะประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาด 0-400 Da (แสดงในรูป 4.7 B) คือ 74.730, 116.858, 130.887 และ 265.188 Da แต่ไม่พบ เปปไทด์ที่มีขนาดในช่วง 400-1800 Da (ไม่แสดงผลการทดลอง) ในขณะที่จะพบเปปไทด์ขนาดใหญ่ (แสดงผลการทดลองในรูปภาคผนวกที่ ง.8) คือ 5678.141 และ 5781.973 Da ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่า โปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก และมีความหลากหลายในช่วง 400-1800 Da มากกว่าเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใดของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง ทั้งนี้เป็นเพราะว่า เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ที่ใช้

ในการย่อยสลายนั้นเป็นเอนไซม์ผสมระหว่าง endoprotease และ exoprotease ซึ่งจะสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้ จากทั้งปลายสาย และภายในสายเปปไทด์ ดังนั้นปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ได้มากขึ้น ผลลัพธ์ที่ได้จึงเป็นกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ขนาดเล็ก เมื่อพิจารณาขนาดของ เปปไทด์ที่ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ยับยั้งการทำงานของ ACE โดยพิจารณาขนาดของเปปไทด์ใน 2 ช่วง คือ เปปไทด์ที่มีขนาดประมาณ 1000-1300 Da ซึ่งมีรายงานว่าเปปไทด์ที่เหมาะสมสำหรับต้านอนุมูลอิสระ (Wu, Chen และ Shiau, 2003 ; Jun, Jung และ Kim, 2004)) และเปปไทด์ที่มีขนาดอยู่ในช่วง ได หรือ ไตรเปปไทด์ (เป็นขนาดที่เหมาะสมในการยับยั้งการทำงานของ ACE (Tsai, Chen และ Pan, 2008))พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาด 400-1300 Da เป็นจำนวนมาก และมีได หรือ ไตรเปปไทด์ในปริมาณที่มากกว่าในส่วนของโครงปลานิลสดเฉื่อยที่ได้จากการบ่มหึ่ง จึงอาจเป็นเหตุผลที่ทำให้ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าในส่วนของโครงปลานิลสดเฉื่อย (รูปที่ 4.3, 4.4 ,4.5 และ 4.6 ตามลำดับ)

เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่อยู่ในสถานะของเหลว จะต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C และมีอายุการเก็บรักษาสั้นที่อุณหภูมิห้อง ดังนั้นเพื่อความสะดวกในการเก็บรักษา งานวิจัยนี้จึงศึกษาการผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยวิธีการทำแห้งแบบพ่นกระจาย และศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลจากสภาวะที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับผงส่วนของโครงปลานิลสดเฉื่อยในระหว่างการเก็บรักษา

4.7 การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ดัดแปลงจากวิธีของ Abdul-Hamid, Bakar และ Bee (2002) โดยจะใช้วิธีการทำแห้งแบบพ่นกระจาย (BuCHI Mini Spray Dryer B290) โดยมีอัตราการไหลของอากาศ (air flow) ภายในเครื่องทำแห้งคงที่ 30%, ค่า aspiration เท่ากับ 100, อุณหภูมิลมร้อนขาเข้า 150°C, อุณหภูมิลมร้อนขาออกอยู่ในช่วง 80-90°C, Feed rate 30% (7 มิลลิลิตรต่ออนาที) ใช้ maltodextrin (10% DE) ในปริมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวอย่าง เป็นสารช่วยทำแห้ง ตารางที่ 4.3 และ 4.4 แสดง % yield และ ค่าสีในระบบ L* a* b* ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ตามลำดับ

ตารางที่ 4.3 % yield ของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครง ปลานิล		น้ำหนักตัวอย่าง เริ่มต้น (กรัม)	น้ำหนักตัวอย่าง สุดท้าย (กรัม)	% yield
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการ ย่อย(ชั่วโมง)			
2	1	88	32.21	36.60
0	0	88	32.37	36.78

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง มีค่า % yield ที่ใกล้เคียงกัน คือ 36.60 เปอร์เซ็นต์ และ 36.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง มีลักษณะเป็นผงละเอียด และมีกลิ่นคาวปลา มีความชื้นเป็นองค์ประกอบ 6.93 และ 5.20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

หลังจากพิจารณาลักษณะทางกายภาพ เช่น สี และ กลิ่นของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท การวัดค่าสีในระบบ L* a* b* จะเป็นส่วนที่ช่วยในการพิจารณาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ ให้มีความแม่นยำมากขึ้น

ตารางที่ 4.4 ค่าสีในระบบ L* a* b* ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครง ปลานิล		ค่าสี		
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการ ย่อย(ชั่วโมง)	L*	a*	b*
2	1	67.61 ± 2.83	-1.14 ± 0.14	2.67 ± 0.13
0	0	72.69 ± 0.30	-1.45 ± 0.01	2.16 ± 0.04

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าสีของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ได้จากการทำแห้งในทั้ง 2 สภาวะโดยระบบ L* a* b* พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีสีค่อนข้างเหลือง โดยมีค่าความสว่าง (L*) เป็น 67.61 เปอร์เซ็นต์ ค่าสีแดง (a*) -1.14 เปอร์เซ็นต์ และ ค่าสีเขียว (b*) 2.67 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง จะมีสีค่อนข้างขาว มีค่าความสว่าง (L*) เป็น 72.69 เปอร์เซ็นต์ ค่าสีแดง (a*) -1.45 เปอร์เซ็นต์ และ ค่าสีเขียว (b*) 2.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ที่ใช้ในการย่อยสลายจะมีสีน้ำตาล ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผ่านกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L จึงมีสีเข้ม ซึ่งเป็นผลมาจากเอนไซม์ Flavourzyme® ที่ใช้สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต (Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi, 2007) และสภาวะในการย่อยสลายที่ใช้ความร้อน เป็นเวลานาน จะทำให้เกิดปฏิกิริยาต่างๆได้ง่าย และมากขึ้น เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชัน และ ปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาล เป็นต้น ปฏิกิริยาเหล่านี้จะทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีสีเข้ม (Dong และคณะ, 2007)

หลังจากพิจารณาลักษณะทางกายภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ได้แล้ว ขั้นตอนต่อไปจะเป็นการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสภาวะที่คัดเลือกเทียบกับผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล		ปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
2	1	7.56
0	0	3.44

ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่างทั้งสองที่วิเคราะห์ได้ จะนำมาใช้ในการคำนวณปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ(โดยวิธี DPPH, วิธี metal chelating activity และ วิธี TBA) และยับยั้งการทำงานของ ACE เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใกล้เคียงกับตัวอย่างทั้งสองที่อยู่ในสภาพของเหลวก่อนการทำแห้ง จากตารางที่ 4.5 พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนเป็นองค์ประกอบ 7.56 กรัมต่อ 100 กรัม มากกว่า ปริมาณโปรตีนในผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเฉื่อย ซึ่งมีค่า 3.44 กรัมต่อ 100 กรัม โดยเป็นผลมาจากปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล สภาวะที่คัดเลือกในสภาพของเหลว มีมากกว่าในส่วนใสของโครงปลานิลบดเฉื่อยที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง (ของเหลว) (มีปริมาณโปรตีน 1.17 และ 0.24 กรัมต่อ 100กรัม ตามลำดับ)

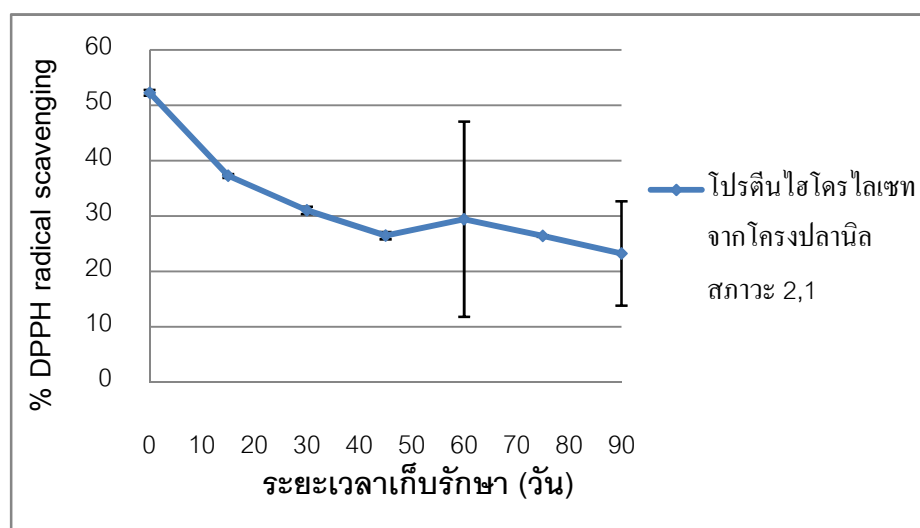
4.7.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ในระหว่างการเก็บรักษา

งานวิจัยนี้จะติดตามอายุการเก็บรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล โดยเก็บตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเซตในถุง laminated aluminium foil (PE-AI-PP) ปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วัน ทำการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต ทุกๆ 15 วัน ในด้านการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ติดตามโดยวิเคราะห์ค่า % DPPH radical scavenging, ค่า % metal chelating activity

และ ค่า % TBA activity ratio และสำหรับความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE นั้นจะพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า % ACE inhibition

4.7.1.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

สำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH นั้น จะทำการทดลองโดยซึ่งนำหน้า้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ผงจากการทำแห้งของส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มาละลายน้ำกลั่น และ ผสมกับสารละลาย DPPH เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายผสมที่มีความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร โดยค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนั้นจะแสดงในรูปที่ 4.9 (ตารางภาคผนวกที่ ก.7)



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

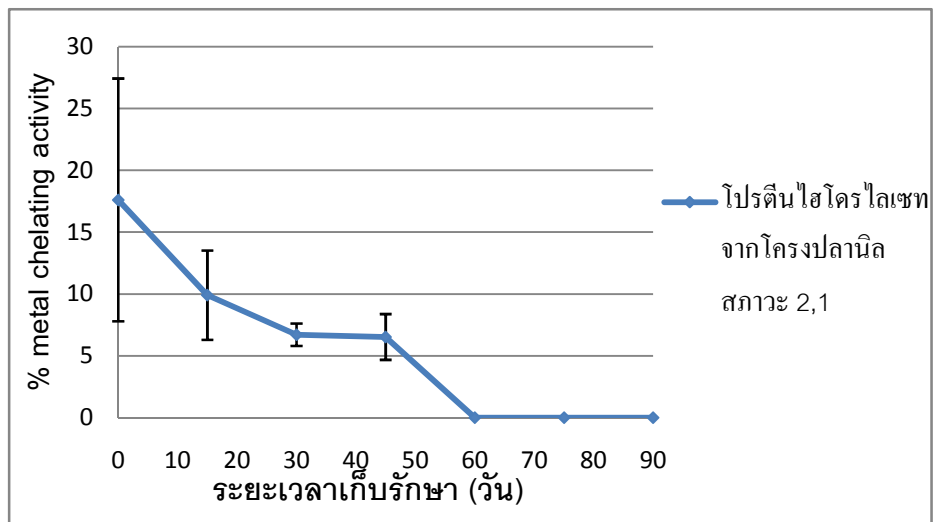
ค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 52.25 เปอร์เซ็นต์ และ จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน จากนั้นเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้นเป็น 45-90 วัน % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากสภาวะที่คัดเลือกจะไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi (2007) ซึ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก round scad (เตรียมโดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก round scad มีค่า % DPPH radical scavenging เริ่มต้นประมาณ 59.9 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของค่า % DPPH radical scavenging เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 6 สัปดาห์ สำหรับผงส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจาง นั้นไม่สามารถคำนวณค่า % DPPH radical scavenging ได้ เนื่องจากสารละลายผสมระหว่างผงส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจาง และสารละลาย DPPH มีลักษณะขุ่น ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้นั้นมีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม จึงไม่สามารถคำนวณค่า % DPPH radical scavenging ได้ ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากการที่ผงส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจางประกอบด้วยโปรตีนในปริมาณที่น้อยกว่าในส่วนของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลสภาวะที่คัดเลือก ดังนั้นเพื่อให้ปริมาณโปรตีนเท่ากัน จึงต้องใช้ผงส่วนใสของโครงปลานิลสดเจือจางในปริมาณมาก ทำให้มีมอลโทเด็คซ์ทริน ซึ่งไม่ละลายน้ำ อยู่ในระบบที่ทำการตรวจวัดในปริมาณมาก สารละลายจึงมีความขุ่น และไม่สามารถวัดการเกิดปฏิกิริยาได้ ซึ่งตรงกันข้ามกับในกรณีของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก จึงใช้ในปริมาณน้อย นอกจากนี้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่สภาวะนี้ จะมีระดับการย่อยสลายโปรตีนค่อนข้างสูง ซึ่งจะทำให้เกิดเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีความเป็นขั้วมากขึ้น จึงสามารถสร้างพันธะไฮโดรเจนกับน้ำ และส่งผลต่อความสามารถในการละลายที่เพิ่มขึ้น (Klompong และคณะ, 2007; Dong และคณะ,

2008) เมื่อเปรียบเทียบค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กับ โปรตีนไฮโดรไลเซต (ของเหลว) ที่สภาวะเดียวกัน จะพบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตมีค่า % DPPH radical scavenging น้อยกว่าค่า % DPPH radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซต (ของเหลว) อาจเนื่องมาจากความร้อนที่ใช้ในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเซต ทำให้กรดอะมิโนและเปปไทด์บางส่วนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ (Abdul-Hamid, Bakar และ Bee, 2002)

4.7.1.2 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี metal chelating activity

ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นั้นจะทำการทดลองโดยดัดแปลงจากวิธีของ Klompong และคณะ (2007) โดยเริ่มต้นจากการชั่งตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลาที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ละลายในน้ำกลั่น และผสมกับสารละลาย $FeCl_2$ และสารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) เขย่าให้เข้ากัน และตั้งทิ้งไว้ 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร

รูปที่ 4.10 (ตารางภาคผนวกที่ ก.9) แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษา ส่งผลให้ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระลดน้อยลงเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี metal chelating activity ผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีค่า % metal chelating activity เริ่มต้น 17.61 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เป็น 9.90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน และจะมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา เป็น 45 วัน



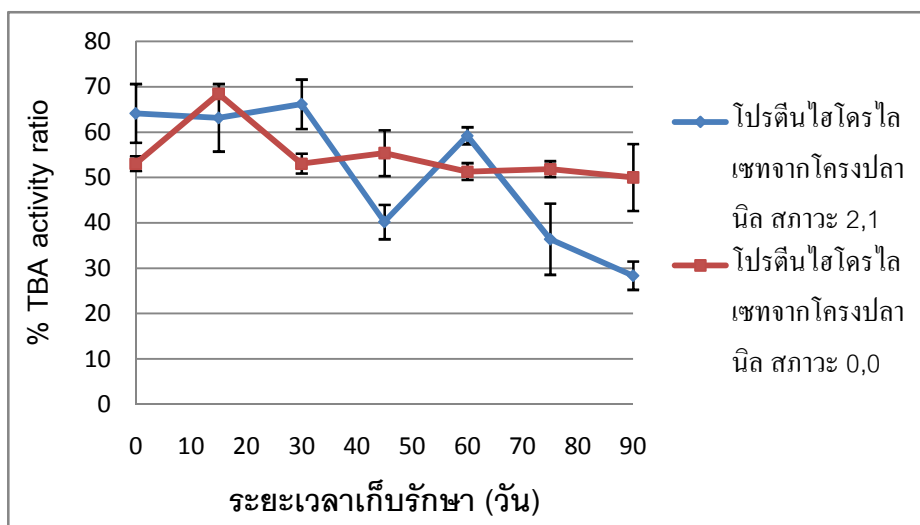
รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

จะไม่สามารถวิเคราะห์ค่า % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากสารละลายผสมระหว่างผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และน้ำกลั่น มีลักษณะขุ่น ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการละลายที่ลดต่ำลงในระหว่างการเก็บรักษา (Klompong และคณะ, 2007 ; Dong และคณะ, 2008 ; Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi, 2007) นอกจากนี้การลดลงของค่า % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้น อาจเป็นผลมาจากมาจากกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซทถูกทำลายไป หรือทำปฏิกิริยากับสารอื่นในระบบ (Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi, 2007)

4.7.1.3 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี TBA

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถทำได้โดยผสมตัวอย่างเข้ากับน้ำมันถั่วเหลือง เอทานอล และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ค่า % TBA activity ratio โดยการทำปฏิกิริยากับ TBA reagent แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร รูปที่ 4.11 (ตารางภาคผนวกที่ ก.11 และ ก.12) แสดงการเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เทียบกับผงส่วนใสของโครงปลานิลสดเฉื่อย

จากรูปที่ 4.11 จะเห็นว่า การลดลงของค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่าค่อนข้างแปรปรวน กล่าวคือ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะมีค่าลดลง ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 45 วัน จากนั้นจะเพิ่มขึ้นและลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ที่ระยะเวลาในการเก็บรักษา 60 วัน และ 75-90 วัน ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอันตรกิริยาระหว่าง สารประกอบไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ กับกรดอะมิโน และโปรตีน ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา โดยมี pH อุณหภูมิ และ ค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity; a_w) เป็นปัจจัยสำคัญในการเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Ladikos และ Lougovois, 1990) ทั้งนี้อันตรกิริยาดังกล่าวอาจส่งผลต่อความแปรปรวนของค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้นอกจากนี้การลดลงของค่า % TBA activity ratio ของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทอาจเกิดขึ้นเนื่องจากแก๊ซออกซิเจนบางส่วนซึมผ่านเข้าสู่ผลิตภัณฑ์ได้ในระหว่างการเก็บรักษา



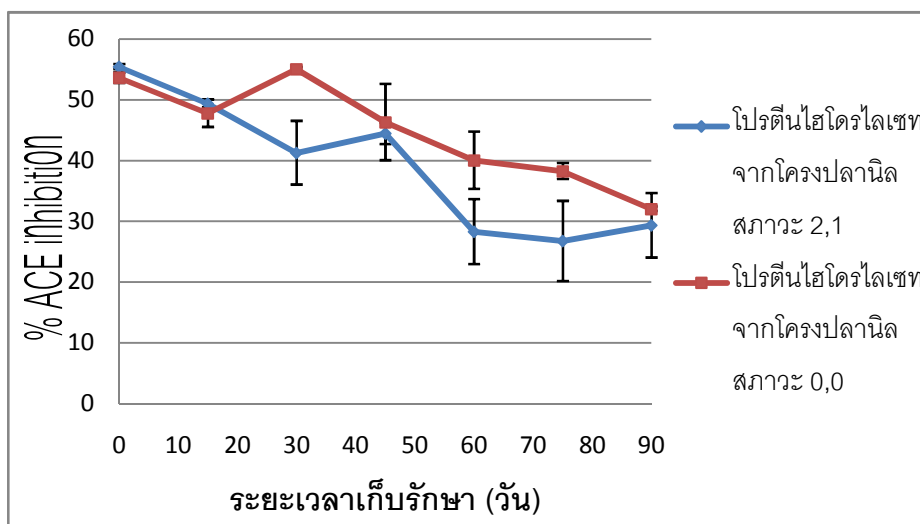
รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง

โดยงานวิจัยของ Jena และ Das (2012) รายงานค่า oxygen transmission rate ของบรรจุภัณฑ์ ชนิดลามิเนต PE-Al-PE ว่ามีค่าเท่ากับ $0.6 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2} \text{ day}^{-1}$ ซึ่งมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์ coconut milk powder ที่เก็บที่อุณหภูมิ 38°C เป็นระยะเวลา 50 วัน มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันมากขึ้น ในขณะที่เมื่อพิจารณาว่า % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง จะพบ ความแปรปรวนในช่วง 30 วันแรกของการเก็บรักษา และจากนั้นค่า % TBA activity ratio ของผง ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง จะมีค่าคงที่ แม้จะเพิ่มเวลาในการเก็บเป็น 45-90 วัน สาเหตุ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเปปไทด์ขนาดใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบในผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือ จาง สามารถรักษาเสถียรภาพในระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก

4.7.1.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

สำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดร-ไลเซตจากโครงปลานิลนั้น จะทำการวิเคราะห์โดยชั่งน้ำหนักตัวอย่าง ผสมกับเอนไซม์ Angiotensin I converting และ สารละลาย hippuryl-L-histidyl-lysine บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็น เวลา 30 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นเติมสารละลายเอทิลอะ-

ซีเตต บั่นเหวียง และนำไปประเหยสารละลายเอทิลอะซีเตตในสภาวะสุญญากาศ ได้ผลการทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 4.12 (ตารางภาคผนวกที่ ก.13 และ ก.14)



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเคี้ยว

รูปที่ 4.12 แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษาส่งผลต่อการลดลงของค่า % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเคี้ยว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เนื่องจากความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลนั้น เป็นผลมาจากกรดอะมิโน และเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของกรดอะมิโน และเปปไทด์ในระหว่างการเก็บรักษาจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ส่งผลต่อการลดลงของค่า % ACE inhibition (Hernandez-Ledesma, Contreras และ Recio, 2011) กระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายที่ใช้ความร้อนสูงในการระเหยน้ำออกจากผลิตภัณฑ์ ทำให้ปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลานิลมีปริมาณลดลง (Abdul-Hamid, Barkar และ Bee, 2002) โดยมีรายงานว่ากระบวนการให้ความร้อน (thermal processing) มีผลทำให้เกิดการ cross-linked ของ

กรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์ และทำให้เกิดปฏิกิริยา racemization ปฏิกิริยาเหล่านี้ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ทำให้ปริมาณเปปไทด์ที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เกิดการเปลี่ยนแปลง (Lopez-Fandino, Otte และ van Camp, 2006) ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในระหว่างการแปรรูปและเก็บรักษา สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการออกซิเดชันของกรดอะมิโนบางชนิด เช่น methionine และ tryptophan เป็นต้น ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากงานวิจัยนี้เป็นบรรจุภัณฑ์ชนิด laminated aluminium foil ชนิด PE-Al-PP ซึ่งไม่ได้บรรจุแบบสุญญากาศ จึงอาจยอมให้เกิดการซึมผ่านของแก๊ซออกซิเจน และความชื้นได้ในระหว่างการเก็บรักษา ปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดอะมิโนเหล่านี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเปปไทด์ที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

ในงานวิจัยนี้ นอกจากจะศึกษาสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลแล้ว ยังได้ทำการทดลองในส่วนของโครงปลากะพง ซึ่งมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างไปจากในส่วนของโครงปลานิล การรายงานผลการทดลองในหัวข้อถัดไป จะเป็นส่วนขององค์ประกอบทางเคมีของโครงปลากะพงเริ่มต้น และสมบัติเชิงหน้าที่ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ตามลำดับ

4.9 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของโครงปลากะพง ก่อนการย่อยสลาย

การทดลองในส่วนนี้จะเป็นการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลากะพงเริ่มต้น ก่อนการย่อยสลาย ปลากะพงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากมูลนิธิชัยพัฒนา ในลักษณะของปลากะพงสดคุณภาพดี น้ำหนักตัวละประมาณ 400 -800 กรัม ซึ่งจะต้องนำมาแล่เนื้อออกก่อน ส่วนโครงปลานำมาใช้ในการทดลองนี้ องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลากะพงเริ่มต้น ก่อนการย่อยสลายแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 องค์ประกอบทางเคมีของโครงปลากะพง

องค์ประกอบทางเคมี	โครงปลากะพง (เปอร์เซ็นต์)	
	น้ำหนักเปียก	น้ำหนักแห้ง
ความชื้น	73.35	-
โปรตีน	18.51	69.46
ไขมัน	2.74	10.28
คาร์โบไฮเดรต	3.16	11.86
เถ้า	2.24	8.40

โครงปลากะพงประกอบด้วยความชื้น 73.35 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักเปียก) มีโปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และเถ้า เท่ากับ 69.46, 10.28, 11.86 และ 8.40 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักแห้ง) ตามลำดับเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลากะพงเหลืองที่พบตามธรรมชาติ ซึ่งประกอบด้วย ความชื้น โปรตีน และไขมัน เท่ากับ 81.3, 94.3 และ 1.39 เปอร์เซ็นต์ (Gonzalez และคณะ, 2006) ตามลำดับ พบว่า โครงปลากะพงมีความชื้น และไขมันในปริมาณมากกว่าที่พบในเนื้อปลากะพง ในขณะที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณน้อยกว่า โดยโครงปลา หรือ ก้างปลานั้นจะประกอบด้วยเนื้อเยื่อไขมัน และแคลเซียมเป็นส่วนใหญ่ (Wu, Stine และ Bechtel, 2011)

เมื่อเปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของโครงปลาสองชนิด คือ โครงปลานิล และโครงปลากะพง จะพบว่า โครงปลานิลมีไขมัน และเถ้า เป็นองค์ประกอบในปริมาณ (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักแห้ง) มากกว่าโครงปลากะพง ในขณะที่มีปริมาณโปรตีน (โดยน้ำหนักแห้ง) น้อยกว่า ปริมาณโปรตีนในโครงปลากะพง เนื่องจากโครงปลานิลสำหรับงานวิจัยนี้ ได้มาจากโรงงาน ที่แลเนื้อปลาจากปลานิลขนาดตัวละประมาณ 800 กรัม และเป็นส่วนที่เหลือจากการแลเนื้อปลาในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งจะมีส่วนของเนื้อปลาติดมาในปริมาณน้อย ในขณะที่โครงปลากะพง ได้มาจากปลากะพง ขนาดกลาง (น้ำหนักอยู่ในช่วง 400-800 กรัม) และมีส่วนของเนื้อปลาติดมาในปริมาณมากกว่า ทำให้โครงปลานิลมีปริมาณไขมัน และเถ้าเป็นองค์ประกอบมากกว่าในโครงปลากะพง แต่มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าในโครงปลากะพง นอกจากนี้ ชนิด ช่วงอายุ และสภาวะต่างๆ

(เช่นฤดูกาล เพศ กายวิภาค หรือ ช่วงเวลาวางไข่ เป็นต้น) ก็ส่งผลต่อความแตกต่างขององค์ประกอบทางเคมีของสัตว์น้ำ (นฤมล อัครเทศมณี, 2541)

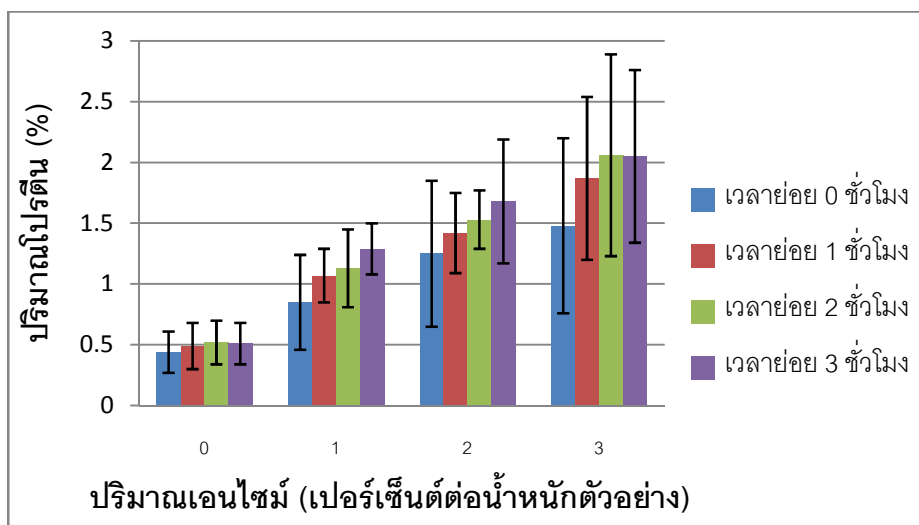
โครงปลากะพงที่ได้นี้จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ต่อไป

4.10 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง จะใช้ Flavourzyme® 1000 L เป็นเอนไซม์ในการย่อยสลาย เช่นเดียวกับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล โดยมี ปริมาณเอนไซม์ และ ระยะเวลาในการย่อย เป็นปัจจัยแปรผัน แปรปริมาณเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ที่ใช้ในการย่อยสลายโปรตีน เป็น 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ (ต่อน้ำหนักตัวอย่าง) บ่มที่อุณหภูมิ 50°C pH 7 เวลาที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 75°C เป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4°C ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 25 นาที เก็บเฉพาะสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน (DH) และ ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

4.10.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง จะใช้วิธี Kjeldahl ซึ่งอาศัยหลักการวัดปริมาณไนโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบในตัวอย่าง และเปลี่ยนเป็นปริมาณโปรตีนโดยใช้ conversion factor เท่ากับ 6.25 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 4.13 (ตารางภาคผนวกที่ ก.15)

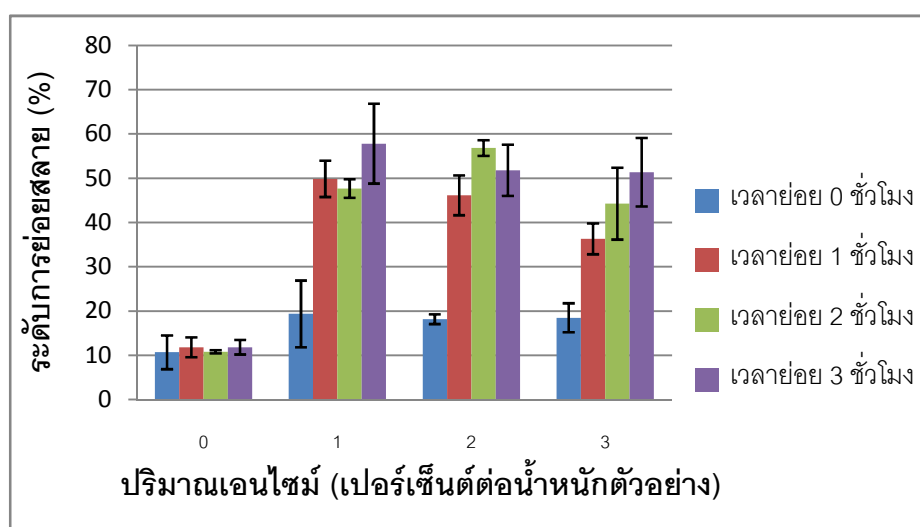


รูปที่ 4.13 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และระยะเวลาในการย่อยเป็น 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีปริมาณโปรตีนเริ่มต้น 0.44 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง จะมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด เท่ากับ 2.06 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงนอกจากนี้ยังพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบในปริมาณที่มากกว่าปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เนื่องจากโครงปลากะพง และโครงปลานิลเริ่มต้น มีปริมาณโปรตีน (โดยน้ำหนักแห้ง) และคุณภาพของโปรตีนที่แตกต่างกัน เป็นผลทำให้คุณภาพทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง และ โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลมีความแตกต่างกันด้วย ปัจจัยสำคัญต่างๆ เช่น ธรรมชาติของแหล่งโปรตีนตั้งต้นที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ธรรมชาติของเอนไซม์ และสภาวะที่ใช้ในการย่อยสลาย (pH, อุณหภูมิ, ระยะเวลาในการย่อย, ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และความเข้มข้นของเอนไซม์) เป็นต้น ก็ส่งผลต่อคุณภาพทางเคมีของโปรตีนไฮโดรไลเซท (Adler-Nissen, 1986)

4.10.2 การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีน

การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลายโปรตีนจะใช้วิธี OPA ซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสาร OPA และ primary amino group ในสภาวะที่มีสาร dithiothreitol (DTT) เป็นองค์ประกอบ วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตรและคำนวณระดับการย่อยสลายของโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง รูปที่ 4.14 (ตารางภาคผนวกที่ ก.16) แสดงระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง



รูปที่ 4.14 ระดับการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง ที่ปริมาณเอนไซม์ 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อยไม่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายโปรตีน ($p > 0.05$) ผลการทดลองใน รูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่า ระดับการย่อยสลายโปรตีนในส่วนในไซของโครงปลากะพงบด เจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีค่าเริ่มต้น 10.68 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าเพิ่มขึ้น จนกระทั่งเริ่มคงที่ เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย

จึงสามารถกล่าวได้ว่า ปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย ส่งผลให้ปฏิกริยาระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้นเกิดได้สมบูรณ์มากขึ้น (Batista และคณะ, 2010; ดวงใจ ลากยีนยง, 2548) จึงได้ผลิตภัณฑ์คือเปปไทด์ และกรดอะมิโนในปริมาณมากขึ้น เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ธัญพร จันทร์แสนโรจน์ (2550) ซึ่งศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในหอยเป่าฮื้อ โดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® พบว่า การเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยสลายโปรตีนในหอยเป่าฮื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล จะพบว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากทั้งโครงปลานิล และโครงปลากะพง มีแนวโน้มที่เหมือนกันคือ มีค่าระดับการย่อยสลายเริ่มต้นต่ำ และจะมีค่ามากขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย แต่เมื่อปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยสูงถึงระดับหนึ่ง (เช่น การใช้เอนไซม์ในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 หรือ 3 ชั่วโมง เป็นต้น) ระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจะมีค่าคงที่ ทั้งนี้เป็นเพราะว่า ที่สภาวะดังกล่าว สารตั้งต้นของเอนไซม์ หรือ ปริมาณเอนไซม์ลดลงจนกระทั่งหมดไปในที่สุด จึงไม่เกิดการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ด้วยเอนไซม์อีก

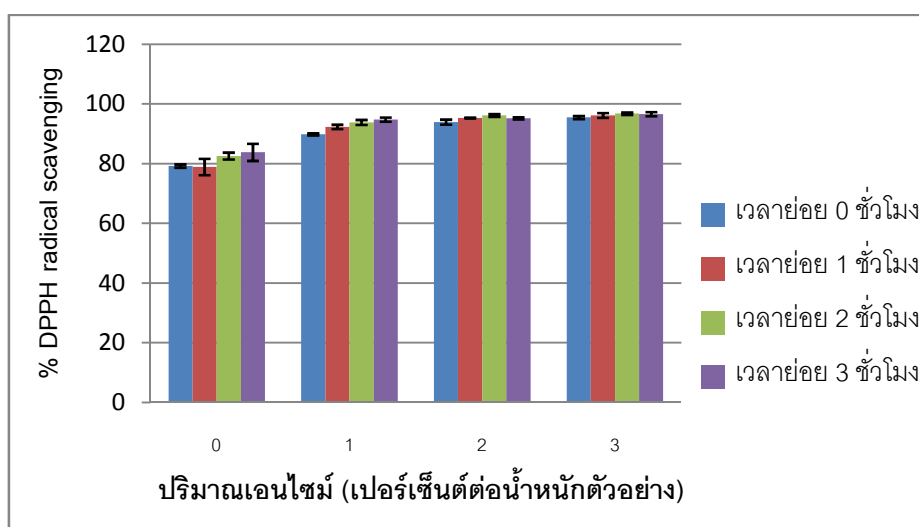
สำหรับการทดลองในส่วนต่อไปนั้นจะเป็นการศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง เพื่อพิจารณาคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงไปใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

4.11 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

การวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง จะใช้วิธีการทดสอบที่มีหลักการแตกต่างกัน คือ วิธี DPPH วิธี metal chelating activity และ วิธี TBA เพื่อใช้ในการพิจารณาการกลไกในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงได้อย่างถูกต้อง

4.11.1 วิธี DPPH

วิธี DPPH เป็นวิธีทดสอบที่อาศัยการส่งผ่านอิเล็กตรอนเดี่ยวจากสารต้านอนุมูลอิสระเข้าสู่อนุมูล DPPH• ซึ่งมีสีม่วง โดยจะทำปฏิกิริยาเช่นเดียวกับในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล รูปที่ 4.15 (ตารางภาคผนวกที่ ก.17) แสดงความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง



รูปที่ 4.15 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

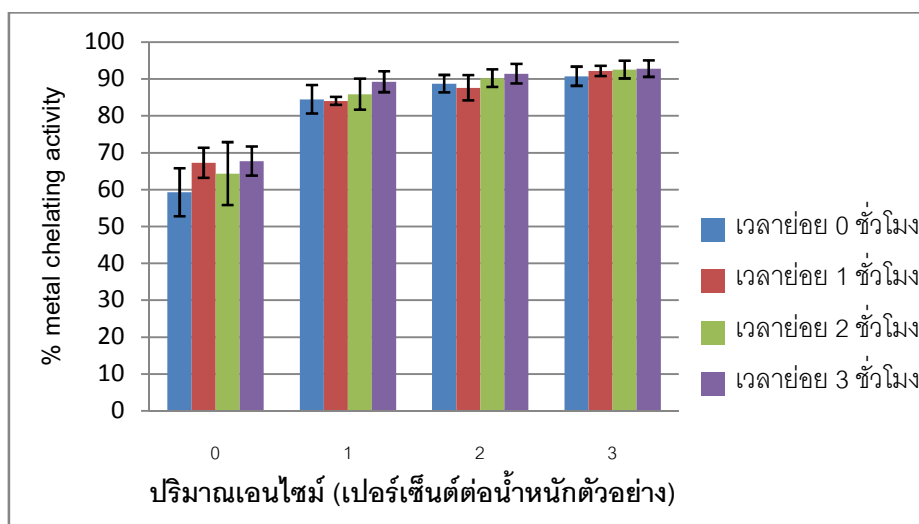
ผลการทดลองในรูปที่ 4.15 แสดงค่า % DPPH radical scavenging ของส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งมีค่าเริ่มต้น 79.24 เปอร์เซ็นต์ และจะเพิ่มขึ้นจนมีค่าสูงที่สุด คือ 96.80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่า ปริมาณเอนไซม์ เวลาในการย่อย และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า % DPPH radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เปรียบเทียบกับผลการทดลองในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซต

จากโครงปลานิล จะพบว่า ส่วนใหญ่ของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีค่า % DPPH radical scavenging เริ่มต้นสูงกว่าในส่วนใหญ่ของโครงปลานิลบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งเกิดขึ้นได้จากการความแตกต่างทางคุณภาพของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโครงปลานิล และโครงปลากะพง การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยจะทำให้โปรตีนถูกย่อยสลายมากขึ้น ส่งผลให้ได้ผลิตภัณฑ์คือ กรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ในปริมาณมากขึ้น กรดอะมิโนบางชนิด เช่น tyrosine, tryptophan และ phenylalanine จะมีวงแหวนอะโรมาติก เป็นโครงสร้างในโมเลกุล จึงสามารถทำปฏิกิริยากับ unpaired electron ของอนุมูล DPPH• ได้ (Rajapakse และคณะ, 2005) ซึ่งผลการทดลองในส่วน % DPPH radical scavenging สอดคล้องกับงานวิจัยของ Klompong และคณะ (2007) ที่ย่อยสลายปลาสิ่กุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) ด้วยเอนไซม์ Flavourzyme[®] จนกระทั่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้มีระดับการย่อยสลายโปรตีนเท่ากับ 5, 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ และศึกษาอิทธิพลของระดับการย่อยสลายโปรตีนที่มีต่อสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง (*Selaroides leptolepis*) โดยวิธี DPPH พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลือง (ระดับการย่อยสลาย 5 เปอร์เซ็นต์) มีค่า % DPPH radical scavenging เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ และค่า % DPPH radical scavenging จะไม่เปลี่ยนแปลงแม้จะเพิ่มระดับการย่อยสลายเป็น 15 และ 25 เปอร์เซ็นต์ โดยอธิบายว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาสิ่กุนข้างเหลืองประกอบด้วยสารซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอน และ ทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระ เพื่อเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้เป็นสารที่เสถียร จึงสามารถหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เกิดจากอนุมูลอิสระได้ ซึ่งเปปไทด์จะมีขนาดเล็กลงเมื่อระดับการย่อยสลายมากขึ้น โดยเปปไทด์ที่มีขนาดเหมาะสมจะมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Jun, Jung และ Kim, 2004 ; Wu, Chen และ Shiau, 2003)

4.11.2 วิธี metal chelating activity

วิธี metal chelating activity อาศัยหลักการวัดความสามารถของสารในการทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะ ในขณะที่มี สารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) ซึ่งทำให้เกิดสีม่วง แล้วตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 20 นาที วัดค่าการ

ดูดกลืนแสงของสารที่มีความยาวคลื่น 562นาโนเมตร รูปที่ 4.16 (ตารางภาคผนวกที่ ก.18) แสดงค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง



รูปที่ 4.16 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อ น้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

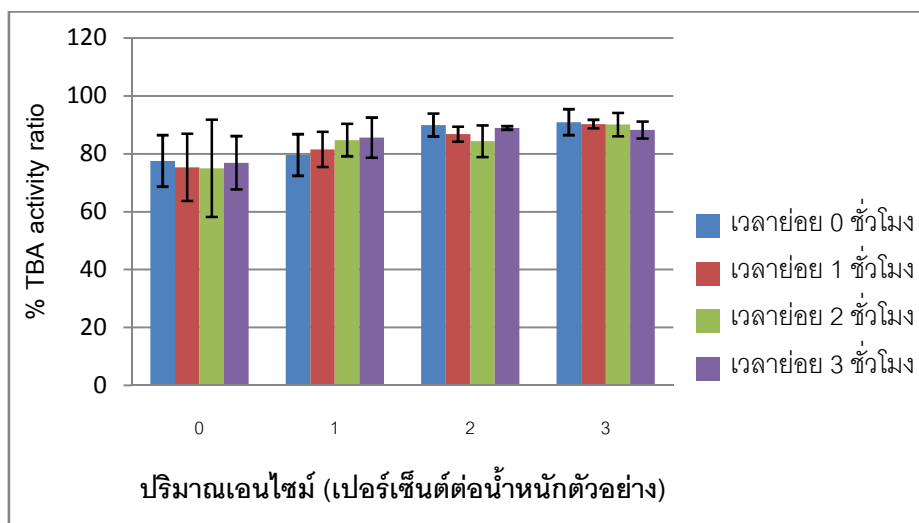
% metal chelating activity ของส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีค่าเริ่มต้น 59.27 เปอร์เซ็นต์ และจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อย จากการวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ พบว่า ปริมาณเอนไซม์ เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในขณะที่เวลาในการย่อย และ ปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์ และ เวลาในการย่อยไม่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง โดยสามารถอธิบายผลการทดลองได้ในลักษณะเดียวกับการอธิบายผลการทดลองในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล คือ ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้โปรตีนถูกเปลี่ยนเป็นกรดอะมิโนอิสระ และเปปไทด์ขนาดเล็ก ที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนักได้ (Dong และคณะ, 2008 ; Klompong และคณะ, 2007) จึงทำให้ % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น เปรียบเทียบกับ

ผลการทดลองในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล จะพบว่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ซึ่งเป็นไปได้ว่าส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง อาจมีกรดอะมิโนและเปปไทด์ ขนาดเล็ก เป็นองค์ประกอบในปริมาณที่แตกต่างจากส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางจึงทำให้ค่า % metal chelating activity ของส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง มีค่ามากกว่าส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง นอกจากนี้ขนาด และ ลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการย่อยสลาย ก็มีความแตกต่างกันด้วย จึงส่งผลต่อการเพิ่มความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกันของโปรตีนไฮโดรไลเซท

4.11.3 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของระบบที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ วิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation ด้วยการทดสอบกับ TBA

ในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ จะเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ง่าย ซึ่งการวิเคราะห์ความสามารถของสารในการเป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน จะนิยมวิเคราะห์การเกิด lipid peroxidation และใช้วิธี TBA ในการทดสอบ โดยในขั้นตอนแรกจะเป็นการผสมน้ำมันถั่วเหลืองกับสารต้านอนุมูลอิสระ แล้วบ่มทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นขั้นตอนที่สอง จะเป็นการติดตามปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่เกิดขึ้น ด้วยการทำปฏิกิริยากับสาร TBA (ซึ่งได้กล่าวอย่างละเอียด ในบทที่ 3) โดยค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง แสดงในรูปที่ 4.17 (ตารางภาคผนวกที่ ก.19)

การเปลี่ยนแปลงของ ค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงมีแนวโน้มที่ต่างไปจากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล กล่าวคือ ค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากโครงปลากะพงมีค่าสูง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์เป็นเวลานานขึ้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.17) พบว่า ปริมาณเอนไซม์ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

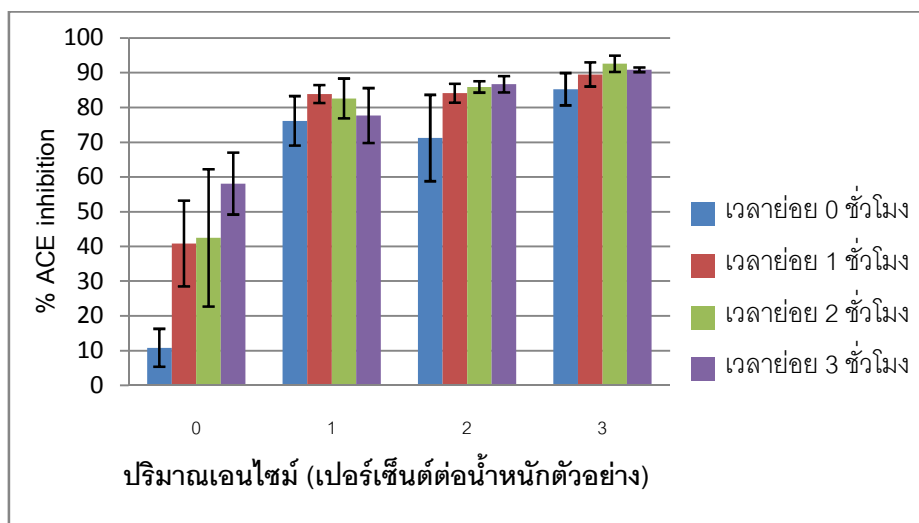


รูปที่ 4.17 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

ในขณะที่เวลาในการย่อย และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยกลับไม่ส่งผล ($p > 0.05$) ต่อค่า %TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง โดยสันนิษฐานว่าเป็นผลมาจากปริมาณ หรือสัดส่วนของกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงแต่ละสภาวะมีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย อาจทำให้ได้กรดอะมิโน และเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีสมบัติชอบน้ำ และ ไม่ชอบน้ำเกิดขึ้น (Jeon, Byun และ Kim, 1999) จึงส่งผลให้สัดส่วนของกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดมีค่าคงที่ จึงด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้ใกล้เคียงกันด้วย

4.12 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง สามารถวิเคราะห์ที่ได้เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ตามวิธีของCrushman และ Cheung (1971) รูปที่ 4.18 (ตารางภาคผนวกที่ ก.20) แสดงค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง



รูปที่ 4.18 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme[®] 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อ % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง มีค่า % ACE inhibition เริ่มต้น 10.82 เปอร์เซ็นต์ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเอนไซม์และเวลาในการย่อย จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติ (ตารางภาคผนวกที่ ข.18)พบว่า ปริมาณเอนไซม์ เวลาในการย่อย และปฏิสัมพันธ์ร่วมระหว่างปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง ($p \leq 0.05$) การเพิ่มปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงมีค่ามากขึ้น ส่งผลให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอะมิโนและเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ในปริมาณที่มากขึ้นด้วย (Raghavan และ Kristinsson, 2009) นอกจากนี้ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซต และชนิดของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ ก็เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซต ในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เช่นกัน (Pan และคณะ, 2012 ; Tsai, Chen และ Pan, 2008) จากงานวิจัยของ Pan และคณะ (2012) พบว่าการย่อยสลาย whey protein ด้วยเอนไซม์ trypsin ทำให้ค่า % ACE inhibition ของ whey protein hydrolysate เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากสถานะที่ไม่ผ่านการย่อยสลาย

ด้วยเอนไซม์ และเมื่อใช้เทคนิค ultrafiltration คัดแยกขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบใน whey protein hydrolysate ออกเป็น 3 ขนาด คือ เล็กกว่า 6 kDa, อยู่ในช่วง 6-10 kDa และ มากกว่า 10 kDa ตามลำดับ พบว่าเปปไทด์ซึ่งมีขนาดเล็กกว่า 6 kDa มีค่า % ACE inhibition 64.26 เปอร์เซ็นต์ มากกว่า ค่า % ACE inhibition ที่พบในเปปไทด์ที่มีขนาดอยู่ในช่วง 6-10 kDa (51.54 เปอร์เซ็นต์) และ มากกว่า 10 kDa (40.46 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในส่วนของ % ACE inhibition ของส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางจะพบว่า ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางมีค่า % ACE inhibition สูงกว่าในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ซึ่งอาจเป็นเพราะโครงปลานิลที่ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับงานวิจัยนี้ เป็นส่วนเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตปลาแล้ในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งปกติแล้วจะขายเป็นอาหารสัตว์ จึงไม่ได้มีการดูแลภาวะในการเก็บอย่างดี โดยเฉพาะในการควบคุมอุณหภูมิ ดังนั้นโครงปลานิลเหล่านี้ อาจเกิดการ autolysis ดังจะสังเกตได้จากระดับการย่อยสลายโปรตีนในส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางมีค่าสูง (รูปที่ 4.2) จึงส่งผลให้ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางมีค่า % ACE inhibition สูงกว่าในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

4.13 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน

ไฮโดรไลเซทจาก โครงปลากะพง ในสภาวะที่ถูกคัดเลือก

เช่นเดียวกับกรณีโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงจะเป็นขั้นตอนที่สำคัญเพื่อเชื่อมโยงถึงคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง กับความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ซึ่งงานวิจัยนี้จะเลือกเฉพาะสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ไปใช้ประโยชน์ทั้งในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของ ACE โดยจะพิจารณาจาก % DPPH radical scavebging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition ตามลำดับ ซึ่งพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ได้จากการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ในปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE เพราะ

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จะมีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE อยู่ในช่วงที่สูงที่สุด โดยจะวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ เปรียบเทียบกับ ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางที่ได้ภายหลังจากการปั่นเหวี่ยง ซึ่งไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ตารางที่ 4.8 แสดงชนิด และ กรดอะมิโนในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทียบกับชนิด และปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

ตารางที่ 4.7 ชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับชนิดและปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม) ที่พบในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

ชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม ต่อ 100 กรัม)	
	ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ซึ่งแยกได้จากการปั่นเหวี่ยง	โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างย่อยสลายเป็นเวลา 2 ชั่วโมง
alanine	59	106
arginine	63	113
glutamic acid	23	137
glycine	14	64
histidine	2	10
isoleucine*	5	25
leucine*	12	64

lysine*	3	21
methionine*	4	33
phenylalanine*	4	19
cysteine	11	15
aspartic acid	17	100
tyrosine	2	26
proline	9	62
serine	7	41
threonine*	5	30
tryptophan*	0	2
valine*	8	58
total	248	926

*กรดอะมิโนจำเป็น

โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ได้จากการย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบ 926 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมโปรตีนไฮโดรไลเซท ในจำนวนนี้มีสัดส่วนกรดอะมิโนที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine, histidine และ cysteine เป็นต้น (Arcan และ Yemenicioglu, 2007; Pena-Ramos และ Xiong, 2001) ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเท่ากับ 0.06 มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนัก เช่น lysine, arginine, aspartic acid, glutamic acid และ histidine เป็นต้น (Arcan และ Yemenicioglu, 2007) ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด เท่ากับ 0.41 มีสัดส่วนกรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ เช่น glycine, methionine, lysine, tryptophan, alanine, histidine, valine และ proline เป็นต้น (Pena-Ramos และ Xiong, 2001; Zhu, Zhou และ Qian, 2006) เท่ากับ 0.38 และมีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE เช่น tyrosine, tryptophan, phenylalanine, proline, leucine, isoleucine, valine, lysine และ alanine เป็นต้น (Gomez-Ruiz, Ramos และ Recio, 2004) ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด เท่ากับ 0.41 ในขณะที่ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง มีสัดส่วนกรดอะมิโนที่มีสมบัติในการ

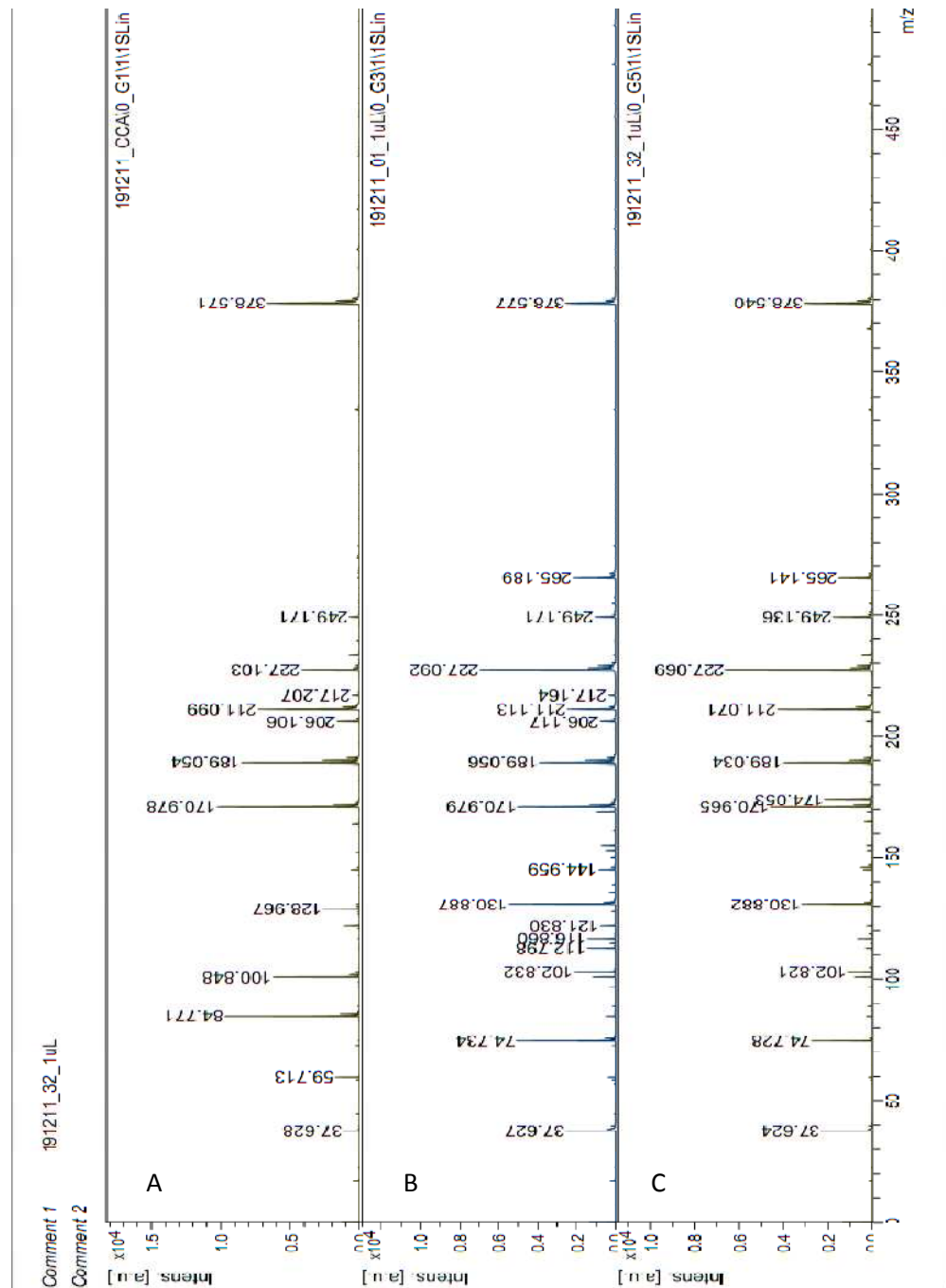
ต้านอนุมูลอิสระ กรดอะมิโนที่สามารถทำปฏิกิริยากับไอออนของโลหะหนัก กรดอะมิโนที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำ และ กรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด เท่ากับ 0.03, 0.43, 0.40, 0.41 ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีกรดอะมิโนทั้ง 4 กลุ่ม ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับที่พบในส่วนของโครงปลากะพงบดเจือจาง จึงน่าจะส่งผลให้ % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ได้ในส่วนของโครงปลากะพงบดเจือจาง แต่จากผลการทดลอง (รูปที่ 4.17) กลับพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงสภาวะที่คัดเลือก กลับมีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition มากกว่าที่วิเคราะห์ได้ในส่วนของโครงปลากะพงบดเจือจาง ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงนั้น ไม่ได้ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีสมบัติดังกล่าวต่อปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดเพียงอย่างเดียว แต่ยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ชนิดของกรดอะมิโน ลำดับของกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องพิจารณา ดังนั้นจึงมีการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงด้วย ซึ่งจะรายงานผลในหัวข้อต่อไป

4.14 การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงสภาวะที่ถูกคัดเลือก

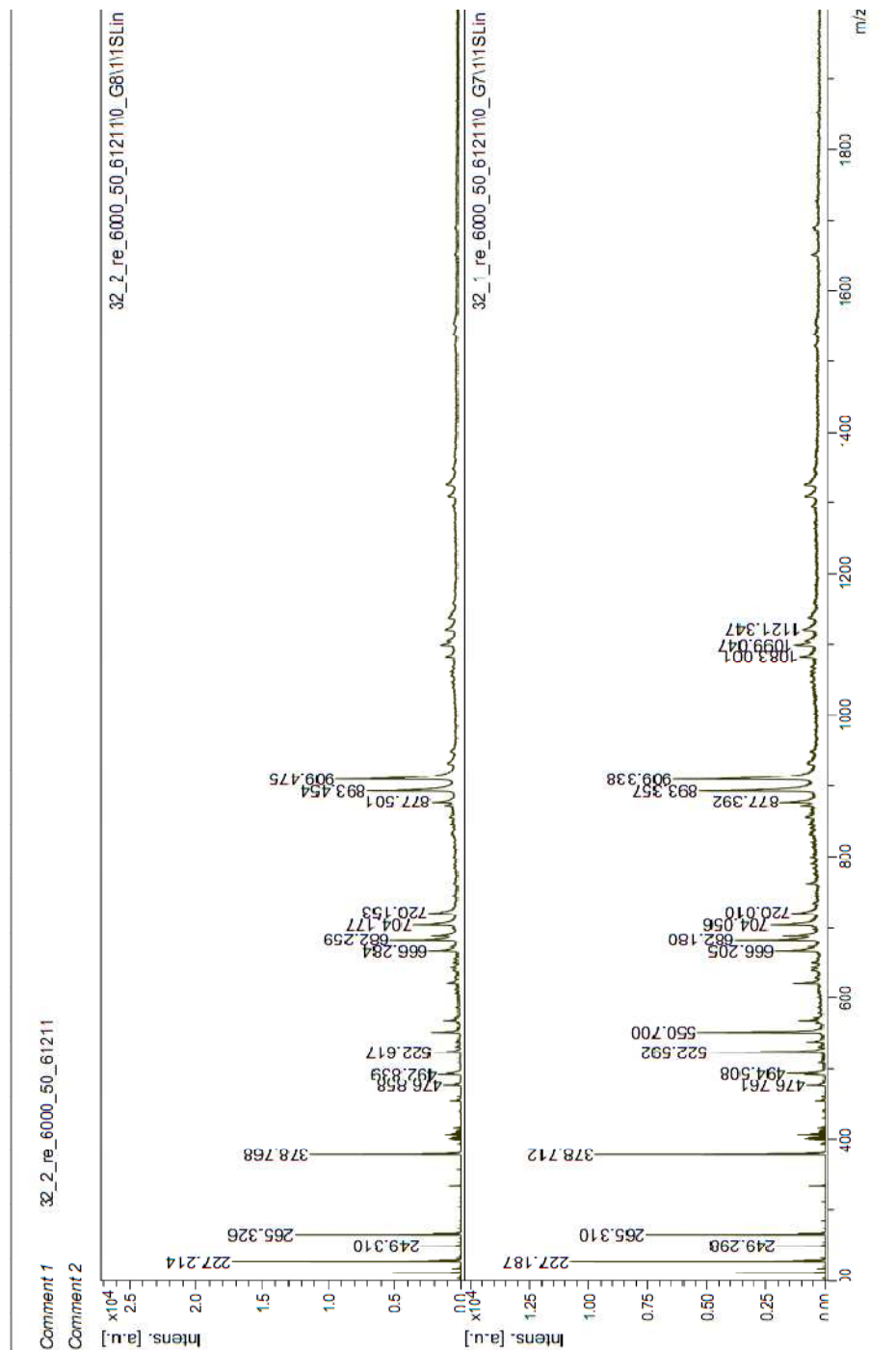
การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง จะใช้วิธีวิเคราะห์เดียวกับในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล กล่าวคือจะใช้เทคนิค MALDI-tof ซึ่งอาศัยหลักการวิเคราะห์มวลของสารในการประเมินขนาดของเปปไทด์ รูปที่ 4.19 แสดง mass spectrum ของขนาดของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับ mass spectrum ของส่วนของโครงปลากะพงบดเจือจาง และ mass spectrum ของ

สารละลาย α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) อิมัตว์ ที่ใช้เป็น matrix สำหรับการทดสอบ สำหรับรูปที่ 4.20 จะแสดง mass spectrum ของขนาดของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อเพิ่มช่วงของการทดสอบเป็น 0-1800 Da

Mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาด 74.728, 102.821, 130.882, 174.053, 265.141, 476.671, 494.508, 522.592, 550.700, 666.205, 682.180, 704.056, 720.010, 877.392, 893.357, 909.338, 1083.001, 1099.047 และ 1121.347 Da โดยจะมีเปปไทด์ขนาดใหญ่ คือ 3837.519, 5756.854 และ 5813.418 Da ตามลำดับ (แสดงในรูปภาคผนวกที่ ง.9) ในขณะที่ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางจะมีเปปไทด์ขนาด 74.734, 102.832, 112.798, 116.860, 121.830, 130.887, 144.959 และ 265.189 Da และมีเปปไทด์ขนาดใหญ่ คือ 3838.688, 3878.563, 5758.007 และ 5814.104 Da (แสดงในรูปภาคผนวกที่ ง.10) ซึ่งจะเห็นว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดเล็ก และมีความหลากหลายในช่วง 400 -1000 Da มากกว่าในส่วนของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง โดยเมื่อพิจารณาขนาดของเปปไทด์ที่ส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ยับยั้งการทำงานของ ACE พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีขนาดน้อยกว่า 1000 Da (ซึ่งจะมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบไม่เกิน 10 โมเลกุลกรดอะมิโน) ซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยาที่บริเวณเร่งของ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Natesh และคณะ, 2003) จึงทำให้ค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ที่สภาวะดังกล่าวมีค่าสูง ในขณะที่เปปไทด์ที่มีขนาดประมาณ 1000-1100 Da นั้นเป็นเปปไทด์ที่มีขนาดใกล้เคียงกับขนาดของเปปไทด์ที่พบในรายงานของ Wu, Chen และ Shiau (2003) และ Jun, Jung และ Kim (2004)



รูปที่ 4.19 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (C) เปรียบเทียบกับขนาดของเปปไทด์ในส่วนของโครงปลานิลบดเจือจาง (B) และสารละลาย CCA อิมัตัวที่ใช้เป็น matrix สำหรับทดสอบ (A)



รูปที่ 4.20 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 400 - 1800 Da

ซึ่งรายงานว่าเป็นโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 1300-1400 Da มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น เปปไทด์ขนาด 1000 -1100 Da ดังกล่าวจึงอาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างสูงของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

การทดลองในส่วนถัดไปจะเป็นการวิเคราะห์คุณภาพของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ซึ่งผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายในสภาวะเช่นเดียวกับการผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล โดยจะติดตามสมบัติในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของ ACE ในระหว่างการเก็บรักษา 90 วัน

4.15 การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

การผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง จะใช้กระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจาย ในสภาวะเช่นเดียวกับที่ได้กล่าวไปแล้วในส่วนของการผลิตผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล โดยจะพิจารณาลักษณะทางกายภาพ เช่น สี และ กลิ่น ของผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 แสดง % yield, ค่าสีในระบบ $L^* a^* b^*$ และ ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ตามลำดับ

ตารางที่ 4.8 % yield ของผลิตภัณฑ์ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

โปรตีนไฮโดรไลเซท		น้ำหนักตัวอย่าง	น้ำหนักตัวอย่าง	% yield
ปริมาณเอนไซม์	เวลาในการ	(เริ่มต้น)	(สุดท้าย)	
(%)	ย่อย(ชั่วโมง)			
3	2	88	32.29	36.69
0	1	88	32.33	36.74

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นกระจายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ทั้งสภาวะที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และส่วนใสของโครงปลากะพงบดเฉื่อย มีค่า % yield ใกล้เคียงกัน คือ 36.69 เปอร์เซ็นต์ และ 36.74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงทั้ง 2 สภาวะ มีลักษณะเป็นผงละเอียด โดยผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากสภาวะที่ใช้ปริมาณเอนไซม์ 3

เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีสีเหลือง และมีกลิ่นคาวปลามากกว่าส่วนผสม
ใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

ตารางที่ 4.9 ค่าสีในระบบ L* a* b* ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

โปรตีนไฮโดรไลเซท		ค่าสี		
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการ ย่อย(ชั่วโมง)	L*	a*	b*
3	2	71.87 ± 0.50	-1.31 ± 0.04	4.20 ± 0.31
0	1	72.63 ± 0.68	-1.27 ± 0.07	0.66 ± 0.07

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าสีของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อย
สลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งมีสีค่อนข้าง
เหลือง มีค่าความสว่าง (L*) เป็น 71.87 เปอร์เซ็นต์ ค่าสีแดง (a*) -1.31 เปอร์เซ็นต์ และ ค่าสีเขียว
(b*) 4.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ส่วนผสมใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง จะมีสีขาว มีค่า
ความสว่าง (L*) เป็น 72.63 เปอร์เซ็นต์ ค่าสีแดง (a*) -1.27 เปอร์เซ็นต์ และ ค่าสีเขียว (b*) 0.66
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถอธิบายโดยใช้เหตุผลเช่นเดียวกับในกรณีของผงโปรตีนไฮโดรไล
เซทจากโครงปลานิล คือ สีเหลืองที่เกิดขึ้นในส่วนของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่
ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นั้น
เป็นผลมาจากเอนไซม์ Flavourzyme[®] ที่ใช้สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท(Thiansilakul,
Benjakul และ Shahidi, 2007)

ตารางที่ 4.10 ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง		ปริมาณโปรตีน (กรัม ต่อ 100 กรัม)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
3	2	9.20
0	1	3.33

ตารางที่ 4.10 แสดงว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ (9.20 กรัมต่อ 100กรัม)มากกว่า ปริมาณโปรตีนในผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง (3.33 กรัมต่อ 100กรัม) ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ จะใช้ในการคำนวณปริมาณตัวอย่างที่ต้องใช้ในการวิเคราะห์สมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใกล้เคียงกับที่วิเคราะห์ได้ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ของเหลว) และส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง (ของเหลว) ตามลำดับ

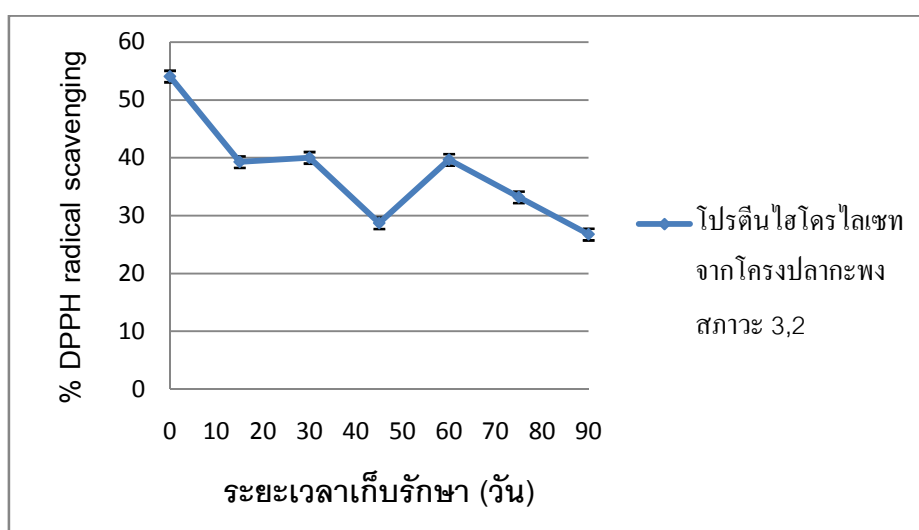
4.15.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ในระหว่างการเก็บรักษา

การพิจารณาอายุการเก็บรักษาของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงสำหรับงานวิจัยนี้ จะเก็บตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ในถุง laminated aluminium foil (PE/Al/PP) ปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 90 วัน ทำการวิเคราะห์ความสามารถของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และ ยับยั้งการทำงานของ ACE ทุกๆ 15 วัน ในด้านของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า % DPPH radical scavenging, ค่า % metal chelating activity และ ค่า % TBA activity ratio และสำหรับความสามารถในการเป็นสารยับยั้ง การทำงานของ ACE นั้นจะพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่า % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทในแต่ละสภาวะ

4.15.1.1 การติดตามการเปลี่ยนแปลงสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH

การติดตามการเปลี่ยนแปลงค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก

ตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผลส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางนั้นจะวิเคราะห์ในลักษณะเช่นเดียวกับกรณีของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล โดยรูปที่ 4.21 (ตารางภาคผนวกที่ ก.21) แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับผลส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง



รูปที่ 4.21 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

รูปที่ 4.21 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า % DPPH radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงซึ่งมีค่าเริ่มต้น 54.07 เปอร์เซ็นต์ และจะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ในขณะที่ผลส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจางนั้น ไม่สามารถคำนวณค่า % DPPH radical scavenging ได้ เนื่องจากสารละลายผสมระหว่างผลส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง และน้ำกลั่น มีลักษณะขุ่น ทำให้การดูดกลืนแสงที่วัดได้นั้นมีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายควบคุม (ตารางภาคผนวกที่ ก.22) เมื่อเปรียบเทียบค่า % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่

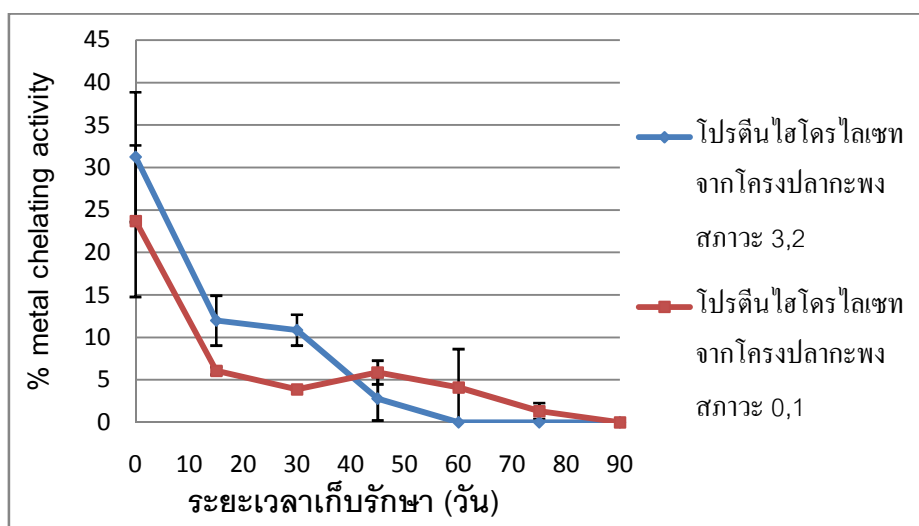
ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กับ โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง (ของเหลว) ที่สภาวะเดียวกัน จะพบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทมีค่า % DPPH radical scavenging น้อยกว่าค่า % DPPH radical scavenging ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง (ของเหลว) เนื่องจากความร้อนที่ใช้ในการทำแห้งโปรตีนไฮโดรไลเซท อาจทำให้โปรตีนบางส่วนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ และอาจทำให้กรดอะมิโนบางชนิด เช่น lysine, phenylalanine และ tyrosine เป็นต้น ถูกทำลาย (Abdul-hamid, Bakar และ Bee, 2002)

4.15.1.2 วิธี metal chelating activity

สำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นั้นจะทำในลักษณะที่คล้ายกับผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล คือ ชั่งน้ำหนักตัวอย่างผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ละลายน้ำกลั่น และผสมกับสารละลาย $FeCl_2$ และ สารละลาย 3-(2-pyridyl)-5,6-bis(4-phenyl-sulfonic acid)-1,2,4-triazine (ferrozine) ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร รูปที่ 4.22 (ตารางภาคผนวกที่ ก.23 และ ก.24) แสดงค่า % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทียบกับผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

รูปที่ 4.22 แสดงให้เห็นว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ ผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเริ่มต้น 31.23 เปอร์เซ็นต์ และ 23.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี metal chelating activity และจะมีค่าลดน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ในระหว่างการเก็บรักษา ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

จะมีค่า % metal chelating activity น้อยที่สุดเท่ากับ 2.78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 45 วันและจะไม่สามารถคำนวณค่า % metal chelating activity ได้เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้นเป็น 60-90 วัน ตามลำดับ



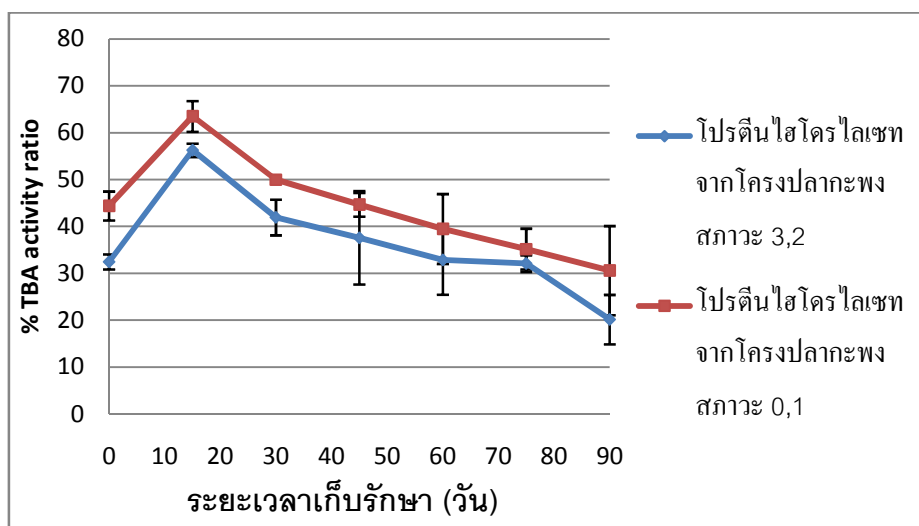
รูปที่ 4.22 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากระพง ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและ ผงส่วนใสของโครงปลากระพงบดเจือจาง

ในขณะที่ผงส่วนใสของโครงปลากระพงบดเจือจาง จะมีค่า % metal chelating activity น้อยที่สุด คือ 1.33 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 75 วัน กระบวนการทำแห้งแบบพ่นกระจายซึ่งใช้ความร้อนสูงในการระเหยน้ำออกจากโมเลกุลอาหาร ส่งผลให้ค่า % metal chelating activity เริ่มต้นของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากระพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ ผงส่วนใสของโครงปลากระพงบดเจือจาง มีค่าน้อยกว่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซท (ของเหลว) ที่สภาวะเดียวกัน โดย Thiansilakul, Benjakul และ Shahidi (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่า % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจาก round scad (ซึ่งผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง) เป็นเวลา 6 สัปดาห์ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจาก round scad มีค่า % metal chelating activity เริ่มต้นประมาณ 57 เปอร์เซ็นต์ และจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 สัปดาห์ โดยอธิบายว่าเป็นผลมาจากสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซตถูกทำลายในระหว่างการเก็บรักษา

4.15.1.3 วิธี TBA

การติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สามารถทำได้โดยผสมตัวอย่างเข้ากับน้ำมันถั่วเหลือง เอทานอล และ สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ค่า % TBA activity ratio โดยการทำปฏิกิริยากับ TBA reagent แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่มีความยาวคลื่น 535 นาโนเมตร รูปที่ 4.23(ตารางภาคผนวกที่ ก.25 และ ก.26) แสดงการเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เทียบกับผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดละเอียด



รูปที่ 4.23 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดละเอียด

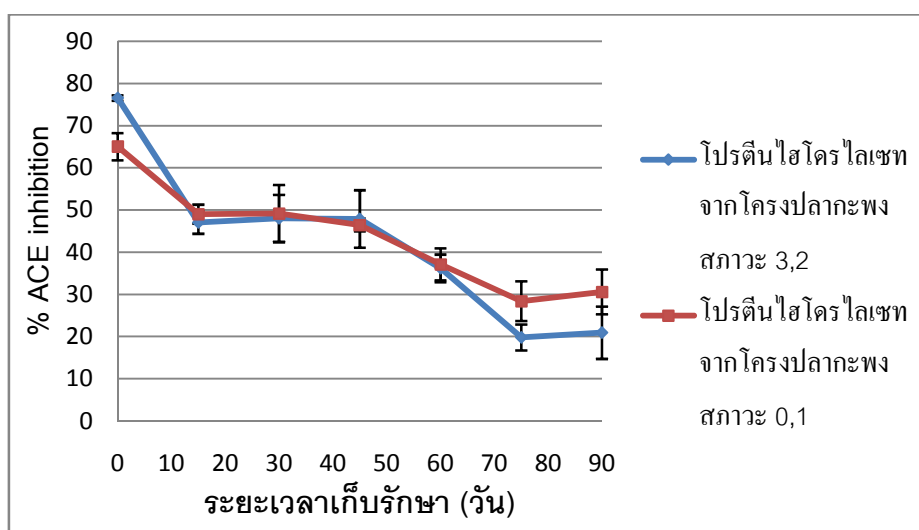
จากรูปที่ 4.23 แสดงให้เห็นว่า ค่า% TBA activityratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน และจะมีแนวโน้มลดลง เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษายาวนานขึ้น ซึ่งส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการปิดผนึกบรรจุภัณฑ์โดยไม่ใช้ระบบสุญญากาศ ทำให้แก๊ซออกซิเจนสามารถซึมผ่านเข้าสู่บรรจุภัณฑ์ได้ การซึมผ่านของแก๊ซออกซิเจนนี้เป็นปัจจัยหนึ่งในการเร่งอัตราการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ซึ่งการวิเคราะห์ความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของสารโดยวิธี TBA นั้น จะวัดความสามารถของสารในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน สารประกอบต่างๆ ที่อาจเกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยานี้ เช่น ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ สามารถเกิดอันตรกิริยากับกรดอะมิโน และโปรตีนได้ (Ladikos และ Lougovois ,1990) ซึ่งอันตรกิริยาดังกล่าวอาจส่งผลต่อการลดลงของค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เก็บรักษาเป็นเวลานานขึ้น

4.15.1.4 ความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE

ในส่วนของติดตามการเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition นั้นก็เช่นเดียวกับในส่วนของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล ซึ่งได้อธิบายไว้แล้วในหัวข้อ 4.7.1.4 โดยรูปที่ 4.24 (ตารางภาคผนวกที่ ก.27 และ ก.28) แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

รูปที่ 4.24 แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาในการเก็บรักษาส่งผลต่อการลดลงของค่า % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ซึ่งสามารถอธิบายผลการทดลองได้เช่นเดียวกับในผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล กล่าวคือ การลดลงของ % ACE inhibition นี้เป็นผลมาจากการที่กรดอะมิโน และเปปไทด์ถูกทำลาย อันเนื่องมาจากความร้อน และปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการทำแห้ง

แบบพ่นกระจาย (Abdul-Hamid, Bakar และ Bee, 2006) และในระหว่างการเก็บรักษา (Hernandez-Ledesma, Contreras และ Recio, 2011) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ เปปไทด์ที่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE (Lopez-Fandino, Otte และ van Camp, 2006)



รูปที่ 4.24 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และ ผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง

การผสมมอลโทเด็กทรีน ซึ่ง เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาล D-glucose ลงไปในโปรตีนไฮโดรไลเซต อาจทำให้เกิดปฏิกิริยา Maillard และ ปฏิกิริยา glycation ระหว่างเปปไทด์และมอลโทเด็กทรีนได้ในระหว่างการการทำแห้ง และเก็บรักษา ปฏิกิริยาเหล่านี้จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของเปปไทด์ และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดอะมิโนบางชนิด เช่น lysine, methionine, tyrosine, histidine, tryptophan และ proline (Lopez-Fandino, Otte และ van Camp, 2006) เป็นต้น นอกจากนี้ปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในระหว่างการแปรรูปและเก็บรักษา ก็ส่งผลต่อการเสื่อมสลายของกรดอะมิโนและเปปไทด์ ที่เป็นองค์ประกอบในผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ และเวลาในการย่อยที่แตกต่างกัน ส่งผลให้โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงที่ได้ มีระดับการย่อยสลายโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ และสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE แตกต่างกัน สามารถคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล และโครงปลากะพงได้จากการพิจารณา ค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition โดยพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล คือสภาวะที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้ประกอบด้วยกรดอะมิโน 697 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมโปรตีนไฮโดรไลเซต มีเปปไทด์ขนาดเล็กในช่วง 400 – 1300 Da เป็นองค์ประกอบในปริมาณมาก และมีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition ที่สูงกว่าในส่วนของโครงปลานิลบด เจือจางซึ่งไม่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ คือ 90.38, 91.80, 70.54 และ 81.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ โดยชนิดของกรดอะมิโน ปริมาณกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซต จะส่งผลต่อความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ในขณะที่สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง คือสภาวะที่ย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้มีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition เท่ากับ 96.80, 92.54, 90.12 และ 92.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งค่าเหล่านี้อยู่ในช่วงที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงสภาวะอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่า มีกรดอะมิโน 926 มิลลิกรัมต่อ 100 กรัมโปรตีนไฮโดรไลเซต และมีเปปไทด์ขนาดเล็กในช่วง 400-1100 Da เป็นองค์ประกอบ

ในการเปรียบเทียบระหว่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นั้นจะพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE มากกว่าในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

สำหรับการพิจารณาการเปลี่ยนแปลงสมบัติเชิงหน้าที่ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งทำแห้งแบบพ่นกระจายนั้นพบว่า ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากทั้ง 2 สภาวะ มีลักษณะเป็นผงละเอียด สีเหลือง และมีกลิ่นคาวปลาเล็กน้อย มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE โดยผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงมีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition เริ่มต้นเท่ากับ 52.25, 17.61, 64.12 และ 55.46 เพลอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าในส่วนของผงโครงปลานิลบดเจือจาง และค่าเหล่านี้จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 วัน ในขณะที่ผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะมีค่า % DPPH radical scavenging, % metal chelating activity, % TBA activity ratio และ % ACE inhibition เริ่มต้น คือ 54.07, 31.23, 32.44 และ 76.51 เพลอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งในจำนวนค่าเหล่านี้ มีเพียงค่า % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมงเท่านั้น ที่มีค่าเริ่มต้นน้อยกว่าในส่วนของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง และค่าทั้ง 4 ค่าดังกล่าวจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน ดังจะเห็นได้ว่าผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เพลอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนั้น จะสามารถเก็บรักษาที่

คุณหมุมิห้องได้ยาวนานกว่าผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง ที่ผ่านการย่อยสลายด้วย เอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

5.2 ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล และโครงปลากะพง นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโน ปริมาณกรดอะมิโน และขนาดของเปปไทด์ ที่เป็นองค์ประกอบเท่านั้น หากแต่ยังขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์ด้วย ซึ่งการวิเคราะห์สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ ACE สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการวิเคราะห์ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล หรือโครงปลากะพง ซึ่งมีกรดอะมิโน หรือเปปไทด์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยกรดอะมิโน และเปปไทด์เหล่านี้อาจจะส่งผลที่แตกต่างกันต่อสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทได้ ดังนั้นในการต่อยอดงานวิจัยจึงควรมีการทำ purification เพื่อแยกเปปไทด์ที่มีสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของ ACE และนำมาวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเปปไทด์นั้นๆ นอกจากนี้ผลการทดลองทั้งหมดสำหรับงานวิจัยนี้เป็นผลการทดลองที่ได้มาจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) เท่านั้น จึงควรมีการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) เพื่อนำมาใช้ในการพิจารณาประสิทธิภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทในระบบของสิ่งมีชีวิต

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- ดวงใจ ลาภยีนง.2548. การใช้โปรตีนเอสในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยเป่าฮื้อ *Haliotis asinina* Linnaeus. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นฤมล อัครเศกมณี. 2541. เทคโนโลยีผลิตภัณพ์ประมง. นครศรีธรรมราช : สถาบันราชภัฏ นครศรีธรรมราช.
- ธัญพร จันทร์แสนโรจน์. 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากหอยเป่าฮื้อ (*Haliotis asinina*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- ปัญญา สุวรรณสมุทร. 2545. การเลี้ยงปลาในกระชัง. กรุงเทพมหานคร : โครงการหนังสือเกษตร ชุมชน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประจิดร วงศ์รัตน์, ประวิทย์ สุรนิรนาถ, กังวาลย์ จันทร์โชติ, สัจจา ยีนง และ อ้อยทิพย์ รุจิเรย. 2531. การเพาะเลี้ยงปลากะพงขาว (หลักการและแนวปฏิบัติ). โครงการหนังสือเผยแพร่ความรู้ทางการประมง. สำนักพิมพ์ ชองนนทรี.
- ประมง, กรม. ยุทธศาสตร์การพัฒนาปลานิล (พ.ศ. 2553 - 2557).[ออนไลน์]. 2554.แหล่งที่มา: <http://www.fisheries.go.th/freshwater/web3/images/download/yutasat.pdf> [26 มีนาคม 2555]
- ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เลิศชัย พัฒนวิจิตร.2548. เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนจาก *Bacillus licheniformis* เพื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล *Oreochromis niloticus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- อุดม เรืองนพคุณ. 2547. การเลี้ยงปลานิล. กรุงเทพมหานคร : อักษรสยามการพิมพ์.

ภาษาอังกฤษ

- Abdul-Hamid, A., Bakar, J., and Bee, G.H. 2002. Nutritional quality of spray dried protein hydrolysate from Black Tilapia (*Oreochromis mossambicus*). Food Chemistry 78: 69-74.
- AOAC. 2000. Official Methods of the Analysis. 17th edition. Washington DC: Association of Official Analysis Chemists.
- Adler-Nissen, J. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. Journal of Agriculture and Food Chemistry 27(6): 1256-1262.
- Adler-Nissen, J. 1986. Enzymatic Hydrolysis of Food Protein. London: Elsevier Applied Science.
- Arcan, I., and Yemenicioglu, A. 2007. Antioxidant activity of protein extracts from heat-treated or thermally processed chickpeas and white beans. Food Chemistry 103: 301-312.
- Aruoma, O.I. 1994. Free radical and antioxidant strategies in sports. Journal of Nutritional Biochemistry 5: 370-381.
- Asbjorn, G. 1993. Enzymic processing of marine raw materials. Process Biochemistry 28: 1-15.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., and Nunes, M.L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry 45: 18-24.
- Benjakul, S., and Morrissey, M. 1997. Protein hydrolysate from pacific whiting solid wastes. Journal of Agriculture and Food Chemistry 45: 3423-3430.
- Bernadini, R.D. et al., 2011. Review : Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chemistry 124: 1296-1307.

- Bhandari, B.R., Datta, N., and Howes, T. 1997. Problems associated with spray drying of sugar-rich foods. Drying Technology 15(2): 671-684.
- Boontha, B., Nukkuntod, J., Hirankarn, N., Chaumpluk, P., and Vilaivan, T. 2008. Multiplex mass spectrometric geotyping of single nucleotide polymorphisms employing pyrrolidinyI peptide nucleic acid in combination with ion-exchange capture. Analytical Chemistry 80: 8178-8186.
- Chobanian A.V. 2003. The seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure. Hypertension 42: 1206-1252.
- Cohen, S.A., and Michaud, D.P. 1993. Synthesis of fluorescent derivatizing reagent, 6-aminoquinolyI-N-hydroxysuccinimidyl cabarmate, and its application for the analysis of hydrolysate amino acid via high performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry 211: 279-287.
- Crushman, D.W., and Cheung, H.S. 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacology 20: 1637-1648.
- Cruz, A.G., Faria, J., and Vandender, A. 2007. Packaging system and probiotic dairy foods. Food Research International 40: 951-956.
- Dekker, E., Raghavan, S., Kristinsson, H.G., and Marshall, M.R. 2011. Oxidative stability of mahimahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysate. Food Chemistry 124: 640-645.
- Dong, S., *et al.* 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry 107: 1485-1493.
- Fernandez, J., Perez-Alvarez, J.A., and Fernandez-Lopes, J.A. 1996. Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. Food Chemistry 59(3): 345-353.

- Gomez-Ruiz, J.A., Ramos, M., and Recio, I. 2004. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity of peptides isolated from Manchego cheese stability under simulated gastrointestinal digestion. International Dairy Journal 14: 1075-1080.
- Gonzalez, S., Flick, G.J., O'Keefe, S.F., Duncan, S.E., McLean, E., and Craig, S.R. 2006. Composition of farmed and wild yellow perch (*Perca flavescens*). Journal of Food Composition and Analysis 19: 720-726.
- Halliwell, B. 1997. Antioxidants : the basic- what they are and how to evaluate them. Journal of Advance Pharmacology 38: 3-20.
- Hernandez-Ledesma, B., Contreras, M.d.M., and Recio, I. 2011. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Advances in Colloid and Interface Science 165(1): 23-35.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry 121(1): 178-184.
- Je, Y.J., Lee, K.H., Lee, M.H., and Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International 42: 1266-1272.
- Jena, S. and Das, H. 2012. Shelf life prediction of aluminum foil laminated polyethylene packed vacuum dried coconut milk powder. Journal of Food Engineering 108(1): 135–142.
- Jeon, Y.J., Byun, H.G., and Kim, S.K. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membrane. Process Biochemistry 35: 471-478.

- Jun, S.Y., Jung, W.K. and Kim, S.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology 219(1): 20-26.
- Khantaphant, S., Benjakul, S., and Kishimura, H. 2011. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial protease. Process Biochemistry 46: 318-327.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote D., and Shahidi F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry 102: 1317-1327.
- Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Hydrolysis of salmon muscle proteins by an enzyme mixture extracted from atlantic salmon. Journal of Food Biochemistry 24(3): 177-187.
- Kumar, P., and Mishra, H.N. 2004. Yoghurt powder-a review of process technology, storage and utilization. Food and Bioproducts Processing 82(C2): 133–142.
- Ladikos, D., and Lougovois, V. 1990. Lipid oxidation in muscle food : Review. Food Chemistry 35: 295-314.
- Lopez-Duarte, A.L., and Vidal-Quintanar, R.L. 2009. Oxidation of linoleic acid as a marker for shelflife of corn flour. Food Chemistry 114: 478-483.
- Lopez-Fandino, R., Otte, J., and van Camp, J. 2006. Review: Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive and ACE-inhibitory activity. International Dairy Journal 16: 1277-1293.
- Marco, A., Rubio, R., Compano, R., and Casals, I. 2002. Comparison of the Kjeldahl method and a combustion method for total nitrogen determination in animal feed. Talanta 57: 1019-1026.

- McCance, R.A. and Widdowson, E.M. 1978. The Composition of Foods, Fourth revised and extended edition of MRC Special Report No.297. Amsterdam, London and Elsevier, HMSO.
- Mestdagh, F., De Meulenaer, B., De, Clippeleer, J., Devlieghere, F., and Huyghebaert, A. 2005. Protective influence of several packaging material on light-oxidation of milk. Journal of Dairy Science 88: 499-510.
- Moore, S., and Stein, W.W.1948. Amino acid free photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acid. Journal of Biological Chemistry 179: 367-388.
- Murray, B.A., Walsh, D.J., and FitzGerald, R.J. 2004. Modification of the furanacryloyl-L-phenylalanylglycylglycine assay for determination of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. Journal of Biochemical and Biophysical Methods 59: 127-137.
- Nakajima, K., Yoshie-Stark, Y., and Ogushi, M. 2009. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. Food Chemistry 114: 844-851.
- Natesh, R., Schwager, S.L.U., Sturrock, E.D., and Acharya, K.R. 2003. Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. Nature (421) 551-554.
- Nielsen, P.M., Petersen, D., and Dambmann, C. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of Food Science 66(5): 642-646.
- Niki, E. 2010. Review : Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. Journal of Free Radical Biology and Medicine 49: 503-515.
- 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: 571-578.

- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2006. Food industry and fermented foods and related waste treatment in Thailand [online]. Available from: <http://www.google.com/oral> presentations 09 [2006, Mar 16]
- Pan, D., Cao, J., Guo, H., and Zhao, B. 2012. Studies on purification and the molecular mechanism of a novel ACE inhibitory peptide from whey protein hydrolysate. Food Chemistry 130: 121-126.
- Pena-Ramos, E.A., and Xiong, Y.L. 2001. Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. Journal of Dairy Science 84: 2577-2583.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal 16: 562-569.
- Prior, R., Wu, X., and Schaich, K. 2005. Standardized method for the determination of antioxidant capacity and phenolics in food and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53:4290-4302.
- Raghavan, S., and Kristinsson, H.G. 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. Food Chemistry 117: 582-588.
- Rajakpase, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, Y.J., and Kim, S.K. 2005. Purification of radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International 38: 175-182.
- Roberston, G.L. 1993. Food Packaging Principle and Practice. New York: Markel Decker.
- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:3661-3667.
- Sarkar, B. 1987. Metal protein interactions. Progress in Food and Nutrition Science 11:363-400.
- Shahidi, F. 1994. Seafood processing by-products. In F. Shahidi and J.R. Botta (eds.), Seafoods Chemistry, Processing Technology and Quality, pp. 320-334. London: Blackie Academic and Professional.

- Silalai, N., and Roos, Y.H. 2011. Mechanical relaxation times as indicators of stickiness in skim milk–maltodextrin solids systems. Journal of Food Engineering 106(4): 306-317.
- Silvestre, M.P.C. 1997. Review of method for the analysis of protein hydrolysate. Food Chemistry 60(2):263-271.
- Steiner-Asiedu, M., Julshamn, K., and Lie, O. 1990. Effect of local processing methods(cooking, frying and smoking)on three fish species from Gana: part I. proximate composition, fatty acids, minerals, trace elements and vitamin. Food Chemistry 40: 309-321.
- Suetsuna, K., Ukeda, H., and Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. Journal of Nutritional Biochemistry 11: 128-131.
- 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.
- Vankerschaver, K., Willocx, C., Smout, M., Hendrickx, and Tobback, P.1996. Modeling and prediction of visual shelf life of minimally processed endive. Journal of Food Science 61: 1094–1098.
- Well, B.G., Dipiro, J.T., Schwinghammer, T.L., and Dipiro, C.V. 2009. Pharmacotherapy Handbook. 7th ed. Singapore: Mcgraw-Hill.
- Whitaker, J.R. 1994. Principles of Enzymology for Food Sciences. New York : Marcel Dekker.
- Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International 36: 949-957.

- Wu, T.H., Stine, J.J., and Bechtel, P.J. 2011. Preliminary chemical and nutritional characterization of liver from longnose skates (*Raja rhina*). Journal of Food Composition and Analysis 24: 356-361.
- Yang, J.I., Liang, W.S., Chow, C.J., and Siebert, K.J. 2009. Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. Process Biochemistry 44: 1152-1157.
- Zhan-li, W., Sai-sai, Z., Wei, W., Feng-qin, F., and Wei-guang, S. 2011. A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from the milk casein : virtual screening and docking studies. Agricultural Science in China 10(3): 463-467.
- Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry 41: 1296-1302.
- Zulueta, A., Esteve, M. J., and Frivola, A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant activity of food products. Food Chemistry 114: 310-316.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

ตารางผลการทดลอง

ตารางที่ ก.1 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล (%)

ตัวอย่าง		% โปรตีน(mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	0.21 ± 0.04 ^a
0	1	0.29 ± 0.03 ^a
0	2	0.34 ± 0.01 ^{ab}
0	3	0.36 ± 0.11 ^{ab}
1	0	0.56 ± 0.02 ^{abc}
1	1	0.72 ± 0.17 ^{abc}
1	2	0.83 ± 0.22 ^{bcd}
1	3	1.01 ± 0.19 ^{cde}
2	0	0.68 ± 0.17 ^{abc}
2	1	0.94 ± 0.28 ^{cde}
2	2	0.97 ± 0.10 ^{cde}
2	3	1.05 ± 0.07 ^{cde}
3	0	0.92 ± 0.29 ^{cde}
3	1	1.37 ± 0.51 ^e
3	2	1.29 ± 0.54 ^{de}
3	3	1.30 ± 0.62 ^{de}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.2 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อยสลาย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อระดับการย่อยสลายโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

ตัวอย่าง		ระดับการย่อยสลาย(mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	24.90 ± 6.82 ^a
0	1	20.41 ± 1.06 ^a
0	2	15.33 ± 3.68 ^a
0	3	15.15 ± 1.80 ^a
1	0	40.39 ± 5.20 ^{bc}
1	1	62.10 ± 8.25 ^{de}
1	2	62.68 ± 8.68 ^{de}
1	3	65.76 ± 8.64 ^e
2	0	41.66 ± 8.81 ^c
2	1	61.10 ± 7.69 ^e
2	2	62.70 ± 2.90 ^{de}
2	3	60.41 ± 5.60 ^{de}
3	0	27.54 ± 5.06 ^{ab}
3	1	45.90 ± 12.53 ^c
3	2	52.95 ± 13.70 ^{cde}
3	3	50.34 ± 11.17 ^{cd}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.3 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

ตัวอย่าง		% DPPH radical scavenging (mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	21.78 ± 1.00 ^a
0	1	49.85 ± 9.57 ^b
0	2	60.17 ± 7.04 ^c
0	3	62.06 ± 10.00 ^c
1	0	83.55 ± 2.45 ^d
1	1	87.53 ± 4.65 ^{de}
1	2	84.66 ± 1.19 ^{de}
1	3	92.47 ± 1.07 ^e
2	0	84.70 ± 3.96 ^{de}
2	1	90.38 ± 2.00 ^{de}
2	2	97.47 ± 1.53 ^{de}
2	3	88.48 ± 1.59 ^{de}
3	0	89.07 ± 1.79 ^{de}
3	1	90.67 ± 2.06 ^{de}
3	2	91.97 ± 1.98 ^{de}
3	3	90.66 ± 1.58 ^{de}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

*% DPPH radical scavenging ของ BHA มีค่าเท่ากับ 87.08 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.4 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

ตัวอย่าง		% metal chelating activity (mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	42.59 ± 1.78 ^a
0	1	44.76 ± 11.37 ^a
0	2	55.90 ± 12.50 ^b
0	3	61.57 ± 4.12 ^b
1	0	75.63 ± 10.07 ^c
1	1	79.61 ± 6.98 ^{cd}
1	2	87.18 ± 2.74 ^{de}
1	3	88.29 ± 5.89 ^{de}
2	0	85.59 ± 2.62 ^{de}
2	1	91.80 ± 1.17 ^e
2	2	91.61 ± 0.49 ^e
2	3	91.34 ± 2.28 ^e
3	0	91.63 ± 0.99 ^e
3	1	94.72 ± 0.66 ^e
3	2	93.34 ± 0.95 ^e
3	3	93.61 ± 0.87 ^e

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.5 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล

ตัวอย่าง		% TBA activity ratio (mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	30.18 ± 10.36 ^a
0	1	37.58 ± 19.43 ^a
0	2	42.30 ± 10.89 ^a
0	3	64.73 ± 7.62 ^b
1	0	74.12 ± 10.80 ^{bc}
1	1	76.57 ± 6.90 ^{bc}
1	2	83.91 ± 4.96 ^c
1	3	82.51 ± 2.10 ^c
2	0	81.82 ± 7.87 ^{bc}
2	1	81.90 ± 10.01 ^{bc}
2	2	82.87 ± 7.26 ^c
2	3	82.04 ± 10.14 ^{bc}
3	0	80.36 ± 9.73 ^{bc}
3	1	89.64 ± 6.84 ^c
3	2	88.95 ± 4.68 ^c
3	3	90.54 ± 2.93 ^c

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

% TBA activity ratio ของ α -tocopherol 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 80.73 ± 3.35 เปอร์เซ็นต์

% TBA activity ratio ของ สารละลาย BHA เข้มข้น 10 ppm มีค่า 80.49 ± 2.98 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.6 อธิพิผลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่างและ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

ตัวอย่าง		% ACE inhibition
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	31.37 ± 15.09 ^a
0	1	42.56 ± 23.48 ^{ab}
0	2	55.17 ± 2.02 ^{bc}
0	3	60.77 ± 6.70 ^{cd}
1	0	72.63 ± 1.04 ^{de}
1	1	82.82 ± 5.70 ^e
1	2	83.00 ± 2.46 ^e
1	3	83.74 ± 2.13 ^e
2	0	82.14 ± 0.97 ^e
2	1	83.77 ± 1.83 ^e
2	2	84.38 ± 0.73 ^e
2	3	87.78 ± 0.61 ^e
3	0	81.72 ± 3.74 ^e
3	1	85.82 ± 4.58 ^e
3	2	88.25 ± 3.30 ^e
3	3	89.63 ± 2.22 ^e

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

% ACE inhibition ของ Captopril® ความเข้มข้น 0.1 mM มีค่าเท่ากับ 79.12 ± 4.33 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.7 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซต จากโครงการปาล์มที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็น เวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% DPPH radical scavenging
0	52.25 ± 0.52 ^b
15	37.24 ± 0.36 ^{ab}
30	31.01 ± 0.66 ^a
45	26.47 ± 0.65 ^a
60	29.42 ± 17.63 ^a
75	26.39 ± 0.14 ^a
90	23.25 ± 9.42 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.8 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงส่วนใสของโครงการปาล์มบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% DPPH radical scavenging
0	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
15	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
30	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
45	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
60	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
75	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.9 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจาก
โครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1
ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% metal chelating activity
0	17.61 ± 9.82 ^b
15	9.90 ± 3.61 ^{ab}
30	6.71 ± 0.90 ^a
45	6.53 ± 1.85 ^a
60	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
75	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.10 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงส่วนใสของโครงปลานิล
บดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% metal chelating activity
0	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
15	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
30	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
45	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
60	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
75	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.11 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% TBA activity ratio
0	64.12 ± 6.48 ^b
15	63.15 ± 7.44 ^b
30	66.15 ± 5.44 ^b
45	40.18 ± 3.79 ^a
60	59.21 ± 1.87 ^b
75	36.41 ± 7.86 ^a
90	28.35 ± 2.11 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.12 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโปรตีนโครงปลานิล บดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% TBA activity ratio
0	53.06 ± 1.62 ^b
15	68.42 ± 0.93 ^a
30	53.07 ± 2.17 ^b
45	55.36 ± 5.05 ^b
60	51.31 ± 1.86 ^b
75	51.85 ± 1.75 ^b
90	50.00 ± 7.38 ^b

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.13 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% ACE inhibition
0	55.46 ± 0.43 ^a
15	49.39 ± 0.64 ^{ab}
30	41.28 ± 5.25 ^b
45	44.49 ± 1.77 ^b
60	28.30 ± 5.35 ^a
75	26.75 ± 6.60 ^a
90	29.32 ± 5.30 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.14 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจางเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% ACE inhibition
0	53.63 ± 0.86 ^{de}
15	47.80 ± 2.25 ^e
30	55.07 ± 0.32 ^{de}
45	46.33 ± 6.28 ^{cd}
60	40.04 ± 4.72 ^{bc}
75	38.27 ± 1.32 ^{ab}
90	32.04 ± 0.37 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.15 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์
ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนใน
โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง (%)

ตัวอย่าง		% โปรตีน(mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	0.44 ± 0.17 ^a
0	1	0.49 ± 0.19 ^a
0	2	0.52 ± 0.18 ^a
0	3	0.51 ± 0.17 ^a
1	0	0.85 ± 0.39 ^{ab}
1	1	1.07 ± 0.22 ^{abc}
1	2	1.13 ± 0.32 ^{acd}
1	3	1.29 ± 0.21 ^{abcd}
2	0	1.25 ± 0.60 ^{abcd}
2	1	1.42 ± 0.33 ^{bcd}
2	2	1.53 ± 0.24 ^{bcd}
2	3	1.68 ± 0.51 ^{bcd}
3	0	1.48 ± 0.72 ^{bcd}
3	1	1.87 ± 0.67 ^{cd}
3	2	2.06 ± 0.83 ^d
3	3	2.05 ± 0.71 ^d

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.16 ผลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ ระยะเวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ต่อดัชนีการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

ตัวอย่าง		ระดับการย่อยสลาย(mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	10.68 ± 3.84 ^a
0	1	11.80 ± 2.24 ^a
0	2	10.79 ± 0.35 ^a
0	3	11.82 ± 1.64 ^a
1	0	19.35 ± 7.53 ^a
1	1	49.86 ± 4.09 ^{cd}
1	2	47.68 ± 2.10 ^c
1	3	57.82 ± 9.02 ^d
2	0	18.15 ± 1.10 ^a
2	1	46.13 ± 4.51 ^c
2	2	56.14 ± 1.77 ^d
2	3	51.81 ± 5.78 ^{cd}
3	0	18.48 ± 3.27 ^a
3	1	36.30 ± 3.48 ^b
3	2	44.25 ± 8.11 ^{bc}
3	3	51.36 ± 7.12 ^{cd}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.17 อธิพิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์
 ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อความสามารถในการ
 ขจัดอนุมูล DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

ตัวอย่าง		% DPPH radical scavenging (mean ± SD)
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	79.24 ± 0.54 ^a
0	1	78.94 ± 2.72 ^a
0	2	82.60 ± 1.13 ^b
0	3	83.82 ± 2.86 ^b
1	0	83.82 ± 0.37 ^c
1	1	92.33 ± 0.73 ^d
1	2	93.86 ± 0.81 ^{de}
1	3	94.80 ± 0.70 ^{ef}
2	0	93.96 ± 0.82 ^{de}
2	1	95.34 ± 0.14 ^{ef}
2	2	96.23 ± 0.46 ^f
2	3	95.23 ± 0.36 ^{ef}
3	0	95.53 ± 0.51 ^{ef}
3	1	96.19 ± 0.79 ^f
3	2	96.80 ± 0.39 ^f
3	3	96.60 ± 0.70 ^f

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

*% DPPH radical scavenging ของ BHA มีค่าเท่ากับ 87.08 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.18 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % metal chelating activity ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

ตัวอย่าง		% Metal chelating activity
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	
0	0	59.27 ± 6.53 ^a
0	1	67.24 ± 4.09 ^b
0	2	64.31 ± 8.53 ^{ab}
0	3	67.73 ± 3.93 ^b
1	0	84.48 ± 3.87 ^c
1	1	84.04 ± 1.07 ^c
1	2	85.87 ± 4.19 ^{cd}
1	3	89.24 ± 2.85 ^{cd}
2	0	88.71 ± 2.35 ^{cd}
2	1	87.61 ± 3.42 ^{cd}
2	2	90.23 ± 2.39 ^{cd}
2	3	91.41 ± 2.45 ^{cd}
3	0	90.72 ± 2.60 ^{cd}
3	1	92.16 ± 1.37 ^d
3	2	92.54 ± 2.41 ^d
3	3	92.74 ± 2.23 ^d

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.19 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์
ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % TBA activity
ratio ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

ตัวอย่าง		
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	% TBA activity ratio
0	0	77.55 ± 8.90 ^{ab}
0	1	75.35 ± 11.61 ^a
0	2	74.49 ± 16.82 ^a
0	3	76.91 ± 9.21 ^{ab}
1	0	79.59 ± 7.18 ^{ab}
1	1	81.55 ± 6.08 ^{ab}
1	2	84.75 ± 5.59 ^{ab}
1	3	85.59 ± 6.92 ^{ab}
2	0	89.95 ± 3.95 ^b
2	1	86.79 ± 2.59 ^{ab}
2	2	84.35 ± 5.449 ^{ab}
2	3	88.92 ± 0.60 ^{ab}
3	0	90.92 ± 4.47 ^b
3	1	90.29 ± 1.46 ^b
3	2	90.12 ± 4.04 ^b
3	3	88.21 ± 2.90 ^{ab}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

*% TBA activity ratio ของ α -tocopherol 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ 80.73 ± 3.35
เปอร์เซ็นต์

*% TBA activity ratio ของ สารละลาย BHA เข้มข้น 10 ppm มีค่าเท่ากับ 80.49 ± 2.98
เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.20 อิทธิพลของปริมาณเอนไซม์ (Flavourzyme® 1000 L) 0, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์
ต่อน้ำหนักตัวอย่าง และ เวลาในการย่อย 0, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง ที่ส่งผลต่อค่า % ACE inhibition
ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

ตัวอย่าง		
ปริมาณเอนไซม์ (%)	เวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	% ACE inhibition
0	0	10.82 ± 5.48 ^a
0	1	40.84 ± 12.34 ^b
0	2	42.45 ± 19.75 ^b
0	3	58.09 ± 8.90 ^c
1	0	76.17 ± 7.12 ^{de}
1	1	83.89 ± 2.58 ^{def}
1	2	82.62 ± 5.73 ^{def}
1	3	77.66 ± 7.91 ^{def}
2	0	71.20 ± 12.44 ^{cd}
2	1	84.11 ± 2.74 ^{def}
2	2	83.92 ± 1.62 ^{def}
2	3	86.69 ± 2.35 ^{ef}
3	0	85.25 ± 4.65 ^{def}
3	1	89.52 ± 3.47 ^{ef}
3	2	92.59 ± 2.32 ^f
3	3	90.86 ± 0.66 ^{ef}

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

% ACE inhibition ของ Captopril® ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ มีค่าเท่ากับ

79.12 ± 4.33 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ ก.21 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท จากโครงปลากระพง ที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็น เวลา 2 ชั่วโมงเมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% DPPH radical scavenging
0	54.07 ± 2.05 ^d
15	39.27 ± 0.83 ^c
30	40.01 ± 0.42 ^c
45	28.68 ± 0.91 ^{ab}
60	39.65 ± 3.87 ^c
75	33.17 ± 0.43 ^b
90	26.74 ± 2.62 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.22 การเปลี่ยนแปลงของ % DPPH radical scavenging ของผงส่วนในของโครงปลา กระพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% DPPH radical scavenging
0	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
15	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
30	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
45	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
60	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
75	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

ตารางที่ ก.23 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% metal chelating activity
0	31.23 ± 7.64 ^c
15	11.98 ± 2.94 ^b
30	10.86 ± 1.81 ^b
45	2.78 ± 2.55 ^a
60	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
75	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.24 การเปลี่ยนแปลงของ % metal chelating activity ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเคี้ยว เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% metal chelating activity
0	23.69 ± 8.92 ^b
15	6.07 ± 0.45 ^a
30	3.89 ± 0.09 ^a
45	5.88 ± 1.39 ^a
60	4.11 ± 4.52 ^a
75	1.33 ± 0.94 ^a
90	ไม่สามารถวิเคราะห์ได้

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.25 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% TBA activity ratio
0	32.44 ± 1.62 ^{ab}
15	56.25 ± 1.40 ^c
30	41.92 ± 3.81 ^b
45	37.60 ± 9.96 ^b
60	32.89 ± 7.44 ^b
75	32.09 ± 1.75 ^{ab}
90	20.15 ± 5.27 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.26 การเปลี่ยนแปลงของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% TBA activity ratio
0	44.38 ± 3.08 ^{bc}
15	63.48 ± 3.26 ^d
30	50.00 ± 0.00 ^c
45	44.64 ± 2.52 ^{bc}
60	39.47 ± 7.44 ^{abc}
75	35.18 ± 4.36 ^{ab}
90	30.59 ± 9.50 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.27 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลา
กะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% ACE inhibition
0	76.51 ± 0.64 ^d
15	47.04 ± 2.68 ^c
30	48.03 ± 5.57 ^c
45	47.87 ± 6.82 ^c
60	36.17 ± 3.26 ^b
75	19.81 ± 3.08 ^a
90	20.93 ± 6.21 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ ก.28 การเปลี่ยนแปลงของ % ACE inhibition ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบด
เจือจาง เมื่อผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

ระยะเวลาในการเก็บรักษา(วัน)	% ACE inhibition
0	65.00 ± 3.21 ^d
15	49.01 ± 2.26 ^c
30	49.16 ± 6.75 ^c
45	46.43 ± 1.50 ^{bc}
60	37.14 ± 3.78 ^{ab}
75	28.42 ± 4.70 ^a
90	30.62 ± 5.30 ^a

a, b, c,... ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ภาคผนวก ข.
ตารางผลการวิเคราะห์ทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ ข.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ และ ระยะเวลาในการย่อยที่ระดับต่างๆ

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	5.398	1.799	25.846	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	0.876	0.292	4.195	0.013
AB	9	0.201	0.022	0.322	0.962
ERROR	32	0.258	0.070		

ตารางภาคผนวกที่ ข.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยสลายโปรตีน ในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	12110.561	4036.854	63.803	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	1962.402	654.134	10.339	0.000
AB	9	1760.936	195.660	3.092	0.009
ERROR	32	1961.400	63.271		

ตารางภาคผนวกที่ ข.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี DPPH

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	14483.757	4827.919	248.569	0.00
เวลาในการย่อย (B)	3	1301.880	433.960	22.343	0.00
AB	9	2013.485	223.721	11.518	0.00
ERROR	32	621.531	19.423		

ตารางภาคผนวกที่ ข.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี metal chelating activity

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	13362.335	4454.112	138.371	0.00
เวลาในการย่อย (B)	3	706.131	235.377	7.312	0.01
AB	9	458.878	50.986	1.584	0.162
ERROR	32	1030.072	32.190		

ตารางภาคผนวกที่ ข.5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิล เมื่อใช้วิธี TBA

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	14260.985	4753.662	56.567	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	1125.018	375.006	4.462	0.010
AB	9	1267.877	140.875	1.676	0.136
ERROR	32	2689.138	84.036		

ตารางภาคผนวกที่ ข.6 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิล

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	8075.018	2691.673	46.477	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	831.360	277.120	4.785	0.014
AB	9	485.298	53.922	0.931	0.525
ERROR	32	926.627	57.914		

ตารางภาคผนวกที่ ข.7 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1166.808	194.468	3.385	0.068
ERROR	7	402.185	57.455		
TOTAL	13	1568.993			

ตารางภาคผนวกที่ ข.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% metal chelating activityของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	517.459	86.243	5.307	0.023
ERROR	7	113.747	16.250		
TOTAL	13	631.207			

ตารางภาคผนวกที่ ข.9 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% TBA activity ratio ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	2918.995	486.499	16.140	0.001
ERROR	7	210.997	30.142		
TOTAL	13	3129.992			

ตารางภาคผนวกที่ ข.10 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% TBA activity ratio ของผงส่วนใต้ของโครงปลานิลบดเคี้ยว ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	471.317	78.553	5.806	0.018
ERROR	7	94.701	13.529		
TOTAL	13	566.018			

ตารางภาคผนวกที่ ข.11 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1565.127	260.854	13.853	0.001
ERROR	7	131.815	18.831		
TOTAL	13	1696.942			

ตารางภาคผนวกที่ ข.12 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ% ACE inhibition ของผงส่วนใสของ
โครงปลานิลบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	842.462	140.410	14.185	0.001
ERROR	7	69.290	9.899		
TOTAL	13	911.752			

ตารางภาคผนวกที่ ข.13 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน
โปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อย่อยสลายโดยใช้ปริมาณเอนไซม์ และ ระยะเวลาใน
การย่อยที่ระดับต่างๆ

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	12.363	4.121	19.246	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	0.973	0.324	1.515	0.229
AB	9	0.298	0.033	0.155	0.997
ERROR	32	6.852	0.214		

ตารางภาคผนวกที่ ข.14 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระดับการย่อยสลายโปรตีน ในโปรตีน
ไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	8499.035	2833.012	116.881	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	5087.832	1695.944	69.969	0.000
AB	9	1945.314	216.146	8.918	0.000
ERROR	32	775.627	24.238		

ตารางภาคผนวกที่ ข.15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี DPPH

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	1739.729	579.910	431.662	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	71.756	23.919	17.804	0.000
AB	9	34.615	3.846	2.863	0.14
ERROR	32	42.990	1.343		

ตารางภาคผนวกที่ ข.16 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี metal chelating activity

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	5634.412	1878.137	125.803	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	122.822	40.941	2.742	0.059
AB	9	95.712	10.635	0.712	0.694
ERROR	32	477.736	14.929		

ตารางภาคผนวกที่ ข.17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพง เมื่อใช้วิธี TBA

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	1307.353	435.784	8.210	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	17.775	5.925	0.112	0.953
AB	9	133.522	14.836	0.280	0.976
ERROR	32	1698.528	53.079		

ตารางภาคผนวกที่ ข.18 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของสมบัติในการเป็นสารยับยั้งการทำงานของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
ปริมาณเอนไซม์ (A)	3	19546.137	6515.379	104.388	0.000
เวลาในการย่อย (B)	3	2245.307	748.436	11.991	0.000
AB	9	1972.621	219.180	3.512	0.004
ERROR	32	1997.282	62.415		

ตารางภาคผนวกที่ ข.19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความสามารถในการขจัดอนุมูล DPPH ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1001.393	166.899	41.739	0.000
ERROR	7	27.991	3.999		
TOTAL	13	1029.383			

ตารางภาคผนวกที่ ข.20 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % metal chelating activity ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1566.058	261.010	23.778	0.000
ERROR	7	76.838	10.977		
TOTAL	13	1642.896			

ตารางภาคผนวกที่ ข.21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % metal chelating activity ของผง ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	769.317	128.219	8.703	0.006
ERROR	7	103.131	14.733		
TOTAL	13	872.448			

ตารางภาคผนวกที่ ข.22 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % TBA activity ratio ของผงโปรตีน ไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนัก ตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1742.495	245.416	9.527	0.004
ERROR	7	180.313	25.759		
TOTAL	13	1652.808			

ตารางภาคผนวกที่ ข.23 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % TBA activity ratio ของผงส่วนใส ของโครงปลากะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1388.192	231.365	8.474	0.006
ERROR	7	191.117	27.302		
TOTAL	13	1579.309			

ตารางภาคผนวกที่ ข.24 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % ACE inhibition ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	4514.152	752.359	36.604	0.000
ERROR	7	143.880	20.554		
TOTAL	13	4658.032			

ตารางภาคผนวกที่ ข.25 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของ % ACE inhibition ของผงส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ที่ผ่านการเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน

SOV	df	SS	MS	F	Sig.
เวลาในการเก็บ	6	1933.579	322.263	17.662	0.001
ERROR	7	127.723	18.246		
TOTAL	13	2061.303			

ภาคผนวก ค

วิธีวิเคราะห์ทางเคมี

ค.1 การวิเคราะห์ความชื้น (AOAC, 2000)

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

- ตู้อบ
- เดซิเคเตอร์
- ถ้วยอลูมิเนียม

2. วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยอลูมิเนียม พร้อมฝาในตู้อบ ที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ประมาณ 30 นาที ชั่งน้ำหนักที่คงที่ของถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝา จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ให้ได้ 5 กรัม ใส่ใน ถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝา นำเข้าไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 °C โดยไม่ต้องปิดฝาด้วยอลูมิเนียมเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด จึงปิดฝาด้วยอลูมิเนียม และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่ของตัวอย่างภายหลังการอบแห้ง

3. วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณความชื้น} = \frac{(W1 + S) - W2}{S} \times 100$$

เมื่อ W1 คือ น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียม พร้อมฝาหลังอบ หน่วยเป็นกรัม

W2 คือ น้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ หน่วยเป็นกรัม

S คือ น้ำหนักของถ้วยอลูมิเนียม พร้อมฝาและตัวอย่างหลังอบ หน่วยเป็นกรัม

ค.2 การวิเคราะห์โปรตีน (AOAC, 2000)

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

- เครื่องชั่ง ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
- เครื่องย่อยโปรตีน
- หลอดย่อยโปรตีน

- เครื่องดูดควันกรด
- เครื่องกลั่น
- Flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- Burette ขนาด 50 มิลลิลิตร

2. สารเคมี

- สารเร่งปฏิกิริยา (สารผสมของซีลีเนียม หรือ คอปเปอร์)
- สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น
- สารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์
- บอริกอินดิเคเตอร์ ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์

ละลายกรดบอริก 40 กรัม ในน้ำกลั่นต้มเดือด 800 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเติม โบรโมครีซอลกรีน 50 มิลลิลิตร (ละลาย โบรโมครีซอลกรีน 0.05 กรัม ใน เอทานอล 50 มิลลิลิตร) และ เมทิลเรด 35 มิลลิลิตร (ละลาย เมทิลเรด 0.05 กรัม ใน เอทานอล 50 มิลลิลิตร) ปรับปริมาตรสารละลายทั้งหมดเป็น 1000 มิลลิลิตร กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 10 นาที

- สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มอล

3. วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน 1 กรัม ใส่ลงในหลอดกลั่น เติมสารเร่งปฏิกิริยา 7 กรัม และ สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 15 มิลลิลิตร จากนั้นต่อหลอดกลั่นเข้ากับชุดเครื่องย่อยโปรตีน ทำการย่อยที่ความร้อนระดับ 8 เป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายสีน้ำตาลใส ทิ้งไว้ให้เย็นและไม่มีไอกรดหลงเหลืออยู่ จากนั้นต่อหลอดย่อยเข้ากับชุดเครื่องกลั่นโดยเติมบอริกอินดิเคเตอร์ 25 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อรองรับสิ่งที่กลั่นได้ ตั้งค่าชุดเครื่องกลั่น โดยใช้ปริมาณสารละลายไฮเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์ 75 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 นาที นำสิ่งที่กลั่นได้ มาไทเทรตกับ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเทาที่จุดยุติ

4. วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณโปรตีน} = \frac{C \times \text{ปริมาตรกรดไฮโดรคลอริก (มิลลิลิตร)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ C คือ ความเข้มข้นของกรดไฮโดรคลอริก (นอร์มอล) $\times 1.4 \times 6.25$

ค.3 การวิเคราะห์ไขมัน โดยการสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ (AOAC, 2000)

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

- Soxhlet system
- thimble
- ขวดกั่นกลม
- ตู้อบ 105 °C

2. สารเคมี

- ตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์

3. วิธีการวิเคราะห์

ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของตัวอย่างอบแห้ง 5 กรัม ใส่ thimble (โดยตัวอย่างนี้เป็นตัวอย่างที่ผ่านการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) แล้วนำ thimble นี้ใส่ใน extraction unit จากนั้นชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของขวดกั่นกลม และเติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ลงในขวดกั่นกลม ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ต่อขวดกั่นกลมเข้ากับ extraction unit และให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับ 3 ของเตาให้ความร้อน ทำการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จึงระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหย และ นำขวดกั่นกลมนี้ไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C นาน 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของขวด

4. วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณไขมัน} = \frac{(W3 - W2)}{W1} \times 100$$

เมื่อ W1 คือ น้ำหนักตัวอย่าง หน่วยเป็นกรัม

W2 คือ น้ำหนักขวดก้นกลม หน่วยเป็นกรัม

W3 คือ น้ำหนักขวดก้นกลม และ ไขมันที่ได้จากการสกัด หน่วยเป็นกรัม

ค.4 การวิเคราะห์เถ้า (AOAC, 2000)

1. เครื่องมือ และอุปกรณ์

- ถ้วยครุชีเบิล
- เตาเผา อุณหภูมิ 550 °C
- ตู้อบ 105 °C
- คีมคีบครุชีเบิล
- เครื่องชั่งน้ำหนัก ความละเอียด 0.1 มิลลิกรัม
- เดซิเคเตอร์

2. วิธีการวิเคราะห์

อบถ้วยครุชีเบิลที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์เป็นเวลา 30 นาที แล้วชั่งน้ำหนักที่คงที่ของครุชีเบิล จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน 2 กรัม ใส่ลงในถ้วยครุชีเบิล และเผาตัวอย่างพร้อมถ้วยครุชีเบิลบนเตาให้ความร้อนจนกระทั่งหมดควัน และนำเข้าไปเผาต่อในเตาเผาที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง (หากเผาไหม้ไม่สมบูรณ์อาจต้องเพิ่มเวลาให้มากขึ้น) ตั้งทิ้งไว้ในตู้อบอุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งน้ำหนักที่คงที่อีกครั้งหนึ่ง

3. วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละของปริมาณเก่า} = \frac{(W1 - W2)}{S} \times 100$$

S

เมื่อ

W1 คือ น้ำหนักถ้วยครุชชีเบล และ ตัวอย่าง (ก่อนเผา) หน่วยเป็นกรัม

W2 คือ น้ำหนักถ้วยครุชชีเบล และ ตัวอย่าง (หลังเผา) หน่วยเป็นกรัม

S คือ น้ำหนักตัวอย่าง (ก่อนเผา) หน่วยเป็นกรัม

ค.5 การวิเคราะห์ชนิด และปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซท

(In house method based on Journal of Chromatography A (2002). 961: 9-21)

ค.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน tryptophan

ซึ่งตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทหนัก 0.5 – 5 กรัม ย่อยด้วยสารละลาย Ba(OH)₂ อิ่มตัว ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไประเหยแห้ง และละลายกลับด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย OPA และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ด้วยเทคนิค HPLC ใช้ detector แบบ fluorescence Ex: 340 Em : 455

ค.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน proline

ซึ่งตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทหนัก 0.5 – 5 กรัม ย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไประเหยแห้ง และละลายกลับด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC-Cl) และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน proline ด้วยเทคนิค HPLC ใช้ detector แบบ fluorescence Ex: 270 Em : 316

ค.5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนที่เหลือ

ซึ่งตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทหนัก 0.5 – 5 กรัม ย่อยด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 110°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไประเหยแห้ง และละลายกลับ

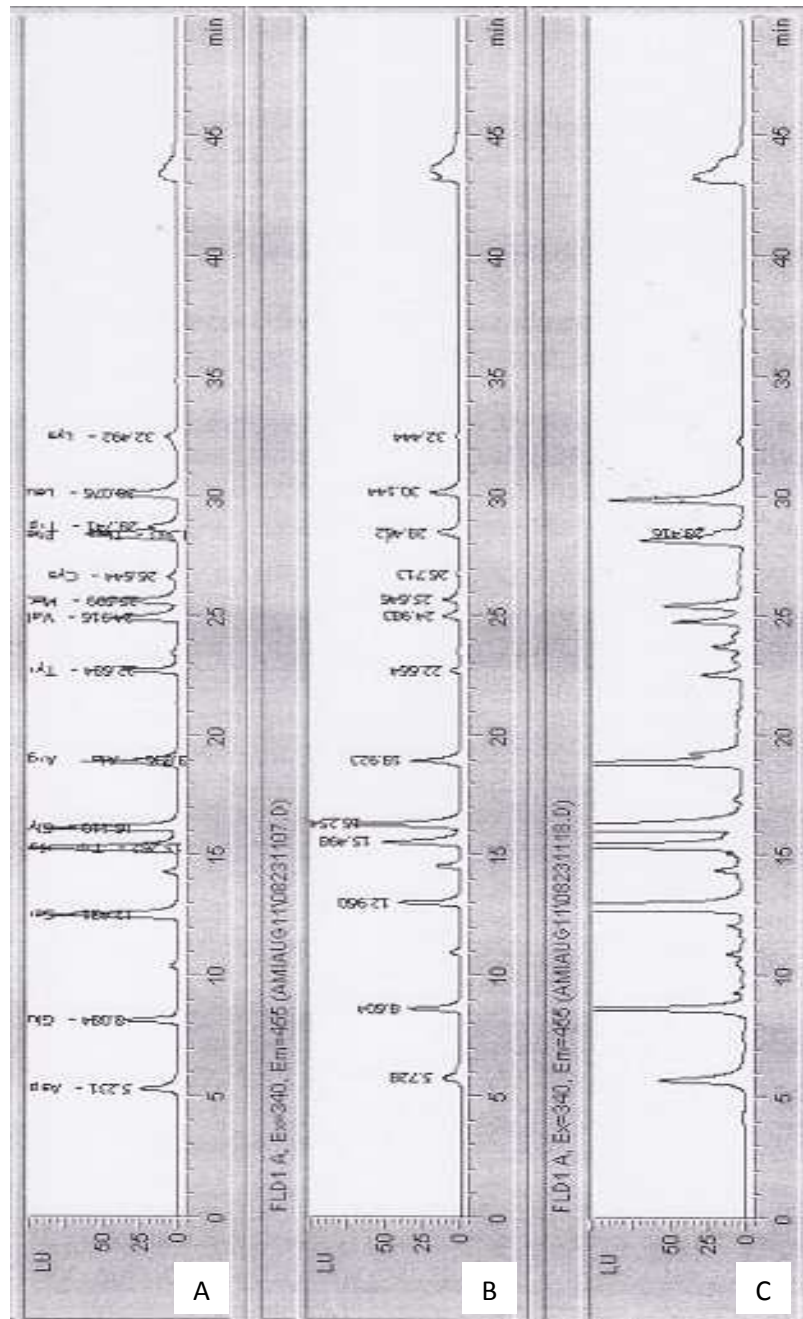
ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย OPA และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน tryptophan ด้วยเทคนิค HPLC ใช้ detector แบบ fluorescence Ex: 340 Em : 455

ค.6 การวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเทคนิค MALDI-tof (Boontha และคณะ, 2008)

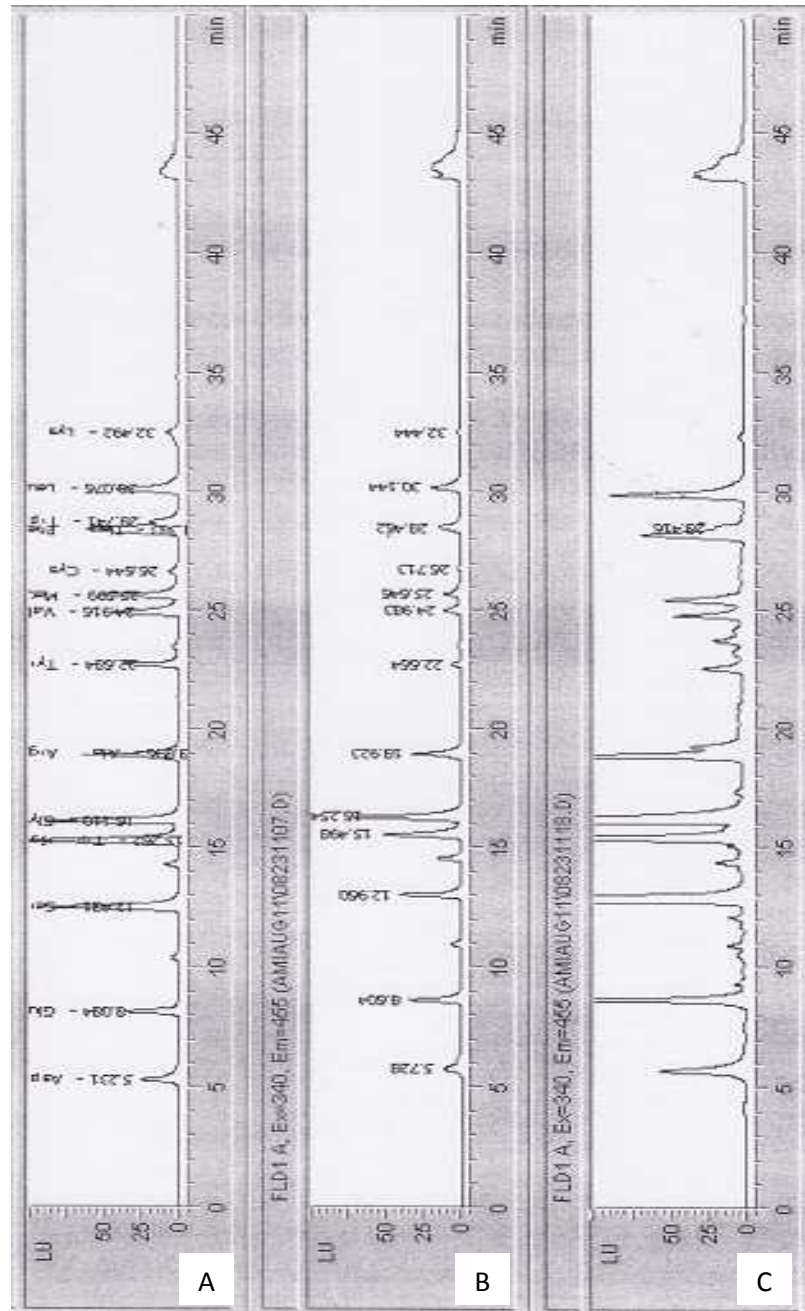
วิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซต ด้วย Microflex MALDI-TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics) โดยผสมตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้ากับสารละลาย matrix (ซึ่งสารละลาย matrix ประกอบด้วย α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CCA) ใน TFA เข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย acetonitrile / น้ำ (ในอัตราส่วน 1:2)) 10 ไมโครลิตร จากนั้นหยดสารผสมของตัวอย่าง และ matrix ปริมาณ 1 ไมโครลิตร ลงบน target รอจนแห้ง แล้ววิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์โดยใช้ระบบตรวจวัดแบบ positive ion linear time – of – flight ที่ความต่างศักย์ 20 kV

ภาคผนวก ง.

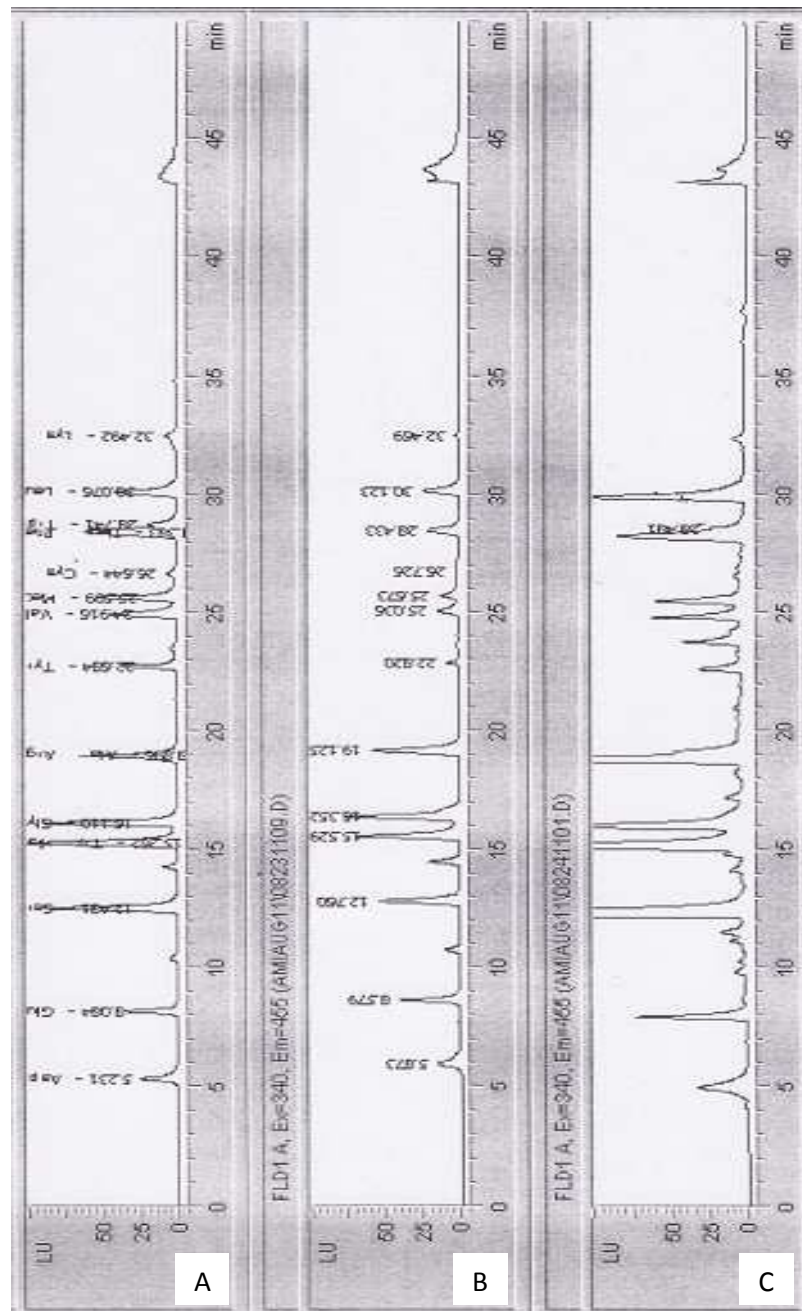
โครมาโตแกรมแสดงผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนอิสระ



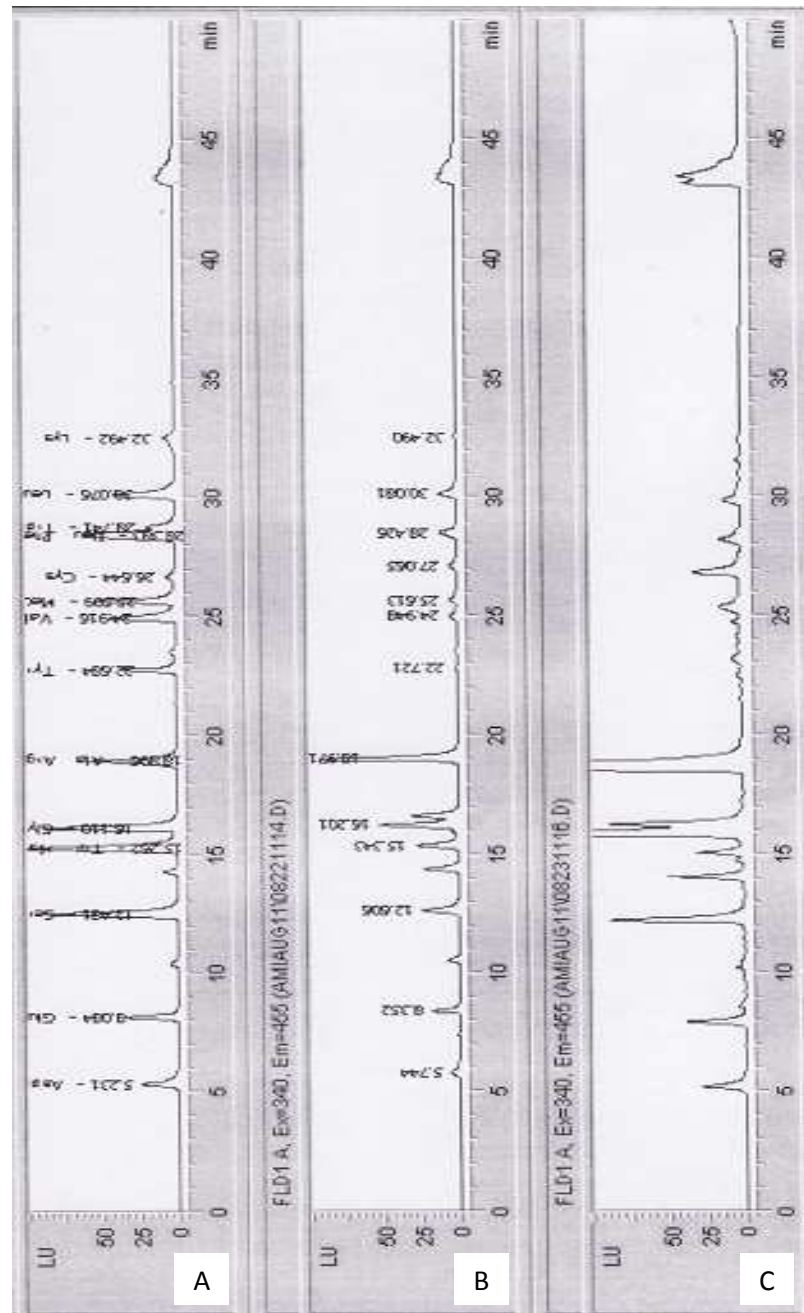
รูปภาคผนวกที่ ง.1 โครมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลานิด สภาวะที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน (A)



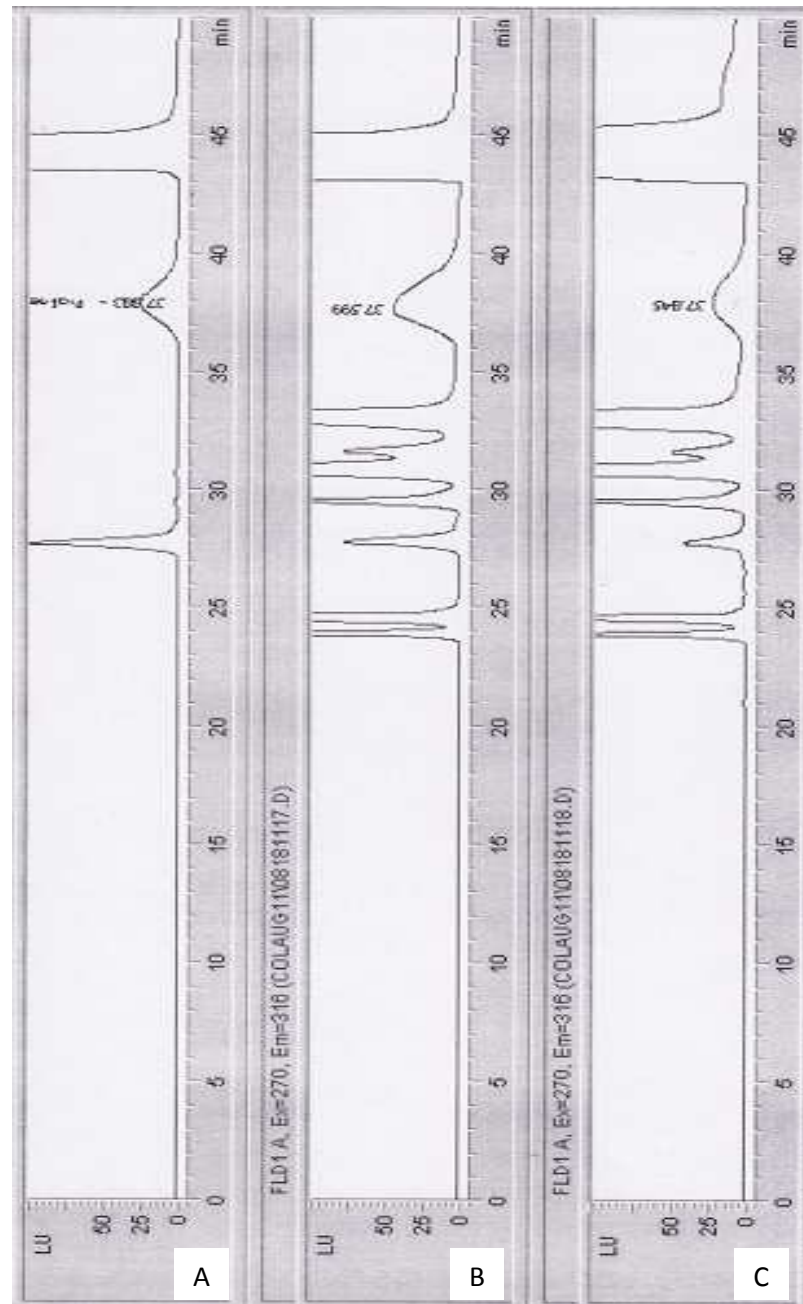
รูปภาคผนวกที่ ง.2 โครมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโครงปลานิลบดเจือจาง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน (A)



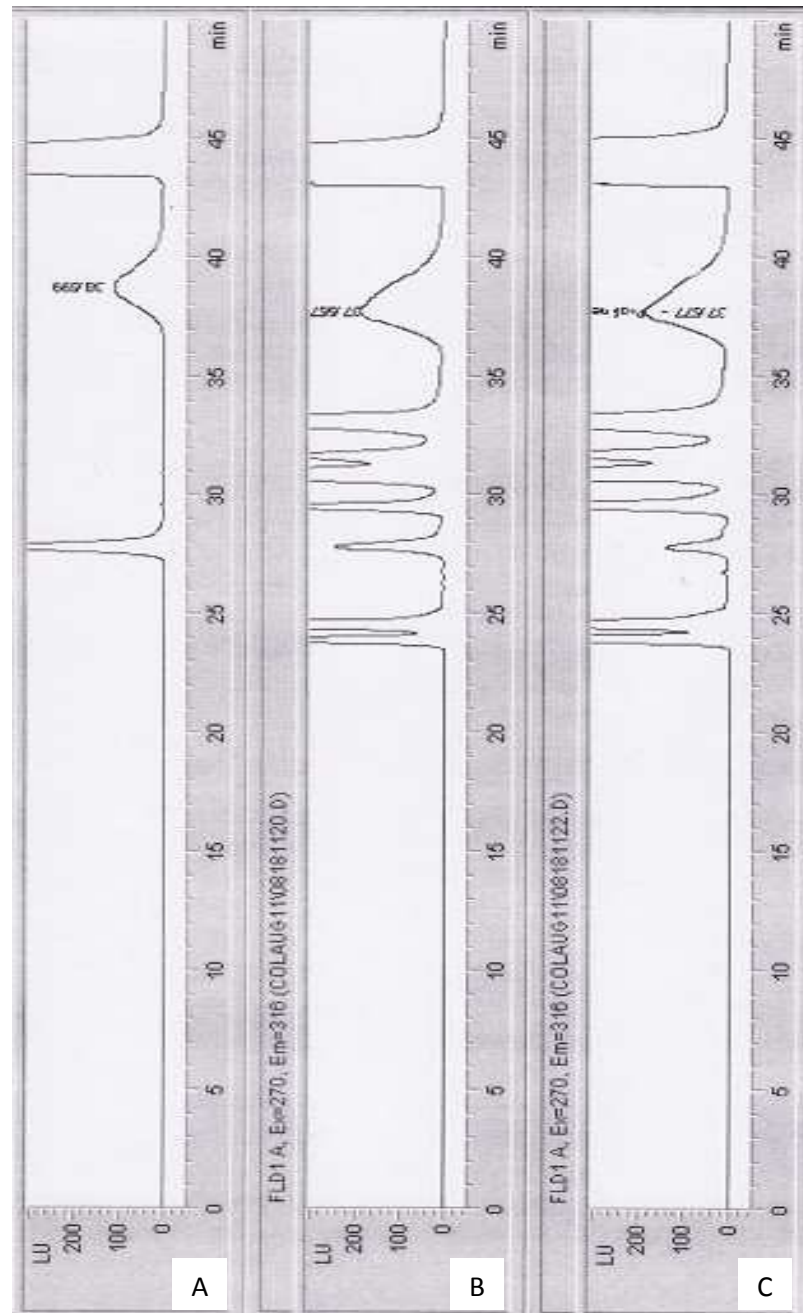
รูปภาคผนวกที่ ง.3 โครมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพง สภาวะ 3,2 (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดอะมิโนมาตรฐาน (A)



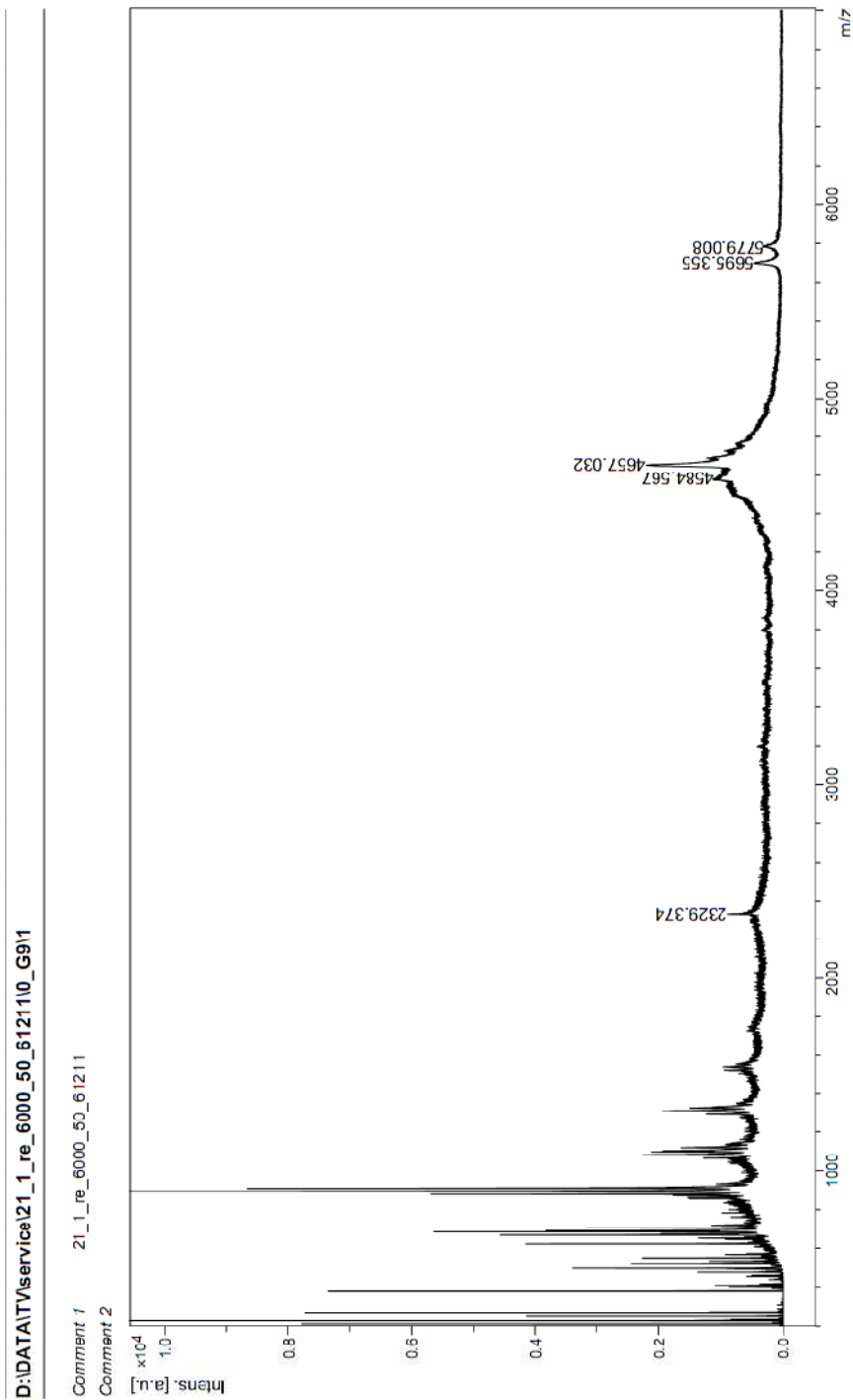
รูปภาคผนวกที่ ง.4 โครมาโตแกรมแสดงชนิดและปริมาณกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในโครง
 ปลากะพงบดเจือจาง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดอะมิโน
 มาตรฐาน (A)



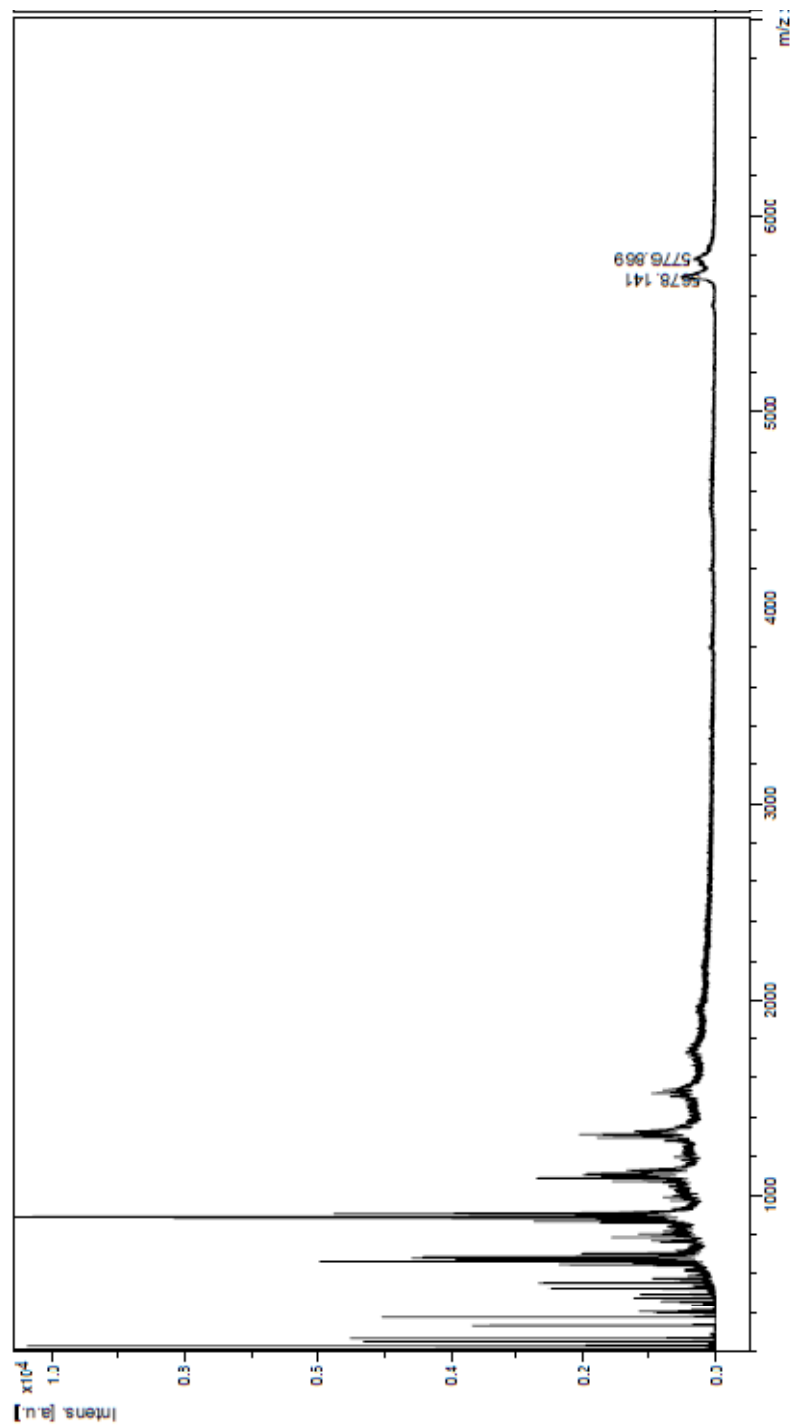
รูปภาคผนวกที่ ง.5 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณกรดอะมิโน proline ที่เป็นองค์ประกอบ
 โครงปลานิลบดเฉื่อย และโครงปลากะพงบดเฉื่อย (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับ
 โครมาโตแกรมของกรดอะมิโน proline มาตรฐาน (A)



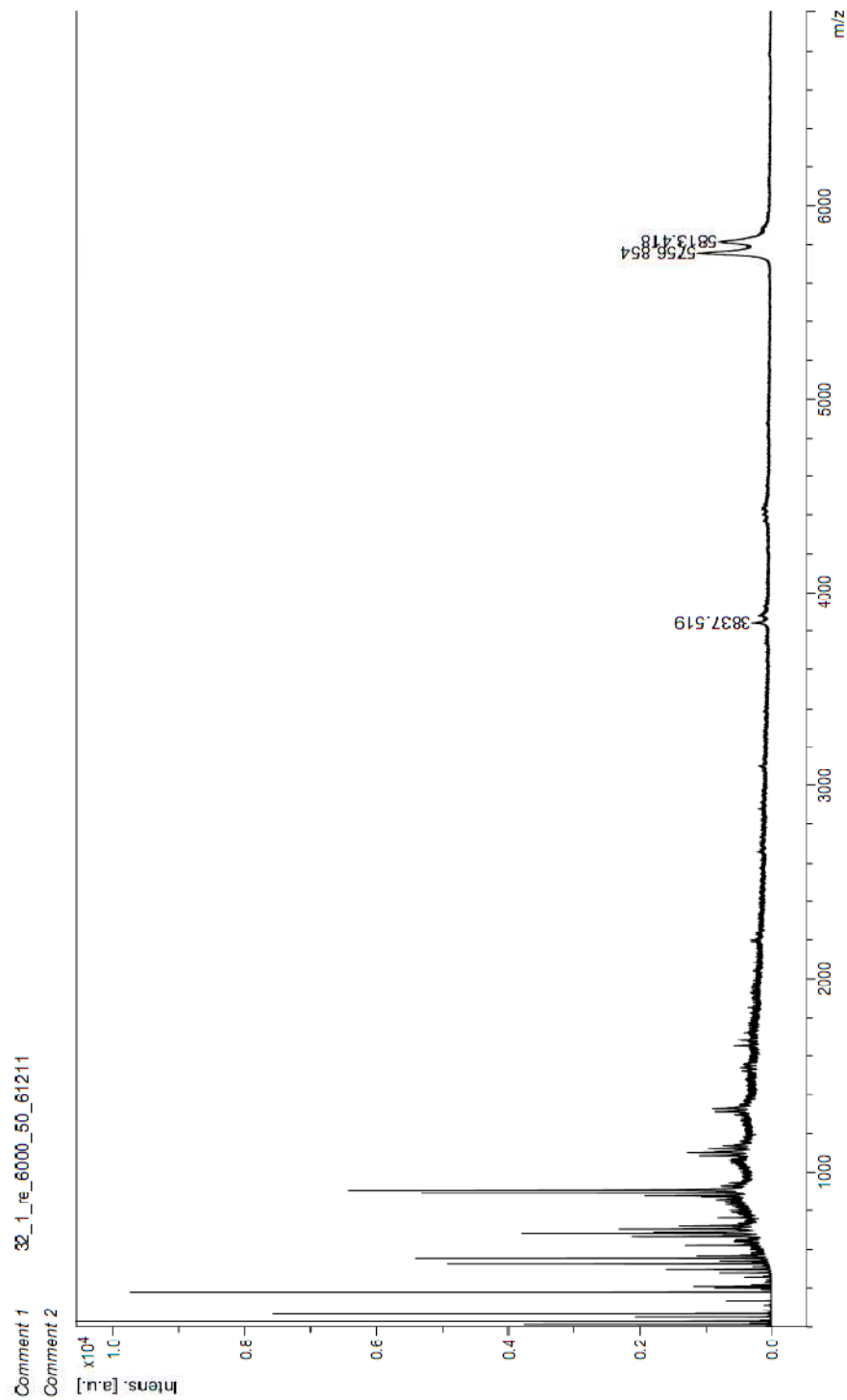
รูปภาคผนวกที่ ง.6 โครมาโตแกรมแสดงปริมาณกรดอะมิโน proline ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และ ในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (B และ C ตามลำดับ) โดยเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของกรดอะมิโน proline มาตรฐาน (A)



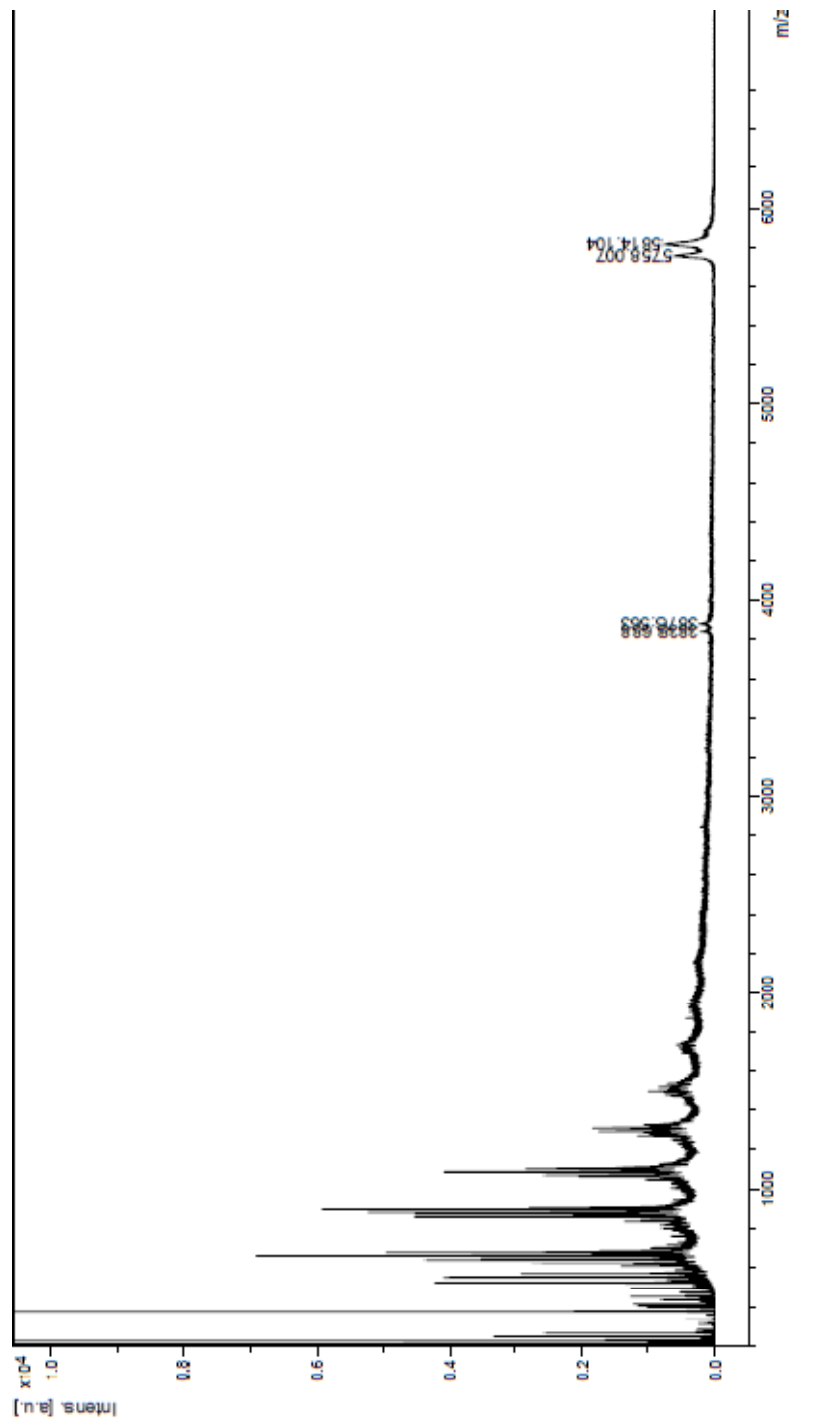
รูปภาคผนวกที่ 7.7 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซตจากโครงปลานิลที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da



รูปภาคผนวกที่ 8.8 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบใน ส่วนใสของโครงปลานิลบดเจือจาง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da



รูปภาคผนวกที่ 9.9 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากโครงปลากะพงที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ปริมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัวอย่าง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da



รูปภาคผนวกที่ ง.10 mass spectrum แสดงการวิเคราะห์ขนาดของเปปไทด์ที่เป็นองค์ประกอบใน ส่วนใสของโครงปลากะพงบดเจือจาง ทำการวิเคราะห์โดยเปลี่ยนช่วงของขนาดของเปปไทด์ที่ ต้องการวิเคราะห์เป็น 1000 - 6000 Da

ภาคผนวก จ

องค์ประกอบทางเคมีที่พบในเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L

ตารางภาคผนวกที่ จ.1 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในเอนไซม์ Flavourzyme® 1000 L

องค์ประกอบ	ปริมาณ (% w /w)โดยน้ำหนักแห้ง
น้ำ	43
ซูโครส	30
อะมิโนเปปทิเดส	17
โพแทสเซียมคลอไรด์	10
โพแทสเซียมซอร์เบท	0.20

ที่มา : บริษัท Brenntag Ingredients (Thailand) Public Co.,Ltd.

ภาคผนวก ฉ

ตารางค่าคงที่ α , β และ h_{tot} ของวัตถุดิบโปรตีนชนิดต่างๆ

Protein	α	β	h tot
Soy	0.970	0.342	7.8
Gluten*	1.00	0.40	8.3
Casein	1.039	0.383	8.2
Whey*	1.00	0.40	8.8
Gelatin	0.796	0.457	11.1
Meat*	1.00	0.40	7.6
Fish*	1.00	0.40	8.6

* When raw material has not been examined, then α and β are estimated to be 1.00 and 0.40, respectively.

ที่มา : Nielsen, Peterson และ Dambmann, 2001

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวปิยะนันท์ ชี้อเสียง เกิดวันที่ 18 สิงหาคม พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดเพชรบุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2552 และ เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ. 2552