

คุณสมบัติการเป็นสารต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเศษครีบปลาไนล์

**Antioxidant Property of Bioactive Peptides Derived from Pectoral Fin of Nile Tilapia by-product**

ดวงทิพย์ มโนคุณ (Duangtip Manokhoon)\* ดร.ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ (Dr.Supawan Thawornchinsombut)\*\*

**บทคัดย่อ**

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมการแปรรูปปลาไนล์โดยนำเศษเหลือจากการตัดแต่งเนื้อปลาไนล์ส่วนครีบออกมาผลิตไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน โดยนำเศษครีบออกมาสกัดโปรตีนโดยใช้สภาวะต่างแล้วย่อยโปรตีนสกัดด้วยเอนไซม์ทางการค้าโปรตีเอส จี 6 (Protease G6, a bacterial alkaline protease) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากครีบปลาไนล์ ได้แก่ ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อย จากการศึกษาพบว่า ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วย เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ระดับ 5.0% (v/w) ระยะเวลาในการย่อย 8 ชั่วโมง มีกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ได้แก่ ความสามารถในการรีดิวซ์ ความสามารถในการจับไอออนโลหะ และความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS สูงสุด ( $p \leq 0.05$ ) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่าง ระดับการย่อยโปรตีน และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์มีความสัมพันธ์ทางบวก (0.895 - 0.968) กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.01$ )

**ABSTRACT**

The main objective of the study was to add value to a byproduct from Nile tilapia processing industry by producing bioactive peptides with antioxidant property from the tilapia pectoral fin. Proteins from pectoral fins were recovered using alkaline-aided extraction method and were consequently hydrolyzed with a commercial Protease G6, a bacterial alkaline protease. Two factors affecting antioxidant properties of the pectoral fin bioactive peptides were evaluated including enzyme concentration and hydrolysis time. It was found that bioactive peptides obtained at 5% (v/w) Protease G6 and 8 h hydrolysis time exhibited the highest antioxidant activities ( $p \leq 0.05$ ) i.e. reducing power, metal chelating ability, and ABTS radical scavenging activity. Correlation coefficient analysis between degree of hydrolysis and antioxidant properties of bioactive peptides demonstrated positive correlations (0.895 - 0.968) ( $p \leq 0.01$ ).

**คำสำคัญ:** ครีบปลาไนล์ ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ คุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน

**Key Words:** Pectoral fin of Nile tilapia, Bioactive peptides, Antioxidant properties

\* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

\*\* ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**บทนำ**

ปลานิลถือเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีผู้นิยมบริโภค เนื่องจากเป็นปลาเนื้อขาว มีปริมาณโปรตีนสูง ไม่มีกลิ่น รสชาติดี ราคาไม่สูง เหมาะกับภาวะเศรษฐกิจโลก ทำให้มีหลายประเทศทั่วโลกมีการเพาะเลี้ยงปลานิลเพื่อบริโภคภายในประเทศและส่งออก ในส่วนของประเทศไทยนั้นข้อมูลจากกรมประมงรายงานว่า ประเทศไทยมีการส่งออกปลานิลทั้งในรูปแบบของแช่แข็งและเนื้อแช่ โดยตลาดส่งออกหลักของไทย คือ กลุ่มประเทศตะวันออกกลาง 68% กลุ่มประเทศยุโรป 14% สหรัฐอเมริกา 6% กลุ่มประเทศอาเซียน 4% กลุ่มประเทศแอฟริกา 3% และอื่นๆ 5% ซึ่งรูปแบบผลิตภัณฑ์ปลานิลที่ไทยส่งออกมากที่สุด คือ ปลานิลแช่แข็ง รองลงมา คือ เนื้อปลานิลแบบฟิเลตสดแช่เย็น เนื้อปลานิลแบบอื่นๆ สดแช่เย็น และรูปแบบอื่นๆ ตามลำดับ (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2555) เมื่อมีอุตสาหกรรมส่งออกเนื้อปลานิลแช่แข็งเพิ่มจำนวนมากขึ้นส่งผลให้ ปริมาณเศษเหลือจากปลานิลในส่วนต่างๆ มีจำนวนมากขึ้นเช่นกัน โดยปริมาณเนื้อเศษเหลือจากการตัดแต่งสูงถึงร้อยละ 68 คิดเป็นส่วนหัว โครงก้างปลา และ ใส้ปลา ร้อยละ 44 ส่วนหนังและเกล็ด ร้อยละ 10 ส่วนคางปลา ร้อยละ 8.5 และส่วนครีบออก ร้อยละ 5.5 (ข้อมูลจาก บริษัท โกรเบสท์อาหารแช่แข็ง จำกัด จังหวัดนครพนม) จะเห็นว่าเศษเหลือเหล่านี้ยังคงเป็นแหล่งของโปรตีนสูง ซึ่งส่วนใหญ่ถูกจำหน่ายเป็นอาหารสัตว์ที่มีมูลค่าค่อนข้างต่ำ ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงการนำเศษเหลือดังกล่าวนี้มาเพิ่มมูลค่าโดยการผลิตเป็นไบโอแอสทิตฟเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน ที่ได้จากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเอส G6 ซึ่งเป็น Bacterial alkaline protease ซึ่งเหมาะสำหรับใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ ซีโมโกลบิน เคซีน ไข่แดง เจลาติน และ ปลา ทำให้เกิดโมเลกุลของโปรตีนที่มีขนาดเล็กลง (สรญา, 2554) จากเศษเหลือจากการตัดแต่งปลานิล (ส่วนครีบออก) ซึ่งเป็นส่วนเศษเหลือที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ยาก

เนื่องจากมีส่วนของกระดูก โดยวัตถุประสงค์ของการศึกษาคือเพื่อใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง โดยนำไปผลิตไบโอแอสทิตฟเปปไทด์ที่ผลิตจากเศษเหลือจากการตัดแต่งปลานิล (ส่วนครีบออก) ที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชัน ซึ่งอาจนำไปใช้พัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารหรือสารเติมแต่งอาหารต่อไป

**วัตถุประสงค์**

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอสทิตฟเปปไทด์จากเศษครีบออกปลานิล

**วิธีการวิจัย**

**1. การศึกษาผลของความเข้มข้นเอนไซม์ต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอสทิตฟเปปไทด์จากเศษครีบออกปลานิล**

นำตัวอย่างครีบออกปลานิลที่ผ่านการแช่เยือกแข็ง (บริษัท โกรเบสท์อาหารแช่แข็ง จำกัด จังหวัดนครพนม) มาละลายน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 5-8 °ซ. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดโดยใช้เครื่องบดเนื้อ (Biro 8-22 E97, the BIRO MFG. Co., USA.) ที่มีขนาดรูตะแกรง 5 มิลลิเมตร จำนวน 2 รอบ นำตัวอย่างครีบออกที่บดแล้วมา ปรับอัตราส่วนกับน้ำกลั่นเป็น 1:5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปโฮโมจีไนซ์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที (Ace homogenizer, Nihonseiki Kaisha Ltd., Japan) เป็นเวลา 1 นาที ทำการปรับ pH ให้ได้  $11.0 \pm 0.05$  โดยใช้ 2.0 N NaOH และ บ่มที่อุณหภูมิ 0-4 °ซ. เป็นเวลา 45 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g, นาน 30 นาที (4 °ซ.) (Sorvall legend Mach 1.6 R, Thermofisher Scientific, German) แยกเอาเฉพาะ ส่วน ของ สาร ละลาย โปรตีน (Supernatant) โดยกรองผ่านผ้าขาวบาง (2 ชั้น) แล้วตกตะกอนโปรตีนโดยการปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH  $5.5 \pm 0.05$  โดยใช้ 2.0 N HCl แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 x g, นาน 20 นาที (4 °ซ.) (คัดแปลงจาก ขวัญ

ฤดี, 2551 และ Kokkaew, 2013) เก็บสะสมเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน โปรตีน และนำตะกอนไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนเริ่มต้น (AOAC, 1999) จากนั้นนำตะกอนโปรตีนที่ได้ไปปรับอัตราส่วนกับน้ำกลั่นโดยกำหนดความเข้มข้นโปรตีนเริ่มต้นก่อนย่อย ร้อยละ 5.0 ของน้ำหนักเปียก แล้วเทส่วนผสมของสารละลายโปรตีน ลงในถังปฏิกรณ์ (Biostat B, B. Braun Biotech International, German) และปรับ pH พร้อมกับค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิ ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 (ค่ากิจกรรม 580,000 DU/กรัม) (pH 8.0 อุณหภูมิ 55 °ซ.) ใช้ระยะเวลาในการย่อย 4 ชั่วโมง ทำการย่อยโปรตีนโดยแปรผันความเข้มข้นของเอนไซม์ (E) 3 ระดับ คือ ร้อยละ 1.0, 3.0 และ 5.0 (% v/w)

เมื่อครบระยะเวลาทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 °ซ. นาน 15 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Sathivel, et al. 2003) และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 °ซ. นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x g, นาน 20 นาที แยกเอาส่วนของสารละลายใสมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิดที่อุณหภูมิ -60 °ซ. ภายใต้สุญญากาศ (ยี่ห้อ CHRIST รุ่น GAMMA 2-16 LSC) และบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

**2. การศึกษาผลของระยะเวลาในการย่อยโปรตีนต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเศษครีบอกปลา**

จากผลการศึกษาข้อ 1 เลือกความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ให้ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนและการต้านออกซิเดชันสูงสุด ไปศึกษาผลของระยะเวลาในการย่อยต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ ทำการย่อยที่สภาวะ pH 8.0 อุณหภูมิ 55 °ซ. และแปรผันระยะเวลาการย่อย (T) ให้นานขึ้นรวมเป็น 3 ระดับ คือ 4 6 และ 8 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาทำการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยนำไปให้ความ

ร้อนที่อุณหภูมิ 85 °ซ. นาน 15 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (Sathivel and others 2003) และทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 5 °ซ. นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 x gf นาน 20 นาที แยกเอาส่วนของสารละลายใสมาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบระเหิดที่อุณหภูมิ -60 °ซ. ภายใต้สุญญากาศ และบรรจุในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °ซ. จนกว่าจะทำการวิเคราะห์

**3. การวิเคราะห์**

**3.1 ระดับการย่อยโปรตีน (degree of hydrolysis; DH)**

ติดตามระดับการย่อยสลายของโปรตีนที่ระยะเวลาย่อย 0-8 ชั่วโมง โดยใช้วิธี pH-Stat (Alder-Nissen, 1986) จดบันทึกปริมาณของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการควบคุม pH ทุกๆ 60 นาที วิธีการคำนวณ ค่าระดับการย่อยสลายของโปรตีน (degree of hydrolysis; DH) มีดังนี้

$$DH (\%) = (B \times N_b / \alpha \times h_{total} \times MP) \times 100$$

เมื่อ B คือ ปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ใช้ในระหว่างกระบวนการย่อย (มิลลิลิตร) เพื่อควบคุม pH ให้คงที่ N<sub>b</sub> คือ ความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล) α คือ ระดับการย่อยสลายของกรดอะมิโน h<sub>total</sub> คือ จำนวนพันธะเปปไทด์ของสารตั้งต้น (7.501 มิลลิกรัมวาลেন্টต่อกรัม อ้างอิงใน Kristinsson and Rasco 2000) MP คือ ปริมาณของโปรตีน ที่มีในตัวอย่าง (กรัมของน้ำหนักเปียก) คำนวณได้จาก

$$\alpha = 10^{pH - pK} / 1 + 10^{pH - pK}$$

เมื่อ pK คำนวณได้จาก

$$pK = 7.8 + [ ( 298 - T ) / 298 \times T ] \times 240$$

ซึ่ง T คือ อุณหภูมิที่ใช้ในระหว่างกระบวนการย่อย (°ซ.)

**3.2 ปริมาณโปรตีนและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชัน**

นำตัวอย่างสารละลายไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากข้อ 1 และ 2 ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Fryer et al., 1986) และวิเคราะห์กิจกรรมการต้านออกซิเดชัน 3 วิธี ได้แก่ Reducing power (Oyaizu,

1986) Metal chelating activity (Boyer, McCleary, 1987) และ ABTS radical scavenging activity (Arnao et al., 2001)

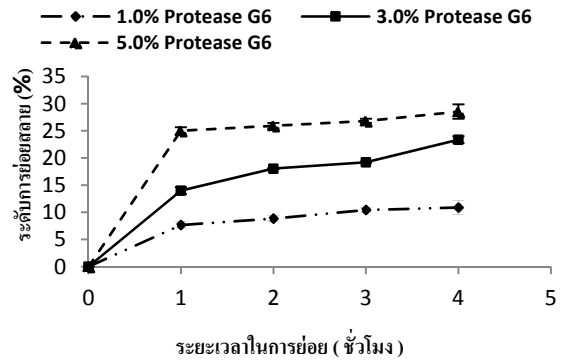
3.3 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance; ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทีไรตเมนต์ด้วยวิธี DNMR (Duncan's New Multiple Range Test) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for Windows version 19.0 และวิเคราะห์ความสัมพันธ์สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) ด้วยวิธีของ Pearson (ปัญญา, 2550)

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

รูปที่ 1 แสดงให้เห็นว่าการใช้เอนไซม์ที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันมีผลทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อยมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าระดับการย่อยสลาย

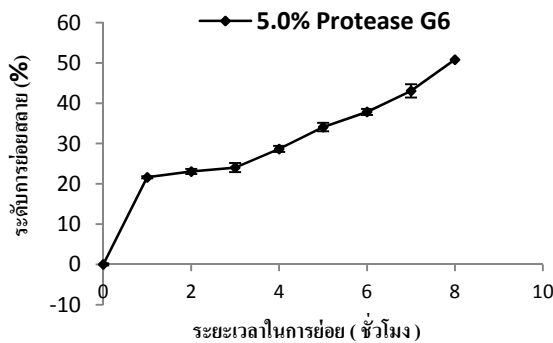
การใช้เอนไซม์ Protease G6 ที่ระดับ 5.0% (v/w) มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าสูงสุดเท่ากับ  $28.5\% \pm 1.31$  การใช้เอนไซม์ที่ระดับ 3.0% และ 1.0% (v/w) มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าเท่ากับ  $23.4\% \pm 0.62$  และ  $10.9\% \pm 0.20$  เมื่อใช้เวลาย่อย 4 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haslaniza และคณะ (2010) พบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์โบรมีเลนเพิ่มขึ้น มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากโปรตีนบางส่วนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทำให้ได้กรดอะมิโนและเปปไทด์สายสั้นๆ เกิดขึ้น เมื่อใช้ความเข้มข้นเอนไซม์เพิ่มขึ้น และงานวิจัยของ ฉัญฉุภา และคณะ (2554) ได้มีการศึกษาการใช้เอนไซม์โปรติเอสทางการค้าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยพบว่า การใช้เอนไซม์โปรติเอสที่ระดับความเข้มข้น 24 % (v/w) และระยะเวลาการย่อยสลาย 12 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงสุด ดังนั้นในการทดลองขั้นต่อไปจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ Protease G6 ที่ระดับ 5.0% (v/w)



รูปที่ 1 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากเศษครีบบอกปลาที่ล่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส จี 6 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ และระยะเวลาย่อยต่างกัน

การใช้เอนไซม์โปรติเอส จี 6 ที่ระดับความเข้มข้น 5.0% (v/w) และระยะเวลาย่อยที่แตกต่างกันโดยศึกษาระยะเวลาย่อย 3 ระดับ คือ 4 6 และ 8 ชั่วโมง (รูปที่ 2) พบว่า การใช้ระยะเวลาย่อยที่แตกต่างกันมีผลทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีน มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) โดยพบว่าระยะเวลาย่อยที่ 8 ชั่วโมง ให้ค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดมีค่าเท่ากับ  $50.8\% \pm 1.65$  และระยะเวลาย่อย 6 และ 4 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายเท่ากับ  $37.9\% \pm 1.04$  และ  $28.7\% \pm 1.14$  ตามลำดับ Nilsang และคณะ (2005) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้เอนไซม์โปรติเอสทางการค้าเพื่อย่อยสารละลายโปรตีนเข้มข้นที่เหลือจากกระบวนการผลิตปลานู่นำมาประกอบ พบว่า การใช้เอนไซม์ Flavourzyme และ Kojizyme ที่ระดับเข้มข้น 5.0% (v/w) และ ระยะเวลาย่อย 6 ชั่วโมง ซึ่งเป็นสภาวะการศึกษาระดับที่สูงสุดทั้ง 2 ปัจจัย มีผลทำให้ระดับการย่อยสลายโปรตีนมีค่าสูงถึง 62% และ 68% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับสภาวะอื่นๆ ที่ต่ำกว่า ขวัญฤติ (2551) พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสท ( $p \leq 0.05$ ) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้นทำให้ค่าระดับการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ระดับความเข้มข้นของ

เอนไซม์และระยะเวลาในการย่อยสลายโปรตีนไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการย่อยสลายโปรตีน ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 2 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากเศษครีบอกปลาที่เตรียมด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 (5.0% v/w) ที่ระยะเวลาการย่อยแตกต่างกัน

กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมด้วยสภาวะต่างๆ สามารถประเมินได้จากการวัดค่าความสามารถในการรีดิวซ์ ซึ่งจะแสดงถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ions) ของสารต้านอนุมูลอิสระหรือโปรตีนไฮโดรไลสแก่อนุมูลอิสระที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Kong and Xiong, 2006) ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะมีความสำคัญและควรรักษาเนื่องจากโลหะเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดอนุมูลอิสระต่างๆมากมายหลายชนิด โดยเฉพาะธาตุเหล็กที่อยู่ในรูปเฟอร์รัส ( $Fe^{2+}$ ) จะทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับออกซิเจนในอากาศ เกิดเป็นสารอนุมูล Superoxide anion radical ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระตัวเริ่มต้นที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระตัวอื่นๆ ต่อไป (Dimis et al., 1994) และความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งแสดงในตารางที่ 1 พบว่า สภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสหรือไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่ใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 เข้มข้น 5.0 % (v/w) และระยะเวลาย่อย 4 ชั่วโมง ไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน (21.2 mg EDTA/100 mg protein) และคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูล ABTS (162.3 mg Trolox/100 mg protein) สูง

กว่าสภาวะการใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ความเข้มข้น 1.0% และ 3.0% ( $p \leq 0.05$ ) ส่วนความสามารถในการรีดิวซ์ของสภาวะการใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ความเข้มข้น 3.0% และ 5.0% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีประสิทธิภาพสูงกว่าที่ระดับ 1.0% และเมื่อนำผลการทดลองที่ได้จากการทดลองที่ 1 มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 2 โดยศึกษาสภาวะการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ความเข้มข้น 5.0% และระยะเวลาการย่อย 3 ระดับคือ 4, 6 และ 8 ชั่วโมง พบว่า การใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ความเข้มข้น 5.0% ระยะเวลาย่อย 8 ชั่วโมงมีผลทำให้ความสามารถในการจับกับอนุมูลโลหะ (39.2 mg EDTA/100 mg protein) และคุณสมบัติในการยับยั้งอนุมูล ABTS (176.7 mg Trolox/100 mg protein) สูงกว่าสภาวะการใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ระยะเวลาย่อย 4 และ 6 ชั่วโมง ( $p \leq 0.05$ ) (ตารางที่ 2) แต่ความสามารถในการรีดิวซ์ของสภาวะการใช้เอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ระยะเวลาย่อย 6 และ 8 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่ผลิตจากครีบอกปลามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยตัวอย่างและระยะเวลาการย่อย สุภาวดี (2556) พบว่าความสามารถในการรีดิวซ์ของโปรตีนไฮโดรไลสจะเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราการย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นเช่นกัน Saiga et al., (2003) รายงานว่าเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลสที่มีความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนทำให้เกิดออกซิเดชันของไขมันลดลง (lipid oxidation) ซึ่งมีสมมติฐานว่าการตัดพันธะเปปไทด์ช่วยเพิ่มความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออนเนื่องจากการเพิ่มความเข้มข้นของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโนในกิ่งก้านของกรดอะมิโนในกลุ่มอะซิดิก (acidic amino acid) และเบสิก (basic amino acid) จึงช่วยกำจัดตัวเร่งการเกิดออกซิเดชัน เช่น ไอออนของโลหะ



ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient) ระหว่างระดับการย่อยโปรตีน และคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ พบว่า ระดับการย่อยโปรตีนมีความสัมพันธ์ทางบวกกับคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันทั้ง 3 คุณสมบัติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.01$ ) โดยมีค่า

อยู่ในช่วง 0.895 - 0.968 (ตารางที่ 3) นั่นคือเมื่อระดับการย่อยโปรตีนเพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาย่อย ส่งผลให้คุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเช่นกัน

**ตารางที่ 1** ปริมาณโปรตีน ความสามารถในการรีดิวซ์ ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) และความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเศษครีบอกปลานิลย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ นาน 4 ชั่วโมง

ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	Protease G6 (%v/w)	ปริมาณโปรตีน (mg/mL)	Reducing Power (mg Trolox/100 mg protein)	Metal Chelating Ability (mg EDTA/100 mg protein)	ABTS radical scavenging activity (mg Trolox/100 mg protein)
4	1.0	5.70 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.92±0.04 <sup>b</sup>	10.04±0.41 <sup>c</sup>	144.26±0.57 <sup>c</sup>
	3.0	7.57 ± 0.21 <sup>b</sup>	4.25±0.04 <sup>a</sup>	12.93±0.31 <sup>b</sup>	157.14±4.50 <sup>b</sup>
	5.0	8.51 ± 0.10 <sup>a</sup>	4.37±0.05 <sup>a</sup>	21.23±0.44 <sup>a</sup>	162.31±1.11 <sup>a</sup>

\*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

**ตารางที่ 2** ปริมาณโปรตีน ความสามารถในการรีดิวซ์ ความสามารถในการจับกับเฟอร์รัสไอออน ( $Fe^{2+}$ ) และความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเศษครีบอกปลานิลย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 (5.0% v/w) ที่ระยะเวลาการย่อยแตกต่างกัน

ระยะเวลาในการย่อย (ชั่วโมง)	Protease G6 (% v/w)	ปริมาณโปรตีน (mg/mL)	Reducing Power (mg Trolox/100 mg protein)	Metal Chelating Ability (mg EDTA/100 mg protein)	ABTS radical scavenging activity (mg Trolox/100 mg protein)
4	5.0 %	8.53 ± 0.28 <sup>c</sup>	4.40±0.15 <sup>b</sup>	22.39±1.62 <sup>c</sup>	158.19±1.79 <sup>c</sup>
6		9.49 ± 0.18 <sup>b</sup>	4.85±0.10 <sup>a</sup>	30.13±0.54 <sup>b</sup>	169.02±0.08 <sup>b</sup>
8		11.46 ± 0.42 <sup>a</sup>	4.96±0.08 <sup>a</sup>	39.16±0.86 <sup>a</sup>	176.65±5.45 <sup>a</sup>

\*ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

ตารางที่ 3 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยโปรตีน (%DH) และคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์จากเศษครีบอกปลา

		%DH	ABTS	METAL	REDUCE
%DH	Pearson Correlation	1	.921**	.968**	.948**
	Sig. (2-tailed)		.000	.000	.000
	N	36	36	36	36
ABTS	Pearson Correlation	.921**	1	.895**	.914**
	Sig. (2-tailed)	.000		.000	.000
	N	36	36	36	36
METAL	Pearson Correlation	.968**	.895**	1	.941**
	Sig. (2-tailed)	.000	.000		.000
	N	36	36	36	36
REDUCE	Pearson Correlation	.948**	.914**	.941**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	
	N	36	36	36	36

\*\* . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

หมายเหตุ: % DH คือ ระดับการย่อยโปรตีน

ABTS คือ ABTS radical scavenging activity.

METAL คือ Metal Chelating Ability

REDUCE คือ Reducing Power

### สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของระดับการย่อยโปรตีนต่อคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่ผลิตจากเศษครีบอกซึ่งเป็นเศษเหลือจากกระบวนการตัดแต่งเนื้อปลานิล โดยศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 และระยะเวลาย่อยที่แตกต่างกัน พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนและระยะเวลาย่อยส่งผลให้คุณสมบัติการต้านออกซิเดชันของไบโอแอคทีฟเปปไทด์ที่ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งสภาวะการย่อยโปรตีนที่สกัดจากเศษครีบอกปลานิลที่แสดงระดับการย่อยและกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน

สูงสุด คือ ความเข้มข้นเอนไซม์โปรตีเอส จี 6 ที่ระดับ 5.0% (v/w) ย่อยนาน 8 ชั่วโมง และค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยโปรตีนและคุณสมบัติการต้านออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กันทางบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์สำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ กอง  
ประมงต่างประเทศ. 2555. การค้าสินค้าประมงไทย  
ไตรมาส 1 ปี 2555. กรุงเทพฯ: กรมประมง  
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ขวัญฤดี วชิรัตน์พงษ์เมธี. 2551. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของ  
โปรตีนไฮโดรไลสจากโครงปลาอุกที่กักอยู่ที่ผ่าน  
การสกัดโดยใช้สภาวะต่าง. วิทยานิพนธ์วิทยา  
ศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ณัฐฐา เลาทกุลจิตต์, ไพลิน เพ็ชรทวิพรเดช, อรพิน  
เกิดชูชื่น, กนก รัตนะกนกชัย. 2554. การผลิตสาร  
ปรุงแต่งกลิ่นรสจากกากถั่วเขียวโดยใช้เอนไซม์โพร  
ติเอสทางการค้า. วารสารวิจัยและพัฒนา มจร  
34(2): 129-145.

ปัญญา โพธิ์ฐิติรัตน์. การวิเคราะห์ข้อมูลโดย SAS และ  
SPSS. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์กฤตญา  
ดา; 2550

สุภาวดี จอดนาค. 2556. กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีน  
ไฮโดรไลสจากกระดูกปลาชนิดและผลต่อเซลล์  
สร้างกระดูก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สรญา ธิมาชัย. 2554. ผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อ  
คุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนรำ  
ข้าวไฮโดรไลส. วิทยานิพนธ์

Alder-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food  
Proteins. London: Elsevier Applied Science.

AOAC. 1999. Official method of analysis association  
of AOAC international. 16th ed. Maryland: USA.

Arnao, M. B., Cano, A. and Acosta, M. 2001. The  
hydrophilic and lipophilic contribution to total  
antioxidant activity. Food Chemistry. 73: 239-  
244.

Boyer, R. F. and McCleary, C. J. 1987. Superoxide ion  
as a primary reductant in ascorbate mediated  
ferritin iron release. Free Radical Biology and  
Medicine. 3(6). 389-395.

Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida L. M.  
1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors  
of membrane lipid peroxidation and as peroxy  
radical scavengers. Archives of Biochemistry and  
Biophysics. 315: 161-169.

Fryer, A., Hume, R. and Strange, R.C. 1986. The  
development of glutathione S-transferase and  
glutathione peroxidase activities in human lung.  
Biochimica et Biophysica Acta. 833: 448 – 453.

Haslaniza, H., Maskat, M.Y., Wan Aida, W.M. and  
Mamot, S. 2010. The effects of enzyme  
concentration, temperature and incubation time on  
nitrogen content and degree of hydrolysis of  
protein precipitate from cockle (*Anadara  
granosa*) meat wash water. International Food  
Research Journal. 17: 147-152.

Kokkaew, H. 2013. Reuduction of contaminants in  
protein extracted from yellowfin tuna and tilapia  
byproducts using alkali-aided extraction for  
bioactive peptide production [The Degree of  
Doctor of Philosophy in Food Technology]. Khon  
Kaen: The Graduate School, Khon Kaen  
University; 2013. [in Thai].

Kong B.-H., Xiong Y.-L. 2006. Antioxidant activity of  
zein hydrolysate in liposome system and the  
possible mode of action. Journal of Agricultural  
and Food Chemistry. 54: 6059-6068.

Kristinsson, H. G., and Rasco, B. 2000. Biochemical  
and functional properties of Atlantic salmon  
(*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with  
various alkaline proteases. Journal of Agriculture  
and Food Chemistry. 48: 657-666.



- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *Journal of Food Engineering*. 70: 571-578.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*. 44: 307-315.
- Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 3661-3667.
- Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D. and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by product hydrolysate. *Journal of Food Science*. 68 (7): 2196 – 2200.