เอกสารวิชาการฉบับที่ ๒/๒๕๖๐

Technical Paper No. 2/2017

การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการย่อยแมงกะพรุนโดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน

Production of Bioactive Peptides from Jellyfish Hydrolyzed by Bromelain Enzyme

พิสิฐ วงศ์สง่าศรี
เบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์
วันวิสาข์ ยวงใย

Pisit Wongsa-Ngasri
Benjawan Thumthanaruk
Wanvisa Youngyai

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Fisheries Industrial Technology
Research and Development Division
Department of Fisheries
Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๒/๒๕๖๐

Technical Paper No. 2/2017

การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการย่อยแมงกะพรุน โดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน

Production of Bioactive Peptides from Jellyfish Hydrolyzed by Bromelain Enzyme

พิสิฐ วงศ์สง่าศรี
เบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์
วันวิสาข์ ยวงใย

Pisit Wongsa-Ngasri
Benjawan Thumthanaruk
Wanvisa Youngyai

กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง
๒๕๖๐

Fisheries Industrial Technology
Research and Development Division
Department of Fisheries
2017

รหัสทะเบียนวิจัย 57-0807-57034

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์	5
วิธีดำเนินการ	5
1. วัตถุดิบ	5
2. อุปกรณ์และเครื่องมือ	5
3. วิธีการทดลอง	7
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	8
1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบแมงกะพรุนดองเค็มสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)	8
2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (eb-JPH)	11
สรุปผลการทดลอง	19
ข้อเสนอแนะ	20
เอกสารอ้างอิง	21
ภาคผนวก	25

สารบาญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)	9
2	ลักษณะทางกายภาพของผงแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)	9
3	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในผงแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)	11
4	ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่สภาวะต่าง ๆ	13
5	ค่าสีของ eb-JPH ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ในสภาวะต่าง ๆ	14
6	ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของ eb-JPH	15
7	ร้อยละประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ปริมาณร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง	18

ตารางผนวกที่

1	การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่าง ๆ จาก Bovine Serum Albumin (BSA)	27

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางกายภาพของแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (a) แมงกะพรุนดองเกลือ (b) ผงแมงกะพรุนอบแห้ง	10
2	ลักษณะปรากฏของ eb-JPH ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 15 ในระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง	14
3	ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง	16
4	ขนาดโมเลกุลโปรตีนของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง (เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ)	17
5	ร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (a) ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง และ (b) ระยะเวลาการย่อย 18 ชั่วโมง	19

ภาพผนวกที่		
1	กราฟมาตรฐานของ BSA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร	27
2	กราฟมาตรฐานโปรตีนขนาดต่างๆของ SDS-PAGE ที่ 12% Gel	28
3	กราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 2-14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร	30

การผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากการย่อยแมงกะพรุน โดยใช้เอนไซม์โบรมิเลน

พิสิฐ วงศ์สง่าศรี[๑*] เบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์[๒] และ วันวิสาข์ ยวงใย[๑]
[๑] กองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง
[๒] คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้า พระนครเหนือ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) (eb-JPH) โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์โบรมิเลนและศึกษาคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้ (ระดับการย่อยสลาย ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ และน้ำหนักโมเลกุล) และสมบัติเชิงหน้าที่ (การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านเอนไซม์ angiotensin I-converting enzyme, ACE) โดยแปรปริมาณเอนไซม์โบรมิเลน (ร้อยละ 5, 10 และ 15 ของน้ำหนักตัวอย่าง) และระยะเวลาในการย่อย (3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง) พบว่า เมื่อปริมาณของเอนไซม์โบรมิเลน และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 0-3 ชั่วโมง ($P \leq 0.05$) จากนั้นระดับการย่อยสลายจะย่อยสลายเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และจะเริ่มคงที่ ซึ่งที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 เวลาการย่อย 18 ชั่วโมง eb-JPH มีค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 59.66 เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเซทพบว่า มีปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงสุดเท่ากับ 287.20 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงสุด ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก มีปริมาณเท่ากับ 46.90, 35.80 และ 33.80 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำของ eb-JPH พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 56.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบแถบสีโปรตีนขนาด 17.90 ถึง 31.59 กิโลดาลตัน

สำหรับสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์และระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น สภาวะที่มีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) และค่า TEAC สูงสุด คือสภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 15 (w/w) ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 55.67 ค่า TEAC เท่ากับ 10.616 ไมโครกรัมโทล็อกซ์ต่อสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ของ eb-JPH ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 10 และ 15 เวลาการย่อย 18 ชั่วโมง ให้ค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 62.40

คำสำคัญ: แมงกะพรุน โปรตีนไฮโดรไลเซท โบรมิเลน เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

*ผู้รับผิดชอบ: เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๐ โทร: ๐-๒๙๔๐-๖๑๓๐-๔๕ ต่อ ๔๓๑๕
Email: fluke_w2001@yahoo.com, pisitw@fisheries.go.th

Production of Bioactive Peptides from Jellyfish Hydrolyzed by Bromelain Enzyme

Pisit Wongsa-Ngasri[1*] Benjawan Thumthanaruk[2] and Wanvisa Youngyai [1]

[1]Fisheries Industrial Technology Research and Development Division, Department of Fisheries

[2]Faculty of Applied Science, King Mongkut's University of Technology North Bangkok

Abstract

The objectives of this study were to investigate the factors affecting enzymatic protein hydrolysate from jellyfish (*Lobonema smithii*) (eb-JPH) hydrolyzed by bromelain and study its qualities (degree of hydrolysis (%DH), amino acid content, water soluble protein and molecular weight) and functional properties (antioxidant activity and anti-angiotensin I-converting enzyme (Anti-ACE)). The studied factors for jellyfish hydrolysis were bromelain concentrations (5, 10 and 15% of sample) and incubation times (3, 6, 12 and 18 h). The results showed that increasing bromelain concentration and incubation time rapidly increased %DH during the first three hours ($P \leq 0.05$) after that %DH slowly increased and then stayed constant. At 15% bromelain concentration and 18 h incubation time provided the maximum %DH at 59.66%. The highest total amino acid was 287.20 mg/g sample and the first 3 highest amino acids were glycine, glutamic acid and aspartic acid which valued 46.90, 35.80 and 33.80 mg/g sample, respectively. For water soluble protein, the result was the same trend as %DH. The highest water soluble protein was 56.92 mg/ml at 15% bromelain concentration and 18 h incubation time. And SDS-PAGE revealed that molecular weight of protein 17.90 to 31.59 kDa.

For the antioxidant property, the condition that provided the highest antioxidant scavenging activity (DPPH) and TEAC value was 15% bromelain concentration and 12 h incubation time which was 55.67% and 10.616 µg trolox/ml, respectively. The highest Anti-ACE value of eb-JPH was 62.40% at 10 and 15% bromelain concentrations 18 h incubation time.

Key words: Jellyfish, Protein Hydrolysate, Bromelain, Bioactive Peptides

*Corresponding author: Kaset-klang Chatuchak, Bangkok 10900 Tel: 0-2940-6130-45 ext. 4315

Email: fluke_w2001@yahoo.com, pisitw@fisheries.go.th

คำนำ

โปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยโปรตีนด้วยสารเคมีหรือเอนไซม์ เพื่อใช้ในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ของโปรตีน ได้แก่ การเกิดโฟม การเกิดอิมัลชัน และการละลาย เป็นต้น (Damadaran *et al*., 2008) โปรตีนที่ผ่านการย่อยสลายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโนหรือเปปไทด์สายสั้น โดยเอนไซม์หรือสารเคมีจะเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยตัดพันธะเปปไทด์ ทำให้ลักษณะของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการย่อยเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท เช่น เวย์โปรตีน นม ถั่วเหลือง และโปรตีนจากแหล่งอื่นๆ (Neklyudov *et al*., 2000) ในปัจจุบันโปรตีนไฮโดรไลเซทถูกนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย เช่น เป็นส่วนผสมของผลิตภัณฑ์ในอุตสาหกรรมอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น (Radha *et al*., 2007) วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทสามารถแบ่งได้กว้าง ๆ 3 วิธี คือ (1) การผลิตโดยใช้สารเคมีที่เป็นกรด (2) ด่าง และ (3) การใช้เอนไซม์

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้กรด กรดที่ใช้ในการย่อย ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริก และกรดซัลฟูริก กรดไฮโดรคลอริกนิยมใช้มาก แต่มีข้อเสีย คือ การใช้กรดไฮโดรคลอริกในการย่อยทำให้เกิดปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ในผลิตภัณฑ์ได้ เนื่องมาจากการปรับค่าพีเอชด้วยด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ (พัสตราภรณ์ และคณะ, 2555; ธันยพร, 2550) สารละลายกรดสามารถทำปฏิกิริยาในการย่อยโปรตีนได้รวดเร็ว และให้กลิ่นรสของผลิตภัณฑ์โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ดี แต่การใช้กรดในการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทร่วมกับความร้อนมีผลทำให้เกิดตะกอนสีดำ (Black Humin) ในผลิตภัณฑ์ (Peterson and Johnson, 1978)

การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้ด่าง สารละลายด่างที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีน ได้แก่ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และสารละลายแบเรียมไฮดรอกไซด์ (วรางคณา, 2549) แต่การใช้สารละลายด่างในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทมีข้อด้อย เนื่องจากกรดอะมิโนบางชนิดเกิดปฏิกิริยา racemization สารละลายด่างเข้าไปทำลายโครงสร้างในลักษณะ L-form และผลิตกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างในลักษณะ D-form ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำกรดอะมิโนเหล่านี้ไปใช้ได้ และการใช้สารละลายด่างในการย่อยที่สภาวะรุนแรงเกิดปฏิกิริยา β-elimination ของกรดอะมิโนซีสทีน และเซอรีนทำให้เกิดสาร dehydroalanine สารประกอบนี้ไปทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ ไลซีน และซีสเตอีนทำให้เกิดสารเคมีที่เป็นพิษกับอาหาร เช่น lysinoalanine และ lanthionine (Clemente, 2000)

สำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยใช้เอนไซม์นั้น เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด สามารถควบคุมการกระจายตัวของผลิตภัณฑ์ได้เป็นอย่างดี และการใช้เอนไซม์ยังเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม (ปราณี, 2547) โดยเอนไซม์จะย่อยพันธะเปปไทด์ที่เชื่อมต่อกับกรดอะมิโนทำให้ได้ขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ และกรดอะมิโนอิสระที่มีความแตกต่างกัน (Clemente, 2000) ในปัจจุบันได้มีการนำโปรติโอไลติกเอนไซม์มาใช้ในการย่อยโปรตีนหลายชนิด เช่น เอนไซม์ปาเปน (Jeong and Hur, 2010) เอนไซม์อัลคาเลส เอนไซม์โบรมิเลน เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ฟลาโวไซม์ เป็นต้น

โดยมีขั้นตอนหลัก ๆ ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท เริ่มจากการนำวัตถุดิบโปรตีนที่เป็นผงแห้งแล้วเติมน้ำลงไป ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับค่าพีเอช และอุณหภูมิ เติมเอนไซม์ทำการย่อยในสภาวะที่

เหมาะสมโดยมีการเขย่าตลอดเวลา หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการให้ความร้อน จากนั้นนำไปปั่นหมุนเหวี่ยง แล้วเก็บสารละลายส่วนใสไปทำแห้ง ได้เป็นตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท (Chalamaiah *et al*., 2010)

โปรตีนนอกจากให้คุณค่าทางโภชนาการแล้ว ยังมีสมบัติเชิงหน้าที่ เช่น การเกิดโฟม การเป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ (Kristinsson and Rasco, 2000; นิธิยา, 2553; Galla *et al*., 2012; Pacheco-Aguilar *et al*., 2008; He *et al*., 2013; Agyare *et al*., 2009) การต้านอนุมูลอิสระ (Naqash and Nazeer, 2013; Sakanakpa *et al*., 2004) และการละลาย (Yalcin and Celik, 2007) ดังนั้น โปรตีนหลายชนิดจึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนมีความสัมพันธ์กับขนาด รูปร่าง ชนิด และโครงสร้างของโปรตีนแต่ละชนิด โดยมีรายงานการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนจากสัตว์ทะเล เช่น ปลาข้างเหลือง (Klompong *et al*., 2007) ปลาโอ (Nalinanon *et al*., 2011) กระดูกสันหลังของปลาคอด (Slizyte *et al*., 2009) หอยนางรม (Chen *et al*., 2013) และกล้ามเนื้อของปลา Pacific whiting (Pacheco-Aguilar *et al*., 2008) ส่วนโปรตีนจากพืช เช่น ถั่วเหลือง (Tsumura *et al*., 2005) โปรตีนไอโซเลตจากข้าว (ภัทราวรรณ และคณะ, 2555) เป็นต้น โดยทั่วไปพบว่าโปรตีนที่ให้สมบัติเชิงหน้าที่นั้นได้มาจากการย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง อยู่ในรูปโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยอาศัยกรด (พัสตราภรณ์ และคณะ, 2555) ด่าง และเอนไซม์ (Chalamaiah *et al*., 2010; Wang *et al*., 2007; Klompong *et al*., 2007; Zhou *et al*., 2012)

แมงกะพรุนประกอบด้วยโปรตีนประเภทคอลลาเจน ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ได้รับความนิยมบริโภคของชาวเอเชีย เนื่องจากมีคุณสมบัติทางด้านการแพทย์มากมาย เช่น ใช้ในการสมานแผล การรักษาอาการไขข้ออักเสบ (Hsieh *et al*., 2001) การรักษาโรคความดันโลหิตสูง และหลอดลมอักเสบ (วิเชียร, 2547) และจัดว่าเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง ไขมันต่ำ จึงมีความเหมาะสมที่จะนำแมงกะพรุนมาเป็นแหล่งของโปรตีนอีกทางหนึ่งซึ่งโปรตีนในแมงกะพรุนส่วนใหญ่เป็นคอลลาเจนมากถึงร้อยละ 30 (วิเชียร, 2547) ซึ่งมีความสามารถรักษาให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้น สามารถนำมาเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ความงามได้ แต่การศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ยังมีจำนวนน้อย งานวิจัยนี้จึงได้นำแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) ซึ่งเป็นเศษเหลือจากการแปรรูปแมงกะพรุนดองเกลือเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับวัสดุเศษเหลือนี้นำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนโดยทำการย่อยสลายด้วยเอนไซม์โบรมิเลน เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความแตกต่างกัน อาทิเช่น เอนไซม์ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่ผลิตโปรตีนไฮโดรเซทโดยให้สมบัติเชิงหน้าที่ที่ดีแต่ให้กลิ่นไม่ดีในผลิตภัณฑ์ จึงมีการนำเอนไซม์โบรมิเลนมาใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทเพื่อปรับปรุงกลิ่น และสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ โดยให้มีความเหมาะสมที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อื่น ๆ รวมทั้งสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ ACE เพื่อเพิ่มโอกาสในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันโรคความดันโลหิตสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสม (ปริมาณเอนไซม์ และระยะเวลา) ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน
2. ศึกษาคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ย่อยได้ เช่น ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำ ระดับการย่อยสลาย และน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท
3. ศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน เช่น การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการต้านเอนไซม์ angiotensin I-converting enzyme (ACE)

วิธีดำเนินการ

วัตถุดิบ

แมงกะพรุนที่ใช้ในการทดลองเป็นแมงกะพรุนดองเกลือส่วนร่มสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) ซึ่งเป็นเศษเหลือจากขั้นตอนการตัดแต่ง จากบริษัท มหาชัย ซีฟูดส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร

อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. โถดูดความชื้น (Desiccator)
2. เทอร์โมมิเตอร์ 0-200 °C (รุ่น 826-T2 ยี่ห้อ Testo 826-T2 ประเทศเยอรมนี)
3. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (รุ่น AG204 ยี่ห้อ Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
4. เครื่องชั่งชนิดหยาบ 2 ตำแหน่ง (รุ่น GX 400 ยี่ห้อ A&D Company, Ltd., ประเทศญี่ปุ่น)
5. เครื่องกวนชนิดแม่เหล็ก (magnetic stirrer)
6. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (รุ่น SX-700 ยี่ห้อ Tomy ประเทศญี่ปุ่น)
7. เครื่องปั่น (รุ่น MX–795N ยี่ห้อ Panasonic ประเทศญี่ปุ่น)
8. Salinometer (รุ่น S/Mill-e ยี่ห้อ ATAGO ประเทศญี่ปุ่น)
9. เครื่องวิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลโปรตีน (รุ่น Amersham ™ ECL™ Gel Box ยี่ห้อ GE Healthcare ประเทศอิสราเอล)
10. แผ่นเจลสำเร็จรูปวิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลโปรตีน (รุ่น Amersham ™ ECL™ 12% Gel ยี่ห้อ GE Healthcare ประเทศอิสราเอล)
11. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (รุ่น K424 Bushi digestion Unit และรุ่น K350 Bushi distillation Unit ยี่ห้อ Bushi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
12. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ชุดสกัดไขมัน (รุ่น B-811 ยี่ห้อ Buchi ประเทศสหรัฐอเมริกา)

13. เครื่องวิเคราะห์ความชื้น (Hot air oven) (รุ่น G 01350 ยี่ห้อ Bluem ประเทศสหรัฐอเมริกา)
14. เตาเผาเถ้า (Muffle Furnance) (รุ่น Eurotrm 91e ยี่ห้อ Scientific ประเทศอังกฤษ)
15. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (รุ่น 510 ยี่ห้อ Cyberscan ประเทศเนเธอร์แลนด์)
16. เครื่องวัดสี (รุ่น Color Quest ยี่ห้อ Hunter Lab ประเทศสหรัฐอเมริกา)
17. เครื่องวัด water activity (รุ่น CX – 2 ยี่ห้อ AQUA LAB ประเทศสหรัฐอเมริกา)
18. ชุดระเหย (Evaporator) (Rotavopor รุ่นR–114, Vacuum Controller รุ่น B-721, Waterbath รุ่น B-480 ยี่ห้อ Buchi ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
19. เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น High speed refrigerated centrifuge Suprema 21 ยี่ห้อ Tomy ประเทศญี่ปุ่น)
20. เครื่องปั่นผสม (รุ่น DI 25 digital ยี่ห้อ Yellowline ประเทศเยอรมนี)
21. เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (รุ่น UV-160A ยี่ห้อ Shimadzu ประเทศไต้หวัน)
22. ตู้อบลมร้อนแบบถาด (รุ่น FD115 ยี่ห้อ Binder ประเทศเยอรมนี)

สารเคมี

1. เอนไซม์โบรมิเลน (บริษัท K-much Industry, ประเทศไทย (enzyme activity 2,683 GDU/g))
2. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส
3. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) ยี่ห้อ Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ
4. โซเดียมซัลเฟต (Anhydrous Na_2SO_4) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์
5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ QRëC ประเทศนิวซีแลนด์
6. กรดบอริก (H_3BO_3) ยี่ห้อ Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส
8. ปิโตรเลียมอีเทอร์ ยี่ห้อ Mallinckrodt ประเทศฝรั่งเศส
9. เอทานอล (C_2H_5OH) ยี่ห้อ Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
10. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมนี
11. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid solution (TNBS) ยี่ห้อ Fluka ประเทศเยอรมนี
12. Folin-phenol reagent บริษัท VWR International Ltd. ประเทศอังกฤษ
13. Methanol ยี่ห้อ Ajax Finechem ประเทศออสเตรเลีย
14. Sodium Sulphite ยี่ห้อ PRS Panreac ประเทศสเปน
15. โปรตีนมาตรฐานวิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลโปรตีน ยี่ห้อ Novex รุ่น Mark12™ Unstained Standard ประเทศสหรัฐอเมริกา
16. สารละลายบัฟเฟอร์วิเคราะห์ขนาดมวลโมเลกุลโปรตีน ยี่ห้อ Biochemical รุ่น Vivantis, 10X Tris-Glycine-Sodium Dodecry Sulfate (TG-SDS) Buffer ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมวัตถุดิบ

นำแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่องดองเกลือส่วนร่มที่เป็นเศษเหลือจากการตัดแต่ง ที่ผ่านการบดด้วยเครื่องบด มาล้างด้วยน้ำสะอาด และแช่น้ำทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อเอาเกลือที่ติดมากับวัตถุดิบออก จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดจนกว่าแมงกะพรุนจะไม่มีเกลือติดอยู่ โดยใช้เครื่อง Salinometer วัดปริมาณเกลือ ให้มีค่าเท่ากับ 0 ppt นำไปวางบนตะแกรงเพื่อสะเด็ดน้ำ (ธรรมวัฒน์, 2552; สุทธิวัฒน์, 2554) นำแมงกะพรุนใส่ถาดเข้าอบในตู้ Tray dryer อุณหภูมิ 50 °C จนมีปริมาณน้ำอิสระเท่ากับ 0.400 ถึง 0.450 บดแมงกะพรุนที่ผ่านการอบแห้งให้ละเอียด นำมาร่อนผ่านตะแกรงที่มีขนาด 80 ช่องต่อตารางนิ้ว เก็บใส่ถุงพลาสติก แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้น (อาทิมา, 2556) เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของแมงกะพรุนดองเค็มสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

นำแมงกะพรุนอบแห้งที่ได้ มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี และกายภาพ ได้แก่ ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณโปรตีน ปริมาณกรดอะมิโน ปริมาณเถ้า (AOAC, 2000) และค่าสีด้วยเครื่อง Hunter Lab

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อย

3.1 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (enzymatic bromelain jellyfish protein hydrolysate; eb-JPH)

นำแมงกะพรุนอบแห้งข้อ 1 มาผสมกับน้ำในอัตราส่วน 1:20 (w/v) แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างให้ความร้อนอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 6 ด้วย 1 นอร์มัล NaOH และ HCl เติมเอนไซม์โบรมิเลนความเข้มข้นร้อยละ 5, 10 และ 15 ของน้ำหนักตัวอย่างแมงกะพรุนแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง เมื่อถึงเวลานำมาหยุดปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.2 การวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุน (JPH)

3.2.1 วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) วิธีของ Benjaku and Morrissey (1997) (ภาคผนวกที่ 1)

3.2.2 วิเคราะห์ค่าสีด้วยเครื่อง Hunter Lab

3.2.3 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน (ภาคผนวกที่ 2)

3.2.4 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ (Soluble protein) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธี Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวกที่ 3)

3.2.5 วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนเฉพาะสภาวะที่มีค่าระดับการย่อยสลายสูง โดยวิธี Sodium-Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (ภาคผนวกที่ 4)

3.3 ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซท

วิเคราะห์คุณสมบัติการต้าน และประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH Radical Scavenging Activity ตามวิธีของ Yen and Wu (1999) แสดงผลด้วยค่า Radical-scavenging activity และค่า Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ 5 และ 6)

3.4 ศึกษาคุณสมบัติการต้านเอนไซม์ ACE

วิเคราะห์ angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi) โดยใช้ ACE Kit (ยี่ห้อ Dojindo, Japan) (รัชนี และสุรพงษ์, 2555)

4. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองในการวิเคราะห์แบบ 3×4 factorial in RCBD (โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์) โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ค่าทางสถิติ ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT) พิจารณาค่าความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ข้อมูลทั้งหมดจะถูกแสดง เป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

1. การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีและกายภาพของวัตถุดิบแมงกะพรุนดองเค็มสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

1.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง มีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้นร้อยละ 75.09, 5.16, 8.56 และ 9.66 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับงานวิจัยของอิสรี (2552) รายงานว่าแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง มีปริมาณโปรตีน (% dry basis) ร้อยละ 75.10 ส่วนงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ (2554) ได้รายงานว่าในแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง มีปริมาณโปรตีน (% dry basis) ร้อยละ 73.27 ปริมาณโปรตีนของแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่องที่วิเคราะห์ได้มีค่าของปริมาณโปรตีนต่างกันเล็กน้อยกับแมงกะพรุนสายพันธุ์อื่น เช่น แมงกะพรุนสายพันธุ์หนัง (*Rhopilema hispidum*) ซึ่ง

มีปริมาณโปรตีนร้อยละ 68.60 (เบญจวรรณ และคณะ, 2551) แมงกะพรุนสายพันธุ์ *Stomolophus meleagris* มีปริมาณโปรตีน (% dry basis) ร้อยละ 74.87 (Hsieh *et al*., 2001) โดยโปรตีนจากแมงกะพรุนส่วนใหญ่เป็นโปรตีนคอลลาเจน (collagen) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน คือ ไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน และโปรลีน (วิเชียร, 2547) จากงานวิจัยของธรรมวัฒน์ (2552) รายงานว่าปริมาณกรดอะมิโนของคอลลาเจนที่สกัดได้จากแมงกะพรุนสายพันธุ์หนัง และสายพันธุ์ลอดช่องพบปริมาณกรดอะมิโน ไกลซีน มากที่สุด และนอกจากนี้ยังพบปริมาณกรดอะมิโน ไฮดรอกซีโพรลีน ด้วย แมงกะพรุนจึงจัดว่าเป็นอาหารเพื่อสุขภาพที่อุดมไปด้วยโปรตีนสูง ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับนำมาผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทต่อไป

ตารางที่ 1 ร้อยละขององค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

วัตถุดิบ	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	ความชื้น
แมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง	75.09±0.70	5.16±0.07	8.56±0.08	9.66±0.04

1.2 ลักษณะทางกายภาพของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

ลักษณะทางกายภาพของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง วัดค่าสีด้วยเครื่อง Hunter Lab รายงานผลในค่าของ L*, a* และ b* (ตารางที่ 2) พบว่าแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง มีค่าสี L* เท่ากับ 48.25, a* เท่ากับ 10.06 และ b* เท่ากับ 22.32 มีลักษณะเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม (ภาพที่ 1) สีของแมงกะพรุนที่เข้มขึ้นอาจเนื่องมาจากปฏิกิริยาการเกิดสีน้ำตาลที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ซึ่งเกิดขึ้นจากกรดอะมิโน โปรตีนหรือสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ที่มีอยู่ในแมงกะพรุน โดยมีความร้อนเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (นิธิยา, 2553) ผลการวิเคราะห์ปริมาณของน้ำอิสระ (water activity: a_w) ที่มีอยู่ในผงแมงกะพรุนอบแห้ง พบว่ามีปริมาณน้ำอิสระ เท่ากับ 0.430 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ และปฏิกิริยาทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งเมื่อมีค่าปริมาณน้ำอิสระต่ำกว่า 0.6 (Fellows, 2000)

ตารางที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของผงแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

วัตถุดิบ	ค่าสี			ค่า a_w
	L*	a*	b*	
ผงแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง	48.25±0.06	10.06±0.03	22.32±0.18	0.430±0.01

(a)

(b)

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (a) แมงกะพรุนดองเกลือ (b) ผงแมงกะพรุนอบแห้ง

1.3 ปริมาณกรดอะมิโนในผงแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในผงแมงกะพรุนลอดช่อง (ตารางที่ 3) พบปริมาณกรดอะมิโน 17 ชนิด มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 505.21 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อพิจารณาปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้ พบว่า กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงที่สุด ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก ฮิสทีดีน และโพรลีน มีค่าเท่ากับ 122.80, 85.90, 54.70 และ 44.30 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ เนื่องจากโปรตีนแมงกะพรุนส่วนมากเป็นคอลลาเจน ซึ่งโครงสร้างของคอลลาเจนประกอบด้วยกรดอะมิโน ไกลซีน โพรลีน และไฮดรอกซีโพรลีน เรียงตัวกันซ้ำไปมา ลำดับของกรดอะมิโนที่สามารถพบได้มากในโปรตีนคอลลาเจนคือ ไกลซีน-โพรลีน-ไฮดรอกซีโพรลีน (David, 2005) สุทธิวัฒน์ (2554) รายงานว่า ในแมงกะพรุนลอดช่องมีกรดอะมิโนสูงสุด ได้แก่ ไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน และโพรลีน ตามลำดับ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagai (1999) ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนจากแมงกะพรุน cannonball (*Stomolophu smeleagris*) พบว่ากรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในแมงกะพรุนสายพันธุ์นี้คือ ไกลซีน (309 residue/1000 residue)

ตารางที่ 3 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในผงแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง)
Glycine	122.80±0.31
Glutamic acid	85.90±0.48
Histidine	54.70±0.51
Proline	44.30±0.03
Aspartic acid	44.00±0.16
Lysine	38.10±0.21
Leucine	24.80±0.19
Valine	22.80±0.18
Isoleucine	16.90±0.09
Phenylalanine	8.60±0.08
Tyrosine	7.90±0.03
Methionine	7.60±0.04
Alanine	7.50±0.01
Threonine	7.01±0.02
Cysteine	6.60±0.03
Arginine	2.90±0.02
Tryptophan	2.80±0.02
ปริมาณกรดอะมิโนรวม	505.21±0.14

2. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยและคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (eb-JPH)

2.1 ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis)

โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่สภาวะต่าง ๆ โดยแปรปริมาณของเอนไซม์โบรมิเลน 3 ระดับ คือร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/w) ของน้ำหนักตัวอย่างแมงกะพรุนแห้ง และแปรระยะเวลาในการย่อย 4 ระดับ คือ 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 50 °C ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6

ผลการทดลองพบว่า เมื่อปริมาณของเอนไซม์โบรมิเลน และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3 ชั่วโมงแรก จากนั้น

ระดับการย่อยสลายจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และมีแนวโน้มเริ่มคงที่ (ตารางที่ 4) สอดคล้องกับการรายงานของ Mackie (1982) ซึ่งพบว่าหลังจากที่มีการย่อยโปรตีนอย่างรวดเร็วในช่วงแรกแล้ว อัตราการย่อยโปรตีนเริ่มคงที่แล้วเข้าสู่ช่วงของ stationary phase

สภาวะการย่อยสลายที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้สูงสุดคือ ที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลาการย่อย 12 และ 18 ชั่วโมง มีค่าระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 59.46 และ 59.66 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าปริมาณของเอนไซม์โบรมิเลน และระยะเวลาในการย่อยมีอิทธิพลร่วมหรือมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนแมงกะพรุนอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เมื่อถึงช่วงระยะหนึ่งส่งผลให้สารตั้งต้น และสายเปปไทด์คงที่ตลอดระยะเวลาของการย่อย (Adler-Nissen, 1986) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ (2554) ศึกษาการย่อยโปรตีนจากแมงกะพรุนสายพันธุ์หนัง (*Rhopilema hispidum*) และแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) ด้วยเอนไซม์โบรมิเลน พบว่าเมื่อปริมาณของเอนไซม์โบรมิเลน และระยะเวลาในการย่อยสลายเพิ่มขึ้นส่งผลให้ค่าระดับการย่อยเพิ่มขึ้น โดยระดับการย่อยสลายของแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่องส่วนร่มใช้ปริมาณเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 1.5 (w/v) ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง มีค่าระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 69.93 ส่วนแมงกะพรุนสายพันธุ์หนังส่วนร่มใช้ปริมาณเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 1.5 (w/v) ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง มีระดับการย่อยสลายสูงสุดเท่ากับร้อยละ 87.76 เมื่อระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมง ค่าร้อยละการย่อยสลายจะคงที่ การทำงานของเอนไซม์โบรมิเลนจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนภายในพันธะเปปไทด์ สามารถย่อยพันธะระหว่างกรดอะมิโนอะลานีนกับอาร์จินีน และอะลานีนกับกลูตามีน ไม่สามารถย่อยพันธะระหว่างกรดอะมิโนอาร์จินีนกับอาร์จินีน และไลซีนกับไทโรซีนได้ (Kunst, 2003)

เมื่อเปรียบเทียบค่าระดับการย่อยสลายของ eb-JPH กับงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ (2554) พบว่าค่าระดับการย่อยสลายน้อยกว่า โดยที่ใช้ปริมาณของเอนไซม์สูงกว่า เนื่องจากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบแมงกะพรุนเริ่มต้นแตกต่างกัน คืองานวิจัยของสุทธิวัฒน์ นำแมงกะพรุนดองเกลือที่ผ่านการล้างน้ำไปผ่านกระบวนการนึ่งโดยใช้ความดัน (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ระยะเวลา 15 นาที แล้วย่อยด้วยเอนไซม์ ในขณะที่การทดลองนี้นำแมงกะพรุนไปผ่านกระบวนการอบแห้งในตู้อบแห้งแบบถาด ที่อุณหภูมิ 50 °C ระยะเวลา 15 นาที ก่อนย่อยสลายด้วยเอนไซม์ ทั้ง 2 กระบวนการนี้มีผลทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสของวัตถุดิบแมงกะพรุนต่างกัน โดยลักษณะเนื้อสัมผัสของแมงกะพรุนในงานวิจัยของสุทธิวัฒน์มีลักษณะที่นิ่มกว่าแมงกะพรุนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จึงมีผลทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายโปรตีนแมงกะพรุนในงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ได้ดีกว่าแมงกะพรุนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ส่งผลทำให้มีค่าระดับการย่อยสลายสูงกว่า และอาจเนื่องจากโปรตีนแมงกะพรุนผ่านกระบวนการที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพมาหลายขั้นตอนตั้งแต่กระบวนการแปรรูปดองเกลือด้วย

ตารางที่ 4 ระดับการย่อยสลายของโปรตีนจากแมงกะพรุนด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่สภาวะต่าง ๆ

ปริมาณเอนไซม์	ระดับการย่อยสลาย (%DH) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)			
(% w/w)	3	6	12	18
5	50.26 ± 1.40^{bD}	52.80 ± 0.34^{bC}	56.13 ± 2.48^{bB}	57.13 ± 1.33^{cA}
10	53.40 ± 0.52^{aC}	53.00 ± 0.40^{bC}	57.26 ± 2.64^{bB}	58.26 ± 1.66^{bA}
15	54.53 ± 0.94^{aC}	56.53 ± 1.52^{aB}	59.46 ± 1.79^{aA}	59.66 ± 0.50^{aA}

หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$)

^{ABC}ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$)

2.2 คุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนในสภาวะต่าง ๆ

2.2.1 ลักษณะปรากฏและค่าสีของ eb-JPH

ลักษณะสีโดยการตรวจพินิจของ eb-JPH มีสีเหลืองใส โดยจะสังเกตว่าเมื่อปริมาณเอนไซม์เพิ่มสูงขึ้น ลักษณะสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทมีสีเข้มขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากสีของเอนไซม์ และสีที่มาจากแมงกะพรุน เมื่อระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นสีของ eb-JPH จะมีลักษณะปรากฏที่เข้มขึ้น (ภาพที่ 2)

เมื่อนำมาวิเคราะห์ค่าสีโดยใช้เครื่อง Hunter lab โดยเครื่องวัดสีจะอ่านค่ามาในรูปของ L^*, a* และ b* ผลการวิเคราะห์ค่าสี (ตารางที่ 5) พบว่าค่า L^* อยู่ในช่วงระหว่าง 52.51 ถึง 57.65

จากการวิเคราะห์ค่าสี พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยมีอิทธิพลร่วมกันหรือมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันต่อค่าสีของโปรตีนไฮโดรไลเซทอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$) จากนั้นนำมาคำนวณหาค่า Hue angle (= $\tan^{-1}$ (b*/a*)) พบว่า eb-JPH มีค่าในช่วง 45-90 แสดงสีในเฉดสีเหลือง

ตารางที่ 5 ค่าสีของ eb-JPH ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ในสภาวะต่าง ๆ

ร้อยละเอนไซม์	เวลาการย่อย (ชม.)	eb-JPH	
		L*	Hue angle
5	3	52.74±0.55[a]	71.19±0.06[de]
	6	52.67±0.59[a]	62.83±0.40[a]
	12	54.31±0.42[b]	69.97±0.02[d]
	18	52.51±0.41[a]	68.26±0.87[c]
10	3	54.01±0.49[b]	66.83±0.52[b]
	6	52.75±0.39[a]	71.53±0.19[e]
	12	54.34±0.25[b]	70.48±0.02[de]
	18	54.60±0.52[b]	77.87±0.23[g]
15	3	56.27±0.59[d]	67.98±0.13[bc]
	6	56.79±0.17[d]	73.66±0.34[f]
	12	55.49±0.24[c]	73.55±0.22[f]
	18	57.65±0.53[e]	73.14±0.04[f]

หมายเหตุ: [abc] ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

ภาพที่ 2 ลักษณะปรากฏของ eb-JPH ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ร้อยละ 15 ในระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง (เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ)

2.2.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของ eb-JPH

ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดใน eb-JPH (ตารางที่ 6) มีปริมาณของกรดอะมิโนรวมทั้งหมด 287.20 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง เมื่อพิจารณาปริมาณของกรดอะมิโนแต่ละชนิดที่วิเคราะห์ได้พบว่า กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงที่สุดใน eb-JPH ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก มีปริมาณเท่ากับ 46.90, 35.80 และ 33.80 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณของกรดอะมิโนที่พบใน

โปรตีนไฮโดรไลเซทจะมีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ต่าง ๆ ได้แก่ กรดอะมิโนกลุ่ม hydrophilic และ hydrophobic มีผลต่อการเกิดโฟม และอิมัลชัน ส่วนกรดอะมิโนกลุ่ม aromatic ring มีผลต่อสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Stadtman and Levine, 2003) เป็นต้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ งานวิจัยของ Zhuang *et al.* (2010) ศึกษาสมบัติเจลาตินจากแมงกะพรุน (*Rhopilema esculentum*) ที่มีผลต่อสมบัติการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าปริมาณของกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก โพรลีน และกรดแอสพาร์ติก ตามลำดับ

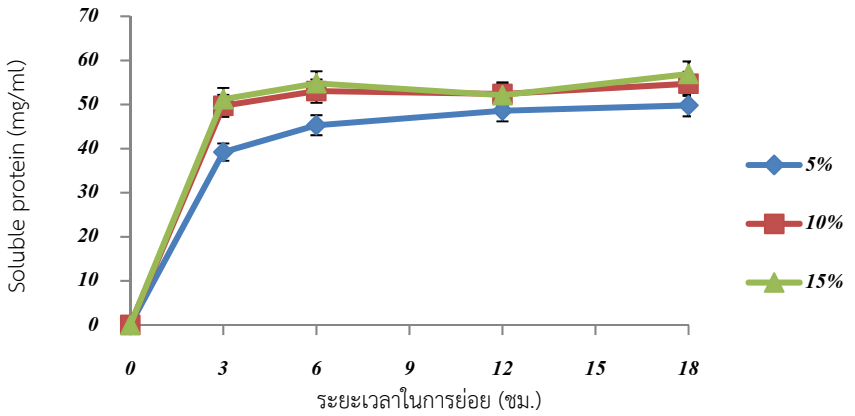
ตารางที่ 6 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของ eb-JPH

ชนิดกรดอะมิโน	ปริมาณกรดอะมิโน (มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่างไฮโดรไลเซท)
	eb-JPH
<u>กลุ่ม hydrophilic</u>	
Glycine	46.90
Cysteine	3.10
Threonine	22.60
Serine	10.50
Glutamic acid	35.80
Aspartic acid	33.80
Lysine	12.30
Histidine	3.50
Arginine	23.20
Tyrosine*	3.20
<u>กลุ่ม hydrophobic</u>	
Proline	22.40
Leucine	11.90
Valine	12.10
Isoleucine	11.40
Methionine	2.40
Alanine	23.10
Phenylalanine*	5.80
Tryptophan*	3.20
ปริมาณกรดอะมิโนรวม	287.20

* กรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็น aromatic ring

2.2.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำของ eb-JPH

ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำของ eb-JPH พบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำสูงขึ้นด้วย (ภาพที่ 3) โดย ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลา 18 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำได้สูงสุดมีค่าเท่ากับ 56.92 mg/ml เนื่องจากความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้นทำให้การย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยเอนไซม์จะเข้าตัดตรงตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) ในบริเวณสายเปปไทด์ส่งผลทำให้มีกรดอะมิโนกลุ่มที่ชอบน้ำ ทำให้มีโปรตีนที่ละลายน้ำได้มากขึ้น โดยงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ (2554) ได้ทำการวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่องส่วนร่ม และส่วนขา พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 1.5 (w/v) ที่ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้สูงสุดเท่ากับ 59.95 และ 59.1 mg/ml ตามลำดับ และการเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนมีผลต่อการเพิ่มปริมาณของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งเอนไซม์โบรมิเลนจะเข้าไปตัดสายเปปไทด์ของโปรตีนให้มีขนาดสายสั้นลง มีผลทำให้คุณสมบัติในการละลายน้ำของโปรตีนเพิ่มขึ้น เอนไซม์โบรมิเลนจะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดอะมิโนภายในพันธะเปปไทด์สามารถย่อยพันธะระหว่างกรดอะมิโนอะลานีนกับอาร์จินีน และอะลานีนกับกลูตามีน (Kunst, 2003)

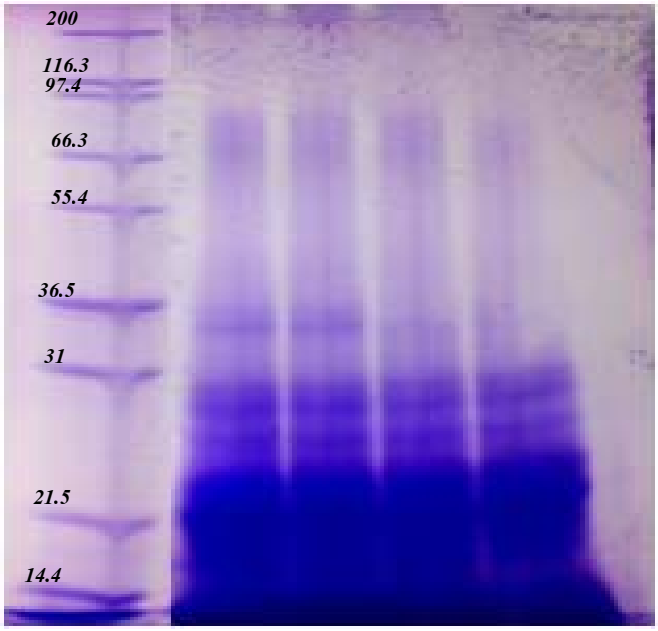


ภาพที่ 3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

2.2.4 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเซท

วิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของ eb-JPH พบว่ามีแถบสีโปรตีน 6 แถบ ได้แก่โปรตีนขนาด 17.90 ถึง 31.59 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 4) โดยผลการทดลองสอดคล้องกับผลของสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ตาม

รายงานของ Su *et al.* (2011) ซึ่งระบุว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีโมเลกุลของโปรตีนขนาดเล็กจะมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าโมเลกุลโปรตีนขนาดใหญ่ ส่วนขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่มากกว่า 10 กิโลดาลตัน สามารถมีคุณสมบัติในการเกิดโฟม และอิมัลชันได้ดี



ภาพที่ 4 ขนาดโมเลกุลโปรตีนของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง (เรียงจากซ้ายไปขวาตามลำดับ)

2.2.5 คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทโดยการวัดประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ของ eb-JPH

จากการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของ eb-JPH ซึ่งรายงานเป็นค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และค่า TEAC โดยเทียบกับสารละลายมาตรฐานของ Trolox พบว่า ความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนและระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ($P<0.05$) เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น สภาวะที่มีร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระ และค่า TEAC สูงสุดคือที่สภาวะความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 15 (w/w) ระยะเวลา 6 และ 12 ชั่วโมงซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ค่าการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับร้อยละ 55.46 และ 55.67 และค่า TEAC เท่ากับ 10.569 และ10.616 ไมโครกรัม Trolox ต่อสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (ตารางที่ 7) ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของสุทธิวัฒน์ (2554) พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 0 ถึง 0.5 (w/v) ประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) เพิ่มสูงขึ้นทุกช่วงเวลาของการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนหนัง และแมงกะพรุนลอดช่องส่วนขา มีค่าเท่ากับร้อยละ 87.20 และ 81.79 ตามลำดับ อาจเป็นผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของเอนไซม์

และระยะเวลาในการย่อยที่เพิ่มขึ้นทำให้การย่อยสลายโปรตีนให้กลายเป็นสายเปปไทด์ขนาดสั้นลงจึงทำให้สายเปปไทด์ถูกเปิดเพิ่มขึ้นและมีจำนวนสายเปปไทด์ขนาดสั้นมากขึ้น กรดอะมิโนที่อยู่ที่ปลายสายเปปไทด์สามารถให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น (Nalinanon *et al.*, 2011) ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ร้อยละอัตราการย่อยสลายของโปรตีน ชนิดของเอนไซม์ ชนิดของสายเปปไทด์ ปริมาณของโปรตีนที่สามารถละลายได้ สภาวะในการย่อยโปรตีน และกรดอะมิโนอิสระที่เกิดขึ้น (Wu *et al.*, 2003; Jun *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2010)

ตารางที่ 7 ร้อยละประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ (DPPH) ของ eb-JPH ที่สภาวะการย่อยด้วยความเข้มข้นเอนไซม์ปริมาณร้อยละ 5, 10 และ 15 (w/w) ที่ระยะเวลา 3, 6, 12 และ 18 ชั่วโมง

ร้อยละเอนไซม์	เวลาการย่อย (ชม.)	ร้อยละการยับยั้ง DPPH	TEAC (µg Trolox/ml)
5	3	35.24 ± 0.46^{i}	6.234 ± 0.099^{i}
	6	34.98 ± 0.64^{i}	6.178 ± 0.139^{i}
	12	38.51 ± 0.53^{gh}	6.936 ± 0.114^{gh}
	18	37.43 ± 0.91^{h}	6.702 ± 0.197^{h}
10	3	39.96 ± 0.40^{f}	7.245 ± 0.086^{f}
	6	39.26 ± 0.69^{fg}	7.096 ± 0.149^{fg}
	12	43.71 ± 1.02^{e}	8.051 ± 0.219^{e}
	18	46.89 ± 0.78^{d}	8.734 ± 0.169^{d}
15	3	53.00 ± 0.85^{c}	10.045 ± 0.184^{c}
	6	55.46 ± 0.19^{a}	10.569 ± 0.043^{a}
	12	55.67 ± 0.46^{a}	10.616 ± 0.099^{a}
	18	54.23 ± 0.96^{b}	10.307 ± 0.207^{b}

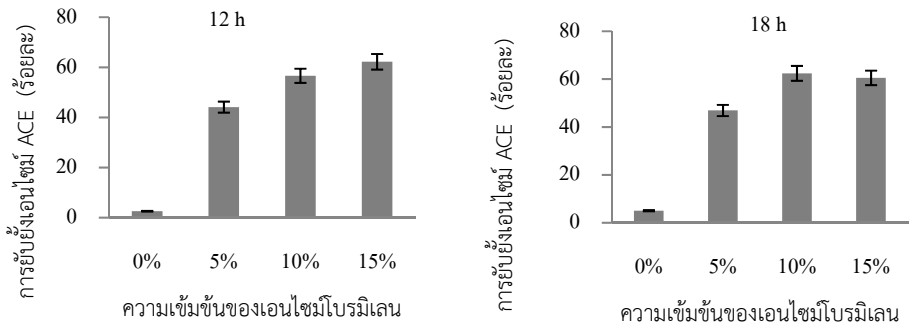
หมายเหตุ: ^{abc} ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P\leq0.05$)

2.2.6 คุณสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Angiotensin converting enzyme (ACE)

การศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Angiotensin converting enzyme (ACE) เลือกจากสภาวะของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระ และสมบัติการเป็นสารรีดิวซ์

สูงที่สุดซึ่งได้แก่ โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 5, 10 และ 15 ที่ระยะเวลาการย่อย 12 และ 18 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง ให้ค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 62.20 (ภาพที่ 5a) และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 10 ระยะเวลาการย่อย 18 ชั่วโมง ให้ค่าสูงสุดเท่ากับร้อยละ 62.40 (ภาพที่ 5b) การที่ eb-JPH มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ได้นั้น อธิบายได้จากผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดซึ่งพบว่า eb-JPH มีกรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงที่สุด 3 อันดับแรก ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก และกรดแอสพาร์ติก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liu *et al.* (2007) ที่ศึกษา Angiotensin converting enzyme (ACE) จากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยจากแมงกะพรุน (*Rhopilema esculentum*) พบว่า กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูง ได้แก่ ไกลซีน กรดกลูตามิก กรดแอสพาร์ติก และโพรลีน ตามลำดับ ซึ่งกรดอะมิโนดังกล่าวนี้ เป็นกรดอะมิโนที่มีผลต่อการยับยั้ง Angiotensin converting enzyme (ACE)



(a) (b)

ภาพที่ 5 ร้อยละการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Angiotensin converting enzyme (ACE) ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (a) ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง และ (b) ระยะเวลาการย่อย 18 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

องค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*)

องค์ประกอบทางเคมีของแมงกะพรุนอบแห้งสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*) มีปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น เท่ากับร้อยละ 75.09, 5.16, 8.56 และ 9.66 ตามลำดับ ลักษณะทางกายภาพ

เป็นผงสีน้ำตาลเข้ม มีค่าสี L* เท่ากับ 48.25, a* เท่ากับ 10.06 และ b* เท่ากับ 22.32 มีปริมาณน้ำอิสระ (water activity: a_w) เท่ากับ 0.430

แมงกะพรุนอบแห้ง มีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด 505.21 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงที่สุด 4 อันดับแรก ได้แก่ ไกลซีน, กรดกลูตามิก, ฮิสทีดีน และโพรลีน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 122.80, 85.90, 54.70 และ 44.30 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

สภาวะการย่อยและคุณภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนที่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลน (eb-JPH)

สภาวะการย่อยสลายโปรตีนสูงสุด ของ eb-JPH คือ ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 15 ระยะเวลาการย่อย 18 ชั่วโมง มีค่าระดับการย่อยสลายเท่ากับร้อยละ 59.66 ลักษณะปรากฏของ eb-JPH มีลักษณะสีเหลืองใส ค่า Hue angle มีค่าในช่วง 45-90 แสดงสีในเฉดสีเหลือง

eb-JPH มีปริมาณของกรดอะมิโนรวมทั้งหมด 287.20 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงที่สุดได้แก่ ไกลซีน กรดแอสพาร์ติก และกรดกลูตามิก มีปริมาณเท่ากับ 46.90, 35.80 และ 33.80 มิลลิกรัมต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ

ความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ เมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำสูงขึ้น โดยที่ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลา 18 ชั่วโมงให้ค่าโปรตีนที่ละลายในน้ำสูงที่สุดเท่ากับ 56.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยได้มีขนาดโมเลกุลส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 17.9 ถึง 31.59 กิโลดาลตัน

คุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ Angiotensin converting enzyme (ACE) ของโปรตีนไฮโดรไลเซส

เมื่อร้อยละการย่อยสลายของ eb-JPH เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้สมบัติการเป็นสารรีดิวซ์สูงขึ้น โดย eb-JPH มีร้อยละการต้านอนุมูลอิสระ (สมบัติการเป็นสารรีดิวซ์) และค่า TEAC สูงสุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์โบรมิเลนร้อยละ 15 ระยะเวลา 12 ชั่วโมง มีค่าร้อยละการยับยั้งอนุมูลอิสระเท่ากับ 55.67 และค่า TEAC เท่ากับ 10.616 ไมโครกรัม Trolox ต่อสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ของ eb-JPH ให้ค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 15 ระยะเวลาการย่อย 12 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 10 ระยะเวลาการย่อย 18 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 62.20 และ 62.40 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรนำสมบัติเชิงหน้าที่ที่ได้ในแต่ละค่า ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารและไม่ใช่อาหาร

2. ควรวิเคราะห์ค่า hydrophobicity ของโปรตีนไฮโดรไลเซท เพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทให้สามารถนำคุณสมบัติการเป็นอิมัลซิฟายเออร์ หรือการดูดซับไขมันไปใช้ประโยชน์เพิ่มขึ้น

3. ควรศึกษาวิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซทเป็นรูปแบบผงเพื่อง่ายต่อการเก็บรักษา และศึกษาอายุการเก็บรักษา

4. ควรศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่น เช่น Anti-inflammatory, Anti-cancer เพื่อเพิ่มโอกาสในการนำไปใช้ประโยชน์ที่หลากหลายมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ธรรมวัฒน์ คล้ายวงษ์. 2552. การสกัดและเปรียบเทียบสมบัติของคอลลาเจนจากแมงกะพรุนสายพันธุ์หนัง (*Rhopilema hispidum*) และสายพันธุ์ลอดช่อง (*Lobonema smithii*). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 107 หน้า.

ธันยพร จันท์แสนโรจน์. 2550. การผลิตและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinine*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 109 หน้า.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 487 หน้า.

เบญจวรรณ ธรรมธนารักษ์ ไพรินทร์ กปิลานนท์ ปกขวัญ หุตางกูร สุริยา ฤธาทิพย์ อุทร ชิขุนทด และ พิสิฐ วงศ์สง่าศรี. 2551. การสำรวจและศึกษาโปรตีนคอลลาเจนจากแมงกะพรุน. โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 107 หน้า.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 442 หน้า.

พัสตราภรณ์ ทองอิ่มพงษ์ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2555. การเปรียบเทียบสมบัติทางเคมี-กายภาพและประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากเมล็ดทานตะวันย่อยสลายด้วยเอนไซม์และกรด. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร (พิเศษ) 43: 513-516.

ภัทราวรรณ มหาสิงห์ ณัฏฐา เลาหกุลจิตต์ และอรพิน เกิดชูชื่น. 2555. ศักยภาพของโปรตีนไอโซเลตข้าวเป็นสารตั้งต้นของสารให้กลิ่นรสด้วยกระบวนการให้ความร้อน. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร(พิเศษ) 43: 609-612.

รัชนี ไสยประจง และ สุรพงษ์ พินิจกลาง. 2555. การยับยั้ง Angiotension I-Converting Enzyme ของเพปไทด์ที่แยกได้จากการใช้เอนไซม์ทริปซินไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากถั่ว. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. ปีที่ 43(2) (พิเศษ): 545-548.

วรางคณา สมพงษ์. 2549. การผลิตซอสปรุงรสจากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ. โครงการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2547. แมงกะพรุนอาหารใหม่สำหรับประเทศตะวันตก. วารสารอาหาร. 34: 225-228.

สุทธิวัฒน์ แซ่ฮ้อ. 2554. การผลิตผงโปรตีนเข้มข้นจากแมงกะพรุนและการประยุกต์ใช้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 133 หน้า.

อาทิมา ลือยศ. 2556. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของผงโปรตีนไฮโดรไลเซท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 127 หน้า.

อิสรี กล่อมแฟง. 2552. การพัฒนาผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มน้ำแมงกะพรุนสกัดเข้มข้น. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ. 123 หน้า.

Adler-Nissen, J. 1986. Enzymic Hydrolysis of Food Protein. Vanderbilt, New York. p. 421.

Agyare, K. K., K. Addo, and Y.L. Xiong. 2009. Emulsifying and foaming properties of transglutaminase-treated wheat gluten hydrolysate as influenced by pH, temperature and salt. *Food Hydrocolloids*, 23: 72-81.

AOAC. 2000. Official methods of analysis (17th ed.). Association of Analytical Chemists, Arlington.

Batista, I, C. Ramos, J. Coutinho, N.M. Bandarr, and M.L. Nunes. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry, 45: 18-24.

Benjakul, S. and M. T. Morrissey. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Food Chemistry*, 45: 3423–3430.

Chalamaiah, M., G.N. Rao, D.G. Rao and T. Jyothirmayi. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus merigala*) egg and evaluationof their functional properties. *Food Chemistry*. 652–657.

Chen, D., Z. Liu, W. Huang, Y. Zhao, S. Dong, and M. Zeng. 2013. Purification and characterisation of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate. Functional Foods, 5: 689-697.

Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 11: 254-262.

Damodaran, S., K. Parkin and O. R. Fennema. 2008. Fennema's Food Chemistry. Taylor & Francis Group, New York.

David, W. 2005. Proteins: Structure and Function. John Wiley & Sons Ltd. England.

Fellows, P. 2000. Food Processing Technology: Principles and Practice 2nd edition. CRC Press, Boca Raton. 575 pp.

Galla, N. R., P. R. Pamidighantam, S. Akula, and B. Karakala. 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of Channastriatus and Labeorohita. *Food Chemistry*. 135: 1479-1484.

He, S., C. Franco and W. Zhang. 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*. 50: 289-297.

Hsieh, Y-H.P., F-M. Leong and J. Rudloe. 2001. Jellyfish as food. *Hydrobiologia*. 451: 11-17.

Jeong, J. and W. Hur. 2010. Even-numbered peptides from a papain hydrolysate of silk fibroin. *Chromatography B*, 878: 836-840.

Jun, S.Y., P.J. Park, W.K. Jung and S.K. Kim. 2004. Purification and characterization of and antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Food Research and Technology*, 219: 20-26.

Klompong, V., S. Benjakul, D. Kantachote and F. Shahidi. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe treally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*. 162: 1317–1327.

Kristinsson, H.G. and B.A. Rasco. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and preparation from soy flour obtain by limited enzymatic hydrolysis of extrudates. *Innovation Food Science and Emerging Technologies*. 2: 225-234.

Kunst, T. 2003. Protein modification in optimize functionality: protein hydrolysates, In: Whitaker J,Voragen A. and Wong D. (Eds.), Handbook of Food Enzymology, New York, 222-236.

Liu, X., H. Yu, S. Liu, Z. Li, Z. Xu, and P. Li. 2007. Analysis of amino acid compositions and content in three different parts of jellyfish (*Rhopilema esculentumkishinouye*). *Marine Sciences.* 3(2): 9-12.

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.

Mackie, I. M. 1982. Fish protein hydrolysate. *Process Biochemistry*. 17: 26-28.

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.

Nagai, T. 1999. Collagen of edible jellyfish exumbrella. *Journal of Science of Food and Agriculture*, 79: 855-858.

Naqash, S.Y. and R.A. Nazeer. 2013. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science Technology*. 50: 972-978.

Neklyudov, A. D., A. N. Ivankin and A. V. Berdutina. 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. *Appiled Biochemistry and Microbiology*. 36: 452-459.

Pacheco-Aguilar, R., M.A. Mazorra-Manzano, and J.C. Ramırez-Suarez. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*. 109: 782–789.

Peterson, M.S. and A.H. Johnson. 1978. Encyclopedia of Food Science. AVI Publishing Company, Connecticut, p1005.

Radha, C., P.R. Kumar, and V. Prakash. 2007. Preparation and characterization of a protein hydrolysatefrom an oilseed flour mixture. *Food chemistry*. 1166–1174.

Sakanaka, S., Y. Tachibana, N. Ishihara, and L.R. Juneja. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86: 99-103.

Slizyte, R., R. Mozuraityte, O. Martınez-Alvarez, E. Falch, M. Fouchereau-Peron and T. Rustad. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (Gadusmorhua) backbones. *Process Biochemistry*. 668–677.

Stadtman, E.R. and R.L. Levine. 2003. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino acid*s. 25(3-4): 207-218.

Su, G., J. Ren, B. Yang, C. Cui, and M. Zhao. 2011. Comparison of hydrolysis characteristics on defatted peanut meal proteins between a protease extract from AspergillusOryzae and commercial protease. *Food Chemistry*, 126(3): 1306-1311.

Tsumura, K., T. Saito, K. Tsugea, H. Ashida, W. Kugimiya and K. Inouye. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT*. 38: 255–261.

Wang, J.S., M.M. Zhao, Q.Z. Zhao and Y. Jiang. 2007. Antioxidant properties of papain hydrolysates of wheat gluten in different systems. *Food Chemistry*. 101: 1658-1663.

Wu, H. C., H.M. Chen and C.Y. Shiau. 2003. Free amino acid and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberau striasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.

Yalcin, E. and S. Celik. 2007. Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. *Food Chemistry*, 104: 1641-1647.

Yen, G., and J. Wu. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extract from Ganodermatsugae. *Food Chemistry*. 65: 375-379.

Zhou, K., S. Sun and C. Canning. 2012. Production and functional characterisation of antioxidativehydrolysates from corn protein via enzymatic hydrolysis and ultrafiltration. *Food Chemistry*, 135: 1192-1197.

Zhuang, Y., L. Sun, X. Zhao, H. Hou and B. Li. 2010. Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro". Food Technology Biotechnology, 48: 222-228.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1 วิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (% Degree of hydrolysis)

วิเคราะห์ตามวิธีของ Benjakul and Morrissey (1997) ใช้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแมงกะพรุนปริมาณ 125 ไมโครลิตร มาผสมกับ 0.2125 โมลาร์ของ phosphate buffer ที่ pH 8.2 จำนวน 2 มิลลิลิตร และผสมกับร้อยละ 0.01 ของ TNBS จำนวน 1 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากัน นำสารตัวอย่างไปให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อนที่มีอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 30 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสาร 0.1 โมลาร์ของ Sodium sulfite จำนวน 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ตรวจสอบอัตราการย่อยสลายโดยการนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer Degree of hydrolysis คำนวณได้จากสมการ ดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis} = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

โดย L_t คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่เวลาใดๆ ของตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรด

L_0 คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรที่ไม่ได้ย่อยด้วยกรด

L_{max} คือ ค่าดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตรของตัวอย่างที่ย่อยด้วยกรดความเข้มข้นสูงสุด นำตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยกรดมา 500 ไมโครลิตรมาผสมกับ 6 นอร์มัลของ HClจำนวน 4.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสมาปรับให้เป็นกลางด้วย NaOH ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธีดังกล่าว

ภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโน

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท 5 กรัมไปย่อยด้วยเครื่อง Block Heater (Model SBH 130D, Stuart Scientific, Manchester, UK) ที่อุณหภูมิ 110 °C 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปทำให้เข้มข้นชะด้วยแก๊สไนโตรเจน และนำไปเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร และกรองด้วยเซลลูโลส 0.45μm (VertiPure™ CA Syringe Filter, Vertical Chromatography Co., Ltd. Bangkok, Thailand) และกรดอะมิโนถูกตรวจสอบโดยนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง (RP-HPLC Model 1200, Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA, USA) และตรวจสอบด้วย ELSD (Model 3300, Alltech®, Deerfield, IL, USA) และใช้กรดอะมิโน 19 ชนิด เป็นกรดอะมิโนมาตรฐานได้แก่ L-alanine, L-arginine, L-aspartic acid, L-cystine, L-glutamic acid, L-glycine, L-histidine, L-isoleucine, L-leucine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-proline, L-serine, L-threonine, L-tryptophan, L-tyrosine และ L-valine

ภาคผนวกที่ 3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำด้วยวิธี Lowry *et al.* (1951) เป็นการทำปฏิกิริยาของ cupric ion (Cu^{2+}) กับอะตอมไนโตรเจนของพันธะเปปไทด์ โดยที่ cupric ion (Cu^{2+}) จะถูกรีดิวซ์เป็น cuprous ion (Cu^{3+}) เมื่อทำการเติมสารละลาย Folin-Ciocalteau สารละลายจะกลายเป็นสีน้ำเงินซึ่งเป็นสีของ molybdenum tungsten blue ที่มีความสามารถในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร โดยนำมาเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA)

วิธีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเตรียมสารละลาย ดังนี้

1. สารละลาย A: 2% (w/v) Na_2CO_3 ใน 0.1N NaOH
2. สารละลาย B: 1% (w/v) Potassium Sodium Tartrate ละลายในน้ำกลั่น
3. สารละลาย C: 0.5% (w/v) $CuSO_4.5H_2O$ ละลายในน้ำกลั่น
4. สารละลาย D: ผสมสารละลาย A B และ C ในอัตราส่วน 48:1:1 ตามลำดับ
5. สารละลาย Folin: Folin Reagent ผสมน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1

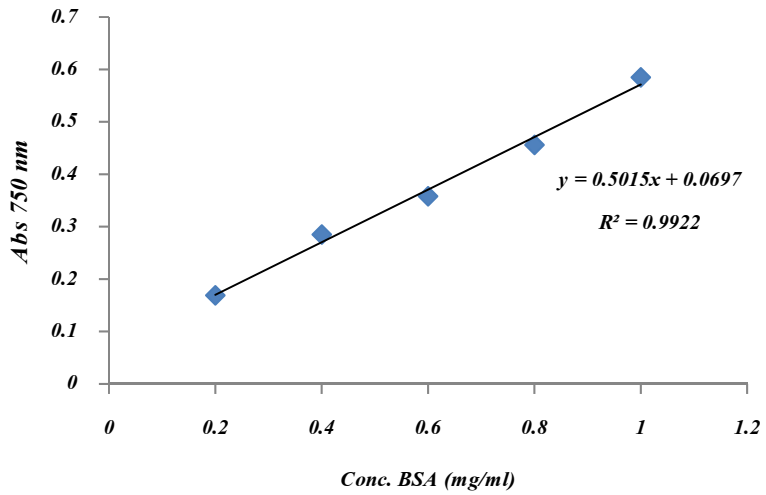
วิธีการวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับสารละลาย D 2 ml ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม 0.2 ml ของสารละลาย Folin ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร สารละลายมาตรฐานใช้ Bovine Serum Albumin (BSA) ความเข้มข้น 1 mg/ml เจือจางให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 mg/ml แสดงดังตารางผนวกที่ 1

ตารางผนวกที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานที่มีความเข้มข้นของโปรตีนระดับต่าง ๆ จาก Bovine Serum Albumin (BSA)

หลอดที่	สารละลายโปรตีนมาตรฐาน (µl)	น้ำกลั่น (µl)	ความเข้มข้นโปรตีนสุดท้ายของสารละลาย (mg/ml)
Blank	-	100	0.0
1	20	80	0.2
2	40	60	0.4
3	60	40	0.6
4	80	20	0.8
5	100	0	1.0

กราฟมาตรฐานของ BSA



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของ BSA ที่ค่าการดูดกลืนแสง 750 นาโนเมตร

ภาคผนวกที่ 4 การวิเคราะห์มวลโมเลกุล

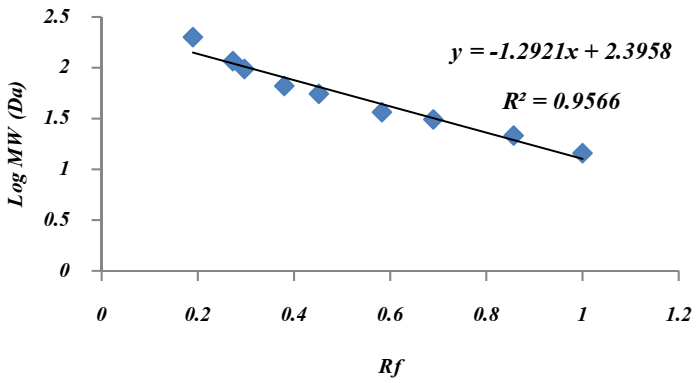
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุล โดยใช้วิธี Sodium dodecyl sulphate-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ที่ความเข้มข้น 12% gel โดยใช้แถบโปรตีนมาตรฐานขนาด 6.0-200 kDa เปรียบเทียบ ใช้ตัวอย่างสารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซท และโปรตีนมาตรฐาน ผสมกับ 2X Sample buffer อัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 95 °C เวลา 3 นาที จากนั้นแช่น้ำแข็งทันที นำชุดอุปกรณ์อิเล็คโตรโฟริซิสแบบแนวนอน (GE Healthcare, Model Amersham ™ ECL™ Gel Box, Israel) ต่อเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (BIO-RAD, Model Power Pac 300, USA) เทสารละลายสารละลายบัฟเฟอร์ (10X Tri-Glycine-Sodium Dodecry Sulfate (TG-SDS) Buffer) ข้างละ 90 มิลลิลิตรนำแผ่นเจลสำเร็จรูปมาวางบนชุดอุปกรณ์ ปรับสภาพเจลกับสารละลายบัฟเฟอร์ 10X Tris-Glycine-Sodium Dodecry Sulfate (TG-SDS) Buffer โดยเปิดกระแสไฟฟ้า 160V เป็นเวลา 12 นาที ใส่สารละลายโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผสมกับ 2X Sample buffer ปริมาณ 35 µl ใส่ในแต่ละช่องของแผ่นเจล เปิดกระแสไฟฟ้า 160 V รอจนแถบโปรตีนเคลื่อนจนสุดแผ่นเจล นำแผ่นเจลไปย้อมสี

วิธีย้อมสีโปรตีน

1. ตัดเจลเอาแต่เฉพาะส่วน Lower gel
2. นำมาย้อมสีเจลด้วย coomasie brilliant blue ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง และล้างสีส่วนเกินในเจลออกด้วย destain จนสีของเจลใส วัดระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่ คำนวณค่า Rf (refractive mobility) ตามสูตร

$$Rf = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะที่ bromophenol blue เคลื่อนที่}}$$

เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่า Rf กับค่า log MW ของโปรตีนมาตรฐาน เพื่อคำนวณหาขนาดของโปรตีนตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานโปรตีนขนาดต่าง ๆ ของ SDS-PAGE ที่ 12% Gel

ภาคผนวกที่ 5 การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระวิธี DPPH Radical Scavenging Activity

การวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH Scavenging Activity ดัดแปลงจากวิธีของ Yen and Wu (1999) โดยใช้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท 1 มิลลิลิตรผสมกับ 0.15 มิลลิโมลาร์ของ DPPH ปริมาตร 2 มิลลิลิตรที่ละลายในเอทานอล 95 เปอร์เซนต์ผสมตัวอย่างอย่างรวดเร็วจากนั้นตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีในที่มืดวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร และคำนวณดังสูตร

Radical-scavenging activity = ((B-A)/B) X 100

A คือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์
B คือ Blank ที่ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

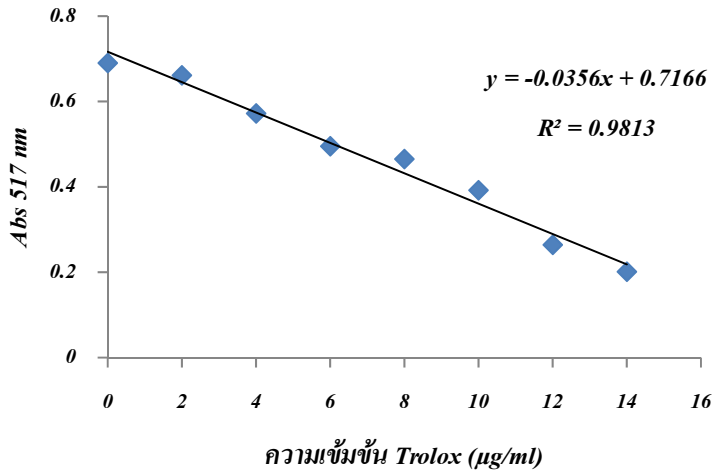
ภาคผนวกที่ 6 ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH$^{\bullet}$) เทียบกับ Trolox

การวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท โดยเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพการยับยั้งอนุมูลอิสระของสาร Trolox ต่อสาร DPPH ซึ่งแสดงด้วยค่า Trolox Equivalent Antioxidant Activity (TEAC) หน่วยเป็น ไมโครกรัม Trolox/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเซท

1) เตรียมสารละลาย 0.15 มิลลิโมลาร์ DPPH$^{\bullet}$ เตรียมโดยชั่ง DPPH$^{\bullet}$ (Mw = 394.32) 0.0591 กรัม ละลายในเอธานอลร้อยละ 95 และปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรที่ห่อด้วย aluminum foil จากนั้นเขย่าให้ DPPH$^{\bullet}$ ละลายเข้ากัน

2) สารละลายมาตรฐาน Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (Mw = 250.29) นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน Trolox

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Trolox ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยดูดสารละลายมาตรฐาน Trolox แต่ละความเข้มข้น ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร เติมสารละลาย 0.15 มิลลิโมลาร์ DPPH$^{\bullet}$ 1 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของ Trolox ไปสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน การวัดค่า TEAC ของตัวอย่าง ให้ใช้ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซท 1,000 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.15 มิลลิโมลาร์ของ DPPH ปริมาตร 1 มิลลิลิตรตั้งทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่ออ่านค่า TEAC (ไมโครกรัม Trolox/มิลลิลิตรโปรตีนไฮโดรไลเซท)



ภาพผนวกที่ 3 กราฟมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 2-14 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร