



**โครงการวิจัยที่ 3** การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่ผ่านการแยก  
น้ำมันออกเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

หัวหน้าโครงการ: อนันต์ ทองทา

ผู้ร่วมงานวิจัย: เยวภา ไหวพริบ

## การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออก เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

อนันต์ ทองทา<sup>1</sup> และ เยาวภา ไหวพริบ<sup>2</sup>

<sup>1</sup> สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี พระจอมเกล้าธนบุรี บางขุนเทียน กรุงเทพฯ

<sup>2</sup> ภาควิชา ผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จตุจักร กรุงเทพฯ

### บทคัดย่อ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องของปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออกแล้วมีความจำเป็น เนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเตรียมหลายปัจจัยมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท เช่น สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) งานวิจัยนี้ พบว่าผลผลิตเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก คิดเป็นร้อยละ  $11.53 \pm 1.33$  มีองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เกล็ด และความชื้น เป็นร้อยละ  $51.79 \pm 2.10$   $7.46 \pm 0.25$   $2.12 \pm 0.24$  และ  $25.66 \pm 1.41$  ตามลำดับ ต่อมาพบว่าชนิดเอนไซม์ มีผลต่อระดับการย่อยสลายแตกต่างกัน ( $p < 0.05$ ) การใช้เอนไซม์ Flavourzyme Alcalase Protamex และ Neutrase ให้ค่าระดับการย่อยสลายที่ประมาณร้อยละ 70 60 35 และ 20 ที่เวลาการย่อยสลาย 5 ชั่วโมง ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงเลือกเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Alcalase Flavourzyme และ Protamex เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน คือการใช้เอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากให้ระดับการย่อยสลาย ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ %FRAP decrease สูงสุด ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท  $< 5$  kDa และ  $> 10$  kDa ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE สูงสุด (ร้อยละ  $84.98 \pm 9.72$  และ  $80.47 \pm 13.05$  ตามลำดับ) ( $p < 0.05$ ) ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนพบว่า มีกรดกลูตามิกเป็นกรดอะมิโนหลัก ตามด้วยกรดแอสปาทิก ปริมาณ 11,083.61 และ 6,670.98 มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน ตามลำดับ

**คำสำคัญ:** โปรตีนไฮโดรไลเซทปลา ผลพลอยได้จากแชลมอน สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ การยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE)

## Production of protein hydrolysate from defatted Salmon belly by-product as a dietary supplement

Anan Tongta<sup>1</sup> and Yaowapha Waiprib<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biotechnology, School of Bioresource and Technology, King Mongkut's University of Technology Thonburi Bangkhuntien, Bangkok.

<sup>2</sup> Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Chatuchak, Bangkok.

### Abstract

Optimal condition for protein hydrolysates production from defatted salmon belly by-product were considered necessary as a result of the functional properties of the final protein hydrolysate products, such as antioxidant properties, and angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity, were affected by the preparation conditions. The preparation of defatted salmon belly by-product meal resulted in  $11.53 \pm 1.33$  % yield with protein, fat, ash and moisture contents of  $51.79 \pm 2.10\%$ ,  $7.46 \pm 0.25\%$ ,  $2.12 \pm 0.24\%$  and  $25.66 \pm 1.41\%$  respectively. Subsequently, the degree of hydrolysis of protein hydrolysates was found to be affected by the type of enzyme being used. The degree of hydrolysis by Flavourzyme, Alcalase, Protamex, and Neutrase were 70%, 60%, 35% and 20% approximately at 5 hour of hydrolysis. Therefore, 3 types of enzymes; that is, Alcalase, Flavourzyme and Protamex were carried out for next step. The optimal condition for the production of protein hydrolysates from defatted salmon belly by product was the use of Flavourzyme at the concentration of 1.5% for 2 hours as a result of the highest degree of hydrolysis, the highest % DPPH radical inhibition and the highest % FRAP decrease achieved ( $p < 0.05$ ). The result also demonstrated that the protein hydrolysate with molecular weight  $< 5$  kDa and  $> 10$  kDa exhibited the highest ACE inhibitory activities ( $84.98 \pm 9.72\%$  and  $80.47 \pm 13.05\%$ , respectively) ( $p < 0.05$ ). The amino acid profile data revealed that the protein hydrolysate mainly composed of glutamic acid, followed by aspartic acid at the contents of 11,083.61, and 6,670.98 mg/100 g protein respectively.

**Keywords:** fish protein hydrolysate; salmon by-product; antioxidant property; angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory activity

## บทนำ

กระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ประมงก่อให้เกิดผลพลอยได้ (by product) หรือเศษเหลือได้ถึง 50-60% (He, *et al.*, 2013; Chalamaiyah, *et al.*, 2012) ซึ่งส่วนใหญ่จะนำไปผลิตเป็นอาหารสำหรับสัตว์ อุตสาหกรรมการผลิตปลาแชลมอนแช่เยือกแข็งมีเศษเหลือส่วนท้อง (bellies) ที่มีไขมันสูง สามารถนำไปแยกน้ำมันเพื่อผลิตน้ำมันปลาได้ พบว่าเศษเหลือจากการแยกน้ำมัน ได้แก่ เนื้อปลา สารละลายโปรตีนและน้ำคาวปลา สามารถนำไปใช้เป็นตัวกระตุ้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตได้เพื่อเพิ่มมูลค่าและใช้ประโยชน์จากเศษเหลือให้มากที่สุด

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลาได้รับความสนใจมากเนื่องมาจากความพร้อมของปริมาณของวัตถุดิบ โดยเฉพาะวัตถุดิบจากผลพลอยได้กระบวนการแปรรูป เป็นแหล่งโปรตีนที่มีความสมดุลของกรดอะมิโนที่ดีและการเป็นเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptides) (Chalamaiyah, *et al.*, 2012) โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยโปรตีนบริเวณพันธะเปปไทด์ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของโปรตีน บางประการ เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดอิมัลชัน (emulsification property) สมบัติการเกิดโฟม (foaming property) และสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เป็นต้น โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ (feed supplement) การใช้เป็นตัวกระตุ้นอาหาร เช่น foaming agent emulsifying agent รวมทั้งการใช้เป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริม เช่น ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมโปรตีนที่ดูดซึมเร็ว นอกจากนี้พบว่าสมบัติการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Klompong, *et al.*, 2008; Samaranayaka, and Li-Chan, 2011; Khantaphant, Benjakul, and Kishimura, 2011; Ahn, *et al.*, 2012a) และสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก (Klompong, *et al.*, 2007; Thiansilakul, Benjakul, and Shahidi, 2007a; Thiansilakul, Benjakul, and Shahidi, 2007b; Khantaphant, and Benjakul, 2008; Phanturat, *et al.*, 2010; Khantaphant, *et al.*, 2011; Ahn *et al.*, 2012b) การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยทั่วไปมี 2 วิธีคือ การใช้สารเคมีและการใช้เอนไซม์ โดยวิธีการใช้สารเคมีเป็นปฏิกิริยาที่ค่อนข้างรุนแรง ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ ส่วนการผลิตด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจง ได้ผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมได้ง่าย (He, *et al.*, 2013) โดยมีการใช้เอนไซม์ทั้งที่เตรียมจากส่วนของเครื่องในของปลานี้ๆ และเอนไซม์ทางการค้า อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซต (Je, *et al.*, 2009; Klompong, *et al.*, 2007; Ovissipour, *et al.*, 2009; Bhaskar, *et al.*, 2008) รวมทั้งชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตซึ่งมีรายงานการเตรียมจากผลพลอยได้การแปรรูปปลา เช่น หนัง หัว กระดูก โครง ครีบอก อวัยวะภายใน ตับ ไข่ปลา และส่วน

เนื้อที่ได้จากการตัดแต่ง เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อสมบัติการใช้งานของโปรตีนไฮโดรไลเซททั้งสิ้น (Ahn, *et al.*, 2010; Wiryaphan, *et al.*, 2012; Ahn, *et al.*, 2012a; Chalamaiah, *et al.*, 2012; Galla, *et al.*, 2012a; Galla, *et al.*, 2012b) ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจึงมีความจำเป็นเมื่อมีการเตรียมในวัตถุดิบชนิดหรือแหล่งใหม่ เช่นการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องของปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออกแล้วซึ่งยังไม่พบรายงานการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากส่วนนี้ของปลาแชลมอน

งานวิจัยนี้สนใจศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องของปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออกเพื่อผลิตนำไปผลิตเป็นน้ำมันปลา โดยส่วนท้องปลาแชลมอนสำหรับงานวิจัยนี้ได้จากกระบวนการผลิตปลาแชลมอนแช่เยือกแข็ง ของโรงงานแปรรูปแช่เยือกแข็ง จังหวัดสมุทรสาคร มาแยกน้ำมันออกก่อนนำเศษเหลือมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นเอนไซม์ เวลาในการย่อยสลาย ชนิดของเอนไซม์ และขนาดของโปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นต้น ต่อสมบัติการใช้งาน ได้แก่ สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทดังกล่าว

### วัตถุประสงค์

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องของปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออก

## การทบทวนวรรณกรรม

### 1. โปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเซตเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยเพปไทด์ (peptide) และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยโปรตีนบริเวณพันธะเพปไทด์ด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของโปรตีน บางประการ เช่น สมบัติการละลาย สมบัติการเกิดอิมัลชัน (emulsification property) สมบัติการเกิดโฟม (foaming property) และสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) เป็นต้น

### 2. ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ได้แก่ วัตถุดิบ และกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลา

#### 2.1. วัตถุดิบ

แหล่งที่มาของวัตถุดิบจากปลา ได้แก่ ปลาทั้งตัว ชิ้นเนื้อปลา (fillet) กล้ามเนื้อปลา (muscle) หนังปลา โครง (frame) กระดูกอ่อน (cartilage) และอวัยวะภายใน เช่นตับ เครื่องใน หัว และไส้ และผลพลอยได้ (by-product) จากกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารทะเล เช่น น้ำนึ่ง กระบวนการแปรรูปปลาทูน่า แสดงได้ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แหล่งที่มาของวัตถุดิบและเอนไซม์/สารเคมีที่ใช้สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลา

แหล่งที่มา	ชนิดของปลา	เอนไซม์/สารเคมี	เอกสารอ้างอิง
ปลาทั้งตัว	Capelin	Alcalase	Amarowicz and shahidi (1997)
	Blue mussel ( <i>Mytilus edulis</i> )	25%(w/w) NaCl, 6 เดือน	Rajapakse, <i>et al.</i> (2005a)
	Blue mussel ( <i>Mytilus edulis</i> )	In vitro gastrointestinal digestion	Jung, <i>et al.</i> (2007)
	Oyster ( <i>Crassostrea talienwhannensis</i> )	Papain, Neutrase, Alcalase	Dong, <i>et al.</i> (2010)
	ปลาสีกุนข้างเหลือง (yellow stripe trevally, <i>Selaroides leptolepis</i> )	Flavourzyme	Klompong, <i>et al.</i> (2007)
ชิ้นเนื้อ (fillet)	Mackerel ( <i>Scomber austriasicus</i> )	autolysis, ProteaseN	Wu, <i>et al.</i> (2003)

แหล่งที่มา	ชนิดของปลา	เอนไซม์/สารเคมี	เอกสารอ้างอิง
	Pacific hake ( <i>Merluccius productus</i> )	autolysis	Samaranayaka and Li-Chan (2011)
กล้ามเนื้อ (muscle)	Salmon	pyloric caeca, Alcalase 2.4L, Flavourzyme 1000L, Corolase PN-L and 7089)	Kristinsson, and Rasco (2000)
	กะพงแดงข้างแฉวง brownstripe red snapper ( <i>Lutjanus vitta</i> )	2 step hydrolysis: Alcalase, Flavourzyme และ pyloric caeca protease (PCP)	Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011); Khantaphant, Benjakul, and Ghomi (2011)
	ทรายแดงโม่ง ornate threadfin bream ( <i>Nemipterus hexodon</i> )	skipjack tuna pepsin	Nalinanon, <i>et al.</i> (2011)
	Jiant squid ( <i>Docidicus gigas</i> )	Trysin, Chymotrysin, pepsin	Rajakakse, <i>et al.</i> (2005b)
	ปลาไหลทะเล Conger eel ( <i>Conger myriaster</i> )	Trypsin	Ranathunga, <i>et al.</i> (2006)
	ทูแขกหางเหลือง Round scad ( <i>Decapterus maruadsi</i> )	Alcalase, Flavourzyme	Thiansilakul, Benjakul, and Shahidi (2007a); Thiansilakul, Benjakul, and Shahidi (2007b)
	Grass Carp	Papain, Bovine pancreatin6.0, Bromelain, Neutrase, Alcalase	Ren, <i>et al.</i> (2008)
Dark muscle	Tuna ( <i>Thunnus obesus</i> )	Orientase, ProteaseXXIII	Hsu, <i>et al.</i> (2010)
โครง(frame)	Yellowfin sole ( <i>Limanda aspera</i> )	Pepsin, intestine crude enzyme	Jun, <i>et al.</i> (2004)

แหล่งที่มา	ชนิดของปลา	เอนไซม์/สารเคมี	เอกสารอ้างอิง
	Hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	Papain, pepsin, trypsin, chymotrypsin	Je, et al. (2005a)
	Hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	Pepsin, Alcalase, chymotrysin, Neutrase, papain, trypsin	Kim, et al. (2007)
	Alaska Pollack ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Mackerel intestine crude enzyme	Je, park, and Kim (2005)
หนังปลา	Alaska Pollack ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Alcalase, PronaseE, collagenase	Kim, et al.(2001)
	Alaska Pollack ( <i>Theragra chalcogramma</i> )	Neutrase, Flavourzyme, Alcalase, Protamex	Jia, et al.(2010)
	Jumbo squid ( <i>Docidicus gigas</i> )	Trysin, Chymotrysin, pepsin	Mendis, et al.(2005a)
	Hoki ( <i>Johnius belengerii</i> )	Trysin, Chymotrysin, pepsin	Mendis, et al.(2005b)
กระดูกอ่อน. (cartilage) และหนัง	Chum salmon ( <i>Oncorhynchus keta</i> )	ต้ม 1 ชั่วโมงภายใต้ความดัน	Nagai, et al.(2006)
เครื่องใน	ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ ( <i>Katsuwonus pelamis</i> ).	Alcalase/Flavourzyme	ศกุนตลา พร้อมมูล เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และ สุทธวัฒน์ เบญจกุล (2552)
ตับ	Tuna( <i>Thunnus obesus</i> )	2 step hydrolysis: Alcalase/Flavourzyme, Neutrase/Flavourzyme, และProtamex /Flavourzyme	Ahn, et al. (2010)
หัวและไส้	ปลาทรายแดง	อัลคาเลสตรังรูป	วราภรณ์ สุทธิวิชัยพร สายพิน ทานัชฌาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ (2551)

แหล่งที่มา	ชนิดของปลา	เอนไซม์/สารเคมี	เอกสารอ้างอิง
processing by-product	silver carp ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	Alcalase , Flavourzyme , Neutralse , Papain , Pepsin, Protamex , Trypsin	Zhong, <i>et al.</i> (2011)
น้ำนึ่งปลา (cooking juice)	Tuna	ProteaseXXIII	Jao and Ko (2002)
	Tuna	orientase	Hsu, Lu, and Jao (2009)
Press juice	Herring ( <i>Clupea harengus</i> )	Simulated Gastrointestine digestion	Sannaveerappa, <i>et al.</i> (2007)
protein	ปลาหมอเทศ Tilapia ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	CryotinF, ProteaseA, Amano2, ProteaseN, Amano, Flavourzyme, Neutralse	Raghavan, <i>et al.</i> (2008)
Protein waste	Algae (Chlorella)	pepsin	Sheih, <i>et.al.</i> (2009)
Roe protein concentrate	<i>Channa striatus</i> and <i>Lates calcarifer</i>	Alcalase	Galla, <i>et al.</i> (2012a)
Roe protein concentrate	<i>Channa striatus</i> and <i>Labeo rohita</i>	Alcalase	Galla, <i>et al.</i> (2012b)

## 2.2. กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากปลา

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยทั่วไปมี 2 วิธี ใหญ่ๆ คือ การใช้สารเคมีและการใช้เอนไซม์ โดยวิธีการใช้สารเคมี ได้แก่กรดไฮโดรคลอริก หรือด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นปฏิกิริยาที่ค่อนข้างรุนแรง ยากต่อการควบคุมการย่อยสลาย ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่คงที่ ส่วนการผลิตด้วยเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจง ได้ผลิตภัณฑ์ที่ควบคุมได้ง่าย โดยมีการใช้เอนไซม์ทั้งที่เตรียมจากส่วนของเครื่องในของปลานั้นๆ และเอนไซม์ทางการค้า นอกจากนี้พบว่ามีการใช้เอนไซม์ตรึงรูป (immobilized enzyme) ด้วย แสดงได้ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้พบว่ามีการศึกษาการใช้สารเคมี ร่วมกับการใช้เอนไซม์ (ขวัญฤดี วชิรัตน์พงษ์เมธี ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และจิราวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 2551; Zhong, *et al.*, 2011) เพื่อลดระยะเวลาและปริมาณเอนไซม์ที่ใช้

โปรตีนไฮโดรไลเซทยังสามารถผลิตได้จากการย่อยด้วยตัวของมันเอง (autolysis) หรือกระบวนการหมัก (fermentation) แต่ต้องอาศัยเวลาค่อนข้างนาน หรืออาจใช้การต้มร่วมกับการใช้ความดัน

สุปราณี แยมพราย (2539) นำเศษเหลือของปลาทรายแดง จากกระบวนการผลิตซูริมินำมาบดและทำแห้งจนเหลือความชื้นร้อยละ 6.85 มีองค์ประกอบที่สำคัญคือ โปรตีนร้อยละ 49.92 ไขมันร้อยละ 9.32 เถ้าร้อยละ 31.12 (ของ น.น.แห้ง) มาศึกษาเพื่อผลิตเป็นไฮโดรไลเซทชนิดผงแห้งสำหรับใช้เป็นโปรตีนเสริมในไส้กรอกชนิดอิมัลชัน พบว่าก่อนทำการย่อยเศษปลาด้วยเอนไซม์-อัลคาเลสควรแช่เศษปลาบดแห้งในด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ pH 8.5 นาน 90 นาที ที่ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งจะให้ผลดีกว่าการนำมาให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส ในหม้อควบคุมความดัน หลังจากนั้นจึงย่อยด้วยอัลคาเลส (Activity 2.4 AU/กรัม) ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมคือ 0.075 มิลลิลิตรต่อเศษปลาแห้ง 100 กรัม ใช้เวลาย่อย 150 นาที ที่ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที แยกของเหลวใสหรือไฮโดรไลเซทด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง ทำเป็นผงแห้งโดยใช้ spray dryer ที่สภาวะของลมร้อนขาเข้า 160 องศาเซลเซียส แรงดันลมหมุนหัวเหวี่ยง 5 กก/ตร.ซม. อัตราการป้อนของเหลวคือ 300 มล.ต่อ ชม. ไฮโดรไลเซทผงที่ได้มีความชื้นร้อยละ 3 โปรตีนร้อยละ 81 (TN\*6.25)

รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์ (2545) ทำการศึกษาการกำจัดไขมันออกจากหัวและไส้ปลาทรายแดงบดโดยวิธีการล้างน้ำและวิธีการสกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการกำจัดไขมันโดยการล้างน้ำคือ การล้างที่สภาพความเป็นกรด-เบส 5.5 ที่ใช้อัตราส่วนระหว่างหัวและไส้ปลาบดต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 1 (โดยน้ำหนัก) ล้าง 2 ครั้ง และสภาวะที่เหมาะสมของการกำจัดไขมันโดยการสกัดด้วยเอทานอลคือ การสกัด 1 ครั้งโดยใช้อัตราส่วนระหว่างหัวและไส้ปลาบดต่อเอทานอลเท่ากับ 1 ต่อ 0.25 (โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมทั้งในด้านปริมาณไขมันที่ถูกกำจัดและปริมาณโปรตีนที่สูญเสีย นอกจากนั้นแล้วการเพิ่มจำนวนครั้งการสกัดด้วยเอทานอลจะลดปริมาณไขมันได้อีกไม่มากนัก จึงเลือกการสกัดด้วยเอทานอลเพียง 1 ครั้ง เมื่อนำหัวและไส้ปลาบดที่ไม่ผ่านการกำจัดไขมันและผ่านการกำจัดไขมันทั้ง 2 วิธี มาแล้ว ผลิตเป็นโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ โดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 0, 0.005 และ 0.05 (โดยน้ำหนัก) ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง ทำการย่อยสลายนาน 30, 60 และ 90 นาที ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

จิรนาถ ทิพย์รักษาและสศิธร สุขชัย (2550) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลาตาบเงินอบแห้ง โดยศึกษาปัจจัยด้านสัดส่วนของเนื้อปลาและกรดไฮโดรคลอริก และเวลาที่ใช้ในการย่อยโปรตีน เมื่อศึกษาสัดส่วนของเนื้อปลาและ

กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 โมลาร์ ที่ระดับ 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (โดยน้ำหนัก) พบว่า ที่สัดส่วนเนื้อปลาและกรดไฮโดรคลอริกเท่ากับ 1:1 มีระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโน ไนโตรเจน และอัตราส่วนของกรดอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมดสูงสุด จากนั้นใช้สัดส่วนของเนื้อปลาและกรดไฮโดรคลอริกที่เหมาะสมข้างต้นมาศึกษาปัจจัยด้านระยะเวลาในการย่อยสลาย ที่เวลา 2, 4 และ 6 ชั่วโมง และวิเคราะห์ค่าสมบัติทางเคมี พบว่า ระยะเวลาการย่อยสลายที่ 6 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโนไนโตรเจน และอัตราส่วนของกรดอะมิโนไนโตรเจนต่อไนโตรเจนทั้งหมดสูงสุด

วารภรณ์ สุทธิวิชัยพร สายพิณ ทานัชฌาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ (2551) ผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซตโดยการนำหัวและไส้ปลาทรายแดงบดที่ผ่านการกำจัดไขมันมาย่อยสลายด้วยเอนไซม์อัลคาเลสตรังรูปพบว่า ปริมาณเอนไซม์อัลคาเลสตรังรูปที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนจากหัวและไส้ปลาทรายแดงบดความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร คือ 0.2 กรัม โดยสภาวะการย่อยสลายที่ทำให้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซตมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดคือ การย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9.0 นาน 40 นาที

ขวัญฤดี วชิรัตน์พงษ์เมธี ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และจิราวัฒน์ ยงสวัสดิกุล (2551) ศึกษาผลของ pH และอัตราส่วนโครงปลาตุ๋นบดกับที่อยู่บดต่อน้ำในกระบวนการสกัดโปรตีน และผลของสภาวะในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนสกัดโดยใช้สภาวะต่าง พบว่าที่ pH 11.0 สามารถละลายโปรตีนได้สูงสุด และอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับใช้ในกระบวนการสกัดโปรตีนของโครงปลาตุ๋นบดต่อน้ำคือ 1:5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เมื่อนำโปรตีนสกัดที่สภาวะต่าง (AP) มาย่อยด้วยเอนไซม์เชิงการค้า (Protex 6L) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3.0 % (ปริมาตรต่อน้ำหนักของโปรตีน) และเวลาในการย่อย (60 120 และ 180 นาที) หลังจากผ่านการทำแห้งแบบระเหิดนำโปรตีนไฮโดรไลเซตผง (alkali-extracted protein hydrolysate powders; APHPs)

ศกุนตลา พร้อมมูล เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และ สุทธิวัฒน์ เบญจกุล (2552) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการผลิตปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง โดยการย่อยด้วยเอนไซม์แอลคาเลส 2.4L (AL) และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ 500L (FL) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดมีคุณลักษณะแตกต่างกัน โดย FL ให้ระดับการย่อยสลาย (DH) สูงกว่า AL ที่ปริมาณเอนไซม์เท่ากัน และ DH เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้อย่างเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.1, 1.0 และ 4.0 ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) โดยที่ปริมาณเอนไซม์ FL ร้อยละ 4 ให้ค่า DH สูงสุด (ร้อยละ 64)

Khantaphant, Benjakul and Kishimura (2011) ศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้ามเนื้อของปลากะพงแดง brownstripe (*Lutjanus vitta*) โดยใช้เอนไซม์ Alcalase

Flavourzyme และ pyloric caeca protease (PCP) เลือกโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis; DH) 40% ต่อมาย่อยสลายด้วย เอนไซม์ Alcalase Flavourzyme และ pyloric caeca protease (PCP) ที่เวลา 1,2,3, และ 5 ชั่วโมง

### 3. สมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) ของโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทปัจจุบันมีที่ใช้หลายรูปแบบ ได้แก่ การใช้เป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ (feed supplement) การใช้เป็นวัตถุเจือปนอาหาร เช่น foaming agent emulsifying agent ในส่วนของการใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร มีที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมโปรตีนที่ดูดซึมเร็ว นอกจากนี้พบว่าสมบัติการใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Samaranayaka, and Li-Chan, 2011; Khantaphant, Benjakul, and Kishimura, 2011) และสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) กำลังได้รับความสนใจอย่างมาก (Klompong, *et al.*, 2007; Thiansilakul, Benjakul and Shahidi, 2007a; Thiansilakul, Benjakul and Shahidi, 2007b; Khantaphant and Benjakul, 2008; Phanturat, *et al.*, 2010; Khantaphant, Benjakul and Kishimura, 2011)

สุปราณี แยมพราย (2539) ทดลองเสริมโปรตีนไฮโดรไลเซทในไส้กรอกหมูในปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักเนื้อหมูเทียบกับโซเดียมเคซีนในปริมาณเท่ากัน และไส้กรอกที่ไม่เสริมโปรตีนอื่น พบว่าข้อดีของไส้กรอกเสริมไฮโดรไลเซทปลา คือ มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน ความคงตัวของอิมัลชันและแรงต้านการกดสูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ แต่มีกลิ่นรสปลาซึ่งตรวจสอบได้ชัดเจนโดยผู้ชิม การเก็บรักษาไฮโดรไลเซทผงแห้ง เมื่อเปรียบเทียบกับสภาพการบรรจุแบบสุญญากาศ และบรรยากาศปกติ โดยบรรจุถุง PE หรืออลูมิเนียมพอยล์ลามิเนทด้วย PE พบว่าควรบรรจุในถุงที่ป้องกันความชื้น อากาศ และแสง นั่นคือใช้ถุงอลูมิเนียมพอยล์ลามิเนทด้วย PE บรรจุสุญญากาศปิดผนึกด้วยความร้อน

รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์ (2545) ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเกิดอิมัลชันของโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายวัตถุดิบชนิดเดียวกัน โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาสดที่ไม่ผ่านการกำจัดไขมันในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อัลคาเลส นาน 30 นาที โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาสดที่ผ่านการล้างน้ำในสภาวะที่ไม่มีการเติมเอนไซม์อัลคาเลส นาน 60 นาที และโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาสดที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยเอทานอลโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.005 (โดยน้ำหนัก) ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง ย่อยสลายนาน 60 นาที จะมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 88.80, 151.69 และ 169.52 มิลลิลิตรน้ำมันต่อกรัมโปรตีน

ตามลำดับ จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านความเข้มของกลิ่นคาวปลาและตรวจวัดปริมาณไขมันในโปรตีนปลาไฮโดรไลเซททั้ง 3 ชนิดดังกล่าวข้างต้น พบว่าโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทเหลวที่ได้จากการย่อยสลายหัวและไส้ปลาทรายแดงที่ผ่านการสกัดไขมันด้วยเอทานอลโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.005 (โดยน้ำหนัก) ของปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่าง นาน 60 นาที จะมีค่าความเข้มของกลิ่นคาวปลาและปริมาณไขมันต่ำที่สุดโดยมีปริมาณไขมันร้อยละ 0.08 จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ในวัตถุดิบและโปรตีนปลาไฮโดรไลเซท โดยใช้วิธี SDS-PAGE พบว่าขนาดโมเลกุลของเพปไทด์จะลดลงภายหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 1.4-16.9 กิโลดาลตัน

Je, park, and Kim (2005) ย่อยสลายโครง Alaska pollack ด้วย mackerel intestine crude enzyme (MICE) ได้ Alaska pollack frame protein hydrolysate (APH) peptides 5 ชนิด ได้แก่ APH-I (30–10 kDa), APH-II (10–5 kDa), APH-III (5–3 kDa), APH-IV (3–1 kDa), และ APH-V (ต่ำกว่า 1 kDa) โดยใช้ ultrafiltration (UF) membrane bioreactor พบว่า APH-V (ต่ำกว่า 1 kDa) ให้สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

วรารณ สุธวิชัยพร สายพิณ ทานัชฌาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ (2551) พบว่าสภาวะการย่อยสลายที่ทำให้โปรตีนปลาไฮโดรไลเซทมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันสูงสุดคือ การย่อยสลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 9.0 นาน 40 นาที ซึ่งโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทที่ได้จะมีความสามารถในการเกิดอิมัลชันเท่ากับ 189.22 มิลลิลิตรน้ำมันต่อกรัมโปรตีน ที่ระดับการย่อยสลายเท่ากับ 35.82% การใช้เอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปซ้ำทำให้ระดับการย่อยสลายลดลง เมื่อทดลองนำเอนไซม์อัลคาเลสตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำรวม 4 ครั้ง พบว่าระดับการย่อยสลายโปรตีนลดลงจาก 35.82 % เป็น 26.16%, 20.07% และ 20.12% ตามลำดับ และการนำส่วนของแข็งที่เหลือหลังการย่อยสลายกลับมาย่อยสลายซ้ำจะช่วยให้ออกซิเดชันจากวัตถุดิบได้มากขึ้น โดยพบว่าการย่อยสลายซ้ำ 3 ครั้งจะสกัดโปรตีนได้เท่ากับ 86.39%

ศกุนตลา พร้อมมูล เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และ สุธวัฒน์ เบญจกุล (2552) พบว่ากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme (FL) มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันสูงกว่า Alcalase (AL) ( $P < 0.05$ ) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วย FL มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน DPPH-radical scavenging activity และ ferric reducing antioxidant power เพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้ย่อยเพิ่มขึ้น ( $P < 0.05$ ) แต่กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS-, OH- และ O-2- radical scavenging activity ลดลง ( $P < 0.05$ ) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วย AL มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชันเพิ่มขึ้นสำหรับทุกวิธีที่ทดสอบเมื่อปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เพิ่มขึ้น ( $P < 0.05$ )

Hsu, Lu, and Jao (2009) พบว่าการย่อยสลายน้ำนิ่งปลาทูน่าด้วยเอนไซม์ orientase ที่เวลา 60 นาที ให้สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging capacity สูงสุด เมื่อนำไปแยกเป็น fraction โดย Sephadex G-25 gel filtration chromatography พบว่า Peptide fractions ขนาด 400- 1500 Dalton ให้สมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุด

Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ย่อยโดย Alcalase ตามด้วย pyloric caeca protease (HAP) ให้ค่า DPPH and ABTS radical scavenging activity และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) สูงสุดในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซท ที่ย่อยโดย Flavourzyme ตามด้วย pyloric caeca protease (HFP) ให้ค่า ferrous chelating activity and ACE inhibitory activity สูงสุด ( $p < 0.05$ ).

## ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

### วัตถุดิบ สารเคมี และวัสดุอุปกรณ์

เศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน จากโรงงานแปรรูปแช่เยือกแข็ง จังหวัดสมุทรสาคร บรรจุท้องปลาแชลมอนแบบสุญญากาศในถุงพลาสติกถ่วงละ 10 kg และแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  เอนไซม์ Alcalase Flavourzyme Neutrase และ Protamex (Novozymes A/S, Denmark) สารเคมี ได้แก่ Hydrochloric acid, Sodium hydroxide, Sucrose, Sodium tripolyphosphate Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Metanol, Ferrous chloride, Ferrozine, Sodium phosphate, Dibasic sodium phosphate, Potassium ferrocyanide, Trichloroacetic acid, Ferric chloride, Di-Sodium tetraborate decahydrate, Sodium-dodecyl-Sulfate, O-phthalaldehyde, Ethanol, Dithiothreitol, Serine, ACE (Angiotensin I-Converting Enzyme),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  buffer, Sodium Chloride, Hippuryl-l-histidyl-leucine (HHL), 2,4,6-Trichloro-1,3,5-triazine และ Dioxane และอุปกรณ์ ultrafiltration (molecular weight cut off 10 kDa และ 5 kDa

### วิธีการศึกษา

#### 1. การเตรียมวัตถุดิบปลา

นำส่วนท้องของปลาแชลมอนซึ่งเป็นเศษเหลือที่ได้จากกระบวนการผลิตปลาแชลมอนแช่เยือกแข็งมาทำการสกัดน้ำมันปลา โดยตัดแปลงจากวิธีในการผลิตน้ำมันปลาในเชิงการค้า ซึ่งทำได้โดยนำส่วนท้องปลาการนึ่งด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5-10 นาที ปั่นให้ละเอียดจนละเอียด ร้อน กรองและบีบอัดเพื่อแยกน้ำมันปลาดิบ (crude fish oil) ออก นำตัวอย่างที่ผ่านการบีบแยกเอาน้ำมันออกไป อบแห้งที่  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 ชั่วโมง บดให้ละเอียดและผสม Sucrose 8% Sodium tripolyphosphate 0.3% BHA:BHT (1:1) 0.01% และ EDTA 0.02% บรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ  $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  จนกว่านำไปใช้

วิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield)

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น (AOAC 992.15, 991.36, 942.05 และ 950.46)

## 2. การเตรียมวัตถุดิบโปรตีน

เตรียมโปรตีนโดยการปรับสภาพความเป็นกรดต่าง โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Zhong, *et al.* (2011) นำวัตถุดิบที่เตรียมได้ มาเติมน้ำอุณหภูมิ 4 °C ที่อัตราส่วน 1:9 (น้ำหนัก:ปริมาตร) homogenize ที่ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 1 นาที ปรับสภาพความเป็นกรดต่างเป็น 11 ด้วย 2 N NaOH กวนอย่างช้า เป็นเวลา 25 นาที ที่ 0-4 °C ต่อมานำมา centrifuge ที่ 10,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมากรองและปรับสภาพความเป็นกรดต่างเป็น 5.5 ด้วย 2 N HCl ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำมา centrifuge ที่ 10,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็น pellet มาทำแห้งแบบระเหิด และเก็บรักษาที่ -20 °C จนกว่านำไปใช้ และวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต (%yield)

## 3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยนำวัตถุดิบโปรตีนที่ได้ มาย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase โดยเติมน้ำให้ได้ความเข้มข้น 5 10 15 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตร homogenize ที่ความเร็วรอบ 10,000g เป็นเวลา 1 นาที ต่อมา pre-incubate ที่สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 0.5 1.5 และ 2.5 % โดยปริมาตรของโปรตีนและเวลาในการย่อย 60 120 และ 180 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมา centrifuge ที่ 5,000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหรือส่วนโปรตีนที่ละลายได้ไปทำแห้งแบบระเหิด ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตผง นำมาวิเคราะห์สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วิเคราะห์ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) แสดงในรูป %decrease โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken design (BBD) ทำการทดลอง 3 ชั้น วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## 4. ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis; %DH)

ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลาย 4 ชนิด ได้แก่ Flavourzyme Alcalase Neutrase และ Protamex ต่อระดับการย่อยสลาย โดยนำวัตถุดิบโปรตีนที่ได้มาเตรียมที่ความเข้มข้น 15% นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 2.5 % โดยน้ำหนักต่อปริมาตรโปรตีน homogenize ที่ความเร็วรอบ 10000g เป็นเวลา 1 นาที ต่อมา preincubate ที่สภาวะที่เหมาะสม

ของเอนไซม์ เป็นเวลา 20 นาทีก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ 60 120 180 240 และ 300 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมา centrifuge ที่ 5000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหรือส่วนโปรตีนที่ละลายได้ไปทำแห้งแบบระเหิด ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทผง วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis; %DH) (Nielsen, *et al.*, 2001) วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เลือกชนิดของเอนไซม์ที่ให้ค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทสูงมา 3 ชนิดเพื่อศึกษาขั้นต่อไป

## 5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

### 5.1 ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย

ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์เชิงการค้า 3 ชนิดที่เลือกได้จากขั้นตอนการวิจัยข้อ 4 โดยนำวัตถุดิบปลา มาเตรียมที่ความเข้มข้นโปรตีน 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร homogenize ที่ความเร็วรอบ 10000g เป็นเวลา 1 นาที ต่อมา preincubate ที่สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาในการย่อย 60 120 180 240 และ 300 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมา centrifuge ที่ 5000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหรือส่วนโปรตีนที่ละลายได้ไปทำแห้งแบบระเหิด ได้โปรตีนไฮโดรไลเซทผง นำมาวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of Hydrolysis; %DH) (Nielsen, Petersen, and Dambmann, 2001)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

### 5.2 ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์เชิงการค้า 3 ชนิดที่เลือกได้จากขั้นตอนการวิจัยข้อ 4 โดยนำวัตถุดิบปลา มาเตรียมที่ความเข้มข้นโปรตีน 15% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร homogenize ที่ความเร็วรอบ 10000g เป็นเวลา 1 นาที ต่อมา preincubate ที่สภาวะที่เหมาะสมของเอนไซม์ เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ที่เวลาในการย่อย 60 120 180 240 และ 300 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยต้มที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที นำมา

centrifuge ที่ 5000 g ที่ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสหรือส่วนโปรตีนที่ละลายได้ไปทำแห้งแบบระเหิด ได้โปรตีนไฮโดรไลเซตผง นำมาวิเคราะห์ ดังนี้

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity) โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วิเคราะห์ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) แสดงในรูป %decrease โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

เลือกสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ทำให้สมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตสูงมา 1 สภาวะ เพื่อศึกษาขั้นต่อไป

## 6. ศึกษาผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตต่อสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

ศึกษาผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยนำส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เตรียมโดยสภาวะที่เหมาะสมจากขั้นตอนการวิจัยข้อ 5 มาแยกขนาดโดยใช้เทคนิค ultrafiltration ที่ molecular weight cut off 10 kDa และ 5 kDa และมาวิเคราะห์ ดังนี้

วิเคราะห์ค่าการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH radical scavenging activity โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วิเคราะห์ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) แสดงในรูป Ferric reducing antioxidant activity โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Khantaphant, Benjakul, and Kishimura (2011)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

## 7. การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซต

วิเคราะห์องค์ประกอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) สูงสุดจากขั้นตอนการวิจัยข้อ 6 โดยวิธีของ Hagen, *et al.* (1989)

## ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

### 1. การเตรียมวัตถุดิบปลา

ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต เนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการบีบน้ำมันออกกับเนื้อท้องปลาแชลมอนเริ่มต้นเป็น  $11.53 \pm 1.33\%$

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อท้องปลาแชลมอนและเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก แสดงได้ดังตารางที่ 3.2

**ตารางที่ 3.2** เปรียบเทียบองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อท้องปลาแชลมอนและเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก

องค์ประกอบทางเคมี (%)	วัตถุดิบ	
	เนื้อท้องปลาแชลมอน	เนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก
โปรตีน	$13.47 \pm 0.54$	$51.79 \pm 2.10$
ไขมัน	$28.11 \pm 1.27$	$7.46 \pm 0.25$
เถ้า	$0.54 \pm 0.13$	$2.12 \pm 0.24$
ความชื้น	$65.71 \pm 2.66$	$25.66 \pm 1.41$

จากตารางที่ 3.2 พบว่าเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออกมีปริมาณโปรตีน ( $51.79 \pm 2.10\%$ ) และเถ้า ( $2.12 \pm 0.24\%$ ) สูงกว่าโปรตีน ( $13.47 \pm 0.54\%$ ) และเถ้า ( $0.54 \pm 0.13\%$ ) ของเนื้อท้องปลาแชลมอน เนื่องจากกระบวนการอบแห้งหลังจากการแยกน้ำมันออกทำให้ปริมาณความชื้นในตัวอย่างลดลงไปอย่างมาก และเนื้อท้องปลาแชลมอนมีปริมาณไขมัน ( $28.11 \pm 1.27\%$ ) และความชื้น ( $65.71 \pm 2.66\%$ ) สูงกว่าเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับรายงานของ Klompong, *et al.* (2007) โดยองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน และความชื้นของเนื้อปลาสีกุนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออกให้ผลการทดลอง คือ  $96.8 \pm 1.02\%$ ,  $0.67 \pm 0.07\%$  และ  $24.73 \pm 0.27\%$  ตามลำดับ และเนื้อปลาสีกุนบดที่ไม่ได้ผ่านการแยกน้ำมันออกให้ผลการทดลอง คือ  $84.2 \pm 1.07\%$ ,  $3.23 \pm 0.27\%$  และ  $79.67 \pm 0.52\%$  ตามลำดับ จะเห็นว่ามีความชื้นเช่นเดียวกับตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง ทั้งนี้วัตถุดิบที่ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทควรมีปริมาณโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30% โดยน้ำหนักแห้ง (Adler-Nissen, 1986)

## 2. เตรียมวัตถุดิบโปรตีน

ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ผลผลิตวัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างก่อนและหลังการทำแห้งโดยการทำให้แห้งแบบระเหิด กับเนื้อท้องปลาแซลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก แสดงได้ดังตารางที่ 3.3

**ตารางที่ 3.3** ผลผลิตวัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างก่อนและหลังการทำแห้งแบบระเหิด ต่อเนื้อท้องปลาแซลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก

ร้อยละผลผลิต	(%)
วัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างก่อนการทำแห้งโดยการทำให้แห้งแบบระเหิด ต่อเนื้อท้องปลาแซลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก	11.79±1.22
วัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างหลังการทำแห้งโดยการทำให้แห้งแบบระเหิด ต่อเนื้อท้องปลาแซลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก	1.83±0.16

จากตารางที่ 3.3 ร้อยละผลผลิตวัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างหลังการทำแห้งแบบระเหิดมีค่าประมาณร้อยละ 2 เนื่องจากเป็นการเตรียมวัตถุดิบโปรตีนเข้มข้นสูง (protein isolates) ซึ่งมีองค์ประกอบโปรตีนคิดเป็นร้อยละมากกว่า 90 ขึ้นไป โดยวิธีที่ดัดแปลงของ Zhong, *et al.* (2011) นอกจากนี้สามารถเตรียมวัตถุดิบโปรตีนเข้มข้น (protein concentrate) โดยวิธีอื่นๆ เช่น Galla, *et al.* (2012a) และ Galla, *et al.* (2012b) รายงานว่าวัตถุดิบโปรตีนเข้มข้นที่เตรียมได้จากไข่ปลา มีองค์ประกอบโปรตีนคิดเป็นร้อยละ 82.5-90.2%

## 3. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

ศึกษาสถานะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต โดยใช้เอนไซม์ Alcalase เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในการเตรียมการของโปรตีนไฮโดรไลเซตเพราะทนความร้อน และความเป็นกรดต่าง ในช่วงกว้าง (Galla, *et al.*, 2012a; Galla, *et al.*, 2012b) โดยศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และค่า FRAP รายละเอียด ดังนี้

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงได้ดังตารางที่ 3.4 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำลองการถดถอยของค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงได้ดังตารางที่ 3.5

ตารางที่ 3.4 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อย โดยเอนไซม์ Alcalase ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย						กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	
	ความเข้มข้นเอนไซม์		ความเข้มข้นของโปรตีน		เวลา		ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ		
1	0	1.5	-1	5	-1	60	98.920	81.264
2	0	1.5	1	15	-1	60	42.492	49.755
3	0	1.5	-1	5	+1	180	59.744	58.471
4	0	1.5	1	15	+1	180	92.090	101.481
5	-1	0.5	-1	5	0	120	98.921	96.600
6	-1	0.5	1	15	0	120	94.608	81.502
7	+1	2.5	-1	5	0	120	62.979	66.737
8	+1	2.5	1	15	0	120	98.202	93.335
9	-1	0.5	0	10	-1	60	37.461	46.056
10	-1	0.5	0	10	+1	180	80.591	80.830
11	+1	2.5	0	10	-1	60	58.306	57.348
12	+1	2.5	0	10	+1	180	54.353	51.508
13	0	1.5	0	10	0	120	96.405	81.955
14	0	1.5	0	10	0	120	96.410	81.955
15	0	1.5	0	10	0	120	96.407	81.955
16	0	1.5	-1	5	-1	60	84.544	81.264
17	0	1.5	1	15	-1	60	42.492	49.755
18	0	1.5	-1	5	+1	180	59.744	58.471
19	0	1.5	1	15	+1	180	87.779	101.481
20	-1	0.5	-1	5	0	120	89.936	96.600
21	-1	0.5	1	15	0	120	91.014	81.502
22	+1	2.5	-1	5	0	120	48.961	66.737
23	+1	2.5	1	15	0	120	99.281	93.335
24	-1	0.5	0	10	-1	60	29.193	46.056
25	-1	0.5	0	10	+1	180	72.683	80.830
26	+1	2.5	0	10	-1	60	58.306	57.348
27	+1	2.5	0	10	+1	180	60.822	51.508
28	0	1.5	0	10	0	120	79.512	81.955
29	0	1.5	0	10	0	120	79.513	81.955
30	0	1.5	0	10	0	120	79.514	81.955

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย						กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH	
	ความเข้มข้นเอโนไซม์		ความเข้มข้นของโปรตีน		เวลา		ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ		
31	0	1.5	-1	5	-1	60	93.530	81.264
32	0	1.5	1	15	-1	60	49.321	49.755
33	0	1.5	-1	5	+1	180	70.886	58.471
34	0	1.5	1	15	+1	180	91.373	101.481
35	-1	0.5	-1	5	0	120	88.857	96.600
36	-1	0.5	1	15	0	120	94.960	81.502
37	+1	2.5	-1	5	0	120	52.196	66.737
38	+1	2.5	1	15	0	120	94.608	93.335
39	-1	0.5	0	10	-1	60	50.399	46.056
40	-1	0.5	0	10	+1	180	86.341	80.830
41	+1	2.5	0	10	-1	60	58.306	57.348
42	+1	2.5	0	10	+1	180	60.463	51.508
43	0	1.5	0	10	0	120	69.808	81.955
44	0	1.5	0	10	0	120	70.013	81.955
45	0	1.5	0	10	0	120	70.014	81.955

ตารางที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำลองการถดถอยของค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Source	df	SS	MS	F-value	P-value
Model	9	13293	1477.03	12.93	0.000
Lack-of-Fit	3	2152	717.27	12.43	0.055
Pure error	32	1847	57.70		
Residual	35	3998	114.24		
Total	44	17292			

จากตารางที่ 3.5 พบว่า ค่า P-value ของแบบจำลอง (model) การถดถอยของค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH มีค่า 0.000 ซึ่งมีความน้อยกว่า 0.05 ( $\alpha$ ) แสดงว่ามีตัวแปรถดถอยอย่างน้อยหนึ่งตัว มีความสัมพันธ์กับค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงว่าสมการถดถอยที่ประมาณได้มีประโยชน์ต่อการทำนายค่าค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และเมื่อพิจารณา Lack of fit มีค่า 0.055 ซึ่งมีความมากกว่า 0.05 ( $p > 0.05$ ) แสดงว่าแบบจำลองการถดถอยมีความเหมาะสมกับข้อมูล และเมื่อพิจารณาค่าทางสถิติของแบบจำลอง พบว่าให้ค่า  $R^2$ , Adj- $R^2$  and

Pred-R<sup>2</sup> มีค่าเท่ากับ 76.88, 70.93 และ 62.08 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเป็นแบบจำลองที่เหมาะสม และเมื่อนำแบบจำลองที่เลือกไว้มาทดสอบว่าตัวแปรอิสระตัวใดบ้างที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม y หรือค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ผลการวิเคราะห์ แสดงได้ดังตารางที่ 3.6

**ตารางที่ 3.6** ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบของสมการกำลังสองของค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

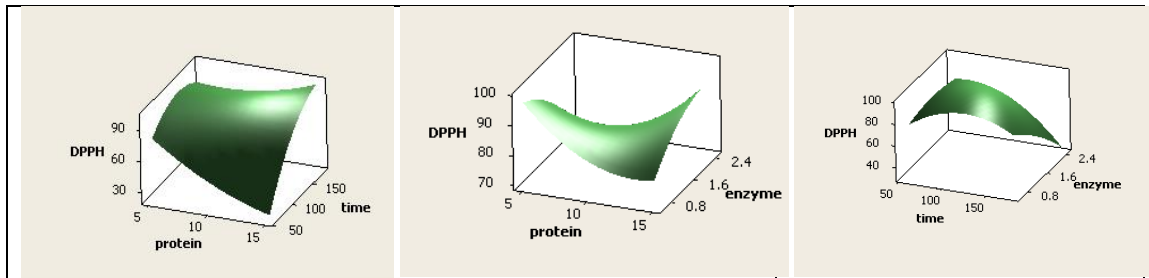
Source	Coef	SE Coef	T	P-value
Constant	81.955	3.563	23.003	0.000
Protein (x <sub>1</sub> )	2.875	2.182	1.1318	0.196
Time (x <sub>2</sub> )	7.233	2.182	3.315	0.002
Enzyme (x <sub>3</sub> )	-4.508	2.182	-2.066	0.046
Protein* Time (x <sub>1</sub> x <sub>2</sub> )	18.63	3.085	6.038	0.000
Protein*Enzyme(x <sub>1</sub> x <sub>3</sub> )	10.424	3.085	3.378	0.002
Time* Enzyme (x <sub>2</sub> x <sub>3</sub> )	-10.154	3.085	-3.291	0.002
Protein <sup>2</sup> (x <sub>1</sub> <sup>2</sup> )	8.198	3.211	2.553	0.015
Time <sup>2</sup> (x <sub>2</sub> <sup>2</sup> )	-17.410	3.211	-5.421	0.000
Enzyme <sup>2</sup> (x <sub>3</sub> <sup>2</sup> )	-5.610	3.211	-1.747	0.089

จากตารางที่ 3.6 เมื่อวิเคราะห์แบบจำลองการถดถอยดังกล่าว ได้ค่าทางสถิติและสมการความสัมพันธ์ที่มีต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เป็นแบบจำลองที่ตัดตัวแปรที่ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม y หรือค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ออกจากแบบจำลองการถดถอยแล้ว (p>0.05) โดยยังคงตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กับอิทธิพลหลักแสดงได้ดังสมการที่ 1

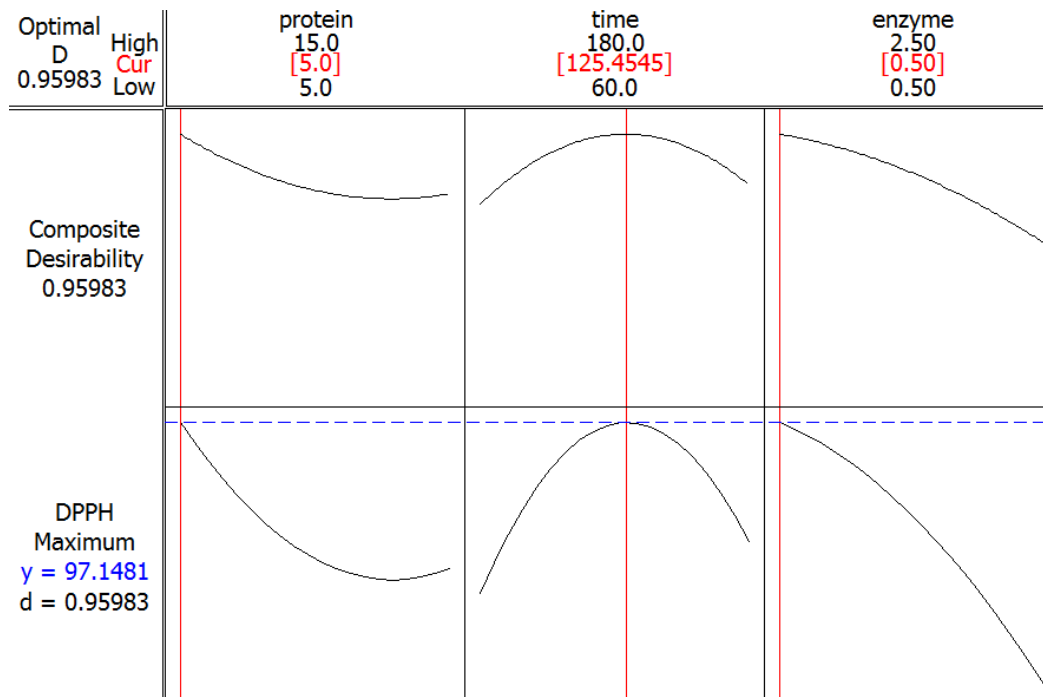
$$y = 81.955 + 7.233x_2 - 4.508x_3 + 18.63x_1x_2 + 10.424x_1x_3 - 10.154x_2x_3 + 8.198x_1^2 - 17.410x_2^2$$

(สมการที่ 1)

จากสมการที่ 1 เมื่อนำมาวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีผลต่อการค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 0.50 ร้อยละ 5 และ 125.4545 ตามลำดับ โดยให้ค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 97.1481 แสดงได้ดังภาพที่ 3.1 และ 3.2



ภาพที่ 3.1 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) (y) กับความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย



ภาพที่ 3.2 กราฟแสดงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต คือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 0.50 ร้อยละ 5 และ 125.4545 ตามลำดับ โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูล DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 97.1481

ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) แสดงได้ดังตารางที่ 3.7 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน แบบจำลองการถดถอยของค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) แสดงได้ดังตารางที่ 3.7

ตารางที่ 3.7 ผลของความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase ต่อค่า %FRAP decrease วางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย						(%FRAP decrease)	
	ความเข้มข้นเอนไซม์		ความเข้มข้นโปรตีน		เวลา		ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ		
1	0	1.5	-1	5	-1	60	-8.2586	-13.197
2	0	1.5	1	15	-1	60	47.4867	44.5388
3	0	1.5	-1	5	+1	180	-8.1470	-4.9097
4	0	1.5	1	15	+1	180	31.0254	37.9093
5	-1	0.5	-1	5	0	120	-9.0853	-7.0343
6	-1	0.5	1	15	0	120	38.7563	36.0701
7	+1	2.5	-1	5	0	120	-8.6253	-9.1347
8	+1	2.5	1	15	0	120	44.0465	48.3157
9	-1	0.5	0	10	-1	60	11.2941	17.1938
10	-1	0.5	0	10	+1	180	13.4660	9.9585
11	+1	2.5	0	10	-1	60	8.4706	14.2022
12	+1	2.5	0	10	+1	180	20.5248	23.0952
13	0	1.5	0	10	0	120	11.8548	14.9549
14	0	1.5	0	10	0	120	11.3659	14.9549
15	0	1.5	0	10	0	120	11.4881	14.9549
16	0	1.5	-1	5	-1	60	-9.5327	-13.197
17	0	1.5	1	15	-1	60	44.6650	44.5388
18	0	1.5	-1	5	+1	180	-8.2996	-4.9097
19	0	1.5	1	15	+1	180	35.4918	37.9093
20	-1	0.5	-1	5	0	120	-8.0812	-7.0343
21	-1	0.5	1	15	0	120	40.1307	36.0701
22	+1	2.5	-1	5	0	120	-8.8785	-9.1347
23	+1	2.5	1	15	0	120	53.9811	48.3157
24	-1	0.5	0	10	-1	60	12.4299	17.1938
25	-1	0.5	0	10	+1	180	15.9856	9.9585
26	+1	2.5	0	10	-1	60	11.1554	14.2022
27	+1	2.5	0	10	+1	180	25.3009	23.0952
28	0	1.5	0	10	0	120	10.1204	14.9549
29	0	1.5	0	10	0	120	10.5263	14.9549
30	0	1.5	0	10	0	120	10.5263	14.9549
31	0	1.5	-1	5	-1	60	-8.5380	-13.197
32	0	1.5	1	15	-1	60	51.6959	44.5388

ชุดการทดลอง	ระดับปัจจัย						(%FRAP decrease)	
	ความเข้มข้นเอนไซม์		ความเข้มข้นโปรตีน		เวลา		ค่าทดลอง	ค่าทำนาย
	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ	รหัส	ระดับ		
33	0	1.5	-1	5	+1	180	-8.5139	-4.9097
34	0	1.5	1	15	+1	180	33.9490	37.9093
35	-1	0.5	-1	5	0	120	-8.3010	-7.0343
36	-1	0.5	1	15	0	120	27.9893	36.0701
37	+1	2.5	-1	5	0	120	-8.5663	-9.1347
38	+1	2.5	1	15	0	120	51.2838	48.3157
39	-1	0.5	0	10	-1	60	18.9602	17.1938
40	-1	0.5	0	10	+1	180	15.0196	9.9585
41	+1	2.5	0	10	-1	60	8.3849	14.2022
42	+1	2.5	0	10	+1	180	32.3572	23.0952
43	0	1.5	0	10	0	120	18.0599	14.9549
44	0	1.5	0	10	0	120	24.7248	14.9549
45	0	1.5	0	10	0	120	25.9274	14.9549

ตารางที่ 3.8 การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำลองการถดถอยของค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease)

Source	df	SS	MS	F-value	P-value
Model	9	15864.5	1762.7	61.10	0.000
Lack-of-Fit	3	395.7	131.9	6.87	0.051
Pure error	32	614.0	19.19		
Residual	35	1009.7	28.85		
Total	44	16874.2			

จากตารางที่ 3.8 พบว่าค่า P-value ของแบบจำลองการถดถอยของค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) มีค่า 0.000 ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.05 ( $\alpha$ ) แสดงว่ามีตัวแปรถดถอยอย่างน้อยหนึ่งตัว มีความสัมพันธ์กับ ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) แสดงว่าสมการถดถอยที่ประมาณได้มีประโยชน์ต่อการทำนายค่า ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) และเมื่อพิจารณา Lack of fit มีค่า 0.051 ซึ่งมีค่ามากกว่า 0.05 ( $p > 0.05$ ) แสดงว่าแบบจำลองการถดถอยมีความเหมาะสมกับข้อมูล และเมื่อพิจารณา ค่าทางสถิติของแบบจำลอง พบว่าให้ค่า  $R^2$ , Adj- $R^2$  and Pred- $R^2$  มีค่าเท่ากับ 94.02, 92.48 และ 90.34 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าเป็นแบบจำลองที่เหมาะสม และเมื่อนำแบบจำลองที่เลือกไว้มาทดสอบ

ว่าตัวแปรอิสระตัวใดบ้างที่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม  $y$  หรือค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) ผลการวิเคราะห์ แสดงได้ดังตารางที่ 3.9

**ตารางที่ 3.9** ผลการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การถดถอยในรูปแบบของสมการกำลังสองของค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease)

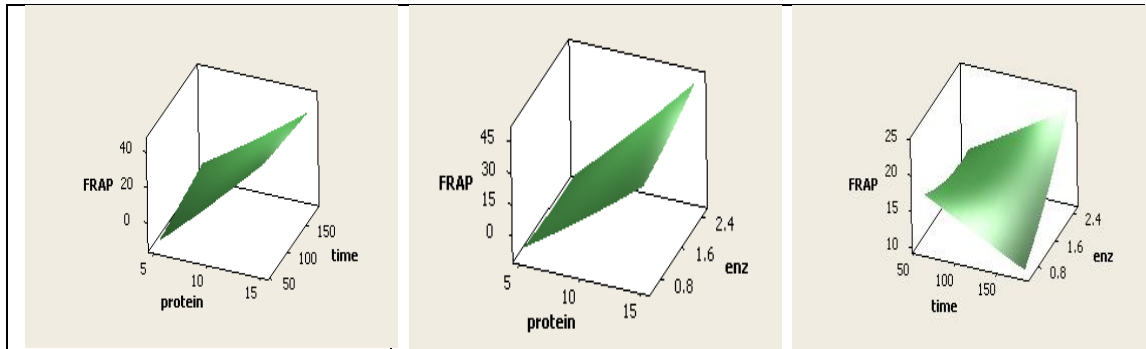
Source	Coef	SE Coef	T	P-value
Constant	14.9549	1.790	8.353	0.000
Protein ( $x_1$ )	25.1387	1.096	22.929	0.000
Time ( $x_2$ )	0.4144	1.096	0.378	0.708
Enzyme ( $x_3$ )	2.5363	1.096	2.313	0.027
Protein* Time ( $x_1x_2$ )	-3.7292	1.551	-2.405	0.022
Protein*Enzyme( $x_1x_3$ )	0.028583	1.551	2.313	0.027
Time* Enzyme ( $x_2x_3$ )	0.036458	1.551	2.600	0.014
Protein <sup>2</sup> ( $x_1^2$ )	1.0361	1.614	0.642	0.525
Time <sup>2</sup> ( $x_2^2$ )	0.005694	1.614	0.058	0.954
Enzyme <sup>2</sup> ( $x_3^2$ )	0.007903	1.614	0.659	0.514

จากตารางที่ 3.9 เมื่อวิเคราะห์แบบจำลองการถดถอยดังกล่าว ได้ค่าทางสถิติและสมการความสัมพันธ์ที่มีต่อค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) เป็นแบบจำลองที่ตัดตัวแปรที่ไม่มีความสัมพันธ์กับตัวแปรตาม  $y$  หรือ ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) ออกจากแบบจำลองการถดถอยแล้ว ( $p > 0.05$ ) โดยยังคงตัวแปรที่มีความสัมพันธ์กับอิทธิพลหลักแสดงได้ดังสมการที่ 2

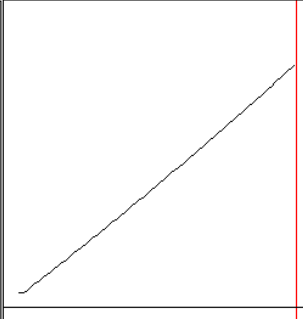
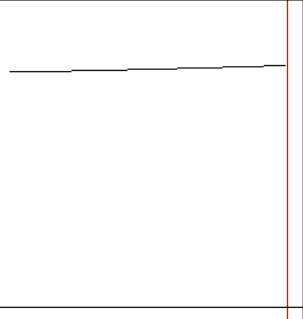
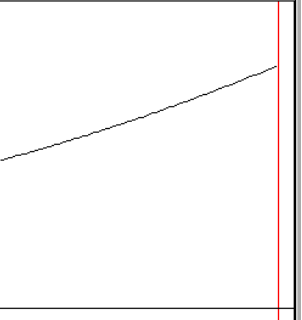
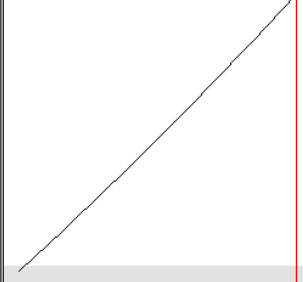
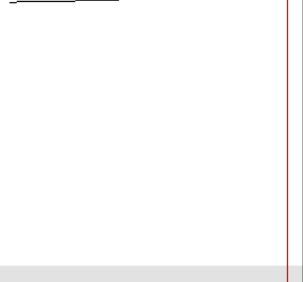
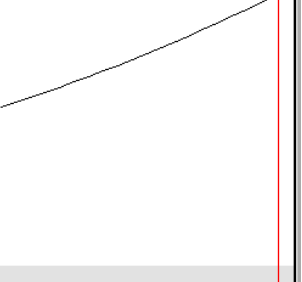
$$y = 14.9549 + 25.1387x_1 + 2.5363x_3 - 3.7292x_1x_2 + 0.028583x_1x_3 + 0.036458x_2x_3$$

(สมการที่ 2)

จากสมการที่ 2 เมื่อนำมาวิเคราะห์สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีผลต่อการค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 2.50 ร้อยละ 15 และ 180 ตามลำดับ ให้ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) สูงสุด เท่ากับร้อยละ 49.13 แสดงได้ดังภาพที่ 3.3 และ 3.4



ภาพที่ 3.3 กราฟพื้นที่ผิวตอบสนองแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) (y) กับความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย

Optimal D 0.81879	High Cur Low	protein 15.0 [15.0] 5.0	time 180.0 [180.0] 60.0	enz 2.50 [2.50] 0.50
Composite Desirability 0.81879				
FRAP Maximum y = 49.1273 d = 0.81879				

ภาพที่ 3.4 กราฟแสดงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 2.50 ร้อยละ 15 และ 180 ตามลำดับ ให้ค่า Ferric reducing antioxidant power (%FRAP decrease) สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 49.1273

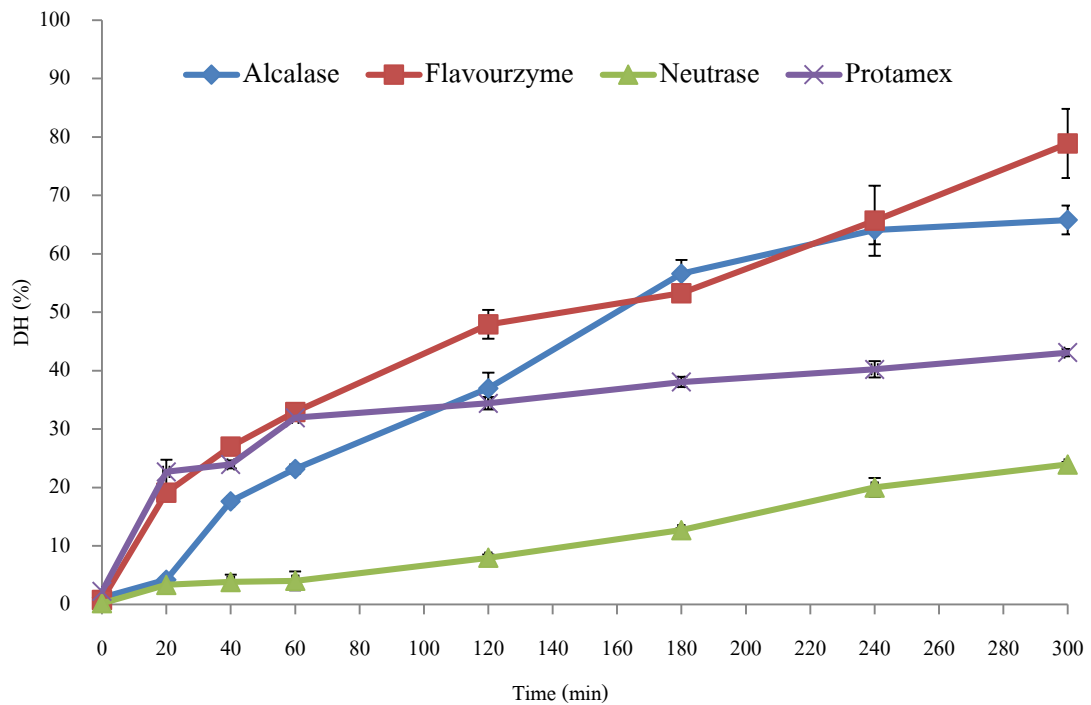
#### 4. ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ต่อระดับการย่อยสลาย

ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์เชิงการค้า 4 ชนิด ได้แก่ Alcalase Flavourzyme Neutrase และ Protamex ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน แสดงได้ดัง ตารางที่ 3.10 และภาพที่ 3.5

**ตารางที่ 3.10** ผลของชนิดเอนไซม์ทางการค้าต่อค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่เวลาต่าง ๆ แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

เวลา (นาที)	ระดับการย่อยสลาย (%DH)			
	Alcalase	Flavourzyme	Neutrase	Protamex
0	1.17 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	0.77 $\pm$ 0.67 <sup>bc</sup>	0.18 $\pm$ 0.20 <sup>c</sup>	2.25 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>
60	23.16 $\pm$ 0.76 <sup>b</sup>	32.92 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	4.03 $\pm$ 1.61 <sup>c</sup>	31.94 $\pm$ 0.50 <sup>a</sup>
120	36.97 $\pm$ 2.70 <sup>b</sup>	47.91 $\pm$ 2.48 <sup>a</sup>	7.97 $\pm$ 0.56 <sup>c</sup>	34.40 $\pm$ 1.07 <sup>b</sup>
180	56.59 $\pm$ 2.33 <sup>a</sup>	53.24 $\pm$ 1.30 <sup>b</sup>	12.71 $\pm$ 0.32 <sup>d</sup>	38.05 $\pm$ 0.87 <sup>c</sup>
300	65.76 $\pm$ 2.46 <sup>b</sup>	78.88 $\pm$ 5.91 <sup>a</sup>	23.95 $\pm$ 0.39 <sup>d</sup>	43.08 $\pm$ 0.64 <sup>c</sup>

a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 3.5 ผลของชนิดเอนไซม์ทางการค้า 4 ชนิดต่อระดับการย่อยสลาย (% DH) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนความเข้มข้น 15% ย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase Flavourzyme Neutrase และProtamex ความเข้มข้น 2.5% เป็นเวลา 0 20 40 60 120 180 240 และ 300 นาที

จากตารางที่ 3.10 (ภาพที่ 3.5) และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางภาคผนวกที่ ก-1 ถึงตารางภาคผนวกที่ ก-5) พบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนโดยเอนไซม์ ที่ชั่วโมงที่ 1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่อยๆเพิ่มเมื่อเวลาผ่านไป 2-3 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ที่เวลา 4-5 ชั่วโมง ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเอนไซม์ Alcalase Flavourzyme และ Protamex มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 40-80 ในขณะที่ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเอนไซม์ Neutrase มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 20 ทั้งนี้ระดับการย่อยสลาย แสดงถึงจำนวนพันธะที่ถูกทำลายระหว่างการเกิดปฏิกิริยา เป็นปริมาณเพปไทด์ที่ถูกทำลายเทียบกับพันธะเพปไทด์ที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบ (Nielsen, *et al.*, 2001) ถ้าค่าระดับการย่อยสลายสูง แสดงว่า โปรตีนถูกย่อยสลายจนได้เพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก ในที่นี้จึงเลือกเอนไซม์ Alcalase Flavourzyme และ Protamex มาศึกษาในขั้นต่อไป

## 5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต

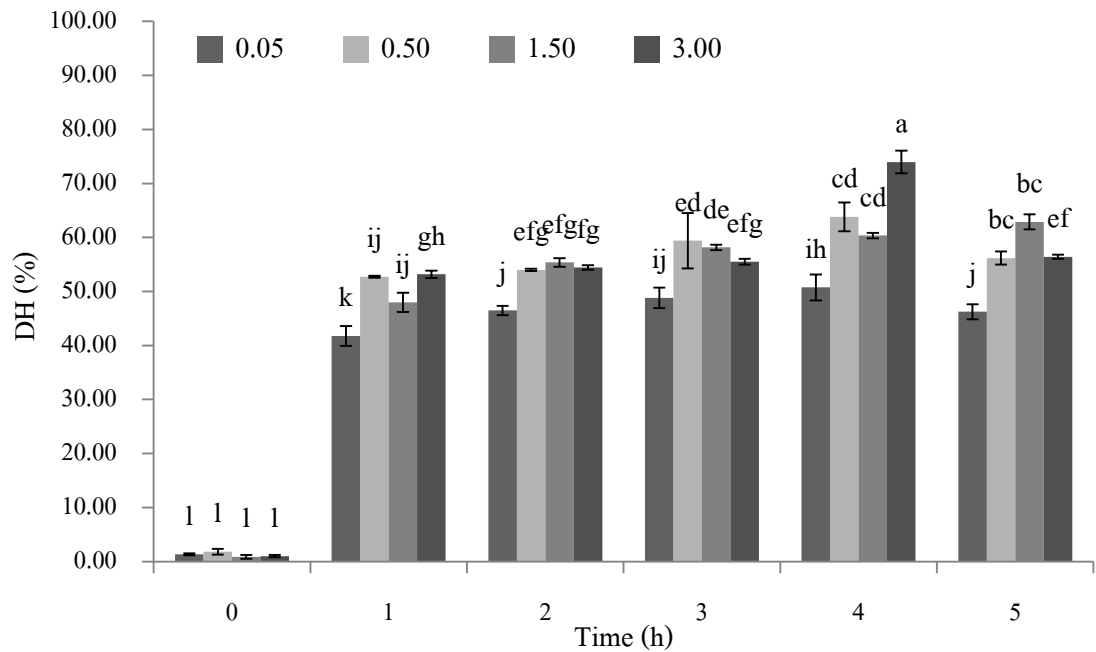
### 5.1 ผลของชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาต่อระดับการย่อยสลาย

ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ ได้แก่ Alcalase Flavourzyme และ Protamax ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ต่อระดับการย่อยสลาย แสดงได้ดังตารางที่ 3.11 และภาพที่ 3.6 3.7 และ 3.8 ตามลำดับ

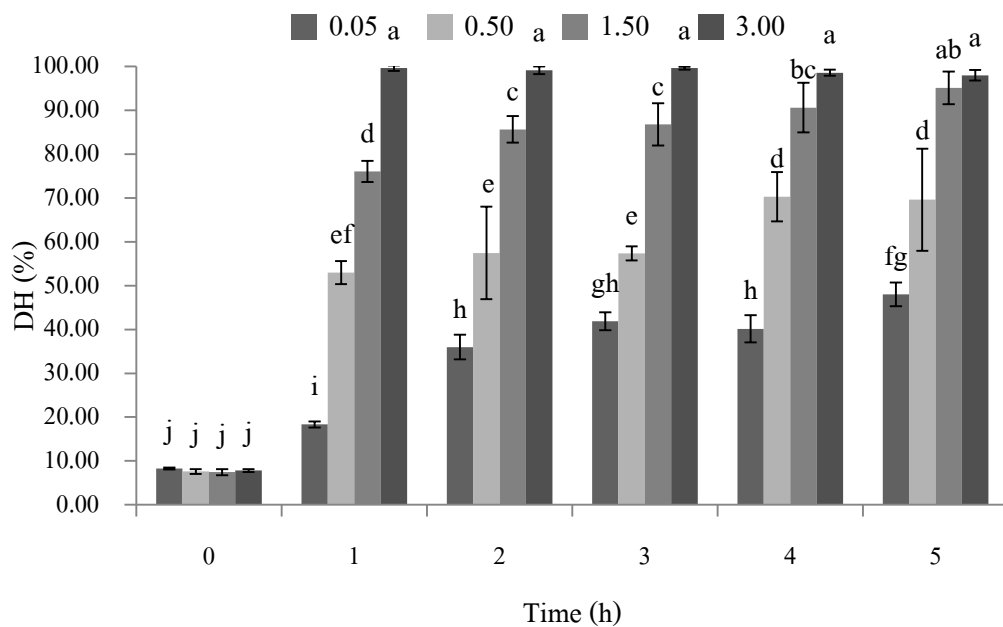
**ตารางที่ 3.11** ผลของเวลาในการย่อย และความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้น เอนไซม์ (%)	เวลาในการ ย่อย (ชม.)	ระดับการย่อยสลาย (% DH)		
		Alcalase	Flavourzyme	Protamex
0.05	0	1.35 $\pm$ 0.20 <sup>l</sup>	8.28 $\pm$ 0.20 <sup>j</sup>	4.47 $\pm$ 0.53 <sup>j</sup>
	1	41.76 $\pm$ 1.83 <sup>k</sup>	18.32 $\pm$ 0.72 <sup>i</sup>	33.91 $\pm$ 1.11 <sup>h</sup>
	2	46.49 $\pm$ 0.87 <sup>j</sup>	35.98 $\pm$ 2.82 <sup>h</sup>	40.37 $\pm$ 0.35 <sup>b</sup>
	3	48.80 $\pm$ 1.91 <sup>ij</sup>	41.87 $\pm$ 2.03 <sup>gh</sup>	42.91 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>
	4	50.76 $\pm$ 2.40 <sup>hi</sup>	40.14 $\pm$ 3.12 <sup>h</sup>	37.02 $\pm$ 0.40 <sup>def</sup>
	5	46.26 $\pm$ 1.39 <sup>j</sup>	47.99 $\pm$ 2.70 <sup>fg</sup>	43.03 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>
0.5	0	1.81 $\pm$ 0.53 <sup>l</sup>	7.59 $\pm$ 0.53 <sup>j</sup>	3.20 $\pm$ 2.36 <sup>j</sup>
	1	52.72 $\pm$ 0.20 <sup>gh</sup>	52.95 $\pm$ 2.62 <sup>ef</sup>	38.64 $\pm$ 0.35 <sup>bcd</sup>
	2	53.99 $\pm$ 0.20 <sup>fg</sup>	57.46 $\pm$ 10.54 <sup>e</sup>	37.72 $\pm$ 1.22 <sup>cde</sup>
	3	59.42 $\pm$ 5.13 <sup>d</sup>	57.34 $\pm$ 1.59 <sup>e</sup>	40.60 $\pm$ 0.87 <sup>b</sup>
	4	63.81 $\pm$ 2.65 <sup>b</sup>	70.27 $\pm$ 5.61 <sup>d</sup>	27.21 $\pm$ 0.60 <sup>i</sup>
	5	56.19 $\pm$ 1.22 <sup>ef</sup>	69.58 $\pm$ 11.65 <sup>d</sup>	33.21 $\pm$ 0.40 <sup>h</sup>
1.5	0	0.89 $\pm$ 0.35 <sup>l</sup>	7.47 $\pm$ 0.69 <sup>j</sup>	3.43 $\pm$ 1.91 <sup>j</sup>
	1	47.99 $\pm$ 1.80 <sup>ij</sup>	76.04 $\pm$ 2.40 <sup>d</sup>	34.71 $\pm$ 1.40 <sup>gh</sup>
	2	55.38 $\pm$ 0.80 <sup>efg</sup>	85.62 $\pm$ 3.03 <sup>c</sup>	26.40 $\pm$ 1.40 <sup>i</sup>
	3	58.15 $\pm$ 0.53 <sup>de</sup>	86.78 $\pm$ 4.81 <sup>c</sup>	34.37 $\pm$ 0.87 <sup>gh</sup>
	4	60.34 $\pm$ 0.53 <sup>cd</sup>	90.59 $\pm$ 5.67 <sup>bc</sup>	33.10 $\pm$ 0.69 <sup>h</sup>
	5	62.88 $\pm$ 1.39 <sup>bc</sup>	95.09 $\pm$ 3.75 <sup>ab</sup>	35.18 $\pm$ 1.83 <sup>gh</sup>
3	0	1.01 $\pm$ 0.20 <sup>l</sup>	7.82 $\pm$ 0.35 <sup>j</sup>	4.82 $\pm$ 0.20 <sup>j</sup>
	1	53.19 $\pm$ 0.69 <sup>gh</sup>	99.59 $\pm$ 0.60 <sup>a</sup>	37.95 $\pm$ 0.69 <sup>cde</sup>
	2	54.46 $\pm$ 0.40 <sup>fg</sup>	99.13 $\pm$ 0.87 <sup>a</sup>	33.91 $\pm$ 0.53 <sup>h</sup>
	3	55.49 $\pm$ 0.53 <sup>efg</sup>	99.59 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	37.49 $\pm$ 0.87 <sup>de</sup>
	4	73.96 $\pm$ 2.11 <sup>a</sup>	98.55 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	39.79 $\pm$ 1.06 <sup>bc</sup>
	5	56.42 $\pm$ 0.40 <sup>ef</sup>	97.98 $\pm$ 1.22 <sup>a</sup>	36.33 $\pm$ 1.64 <sup>efg</sup>

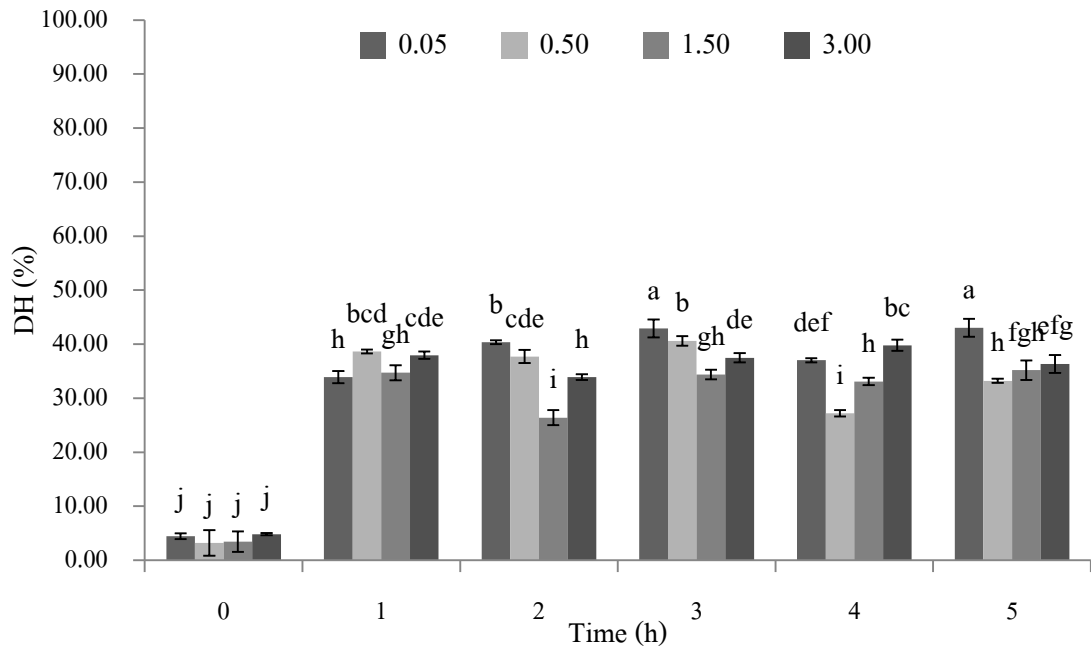
a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 3.6 ระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดย เอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.7 ระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดย เอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.8 ระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Protamex ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง

จากตารางที่ 3.11 (ภาพที่ 3.6 3.7 และ 3.8) และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางภาคผนวกที่ ก-6 ถึงตารางภาคผนวกที่ ก-8) พบว่าระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนโดยเอนไซม์ ขึ้นกับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย โดยพบว่าระดับการย่อยสลายมีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับภาพที่ 3.5 กล่าวคือ ที่ชั่วโมงที่ 1 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และค่อยๆเพิ่มเมื่อเวลาผ่านไป 2-3 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ที่เวลา 4-5 ชั่วโมง โดยระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยเอนไซม์ Alcalase Flavourzyme และ Protamax มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 60 90 และ 40 ตามลำดับ โดย Liu *et al.*(2010) รายงานผลของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยเอนไซม์ Alcalase ว่ามีผลต่อการลดค่า thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) ของ liposome-oxidising system กล่าวคือเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทเพิ่มขึ้น มีผลต่อการลดค่าดังกล่าวมากขึ้น

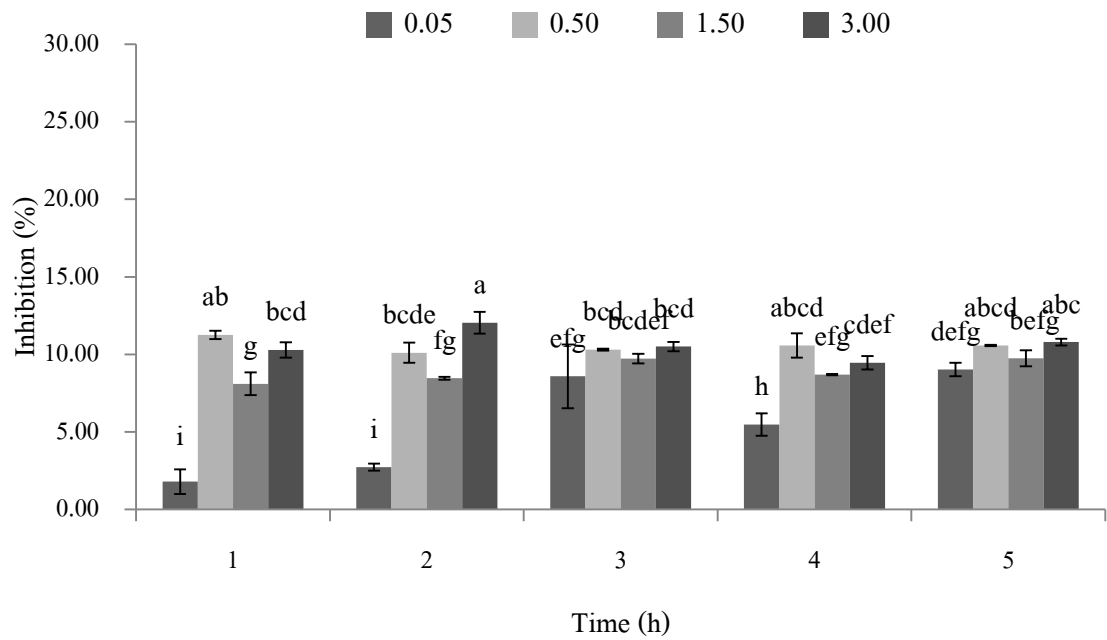
## 5.2 ผลของชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

ผลการศึกษาชนิดของเอนไซม์ ได้แก่ Alcalase Flavourzyme และ Protamax ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH แสดงได้ดังตารางที่ 3.12 และภาพที่ 3.9 3.10 และ 3.12 ตามลำดับ

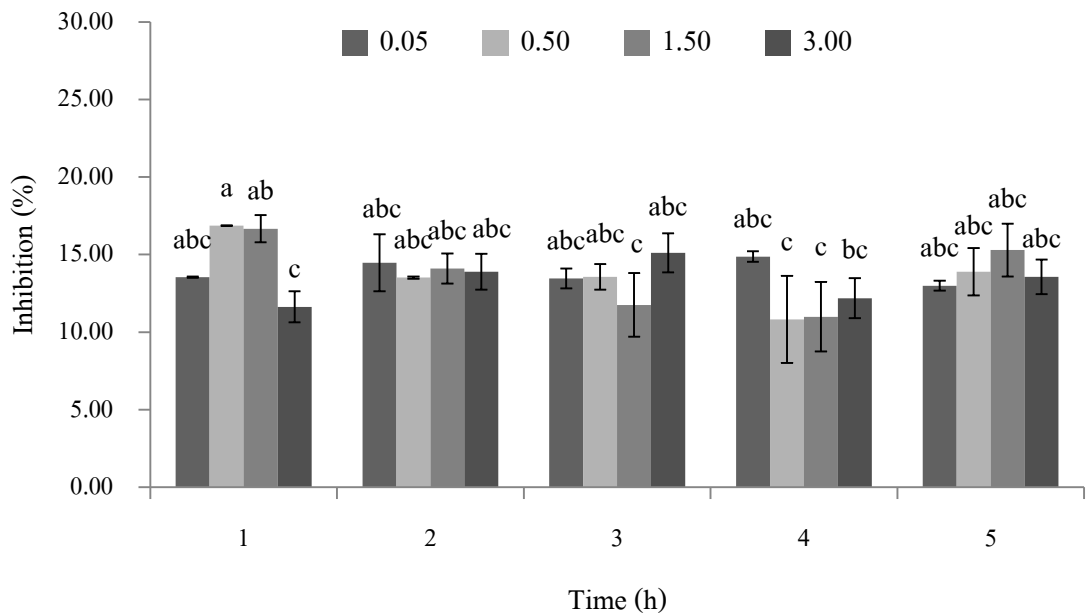
**ตารางที่ 3.12** ผลของเวลาในการย่อย และความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อสมบัติการการยับยั้งอนุมูล DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นเอนไซม์(%)	เวลาในการย่อย(ชม.)	กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (%Inhibition)		
		Alcalase	Flavourzyme	Protamax
0.05	1	1.80 $\pm$ 0.79 <sup>i</sup>	13.55 $\pm$ 0.04 <sup>abc</sup>	1.47 $\pm$ 1.50 <sup>h</sup>
	2	2.74 $\pm$ 0.23 <sup>i</sup>	14.48 $\pm$ 1.83 <sup>abc</sup>	8.76 $\pm$ 1.72 <sup>ef</sup>
	3	8.59 $\pm$ 2.05 <sup>efg</sup>	13.47 $\pm$ 0.64 <sup>abc</sup>	3.96 $\pm$ 3.11 <sup>gh</sup>
	4	5.48 $\pm$ 0.72 <sup>h</sup>	14.88 $\pm$ 0.33 <sup>abc</sup>	3.97 $\pm$ 1.10 <sup>gh</sup>
	5	9.03 $\pm$ 0.44 <sup>defg</sup>	13.00 $\pm$ 0.32 <sup>abc</sup>	2.41 $\pm$ 3.22 <sup>gh</sup>
0.5	1	11.25 $\pm$ 0.27 <sup>ab</sup>	16.87 $\pm$ 0.00 <sup>a</sup>	4.48 $\pm$ 1.40 <sup>gh</sup>
	2	10.10 $\pm$ 0.65 <sup>bcde</sup>	13.52 $\pm$ 0.08 <sup>abc</sup>	10.43 $\pm$ 1.21 <sup>ed</sup>
	3	10.31 $\pm$ 0.06 <sup>bcd</sup>	13.57 $\pm$ 0.83 <sup>abc</sup>	13.30 $\pm$ 0.59 <sup>bcd</sup>
	4	10.57 $\pm$ 0.78 <sup>abcd</sup>	10.82 $\pm$ 5.80 <sup>c</sup>	6.04 $\pm$ 0.37 <sup>fg</sup>
	5	10.58 $\pm$ 0.05 <sup>abcd</sup>	13.90 $\pm$ 3.52 <sup>abc</sup>	6.26 $\pm$ 0.89 <sup>fg</sup>
1.5	1	8.11 $\pm$ 0.73 <sup>g</sup>	16.67 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>	14.40 $\pm$ 0.54 <sup>bc</sup>
	2	8.46 $\pm$ 0.08 <sup>fg</sup>	14.11 $\pm$ 0.97 <sup>abc</sup>	6.14 $\pm$ 0.00 <sup>fg</sup>
	3	9.72 $\pm$ 0.31 <sup>bcdef</sup>	11.76 $\pm$ 2.06 <sup>c</sup>	15.37 $\pm$ 0.35 <sup>ab</sup>
	4	8.70 $\pm$ 0.04 <sup>efg</sup>	11.00 $\pm$ 2.24 <sup>c</sup>	11.31 $\pm$ 0.12 <sup>cde</sup>
	5	9.75 $\pm$ 0.52 <sup>bcdef</sup>	15.29 $\pm$ 1.70 <sup>abc</sup>	10.51 $\pm$ 0.40 <sup>de</sup>
3	1	10.29 $\pm$ 0.50 <sup>bcd</sup>	11.64 $\pm$ 1.00 <sup>c</sup>	16.10 $\pm$ 0.16 <sup>ab</sup>
	2	12.05 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	13.89 $\pm$ 1.16 <sup>abc</sup>	17.72 $\pm$ 0.36 <sup>a</sup>
	3	10.51 $\pm$ 0.30 <sup>bcd</sup>	15.12 $\pm$ 1.27 <sup>abc</sup>	14.10 $\pm$ 0.51 <sup>cb</sup>
	4	9.46 $\pm$ 0.42 <sup>cdefg</sup>	12.19 $\pm$ 1.29 <sup>bc</sup>	9.83 $\pm$ 0.45 <sup>e</sup>
	5	10.80 $\pm$ 0.22 <sup>abc</sup>	13.57 $\pm$ 1.12 <sup>abc</sup>	16.11 $\pm$ 2.35 <sup>ab</sup>

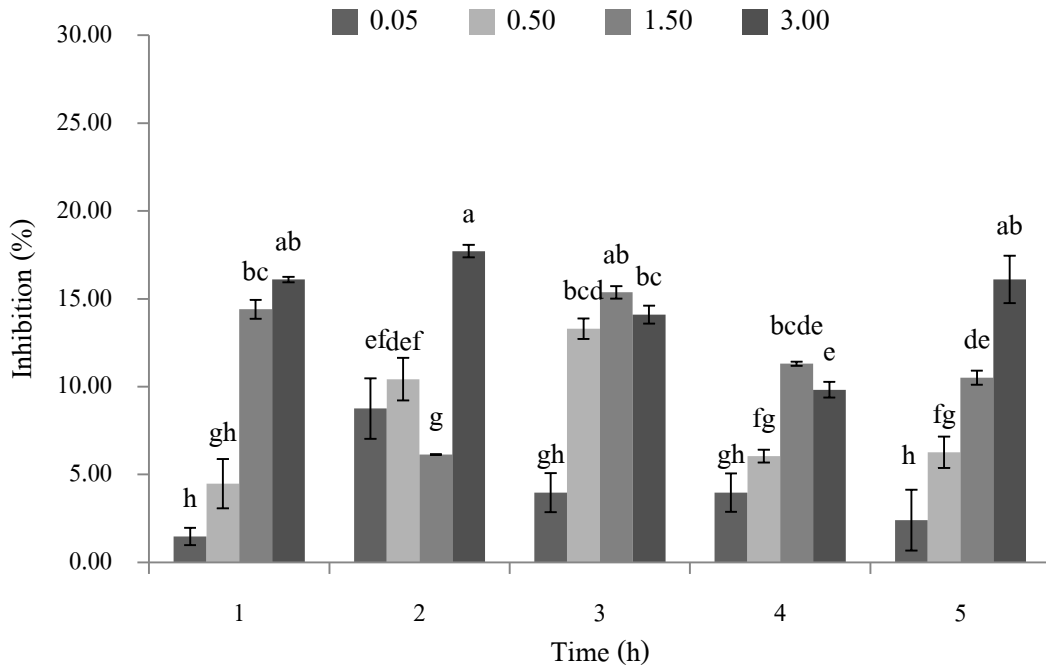
a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 3.9 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.10 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.11 กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Protamex ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง

จากตารางที่ 3.12 (ภาพที่ 3.9 10 และ 3.11) และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางภาคผนวกที่ ก-9 ถึงตารางภาคผนวกที่ ก-11) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนโดยเอนไซม์ ขึ้นกับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย สอดคล้องกับรายงานของ Ahn, *et al.* (2010) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระขึ้นกับชนิดเอนไซม์ โดยรูปแบบความสามารถในการยับยั้งมีความแตกต่างกันสำหรับอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ได้แก่ DPPH hydrogen peroxide radical scavenging, hydroxyl radical scavenging และreducing power ทั้งนี้อาจเกิดจากเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ต่างชนิดกัน มีผลต่อความสามารถที่ต่างกันในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Khantaphant *et al.*, 2011) นอกจากนี้ Ahn, *et al.* (2012a) พบว่าในทุกชนิดเอนไซม์ที่ศึกษา ได้แก่ Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsin และ trypsin เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้น กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH เพิ่มขึ้นด้วย

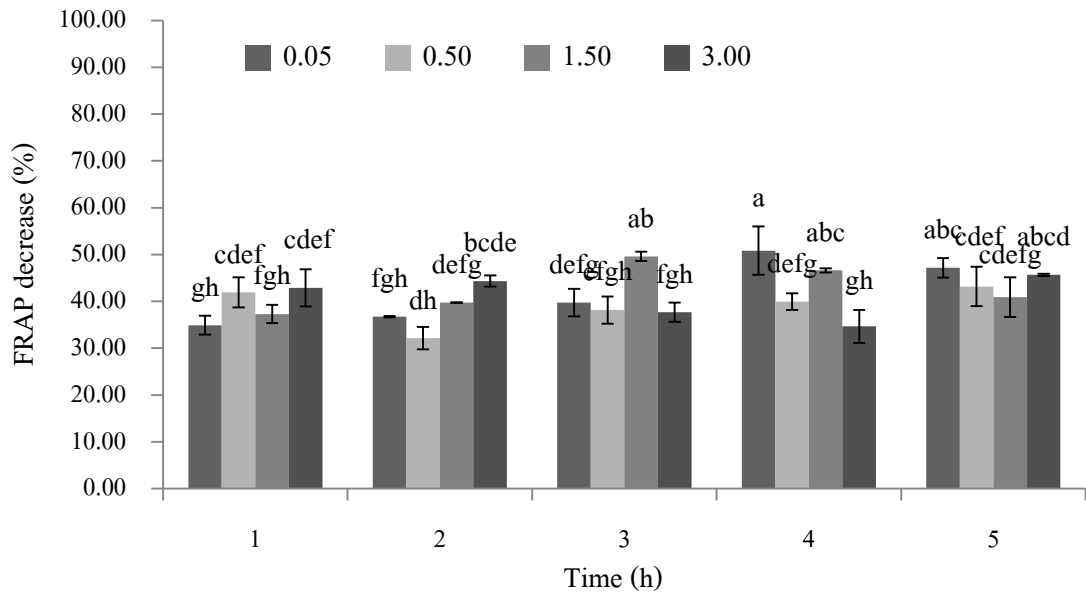
### 5.3 ผลของชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาต่อค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ผลการศึกษานิตของเอนไซม์ ได้แก่ Alcalase Flavourzyme และ Protamax ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาในการย่อย ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) แสดงได้ดังตารางที่ 3.13 และภาพที่ 3.12 3.13 และ 3.13 ตามลำดับ

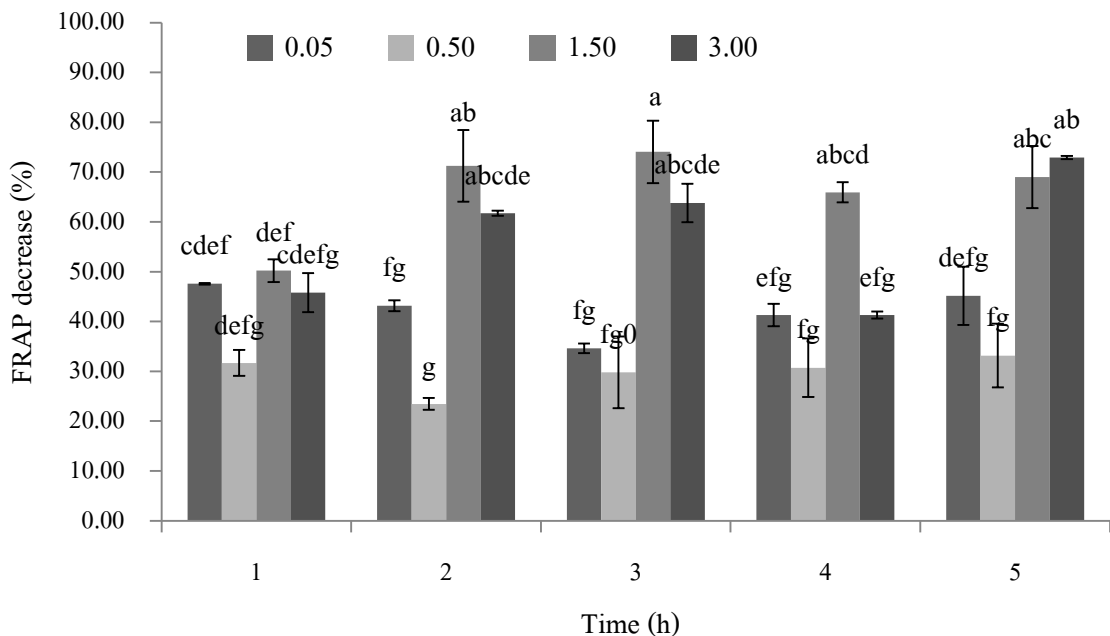
**ตารางที่ 3.13** ผลของเวลาในการย่อย และความเข้มข้นของเอนไซม์ ต่อ Ferric reducing antioxidant power ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ความเข้มข้นเอนไซม์(%)	เวลาในการย่อย(ชม.)	Ferric reducing antioxidant power (% FRAP decrease)		
		Alcalase	Flavourzyme	Protamex
0.05	1	34.91 $\pm$ 2.03 <sup>gh</sup>	47.58 $\pm$ 0.17 <sup>cdef</sup>	6.10 $\pm$ 0.49 <sup>i</sup>
	2	36.71 $\pm$ 0.15 <sup>fgh</sup>	43.15 $\pm$ 1.07 <sup>defg</sup>	5.97 $\pm$ 0.16 <sup>i</sup>
	3	39.72 $\pm$ 2.94 <sup>defg</sup>	34.60 $\pm$ 0.96 <sup>fg</sup>	11.27 $\pm$ 0.81 <sup>fg</sup>
	4	50.84 $\pm$ 5.17 <sup>a</sup>	41.30 $\pm$ 2.23 <sup>efg</sup>	10.18 $\pm$ 0.83 <sup>gh</sup>
	5	47.17 $\pm$ 2.09 <sup>abc</sup>	45.15 $\pm$ 5.85 <sup>defg</sup>	6.07 $\pm$ 0.45 <sup>i</sup>
0.5	1	41.93 $\pm$ 3.22 <sup>cdef</sup>	31.67 $\pm$ 27.60 <sup>fg</sup>	9.98 $\pm$ 0.43 <sup>gh</sup>
	2	32.14 $\pm$ 2.40 <sup>h</sup>	23.44 $\pm$ 16.18 <sup>g</sup>	14.40 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>
	3	38.15 $\pm$ 2.91 <sup>efgh</sup>	29.80 $\pm$ 7.18 <sup>fg</sup>	5.62 $\pm$ 0.33 <sup>i</sup>
	4	39.94 $\pm$ 1.75 <sup>defg</sup>	30.72 $\pm$ 9.87 <sup>fg</sup>	10.26 $\pm$ 0.28 <sup>gh</sup>
	5	43.17 $\pm$ 4.20 <sup>cdef</sup>	33.16 $\pm$ 6.42 <sup>fg</sup>	43.66 $\pm$ 3.51 <sup>cd</sup>
1.5	1	37.30 $\pm$ 1.98 <sup>fgh</sup>	50.22 $\pm$ 23.28 <sup>bcdef</sup>	37.30 $\pm$ 1.98 <sup>e</sup>
	2	39.71 $\pm$ 0.00 <sup>defg</sup>	71.24 $\pm$ 7.18 <sup>ab</sup>	73.59 $\pm$ 3.05 <sup>a</sup>
	3	49.59 $\pm$ 0.99 <sup>ab</sup>	74.06 $\pm$ 6.26 <sup>a</sup>	65.15 $\pm$ 1.51 <sup>b</sup>
	4	46.61 $\pm$ 0.42 <sup>abc</sup>	65.94 $\pm$ 2.03 <sup>abcd</sup>	46.61 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup>
	5	40.89 $\pm$ 4.27 <sup>cdefg</sup>	69.03 $\pm$ 6.23 <sup>abc</sup>	40.89 $\pm$ 4.27 <sup>d</sup>
3	1	42.90 $\pm$ 3.96 <sup>cdef</sup>	45.79 $\pm$ 3.92 <sup>cdefg</sup>	9.32 $\pm$ 0.16 <sup>ghi</sup>
	2	44.34 $\pm$ 1.22 <sup>bcde</sup>	61.76 $\pm$ 0.51 <sup>abcde</sup>	6.85 $\pm$ 0.15 <sup>hi</sup>
	3	37.67 $\pm$ 2.03 <sup>fgh</sup>	63.81 $\pm$ 3.86 <sup>abcde</sup>	12.77 $\pm$ 0.35 <sup>fg</sup>
	4	34.64 $\pm$ 3.50 <sup>gh</sup>	41.31 $\pm$ 0.71 <sup>efg</sup>	7.20 $\pm$ 0.49 <sup>hi</sup>
	5	45.66 $\pm$ 0.24 <sup>abcd</sup>	72.95 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	12.59 $\pm$ 1.77 <sup>fg</sup>

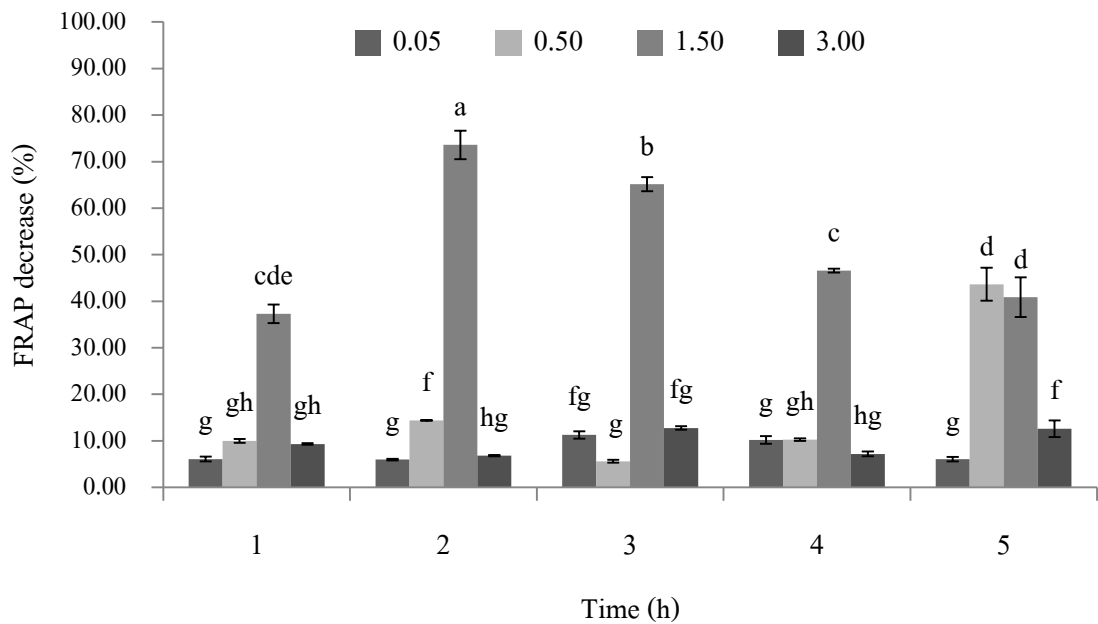
a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)



ภาพที่ 3.12 ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 1 ถึง 5 ชั่วโมง



ภาพที่ 3.13 ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 0 20 40 60 120 180 240 และ 300 นาที



ภาพที่ 3.14 ค่า Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Protamex ความเข้มข้น 0.05 0.5 1.5 และ 3 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 0 20 40 60 120 180 240 และ 300 นาที

จากตารางที่ 3.13 (ภาพที่ 3.12 3.13 และ 3.14) และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ตารางภาคผนวกที่ ก-12 ถึงตารางภาคผนวกที่ ก-14) พบว่าค่า FRAP ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนโดยเอนไซม์ ขึ้นกับปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย ทั้งนี้ ค่า FRAP เป็นค่าความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซทในการรีดิวซ์สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก  $Fe^{3+}$ -TPTZ (ferric tripyridyl triazine) ให้เป็น  $Fe^{2+}$ -TPTZ โดยการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้กับอนุมูลอิสระ (Benzie and Strain, 1996) งานวิจัยนี้รายงานเป็นร้อยละการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระที่ช่วยลด สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก  $Fe^{3+}$ -TPTZ (% FRAP decrease) หากร้อยละการลดลงของสารต้านอนุมูลอิสระมีค่าสูงหมายความว่าสามารถรีดิวซ์ สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็ก  $Fe^{3+}$ -TPTZ ให้เป็น  $Fe^{2+}$ -TPTZ ได้มาก ผลการวิจัยสอดคล้องกับรายงานของ Ahn, *et al.* (2010) ซึ่งรายงานว่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระขึ้นกับชนิดเอนไซม์ โดยรูปแบบความสามารถในการยับยั้งมีความแตกต่างกันสำหรับชนิดของอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ได้แก่ DPPH hydrogen peroxide radical scavenging, hydroxyl radical scavenging และ reducing power ทั้งนี้อาจเกิดจากเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ที่ต่างชนิดกัน มีผลต่อความสามารถที่แตกต่างกันในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน (Khantaphant, Benjakul, and Kishimura, 2011)

จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยศึกษาผลของปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัย ได้แก่ ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย ต่อระดับการย่อยสลาย (ข้อ 5.1) สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ (ข้อ 5.2) และค่า FRAP (ข้อ 5.3) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่ย่อยสลายโดยเอนไซม์ Flavourzyme ให้ระดับการย่อยสลายสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ค่า FRAP สูงกว่าการใช้เอนไซม์ชนิดอื่น เมื่อย่อยสลายด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ ตั้งแต่ 1.5% ที่เวลาตั้งแต่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป

งานวิจัยนี้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่ย่อยสลายโดยเอนไซม์ Flavourzyme คือการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป

## 6. ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ

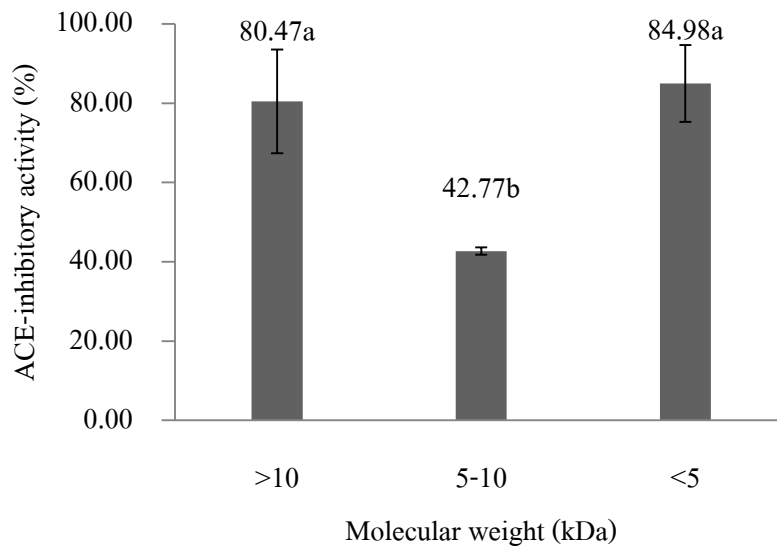
ผลการศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE แสดงได้ดังตารางที่ 3.14 และภาพที่ 3.15

ผลการศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ Ferric reducing antioxidant activity แสดงได้ดังตารางที่ 3.14 และภาพที่ 3.16-3.17

**ตารางที่ 3.14** ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงต่อค่าการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท (kDa)	ค่าการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) (%)
> 10	80.47 $\pm$ 13.05 <sup>a</sup>
5 – 10	42.71 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>
< 5	84.98 $\pm$ 9.72 <sup>a</sup>

a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

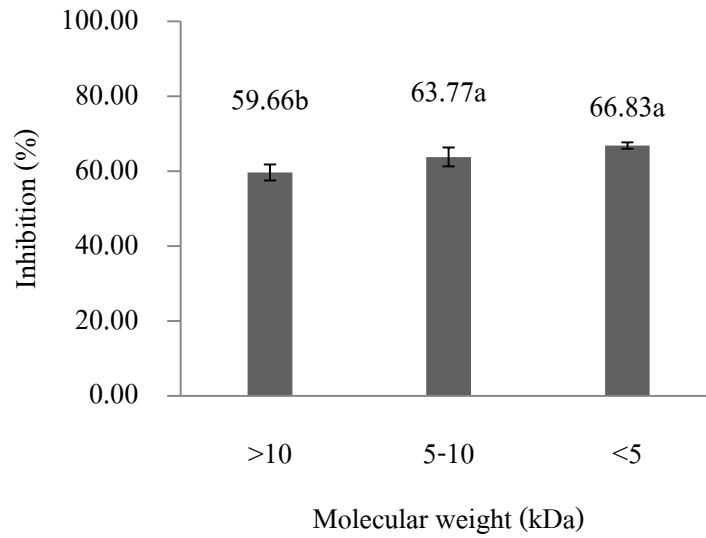


ภาพที่ 3.15 ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุล (>10 kDa, 5-10 kDa และ <5 kDa) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อค่าการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ขนาดน้ำหนักโมเลกุล

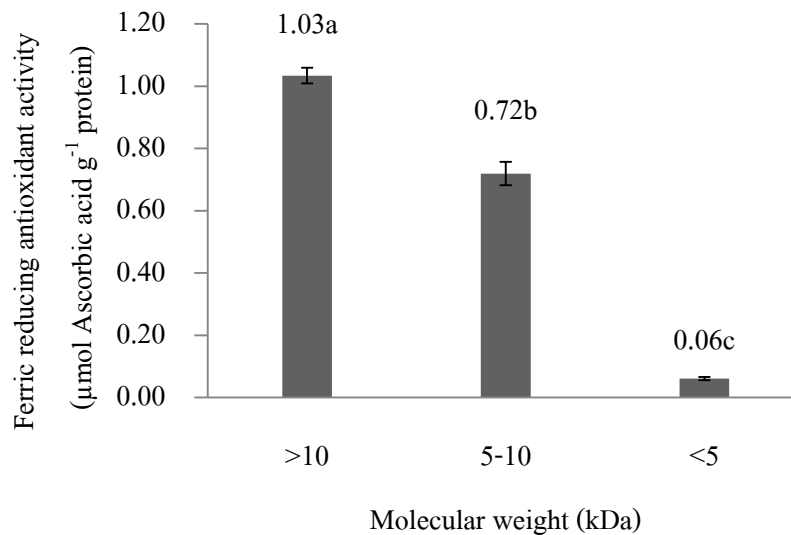
ตารางที่ 3.15 ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท ต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ Ferric reducing antioxidant activity แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท (kDa)	กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (% Inhibition)	Ferric reducing antioxidant activity ( $\mu\text{mol Ascorbic acid g}^{-1}$ protein)
> 10	59.66 $\pm$ 2.15 <sup>b</sup>	1.03 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>
5 - 10	63.77 $\pm$ 2.51 <sup>a</sup>	0.72 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
< 5	66.83 $\pm$ 0.85 <sup>a</sup>	0.06 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

a, b, c, ... หมายถึงตัวอักษรในแนวตั้งเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 3.16 ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุล (>10 kDa, 5-10 kDa และ <5 kDa) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ขนาดน้ำหนักโมเลกุล



ภาพที่ 3.17 ผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุล (>10 kDa, 5-10 kDa และ <5 kDa) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน โดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ต่อค่า Ferric reducing antioxidant activity แสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากตารางที่ 3.15 และภาพที่ 3.14 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของขนาด น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE (ตารางภาคผนวกที่ ก-15) พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต มีผลต่อค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE แตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต  $< 5$  kDa และ  $> 10$  kDa ให้ค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงสุด คือร้อยละ 84.98+9.72 และ 80.47+13.05 ตามลำดับ ในขณะที่ ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต 5-10 kDa ให้ค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ร้อยละ 42.71±0.91 สอดคล้องกับรายงานของ He *et al.* (2013) ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของ โปรตีนไฮโดรไลเซตจาก rapeseed ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล  $< 1$ , 1-3, 3-5 และ 5-10 kDa ต่อการ ยับยั้งกิจกรรมของ ACE พบว่า ที่ขนาด 5-10 kDa ยับยั้งได้ร้อยละ 50 เมื่อขนาดน้ำหนักโมเลกุล ลดลงเป็น 3-5 kDa การยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 65 และลดลงเมื่อขนาดน้ำหนักโมเลกุลเหลือ 1-3 และ  $< 1$  kDa Raghavan and Kristinsson (2009) ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ไฮโดรไลเซตจากปลาไนล์ (tilapia) ย่อยโดยใช้เอนไซม์ Flavourzyme ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล  $< 10$ , 10-30 และ  $> 30$  kDa ต่อการยับยั้งกิจกรรมของ ACE พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำสามารถยับยั้ง กิจกรรมของ ACE ได้ดีกว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลใหญ่

นอกจากนี้พบว่าชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซต และระดับการย่อย สลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของ ACE โดย Ahn *et al.* (2012a) พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากครีบอก (pectoral fin) ของปลาแชลมอนย่อยโดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างกัน ได้แก่ Alcalase, flavourzyme, neutrase, pepsin, protamex และ trypsin มีผลต่อค่าการยับยั้ง กิจกรรมของ ACE ต่างกัน โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ย่อยโดยเอนไซม์ Alcalase ให้ค่าการยับยั้ง กิจกรรมของ ACE สูงสุด โดยมีค่าในช่วง 50-60% ซึ่งยังคงต่ำกว่าค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ของ งานวิจัยนี้ซึ่งอยู่ในช่วง 40-85% นอกจากนี้ Raghavan and Kristinsson (2009) พบว่าระดับการ ย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่แตกต่างกัน มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรม ACE ต่างกัน

จากตารางที่ 3.15 และภาพที่ 3.16 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของขนาด น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (ตาราง ภาคผนวกที่ ก-16) พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซตมีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้ง อนุมูลอิสระ DPPH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดน้ำหนัก โมเลกุลต่ำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดน้ำหนัก โมเลกุลใหญ่ กล่าวคือ โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล  $< 5$  kDa ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด รองลงมา คือ 5-10 kDa และ  $> 10$  kDa คิดเป็นร้อยละ 66.83±0.85, 63.77±2.51 และ 59.66±2.15 ตามลำดับ สอดคล้องกับรายงานของ Zhong *et al.* (2011) ศึกษาผลของขนาด

น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาคาร์พ (silver carp) ได้แก่ >10 kDa, 5–10 kDa, 3–5 kDa, 1–3 kDa และ <1 kDa ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูง โดยขนาดน้ำหนักโมเลกุล < 1 kDa ยับยั้งได้ดีที่สุด มีค่าเท่ากับร้อยละ 77.8 รองลงมาคือ 1–3 kDa, 3-5 kDa, 5-10 kDa และ > 10 kDa คิดเป็นร้อยละ 56.1, 46.2, 11.1 และ 20.4 ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ก่อนผ่านการแยกขนาดมีค่าร้อยละ 52.0 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการแยกขนาดโมเลกุลโดยใช้ Ultrafiltration มีผลให้เพปไทด์ที่มีสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความเข้มข้นสูงขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระได้ดีขึ้น (Zhong *et al.*, 2011)

จากตารางที่ 3.15 และภาพที่ 3.17 และผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท ต่อค่า Ferric reducing antioxidant activity (ตารางภาคผนวกที่ ก-17) พบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีผลต่อค่า Ferric reducing antioxidant activity แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้ค่า Ferric reducing antioxidant activity ต่ำกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลใหญ่ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล > 10 kDa ให้ค่า Ferric reducing antioxidant activity สูงสุด รองลงมา คือ 5-10 kDa และ < 5 kDa โดยมีค่า  $1.03 \pm 0.03$ ,  $0.72 \pm 0.04$  และ  $0.06 \pm 0.01$  ตามลำดับ ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu *et al.* (2003) อ้างถึงใน Moure *et al.* (2006) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาแมคคาเรล (Mackerel hydrolyzates) ขนาดน้ำหนักโมเลกุล 900–1400 Da มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูง Liu, *et al.* (2010) รายงานว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้ค่า FRAP สูง ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงขนาดประเภท ลำดับ และองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเพปไทด์ มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ (Khantaphant and Benjakul, 2008; Centenaro, *et al.*, 2011; Girgih, *et al.*, 2013)

## 7. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซท

จากตารางที่ 3.14 และภาพที่ 3.15 พบว่าของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล < 5 kDa และ > 10 kDa ให้ค่าการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงสุด โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล > 10 kDa ให้ค่า Ferric reducing antioxidant activity สูงสุดด้วย (ตารางที่ 3.16 และภาพที่ 3.17) ในที่นี้จึงเลือกโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล >10 kDa จากการผ่าน

ultrafiltration membrane ที่ molecular weight cut off 10 kDa มาวิเคราะห์องค์ประกอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซท แสดงดังตารางที่ 3.16

**ตารางที่ 3.16** องค์ประกอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่ย่อยโดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขนาดน้ำหนักโมเลกุล >10 kDa จากการผ่าน ultrafiltration membrane ที่ molecular weight cut off 10 kDa

ชนิด	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน)
Alanine	4903.30
Arginine	4241.10
Aspartic acid	6670.98
Cystine	689.89
Glutamic acid	11083.61
Glycine	5801.88
Histidine	2987.02
Hydroxylysine	501.71
Hydroxyproline	1512.79
Isoleucine	2622.82
Leucine	4429.34
Lysine	4914.53
Methionine	1547.98
Phenylalanine	2501.11
Proline	3835.38
Serine	2739.78
Threonine	3094.12
Tryptophan	934.59
Tyrosine	1298.08
Valine	3073.31

หมายเหตุ: ผลวิเคราะห์จาก บริษัท ห้องปฏิบัติการกลาง (ประเทศไทย) จำกัด

จากตารางที่ 3.16 พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่ย่อยโดย เอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขนาดน้ำหนักโมเลกุล >10 kDa จากการผ่าน ultrafiltration membrane ที่ molecular weight cut off 10 kDa มีกรดกลูตามิก (11083.61) เป็นกรดอะมิโนหลัก ตามด้วย กรดแอสปาทิก (6670.98) ไกลซีน (5801.88) ไลซีน (4914.53) อะลานีน (4903.30) และลิวซีน (4429.34) มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน ตามลำดับ ทั้งนี้ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ วัตถุดิบ เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อย สภาวะที่ใช้ในการย่อย เป็นต้น (Klompong, *et al.*, 2009a; Klompong, *et al.*, 2009b) โดยทั่วไปกรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูงมากที่สุดของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา คือ กรดแอสปาทิก และกรดกลูตามิก (Chalamaiah, *et al.*, 2012) นอกจากนี้มีรายงานกรดอะมิโนที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนังปลาแชลมอนพบว่า ไกลซีน (19.45) เป็นกรดอะมิโนหลักที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนังปลาแชลมอน ตามด้วย อาร์จินีน (11.91) และ ไอโซลิวซีน (11.18) กรัม/100 กรัมโปรตีน (See, *et al.*, 2011)

เมื่อพิจารณากรดอะมิโนที่จำเป็น พบว่า ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด ได้แก่ ไอโซลิวซีน ลิวซีน ไลซีน เมไทโอนีน ฟีนิลอะลานีน ทรีโอนีน ทรีปโตเฟน และวาเลีน โดยเฉพาะไลซีน และลิวซีน ซึ่งมีปริมาณสูงถึง 4914.53 และ 4420.34 มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน ตามลำดับ กรดอะมิโนที่จำเป็นมีผลดีต่อสุขภาพ พบมากในโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา (Sathivel, *et al.*, 2003; Sathivel, *et al.*, 2005; Yin, *et al.*, 2010) ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องของปลาแชลมอนที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็น ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์ได้

## ต้นทุนการผลิต

การคำนวณต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเนื้อท้องปลาแชลมอน ปริมาณ 1 กรัม

### 1. ค่าวัตถุดิบ

- ผลผลิตเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก  $11.53 \pm 1.33\%$
- ผลผลิตโปรตีนต่อเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก  $1.83 \pm 0.16\%$
- ผลผลิตโปรตีนต่อวัตถุดิบเนื้อท้องปลาแชลมอนประมาณ  $0.002\%$  หรือ  $0.02$  กรัม ของวัตถุดิบเนื้อท้องปลาแชลมอน 1 กก.

ดังนั้น ต้นทุนวัตถุดิบต่อการผลิตโปรตีนปริมาณ 1 กรัม = 7500 บาท (คิดจากราคาส่วนท้องปลาแชลมอนต่อ 1 กก.= 150 บาท)

### 2. ค่าสารเคมี

ค่าสารเคมีหลักของกระบวนการผลิต ได้แก่ สารเคมีในการ isolate โปรตีนและ enzyme ทั้งนี้ไม่รวมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

ดังนั้น ต้นทุนสารเคมีต่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ปริมาณ 1 กรัม โดยเฉลี่ย = 500 บาท

### 3. ต้นทุนการผลิตโปรตีน = ค่าวัตถุดิบ (1) + ค่าสารเคมี (2) = 7500 + 500 = 8000 บาท

ดังนั้นต้นทุนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต ปริมาณ 1 กรัม มีค่าประมาณ 8000 บาท

## สรุปผลการวิจัย

1. วัตถุดิบปลาที่ใช้ศึกษาผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต เนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก กับเนื้อท้องปลาแชลมอนเริ่มต้น คิดเป็น  $11.53 \pm 1.33\%$  และผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก ได้แก่โปรตีน ไชมัน เถ้าและความชื้น คิดเป็น  $51.79 \pm 2.10\%$   $7.46 \pm 0.25\%$   $2.12 \pm 0.24\%$  และ  $25.66 \pm 1.41\%$  ตามลำดับ

2. ผลการวิเคราะห์ร้อยละผลผลิต ผลผลิตวัตถุดิบโปรตีนที่ได้จากการปรับสภาพความเป็นกรดต่างก่อนและหลังการทำแห้งโดยการทำให้แห้งแบบระเหิด ต่อเนื้อท้องปลาแชลมอนบดที่ผ่านการแยกน้ำมันออก คิดเป็น  $11.79 \pm 1.22\%$  และ  $1.83 \pm 0.16\%$  ตามลำดับ

3. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท พบว่าปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นโปรตีน และเวลาในการย่อยด้วยเอนไซม์ Alcalase มีผลต่อสมบัติการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ %FRAP decrease

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 0.50 ร้อยละ 5 และ 125 นาที ตามลำดับ โดยให้ค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH สูงสุดเท่ากับ ร้อยละ 97.15

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทคือ ความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 2.50 ร้อยละ 15 และ 180 นาที ตามลำดับ ให้ค่า %FRAP decrease สูงสุด เท่ากับร้อยละ 49.13

จากผลการทดลองดังกล่าว งานวิจัยนี้ได้ปรับสภาวะที่ใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท ได้แก่ ขยายช่วงเวลาในการย่อยจาก 0-3 ชั่วโมง เป็น 0-5 ชั่วโมงและขยายอัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับความเข้มข้นของเอนไซม์ ในช่วงที่กว้างขึ้น เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป

4. ชนิดของเอนไซม์ มีผลต่อระดับการย่อยสลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) พบว่าการใช้เอนไซม์ Flavourzyme Alcalase Protamex และ Neutrase ที่ความความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของโปรตีน และเวลาในการย่อยสลาย เท่ากับ ร้อยละ 2.50 ร้อยละ 15 และ 0-5 ชั่วโมง ให้ค่าระดับการย่อยสลายที่ประมาณร้อยละ 70 60 35 และ 20 ที่เวลาการย่อยสลาย 5 ชั่วโมง ตามลำดับ งานวิจัยนี้จึงเลือกเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ Alcalase Flavourzyme และ Protamex เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป

5. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน พบว่า ชนิดของเอนไซม์ ความเข้มข้นของเอนไซม์ และเวลาที่ใช้ในการย่อยสลาย มีผล

ต่อระดับการย่อยสลาย สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ %FRAP decrease พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน คือการใช้เอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากให้ระดับการย่อยสลาย ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ %FRAP decrease สูงสุด ( $p < 0.05$ )

6. ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่ย่อยสลายโดยเอนไซม์ Flavourzyme ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง มีต่อสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ ACE และสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ กิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และค่า FRAP โดยพบว่าขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท  $< 5$  kDa และ  $> 10$  kDa ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE สูงสุด (ร้อยละ  $84.98 \pm 9.72$  และ  $80.47 \pm 13.05$  ตามลำดับ) ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท  $< 5$  kDa และ  $5-10$  kDa ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุด (ร้อยละ  $66.83 \pm 0.85$  และ  $66.83 \pm 0.85$  ตามลำดับ) ( $p < 0.05$ ) และขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท  $> 10$  kDa ให้ค่า Ferric reducing antioxidant activity สูงสุด ( $1.03 \pm 0.03 \mu\text{mol ascorbic acid g}^{-1} \text{ protein}$ ) ( $p < 0.05$ ) ทั้งนี้ค่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE สูงสุดดังกล่าวมีค่ามากกว่าที่มีรายงานมาถึงปัจจุบันสำหรับโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากปลาแชลมอน (ไม่เกิน 60%) (Ahn, et al.(2012b)) จึงมีศักยภาพสามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้เป็นอย่างดี

7. ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบชนิดและปริมาณกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่ย่อยโดยเอนไซม์ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ขนาดน้ำหนักโมเลกุล  $> 10$  kDa จากการผ่าน ultrafiltration membrane ที่ molecular weight cut off 10 kDa มีกรดกลูตามิก (11083.61) เป็นกรดอะมิโนหลัก ตามด้วยกรดแอสปาทิก (6670.98) มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่พบในปริมาณสูงของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลา รวมทั้งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด สามารถนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการที่ดีต่อสุขภาพของมนุษย์ได้

### ข้อเสนอแนะ

สำหรับงานวิจัยต่อไป น่าจะศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับสมบัติทางเคมีกายภาพของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ให้ผลการยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) สูงสุด โดยทำการวิเคราะห์เพิ่มเติม เช่น ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซท เป็นต้น

### สรุปแผนงานวิจัย

#### โครงการที่ 3 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่แยกน้ำมันออก เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

แผนงานวิจัย	ผลที่ได้
1.1 เตรียมปลาแชลมอนที่ผ่านการแยกน้ำมันออก 1.2 เตรียมโปรตีน	1.1 ผลผลิต 11.53±1.33% ไขมัน 7.46 ± 0.25 โปรตีน 51.79±2.10 1.2 ผลผลิต 1.83±0.16%
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต	ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยเอนไซม์ Alcalase 0.5% ปริมาณโปรตีน 5% เวลา 2 ชั่วโมง
3.ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์ 3.1 ศึกษาผลของชนิดของเอนไซม์เชิงการค้า 4 ชนิดต่อระดับการย่อยสลาย 3.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยของเอนไซม์เชิงการค้า 3 ชนิด	3.1 เลือกเอนไซม์ 3 ชนิด คือ Alcalase Flavourzyme และ Protamax ให้ค่าระดับการย่อยสลายที่ประมาณ 70%, 60%, และ 35 % เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป 3.2 ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตโดยเอนไซม์ Flavourzyme ที่ความเข้มข้น 1.5 %เวลา 2 ชั่วโมง เพื่อดำเนินการทดลองขั้นตอนต่อไป
4. ศึกษาผลของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซต	โปรตีนไฮโดรไลเซต ขนาดน้ำหนักโมเลกุล >10kDa ยับยั้งกิจกรรมของ Angiotensin-I converting enzyme (ACE) สูงสุด
5. ศึกษาองค์ประกอบกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ให้สมบัติการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงสุด	มีกรดกลูตามิก (11083.61) เป็นกรดอะมิโนหลัก ตามด้วย กรดแอสพาทิก (6670.98) มิลลิกรัม/100 กรัมโปรตีน และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นครบทุกชนิด
สรุป สภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอนที่แยกน้ำมันออก	ใช้ Flavourzyme ความเข้มข้น ร้อยละ 1.5 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ผ่าน ultrafiltration membrane ขนาดน้ำหนักโมเลกุล >10 kDa

## เอกสารอ้างอิง

- ขวัญฤดี วชิรัตน์พงษ์เมธี ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ และจิราวัฒน์ ยงสวัสดิกุล .2551. ผลของการสกัดโปรตีนจากผลิตผลพลอยได้จากการแปรรูปลาดุกบ็กอยู่ที่สภาวะต่างต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซท. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 39: 3 (พิเศษ): 527-530.
- จิรนาถ ทิพย์รักษาและสศิธร สุขชัย. 2550. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากปลาตาบเงิน. เรื่องเต็มการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 33. 18-20 ตุลาคม. มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จ.นครศรีธรรมราช.
- รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. 2545. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ฤทัยรัตน์ หวานฉ่ำ. 2547. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทผงแห้งจากเศษเหลือของโรงงานผลิตซูริมิ: การผลิตในระดับนำร่อง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วราภรณ์ สุทธิวิชัยพร สายพิณ ทานัชนาสัย และ วรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ. 2551. การผลิตโปรตีนปลาไฮโดรไลเซทด้วยเอนไซม์อัลคาเลสตรังรูป. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาอุตสาหกรรมเกษตร .มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 521-528.
- ศกุนตลา พร้อมมูล, เอกสิทธิ์ จงเจริญรักษ์ และ สุทธิวัฒน์ เบญจกุล. 2552. การศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*).เรื่องเต็มการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35. 15-17 ตุลาคม. มหาวิทยาลัยบูรพา จ.ชลบุรี.
- สุปราณี แยมพราย. 2539. การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากของเหลือจากโรงงานผลิตซูริมิเพื่อใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.



- Adeler-Nissen, J. 1986. **Enzymic hydrolysis of food protein**. Vanderbilt, New York.
- Ahn, C.B., J.Y. Je and Y.S.Cho. 2012a. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. **Food Research International**. 49: 92-98.
- Ahn, C. B., K. H. Lee, and J. Y. Je. 2010. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: Effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. **International Journal of Food Science and Technology**. 45: 562–568.
- \_\_\_\_\_, Y. J. Jeon, Y. T. Kim and J. Y. Je. 2012b. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. **Process Biochemistry**. 47: 2240-2245.
- Amarowicz, R. and F. Shahidi. 1997. Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. **Food Chemistry**.58: 355-359.
- AOAC, 1990. **Official Methods of Analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Arlington, VA., USA.
- Benzie, I. F. F. and J. J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**. 239: 70–76.
- Bhaskar, N., T. Benila, C. Radha and R. G. Lalitha. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. **Bioresource Technology**. 99: 335-343.
- Centenaro, G. S., M. S. Mellado and C. Prentice-Hernández. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. **Advance Journal of Food Science and Technology**. 3: 280-288.

- Chalamaiah, M., B. D. kumar, R. Hemalatha and T. Jyothirmayi. 2013. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**. 135, 3020–3038.
- Galla, N.R., B. Karakala, S. Akula and P. R. Pamidighantam. 2012a. Physico-chemical, amino acid composition, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates obtained from *Channa striatus* and *Lates calcarifer*. **Food Chemistry**. 132: 1171–1176.
- Galla, N. R., P. R. Pamidighantam, S. Akula, and P. Karakala. 2012b. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. **Food Chemistry**. 135: 1479–1484.
- Girgih, A. T., C. C. Udenigwe, F. M. Hasan, T. A. Gill and R. E. Aluko. 2013. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. **Food Research International**. 52: 315-322.
- Hagen, S. R., B Frost and J. Augustin. 1989. Precolumn phenylisothiocyanate derivatization and liquid chromatography of amino acids in food. **Journal Association of Official Analytical Chemists**. 72: 912-16.
- He, R., A. T. Girgih, S. A. Malomo, X. Ju and R. E. Aluko. 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. **Journal of Functional Foods**. 5: 219-227.
- He, S., C. Franc and W. Zhang. 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). **Food Research International**. 50: 289-297.
- Hsu, K.-C., G.-H. Lu. and C.-L. Jao. 2009. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). **Food Research International**. 42: 647-652.



- Jao, C. L. and W.C Ko. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. **Fisheries Science**. 68: 430-435.
- Je, J. Y., P. J. Park, and S. K. Kim. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**. 38: 45-50.
- \_\_\_\_\_, S. Y. Kim and S. K. Kim. 2005. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. **European Food Research and Technology**. 221: 157-162.
- \_\_\_\_\_, K.-H. Lee, M. H. Lee, and C.-B. Ahn. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**. 42: 1266-1272.
- Jun, S. Y., P. J. Park, W. K. Jung and S. K. Kim. 2004. Purification and characterization of an antioxidant peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**. 219: 20-26.
- Jung, W. K., Z. J. Qian, S. H. Lee, S. Y. Choi, N. J. Sung, and H. G. Byun. 2007. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide isolated from in vitro gastrointestinal digests of *Mytilus coruscus*. **Journal of Medicinal Food**. 10: 197-202.
- Khantaphant, S. and S. Benjakul. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. 151: 410-419.



- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and H. Kishimura. 2011. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. **Process Biochemistry**. 46: 318-327.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and M.R.Ghomi. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **LWT-Food Science and Technology**. 44: 1139-1148.
- Kim, S. K., Y. T. Kim, H. G. Byun, K. S. Nam, D. S. Joo and F. Shahidi. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 1984-1989.
- Kim, S. Y., J. Y. Je and S. K. Kim. 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 18: 31-38.
- Klompong, V., S. Benjakul, D. Kantachote and F. Shahidi. 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.
- \_\_\_\_\_. 2009. Characteristics and use of Yellow Stripe Trevally hydrolysate as culture media. **Journal of Food Science**. 74: S219-S225.
- \_\_\_\_\_. 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**. 43: 1019-1026.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, M.Yachai, W.Visessanguan, F.Shahidi and K.D.Hayes. 2009a. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow



- stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). **Journal of Food Science**. 74: C126–C133.
- Kristinsson, H. G., and B. A. Rasco. 2000. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. **Process Biochemistry**. 36: 131–139.
- Liu, Q., B. Kong, Y. L. Xiong and X. Xia. 2010. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. **Food Chemistry**. 118: 403–410.
- Lowry, O.H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. 193: 265-275.
- Mendis, E., N. Rajapakse and S. K. Kim. 2005b. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 581-587.
- Mendis, E., N. Rajapakse, H. G. Byun and S. K. Kim. 2005a. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Science*. 70: 2166–2178.
- Moure, A., H. Dominguez and J. C. Parajo. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**. 41: 447-456.
- Nagai, T., T. Nagashima, A. Abe and N. Suzuki. 2006. Antioxidative activities and angiotensin-I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) cartilage and skin. **International Journal of Food Properties**. 9: 813-822.
- Nalinanon, S., S. Benjakul, H. Kishimura and F. Shahidi. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate



- threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. **Food Chemistry**. 124: 1354-1362.
- Nielsen, P. M., D. Petersen and C. Dambmann. 2001. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*. 66: 642–646.
- Ovissipour, M., A. Abedian, A. Motamedzadegan, B. Rasco, R. Safari and H. Shahiri. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. **Food Chemistry**. 115: 238-242.
- Pearce, K. N. and J. E. Kinsella. 1978. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 26: 716-723.
- Phanturat, P., S. Benjakul, W. Visessanguan and S. Roytrakul. 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **LWT-Food Science and Technology**. 43: 86-97.
- Raghavan, S. and H. G. Kristinsson. 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. **Food Chemistry**. 117: 582-588.
- Raghavan, S., H. G. Kristinsson and C. Leeuwenburgh. 2008. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 10359-10367.
- Rajakapase, N., E. Mendis, W. K. Jung, J. Y. Je, and S. K. Kim. 2005a. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**. 38: 175-182.



- Rajapakse, N., E. Mendis, H. G. Byun and S K. Kim. 2005b. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 16: 562-569.
- Ranathunga, S., N. Rajapakse and S. K. Kim. 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). **European Food Research and Technology**. 222: 310-315.
- Ren, J., M. Zhao, J. Shi, J. Wang, Y. Jiang and C. Cui. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**. 108: 727-736.
- Samaranayaka, A. G. P. and E. C. Y. Li-Chan. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**. 3: 229-254.
- Sannaveerappa, T., N. G. Carlsson, A. S. Sandberg and I. Undeland. 2007. Antioxidative properties of press juice from herring (*Clupea harengus*) against hemoglobin (Hb) mediated oxidation of washed cod mince. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 55: 9581-9591.
- Sathivel, S., P. J. Bechtel, J. Babbitt, S. Smiley, C. Crapo, K. D. Reppond, and W. Prinyawiwatkul. 2003. Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. **Journal of Food Science**. 68, 2196–2200.
- Sathivel, S., S. Smiley, W. Prinyawiwatkul and P.J. Bechtel. 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. **Journal of Food Science**. 70, 401–406.
- See S. F., L. L. Hoo and A. S. Babji. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Salmon (*Salmo salar*) skin by Alcalase. **International Food Research Journal**. 18(4): 1359-1365.



- Shahidi, F., X.-O. Han and J. Synowiecki. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). **Food Chemistry**. 53: 285-293.
- Sheih, I. C., T. K. Wu and T. J. Fang. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**. 100: 3419-3425.
- Theodore, A. E., Raghavan, S., and Kristinsson, H. G. 2008. Antioxidative activities of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 7459-7466.
- Thiansilakul Y., S. Benjakul and F. Shahidi. 2007a. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. **Journal of Food Biochemistry**. 31: 266-287.
- Thiansilakul, Y., S. Benjakul and F. Shahidi. 2007b. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). **Food Chemistry**. 103: 1385-1394.
- Wiriyaphan, C., B. Chitsomboon and J. Yongsawadigul. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chemistry**. 132: 104-111.
- Wu, C. H., H. M. Chen and C. Y. Shiau. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). **Food Research International**. 36: 949-957.
- Yin H., J. Pu, Y. Wan, B. Xiang, P. J. Bechtel and S. Sathivel. 2010. Rheological and functional properties of Catfish skin protein hydrolysates. **Journal of Food Science**. 75: E11-E17.
- Zhong S., C. Ma, Y. C. Lin and Y. Luo. 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein



รายงานฉบับสมบูรณ์: การวิจัยและพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปปลาแชลมนอน

hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. **Food Chemistry**. 126: 1636–1642.

**ภาคผนวก ก**  
**การวิเคราะห์ทางสถิติ**

**ตารางที่ ก-1** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาชนิดของเอนไซม์ ต่อ ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่เวลา 0 นาที

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	3	9.133	3.044	11.047	0.001*
Within Groups	12	3.307	0.276		
Total	15	12.439			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-2** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาชนิดของเอนไซม์ ต่อ ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่เวลา 60 นาที

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	3	2153.258	717.753	670.897	0.000*
Within Groups	12	12.838	1.070		
Total	15	2166.096			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-3** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาชนิดของเอนไซม์ ต่อ ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่เวลา 120 นาที

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	3	3443.436	1147.812	307.603	0.000*
Within Groups	12	44.778	3.731		
Total	15	3488.214			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-4** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาชนิดของเอนไซม์ ต่อ ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่เวลา 180 นาที

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	3	4796.882	1598.961	799.370	0.000*
Within Groups	12	24.003	2.000		
Total	15	4820.885			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-5** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของเวลาชนิดของเอนไซม์ ต่อ ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ที่เวลา 300 นาที

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	3	7100.034	2366.678	227.917	0.000*
Within Groups	12	124.607	10.384		
Total	15	7224.641			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-6** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase และเวลาในการย่อย ต่อระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	23	31794.542	1382.371	529.902	0.000*
Within Groups	48	125.219	2.609		
Total	71	31919.761			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-7** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme และเวลาในการย่อย ต่อระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	23	77200.627	3356.549	198.513	0.000*
Within Groups	48	811.606	16.908		
Total	71	78012.233			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-8** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Protamex และเวลาในการย่อย ต่อระดับการย่อยสลาย ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	23	11485.337	499.362	362.033	0.000*
Within Groups	48	66.208	1.379		
Total	71	11551.545			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-9** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase และเวลาในการย่อย ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	270.588	14.241	32.809	0.000*
Within Groups	20	8.681	0.434		
Total	39	279.269			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-10** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Alcalase และเวลาในการย่อย ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	986.592	51.926	7.108	0.000*
Within Groups	20	146.109	7.305		
Total	39	1132.701			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-11** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme และเวลาในการย่อย ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	104.356	5.492	1.539	0.173 <sup>ns</sup>
Within Groups	20	71.399	3.570		
Total	39	175.755			

<sup>ns</sup> หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \geq 0.05$ )

**ตารางที่ ก-12** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Flavourzyme และเวลาในการย่อย ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	10122.790	532.778	5.432	0.000*
Within Groups	20	1961.637	98.082		
Total	39	12084.426			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-13** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Protamex และเวลาในการย่อย ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	978.628	51.507	27.222	0.000*
Within Groups	20	37.842	1.892		
Total	39	1016.470			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-14** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของความเข้มข้นของเอนไซม์ Protamex และเวลาในการย่อย ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	19	17195.454	905.024	348.359	0.000*
Within Groups	20	51.959	2.598		
Total	39	17247.413			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-15** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ต่อค่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	2	2155.807	1077.904	12.175	0.036*
Within Groups	3	265.612	88.537		
Total	5	2421.419			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

**ตารางที่ ก-16** ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ต่อกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	2	77.521	38.761	9.988	0.012*
Within Groups	3	23.284	3.881		
Total	5	100.806			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ตารางที่ ก-17 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของขนาดน้ำหนักรีดของโปรตีนไฮโดรไลเซท จากเศษเหลือส่วนท้องปลาแชลมอน ต่อค่า Ferric reducing antioxidant power

Source	df	SS	MS	F	Sig.
Between Groups	2	1.478	0.739	1075.415	0.000*
Within Groups	3	0.004	0.001		
Total	5	1.482			

\* หมายถึง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )