



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)
กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ
เค็มบักนุดระหว่างกระบวนการหมัก

**Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant
Activities and Biochemical Changes of Kem-Buk-Nud during Fermentation**

โดย ปญณ์ พรหมโชติ

ธันวาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของ

เค็มปักันระหว่างกระบวนการหมัก

**Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant
Activities and Biochemical Changes of Kem-Buk-Nud during Fermentation**

ปัญญ์ พรหมโชติ

สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. สกว. และ ม.อบ. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ประจำปีงบประมาณ 2554 ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รศ. ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล สังกัดสาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นักวิจัยพี่เลี้ยง ที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ส่งเสริม และสนับสนุนในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และสุดท้ายขอขอบคุณครอบครัวที่เป็นกำลังใจสำคัญในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ปัญญา พรหมโชติ

ธันวาคม 2557

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 5480064
ชื่อโครงการ: กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)
กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ และการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเค็มบักนัด
ระหว่างกระบวนการหมัก
ชื่อนักวิจัย: ดร. ปัญญ์ พรหมชาติ
สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
อีเมล: pan.p@ubu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี

เค็มบักนัดเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักกับเกลือและสับปะรดซึ่งจัดเป็นผลิตภัณฑ์พื้นบ้านของภาคอีสาน แต่เค็มบักนัดไม่ค่อยเป็นที่รู้จักของผู้บริโภคทั่วไปจึงมีจำหน่ายเฉพาะท้องถิ่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการขาดข้อมูลคุณค่าทางโภชนาการและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลดีต่อสุขภาพ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี การยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) การต้านอนุมูลอิสระ และกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก เค็มบักนัด ตัวอย่างเค็มบักนัดผลิตโดยผู้ผลิตทางการค้า 4 ตัวอย่าง ได้แก่ เค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) รัตนสิน (R) มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างมีปริมาณความชื้นร้อยละ 69.92-73.19 โปรตีนร้อยละ 6.19-8.93 ไขมันร้อยละ 1.53-2.49 เถ้าร้อยละ 9.10-13.75 และ ปริมาณเกลือร้อยละ 8.24-12.40 ผลการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของเค็มบักนัดระหว่างกระบวนการหมักพบว่าค่า pH ของเค็มบักนัดลดลงซึ่งสอดคล้องกับผลปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก ระดับการย่อยสลายของโปรตีนมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ค่าดังกล่าวลดลงภายหลังการหมัก 3 เดือนซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับค่าปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide) ที่มีแนวโน้มลดลงภายหลังการหมัก 4 เดือนซึ่งอาจแสดงถึงการรวมตัวกันของโปรตีนสายสั้น อย่างไรก็ตามปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N) และปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ไนโตรเจน (Formaldehyde nitrogen) มีปริมาณเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 6 เดือน แสดงให้เห็นว่าเกิดการย่อยสลายโปรตีนตลอดระยะเวลาการหมักเค็มบักนัด การย่อยสลายโปรตีนระหว่างกระบวนการหมักดังกล่าวส่งผลต่อกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ เค็มบักนัดทุกตัวอย่างแสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and $ABTS^{\bullet+}$ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (แม้ว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของเค็มบักนัดจะมีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นซึ่งให้ผลตรงกันข้ามกับกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$

แต่ค่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} (0.72-0.87 mmole TE/g protein) มีค่าสูงกว่ากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] (0.062-0.173 mmole TE/g protein) ในช่วงการหมัก 6 เดือน ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของตัวอย่างเค็มบักนัด L มีค่าสูงกว่าตัวอย่างอื่นภายหลังการหมัก 4 เดือน ($p < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า เค็มบักนัดมีสมบัติการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ขณะที่ความสามารถในการจับโลหะลดลงอย่างรวดเร็วภายหลังการหมัก 1 เดือน เค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างแสดงกิจกรรมการยับยั้ง ACE โดยกิจกรรมดังกล่าวมีค่าเพิ่มสูงสุดภายหลังการหมัก 2-3 เดือน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE และกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเค็มบักนัดขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายของโปรตีนระหว่างกระบวนการหมัก

นอกจากนี้งานวิจัยนี้ยังศึกษาบทบาทของเอนไซม์โปรตีนเอสในการย่อยสลายโปรตีนระหว่างกระบวนการหมัก ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรตีนเอสในปลาสวายที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเค็มบักนัด พบว่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสวายสามารถเกิดกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส การเร่งกิจกรรมดังกล่าวเกิดขึ้นสูงสุดที่ pH 7-8 และยังพบการเร่งกิจกรรมได้สูงที่ pH 3-4 ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบกิจกรรมของโปรตีนเอสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายซึ่งพบว่าโปรตีนเอสสกัดดังกล่าวสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH 3 และ 8.5 ซึ่งมีนัยว่ากลุ่มโปรตีนเอสหลักในกล้ามเนื้อปลาสวายน่าจะเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม Acid และ Alkaline proteinase อย่างไรก็ตามกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น เอนไซม์โปรตีนเอสสกัดมีเสถียรภาพที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาวะ pH 3 และ 8.5 เอนไซม์โปรตีนเอสสกัดสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC 59.49 Units/mg protein และ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC 40.18 Units/mg protein นอกจากนี้ยังพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของโปรตีนเอสสกัดถูกยับยั้งด้วย *p*-tosyl-Lphenylalanyl-Chloromethylketone (TPCK) Soybean trypsin inhibitor (STI) และ Luepeptin ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดได้มากกว่าร้อยละ 76 ซึ่งผลการทดลองเหล่านี้แสดงถึงบทบาทของ Chymotrypsin และ Trypsin-like proteinase ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของ Serine proteinase เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างเค็มบักนัดที่หมักไว้เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC และ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ได้สูง ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนเอสหลักในเค็มบักนัดจัดอยู่ในกลุ่ม Chymotrypsin-like และ Trypsin-like proteinase

คำหลัก : เค็มบักนัด, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE), กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ,
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

Abstract

Project Code : MRG 5480064

Project Title : Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity, Antioxidant Activities and Biochemical Changes of Kem-Buk-Nud during Fermentation

Investigator : Pan Promchote
Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture,
Ubon Ratchathani University

E-mail Address : pan.p@ubu.ac.th

Project Period : 2 years

Kem-Buk-Nud, a fermented fish product with salt and pineapple, is an indigenous product of North Eastern part of Thailand. Unfortunately, the product is only available locally for consumption. This might be due to lack of scientific information about nutritional value and antioxidant activity for health promotion. Therefore, the objectives of this study were to investigate chemical compositions, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidant activities of Kem-Buk-Nud during fermentation period. Protein degradation related to ACE inhibitory activity and antioxidant activities during fermentation period was also elucidated. Kem-Buk-Nud was processed by four different manufacturers, including Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), in Ubon Ratchathani in order to better assess their contribution. Their chemical compositions were significantly different ($p < 0.05$). The moisture content, protein, lipid, ash and salt contents of all Kem-Buk-Nud samples were 69.92-73.19%, 6.19-8.93%, 1.53-2.49%, 9.10-13.75% and 8.24-12.40%, respectively. During Kem-Buk-Nud fermentation, a dramatic decrease in pH value was observed. This result highly related to the increasing of total acidity. Degree of protein hydrolysis increased rapidly during 3 months and then was slightly decreased over the Kem-Buk-Nud fermentation period as well as the trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide which tended to be decrease after 4 months of fermentation period, indicating that protein aggregation would be occurred. However, protein was hydrolyzed throughout 6 months of Kem-Buk-Nud fermentation as the increasing of total volatile base nitrogen (TVB-N) and formaldehyde nitrogen were observed. Kem-Buk-Nud exhibited ACE inhibitory

activity and antioxidant activities over the fermentation period. (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH[•]) radical scavenging activity increased while 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS^{•+}) radical scavenging activity decreased with increasing of Kem-Buk-Nud fermentation period. However, the higher ABTS^{•+} radical scavenging activity of all samples (0.72-0.87 mmole Trolox equivalent/mg protein) were found when compared to DPPH[•] radical scavenging activity (0.062-0.173 mmole Trolox equivalent/mg protein). After 4 months of Kem-Buk-Nud fermentation, DPPH[•] and ABTS^{•+} radical scavenging activities tended to be high in L sample rather than in other samples, indicating product with highest antioxidant activity. Reducing power of Kem-Buk-Nud also increased with increasing fermentation period whereas a dramatic decrease in chelating activity of all Kem-Buk-Nud samples was observed after 1 month of fermentation. In addition, ACE inhibitory activity of samples was highly increased during 2-3 months of fermentation time. These results indicated that antioxidant activities and ACE inhibitory activity of Kem-Buk-Nud depended on the degree of protein hydrolyzation during fermentation.

In addition, the role of proteinase activities on protein degradation during fermentation was studied. Autolysis activity of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*), a raw material of Kem-Buk-Nud production, was highest at temperature of 65 °C and both pHs 3-4 and 7-8. Crude proteinase extracts exhibited the highest activity at 60 °C. Optimum pH of crude proteinase extracts was found at 3 and 8.5, suggesting the presence of both acid and alkaline. Activity of crude proteinase extracts decreased with increasing of NaCl concentration. Crude proteinase extracts was stable for up to 8 h at temperature of 30 and 60 °C and pHs of 3 and 8. Crude proteinase extracts preferentially cleaved Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC (59.49 Units/mg protein) and Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (40.18 Units/mg protein). In addition, the results found that *p*-tosyl-L-phenylalanyl-Chloromethylketone (TPCK) Soybean trypsin inhibitor and Luepeptin inhibited activities of crude proteinase extracts more than 76 %, indicating chymotrypsin and trypsin-like characteristics. Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC and Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC was strongly hydrolyzed by the crude proteinase from Kem-Buk-Nud throughout 6 months fermentation. Thus, predominant proteinase in the crude proteinase from Kem-Buk-Nud would be a chymotrypsin-like and trypsin-like proteinase.

Keywords: Kem-Buk-Nud, Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE), Antioxidant activity, Fermented fish product

Executive summary

เค็มบักนัดเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักกับเกลือและสับปะรด แต่อย่างไรก็ตามเค็มบักนัดยังเป็นที่รู้จักในกลุ่มผู้บริโภคที่จำกัด การให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณค่าทางโภชนาการและการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลดีต่อสุขภาพเป็นแนวทางหนึ่งเพื่อการส่งเสริมด้านการตลาด เค็มบักนัดเกิดกระบวนการหมักแบบธรรมชาติบางครั้งทำให้เกิดปัญหาในการควบคุมคุณภาพและระยะเวลาการหมัก การทราบข้อมูลเกี่ยวกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาสวายที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเค็มบักนัดและกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในเค็มบักนัดสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการผลิตเค็มบักนัดให้มีประสิทธิภาพได้ในอนาคต ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน การยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) และการต้านอนุมูลอิสระและศึกษาบทบาทของเอนไซม์โปรติเนสต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด

ผลการศึกษาค้นคว้าประกอบทางเคมีพบว่าเค็มบักนัดจากผู้ผลิตทั้ง 4 รายได้แก่ แม่อาเรีย (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) รัตนสิน (R) มีปริมาณความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 69.92-73.19 ตัวอย่างเค็มบักนัด L มีปริมาณโปรตีนสูงสุด (8.93 ± 0.19) รองลงมาคือตัวอย่าง A (6.54 ± 0.51) K (6.54 ± 0.51) และ R (6.19 ± 0.06) ตามลำดับ ปริมาณไขมันในเค็มบักนัดมีปริมาณต่ำร้อยละ 1.53-2.49 เค็มบักนัดมีปริมาณเกลืออยู่ระหว่างร้อยละ 8.24-12.40 ปริมาณถ้ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเกลือที่ใช้ในการผลิตเค็มบักนัด ค่า pH ของเค็มบักนัดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนและปริมาณเกลือ ค่า pH ของเค็มบักนัดลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะภายหลังการหมัก 1 เดือน ขณะเดียวกันปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างมีค่าเพิ่มขึ้น กระบวนการย่อยสลายโปรตีนของเค็มบักนัดเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก 6 เดือน ผลดังกล่าวแสดงโดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณต่างทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N) ปริมาณฟอสฟอรัสไฮโดรเจน และปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide)

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ พบว่า เค็มบักนัดมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรต่อการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันดังจะเห็นจากผลของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} แม้ว่าแนวโน้มกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และ ABTS^{•+} จะให้ผลตรงกันข้าม กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ขณะที่กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} มีแนวโน้มลดลง แต่ตลอดระยะเวลาการหมักเค็มบักนัดแสดงสมบัติต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเค็มบักนัดมีสมบัติการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น แต่สมบัติการจับโลหะมีค่าลดลงภายหลังการหมัก 1 เดือน เค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างประกอบด้วยเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรม ACE ได้ กิจกรรมยับยั้ง ACE ของเค็มบักนัดมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการหมักที่ระยะเวลา 2-3 เดือน เค็มบักนัด L มีกิจกรรมการยับยั้ง ACE สูงสุด รองลงมาคือเค็มบักนัด A กิจกรรมการยับยั้ง ACE ขึ้นอยู่กับการย่อยสลายของ

โปรตีนระหว่างกระบวนการหมัก ผลการศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในเค็มบักนัด L ซึ่งมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและยับยั้ง ACE สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ พบว่า กรดอะมิโนหลักของเค็มบักนัดหมัก 0-6 เดือน ได้แก่ กลูตามิก เอสปาดิก และลิซีน แต่มีปริมาณซีสเทอีนและฮิสติดีนต่ำ ปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นของเค็มบักนัด ได้แก่ ไลซีน ฟีนิลอะลานีนและไทโรซีน มีปริมาณเทียบเท่ากับกับปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ FAO/WHO กำหนด

การศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเค็มบักนัดที่อุณหภูมิ 0 28 40 50 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่าระดับการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสดมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และทั้งที่สภาวะเป็นด่าง (pH 7-8) และสภาวะกรดที่ pH 3-4 การย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาสดลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0-20% และพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายมีค่าลดลงประมาณ 50 % ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 % ผลการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อปลาสด (crude enzyme) โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้นพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนเอสแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส และที่ pH 3 และ 8.5 ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าทั้ง acid และ alkaline proteinase น่าจะเป็นกลุ่มโปรตีนหลักในกล้ามเนื้อปลาสด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีเสถียรภาพที่ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ในสภาวะ pH 3 และ 8.5 เอนไซม์โปรตีนเอสมีความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC (59.49 Units/mg protein) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อเอนไซม์ ทริปซิน (Trypsin) และ แอลฟาทรอมบิน (α -Thrombin) สารสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (40.18 Units/mg protein) ที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) ในขณะที่สารตั้งต้นสังเคราะห์ตัวอื่นๆ ได้แก่ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC Boc-Val-Leu-Lys-AMC Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ที่มีความจำเพาะต่อทริปซิน พลาสมิน (Plasmin) คาเทปซิน บี (Cathepsin B) และ คาเทปซิน-แอล (Cathepsin L) เกิดกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ได้น้อยกว่า 18.8-24.86 Units/mg protein สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสในกลุ่ม Chymotrypsin และ Trypsin ได้แก่ *p*-tosyl-Lphenylalanyl-Chloromethylketone (TPCK) Soybean trypsin inhibitor และ Luepeptin สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากปลาสดได้มากกว่าร้อยละ 76 และยังพบว่าผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ acid proteinase โดยสารยับยั้งประเภท Pepstatin ผลการทดลองดังกล่าวอาจสามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์ที่แสดงกิจกรรมเป็นโปรตีนเอสในกลุ่ม Chymotrypsin และ Trypsin-like proteinase เมื่อพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ในเค็มบักนัดที่หมักไว้เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC และ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ได้สูง ส่วนเอนไซม์ Cathepsin B และ Cathepsin L มีกิจกรรมการย่อยสลายสารตั้งต้น Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ได้ต่ำตลอดระยะเวลาการหมักเค็มบักนัด ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าโปรตีนดังกล่าวจัดอยู่ในกลุ่ม Chymotrypsin-like และ Trypsin-like proteinase

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ศึกษาอิทธิพลการย่อยสลายโปรตีน การยับยั้ง ACE และการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด
2. ศึกษาบทบาทของเอนไซม์โปรตีนเนสต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด

วิธีทดลอง

1. ศีกษากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน การยับยั้ง ACE และการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด

1.1 ตัวอย่างเค็มบักนัด

ตัวอย่างเค็มบักนัดผลิตโดยผู้ผลิตเค็มบักนัด 4 รายได้แก่ แม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) สูตร กระบวนการผลิต และขนาดบรรจุของเค็มบักนัดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับผู้ผลิตแต่ละราย เค็มบักนัดในขวดแก้วปิดฝาจีบบรรจุกล่องกระดาษซึ่งรองด้วยแผ่นฟองน้ำกันกระแทกด้านล่างและด้านข้างกล่องขนส่งมายังห้องปฏิบัติการคณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานีภายหลังจากการผลิตเสร็จสิ้นไม่เกิน 24 ชั่วโมง หมักเค็มบักนัดในกล่องกระดาษปิดสนิท กล่องละ 12 ขวด นาน 6 เดือน ที่อุณหภูมิห้อง สุ่มเค็มบักนัดตัวอย่างละ 6 ขวดทุกเดือน

1.2 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

บดผสมเค็มบักนัดด้วยเครื่องผสม (Waring laboratory, Torrington, CT) เบอร์ 5 นาน 1 นาที และ เบอร์ 10 นาน 30 วินาที วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ปริมาณเกลือ ค่าความเป็นกรดทั้งหมด และวัดค่า pH ตามวิธี AOAC (2000)

1.3 การย่อยสลายโปรตีน

1.3.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble protein) และปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (Trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide) ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดวิเคราะห์โดยนำตัวอย่าง 1 กรัม เติม 5% Sodium dodecyl sulfate (SDS) บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส 60 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 x g 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บส่วนใสวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ทั้งหมดตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลายมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) ส่วนปริมาณโอลิโกเปปไทด์ทำโดยการชั่งตัวอย่าง 1 กรัม เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 5% 9 มิลลิลิตร จำนวน 10 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 11000 rpm 1 นาที บ่มในน้ำแข็ง 30 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10000 x g 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วัดปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลายมาตรฐานไทโรซีน

1.3.2 ปริมาณฟอรัลดีไฮด์ไนโตรเจน (Formaldehyde nitrogen) ดัดแปลงวิธีของ Nash (1953) ตัวอย่าง จำนวน 2.5 กรัม เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 5% จำนวน 10 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที บ่มในน้ำแข็ง 30 นาที กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 สกัดตัวอย่างซ้ำอีก 1 รอบ รวมรวมส่วนใสและปรับพีเอชด้วย 1 N NaOH ให้ได้ pH 6-6.5 ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม Acetylacetone reagent 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ทำให้เย็นโดยใช้น้ำไหลผ่าน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์มาตรฐานและใช้น้ำกลั่นเป็น blank

1.3.3 ปริมาณค่าที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile basic nitrogen, TVB-N) ด้วยวิธี Conway microdiffusion assay ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม เติมกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 4% จำนวน 8 มิลลิลิตร โฮโมจีไนซ์ที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที บ่มในน้ำแข็ง 30 นาทีเพื่อให้ตกตะกอน กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นวิเคราะห์โดยใช้จานคอนเวย์ เติมสารละลายผสมระหว่างบอริก 1% และอินดิเคเตอร์ 1 มิลลิลิตร ในวงแหวนรอบในของจานคอนเวย์ ส่วนวงแหวนรอบนอกใส่ตัวอย่างและโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิมตัวอย่างละ 1 มิลลิลิตร ปิดจานคอนเวย์ก่อนผสมตัวอย่างกับโปแตสเซียมคาร์บอเนตอิมตัว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 100 นาที จากนั้นไทเทรตด้วย 0.02 N HCl คำนวณค่า TVB-N

$$\text{TVB-N (mg N/100 g ตัวอย่าง)} = \frac{N \times 14 \times (A-B) \times V \times 100}{W}$$

N คือ normality ของ HCL ที่ใช้ไทเทรต

A คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ HCL ที่ใช้ไทเทรตตัวอย่าง

B คือ ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ HCL ที่ใช้ไทเทรต Blank

V คือ ปริมาตรรวมของตัวอย่างและ TCA ที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่าง

W คือ น้ำหนักตัวอย่างเริ่มต้น (กรัม)

1.3.4 วัดระดับการย่อย วัดระดับการย่อยโดยการวิเคราะห์ Free amino acid group content (Benjakul and Morrissey, 1997) ส่วนใส 125 ไมโครลิตร เติม 0.2125 M phosphate buffer (pH 8) จำนวน 2 มิลลิลิตร และ 0.01% TNBS (3.41 mM) จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ผสมตัวอย่างให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 30 นาที ในที่มืด เติม 0.1 M sodium sulfite จำนวน 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน L-leucine และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดโดยการย่อยตัวอย่างด้วย HCl เข้มข้น 6 N ก่อนวิเคราะห์ free amino acid จากนั้นคำนวณระดับการย่อย (degree of hydrolysis) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979)

1.4 วิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระ

การโฮโมจีไนซ์ตัวอย่างจากข้อ 1.1 ที่ความเร็วรอบ 11000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3000 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสวิเคราะห์สมบัติต้านอนุมูลอิสระ

1.4.1 วิเคราะห์ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity ดัดแปลงจาก Anusha *et al.* (2008) เตรียมตัวอย่างสารละลายเค็มบักนัดให้มีความเข้มข้น 3 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร จากนั้นผสมตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร กับ 0.1 mM DPPH 1.95 มิลลิลิตร บ่ม ในที่มืด 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน Trolox

1.4.2 วัดค่า 2-2'-azinod-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) ตามวิธีของ Wiriyaphan *et al.* (2011) เตรียมสารละลาย ABTS (7.4 mM ABTS, 2.6 mM potassium persulfate ใน 10 mM phosphate buffer pH 7.4) เก็บในที่มืด 16 ชั่วโมงก่อนใช้ จากนั้นเจือจางสารละลาย ABTS ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (10 mM sodium phosphate-buffered saline (pH 7.4) ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.70 ± 0.02 ที่ 734 nm จากนั้นผสมตัวอย่างสารละลายเค็มบักนัดเข้มข้น 3 มิลลิกรัม โปรตีน/ มิลลิลิตร จำนวน 20 ไมโครลิตร กับ สารละลาย ABTS เจือจาง 1980 ไมโครลิตร เขย่า 30 วินาที ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เปรียบเทียบกับสารละลาย Trolox มาตรฐาน

1.4.3 Reducing Power ดัดแปลงวิธีของ Ahmadi *et al.* (2007) ตัวอย่างสารละลายเค็มบักนัดเข้มข้น 3 มิลลิกรัม โปรตีน/ มิลลิลิตร จำนวน 250 μ L ผสมกับ 0.2 M Phosphate buffer (pH 6.6) จำนวน 1.25 มิลลิลิตร และ 1% Potassium ferricyanide จำนวน 1.25 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เติม 10 % TCA จำนวน 1.25 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ 1500 x g 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสจำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และ 0.1 % ferric chloride 0.2 มิลลิลิตร แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร เปรียบเทียบกับสารละลาย Trolox มาตรฐาน

1.4.4 Metal-chelating activity ตามวิธีของ Decker and Welch (1990) ตัวอย่างสารละลายเค็มบักนัดเข้มข้น 3 มิลลิกรัม โปรตีน/ มิลลิลิตร จำนวน 1 มิลลิลิตร เติมน้ำ 3.7 มิลลิลิตร 2 mM Ferrous chloride 0.1 มิลลิลิตร และ 5 mM ferrozine 0.2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 เปรียบเทียบตัวอย่างโดยใช้ น้ำกลั่น คำนวณ % Metal-chelating activity โดยใช้สูตร $(1 - (A_{562} \text{ of sample} / A_{562} \text{ of control})) \times 100$

1.5 การวิเคราะห์การยับยั้ง ACE ดัดแปลงจากวิธีของ Zhao *et al.* (2007) and Hajji *et al.* (2010) ตัวอย่างสารละลายเค็มบักนัดเข้มข้น 1 mg/ml 50 μ l ผสมกับ ACE solution (25 mU/ml) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติม substrate (8.3 mM Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) ใน 50 mM sodium borate buffer ที่มี 0.5 M NaCl ที่ pH 8.3) นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติม 0.1 M HCl 200 μ l และเติม ethyl acetate 1.5 mL จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4000 xg 15 นาที เก็บส่วนใส 1 มล.นำไปประเหยที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นละลายตัวอย่างด้วยน้ำ DI 3 มล. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร คำนวณ % inhibition

1.6 วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างเค็มบักนัดเดือนที่ 0- 6 ด้วยวิธี HPLC

2. ศึกษาบทบาทของเอนไซม์โปรตีนต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก เค็มบักนัด

2.1 ศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรตีนในปลาสวาย โดยการศึกษาากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนของเนื้อปลาสวายที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเค็มบักนัด

2.1.1 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาสวาย

2.1.1.1 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายตัวเองของปลาสวาย
วิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาโดยเอนไซม์ในเนื้อปลาตามวิธีของ Geene and Babbitte (1990) โดยใช้ตัวอย่างเนื้อปลาสด 3 กรัม บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 0 28 40 50 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และวัดปริมาณโอลิโกเปปไทด์โดยวิธี Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน

2.1.1.2 ศึกษาผลของพีเอช

ศึกษาผลของพีเอชต่อการกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลา โดยบ่มตัวอย่างในสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 3-11 โดยที่พีเอช 3-8 ใช้ MaLlvaine's buffer พีเอช 8.5-9.0 ใช้ 0.2 M Tris-HCl buffer และ พีเอช 9-11 ใช้ 0.1 M Glycine-NaOH buffer แล้วบ่ม ณ อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดซึ่งได้จากการทดลองข้อ 2.1.1.1 เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ โดยวิธี Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน

2.1.1.3 ศึกษาผลของเกลือ

ศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลา โดยใช้ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0-20 % และทำการบ่ม ณ อุณหภูมิที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมสูงสุดซึ่งได้จากการทดลองข้อ 2.1.1.1 เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ โดยวิธี Lowry *et al.* (1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน

2.2 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสกัดจากปลาสวายและเค็มบักนัด

2.2.1 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในเนื้อปลาสวาย

2.2.1.1 การสกัดเอนไซม์ในเนื้อปลา

สกัดเอนไซม์ (crude enzyme) โดยการปั่นผสมเนื้อปลากับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 2 จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 15,000 x g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ้าขาวบาง และผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 สารละลายส่วนใสที่ได้คือเอนไซม์โปรตีน

2.2.1.2 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรตีน

วิเคราะห์กิจกรรมโปรตีนโดยใช้เคซีนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารตั้งต้น บ่มสารละลายผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที

หยุดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยสารละลาย TCA วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์โดยวิธี Lowry *et al.* (1951)

2.2.1.3 ศึกษาอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในเนื้อปลา

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 0 28 40 50 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส บ่มในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7 และศึกษาพีเอชที่เหมาะสมในช่วง 3-11 โดยบ่มในสารละลายบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับข้อ 2.1.1.2 ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้เคซีนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารตั้งต้น บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที หยุดกิจกรรมเอนไซม์ด้วยสารละลาย TCA วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์

2.2.1.4 ศึกษาเสถียรภาพของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.2.1.3 โดยใช้เคซีนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารตั้งต้น

2.2.1.5 ศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอส โดยแปรความเข้มข้นของเกลือ 0-3 โมลาร์ โดยใช้เคซีนเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นสารตั้งต้น บ่มกับสารละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ซึ่งได้จากการทดลอง

2.2.2 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักเค็มบักนัด

สกัดเอนไซม์โปรตีนเอส (crude enzyme) โดยการปั่นผสมเนื้อปลากับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 ในอัตราส่วน 1: 2 จากนั้นปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเอนไซม์ที่ความเร็วรอบ 15,000 x g ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที กรองสารละลายส่วนใสผ้าขาวบาง และผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 สารละลายส่วนใสที่ได้คือเอนไซม์โปรตีนเอสที่ใช้เพื่อการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ดังนี้

2.2.2.1 ศึกษาผลของสารยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนเอสเพื่อจำแนกประเภทของโปรตีนเอสตามกลุ่มกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่ active site ของเอนไซม์

ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสโดยใช้ตัวอย่างเอนไซม์โปรตีนเอสเติมสารยับยั้งโปรตีนเอสชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ pepstatin A, E-64 (trans-Epoxy succinyl-L-Leucylamido-(4-guanidino) butane), leupeptin, , Phenylmethyl sulfonyl fluorid (PMSF), *p*-tosyl-L phenylalanyl-Chloromethylketone (TPCK), Soybean trypsin inhibitor (STI) และ Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) จากนั้นบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิสูงสุดที่เอนไซม์โปรตีนเอสแสดงกิจกรรม วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ โดยวิธี Lowry *et al.* (1951) โดย

ใช้สารละลายไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน จากนั้นคำนวณระดับการยับยั้งกิจกรรม (Degree inhibition)

2.2.2.2 ศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นสังเคราะห์ของเอนไซม์เพื่อจำแนกประเภทของเอนไซม์

ศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นโดยใช้สารสังเคราะห์ ได้แก่ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Suc-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC ตามวิธีของ Barrett and Kirschke (19981) วิเคราะห์ค่าการเรืองแสงของสารที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์ โดยใช้ค่า excitation และ emission ที่ 380 และ 460 นาโนเมตร ตามลำดับ

2.2.2.3 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนระหว่างกระบวนการหมักแบคทีเรียโดยการเตรียมตัวอย่างเอนไซม์สกัดจากแบคทีเรียที่ระยะเวลาการหมัก 0 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ปั่นผสมตัวอย่างให้ละเอียด กรองผ่านผ้าขาวบาง และกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้น dialyze ตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 1 คืน เพื่อกำจัดเกลือในตัวอย่างไม่ให้รบกวนการกรองผ่าน ultrafiltration ที่มี molecular weight cut-off 10,000 ดาลตัน เก็บตัวอย่างในส่วน retentate เพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนชนิดต่างๆ ดังนี้

2.2.2.3.1 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน โดยการผสมสารละลายประกอบด้วย สารสังเคราะห์ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC เข้มข้น 10 uM จำนวน 100 uL สารละลายบัฟเฟอร์ (tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 8.2) จำนวน 800 uL และสารสกัดตัวอย่าง 10 ug protein/mL จำนวน 100 uL ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2.2.3.2 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยการผสมสารละลายประกอบด้วย สารสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Agr-AMC เข้มข้น 10 uM จำนวน 100 uL สารละลายบัฟเฟอร์ (tris-HCl 100 mM, CaCl₂ 100 mM, pH 7.8) จำนวน 800 uL และสารสกัดตัวอย่าง 10 ug protein/mL จำนวน 100 uL ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2.2.3.3 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาเพซิน-แอล ผสมสารละลายประกอบด้วย สารสังเคราะห์ Z-Phe-Arg-AMC เข้มข้น 10 uM จำนวน 100 uL สารละลายบัฟเฟอร์ (sodium citrate 340 mM, EDTA 4 mM, DTT 8 mM, pH 5.5) จำนวน 800 uL และสารสกัดตัวอย่าง 10 ug protein/mL จำนวน 100 uL ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

2.2.2.3.4 วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์คาเพซิน-บี ผสมสารละลายประกอบด้วย สารสังเคราะห์ Z-Arg-Arg-AMC เข้มข้น 10 uM จำนวน 100 uL สารละลายบัฟเฟอร์ (K₂H₂PO₄ 88 mM, Na₂HPO₄ 12 mM, EDTA 1.33 mM, DTT 8 mM, pH 6.0) จำนวน 800 uL และสารสกัดตัวอย่าง 10 ug protein/mL จำนวน 100 uL ปั่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

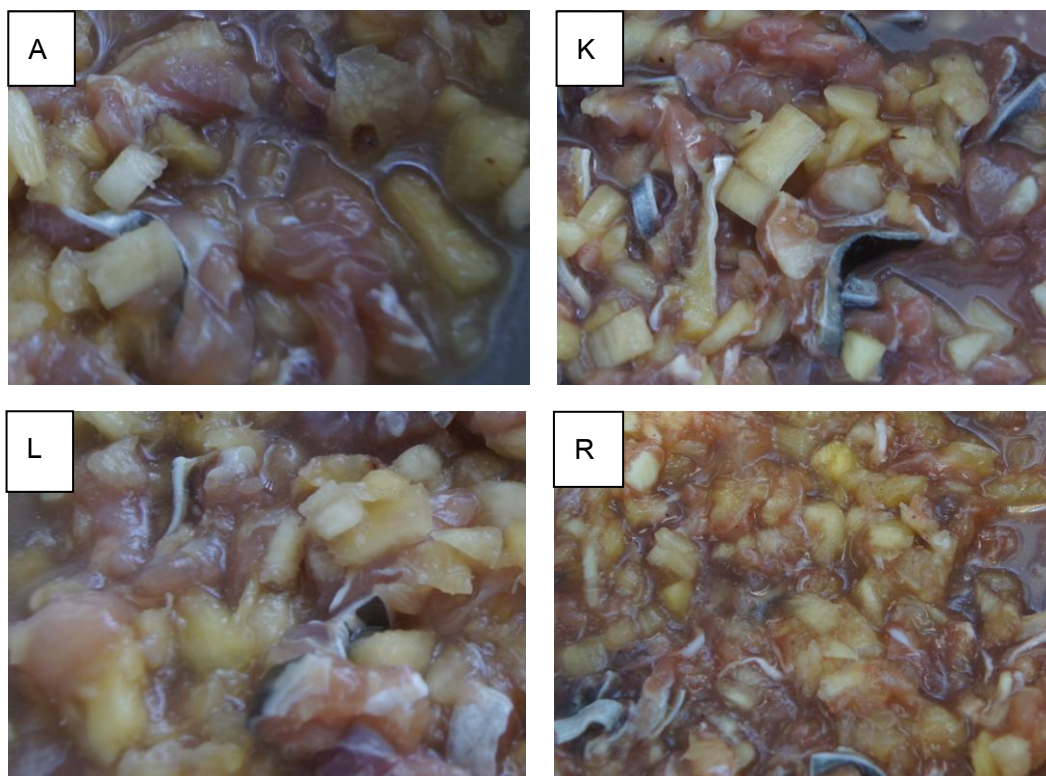
ข้อ 2.2.2.3.1-4 ภายหลังการบ่มหยุดปฏิกิริยาด้วยสารผสม stopping solution (methanol: n-butanol: dl water =35:30:35 v/v/v) จำนวน 1.5 มล. วัด fluorescence intensity ที่ excitation wavelength of 380 nm and an emission wavelength of 460 nm. ตัวอย่างควบคุมเตรียมโดยการไม่เติม synthetic substrate หลังจากเติม stopping solution เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน AMC ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 50, 70 uM ในสารละลาย DMSO

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ส่วนที่ 1 ศึกษากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีน การยับยั้ง ACE และการต้านอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด

องค์ประกอบทางเคมีของเค็มบักนัด

เค็มบักนัดโดยทั่วไปผลิตโดยการผสมเนื้อปลากับเกลือหมักไว้ 1 คืน ก่อนการผสมกับสับปะรดและบรรจุส่วนผสมลงในขวดแก้วฝาจีบ หมักในที่มืดนาน 3 เดือนก่อนการจำหน่าย ความแตกต่างของสูตรส่วนผสมและกระบวนการผลิตส่งผลให้ลักษณะปรากฏของเค็มบักนัดจากผู้ผลิตทั้ง 4 รายได้แก่ แม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) รัตนสิน (R) มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 1) ซึ่งจะสังเกตเห็นขนาดชิ้นปลาและชิ้นสับปะรดแตกต่างกัน นอกจากส่วนผสมเนื้อปลา เกลือและสับปะรดแล้ว ผู้ผลิตบางรายยังมีการเติมข้าวแดงเป็นส่วนผสมในอัตราส่วนเล็กน้อยแตกต่างกันไป



ภาพที่ 1 ลักษณะเค็มบักนัดยี่ห้อแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และ รัตนสิน (R)

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของเค็มบักนัดพบความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง โดยตัวอย่างเค็มบักนัด L มีปริมาณโปรตีนสูงสุด รองลงมาคือตัวอย่าง K A และ R ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ปริมาณโปรตีนในเค็มบักนัดเป็นผลรวมของปริมาณไนโตรเจนจากเนื้อปลาและสับปะรด เค็มบักนัดมีปริมาณโปรตีนร้อยละ 6.19-8.93 ปริมาณโปรตีนในเค็มบักนัดถือว่าอยู่ในเกณฑ์

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน 148 (2548) ซึ่งกำหนดให้เค็มบักนัดต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 5 ปริมาณไขมันในเค็มบักนัดมีปริมาณต่ำร้อยละ 1.53-2.49 และมีปริมาณเกลืออยู่ระหว่างร้อยละ 8.24-12.40 ซึ่งผลดังกล่าวแสดงปริมาณใกล้เคียงกันกับรายงานวิจัยของ จิตรา และคณะ (2549) ซึ่งรายงานปริมาณเกลือของเค็มบักนัด 4 แหล่งได้แก่ ยี่ห่อแม่อารีย์ รัตนสิน แม่กิมชัวและยายเล็ก ว่ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 9.83-12.64 เค็มบักนัดจัดเป็นอาหารหมักที่ใช้เกลือในระดับปานกลางเมื่อเทียบกับปลาหมักหรือแหนมซึ่งเป็นอาหารหมักประเภทเกลือต่ำหรือเทียบกับน้ำปลาซึ่งเป็นอาหารหมักประเภทเกลือสูง ปริมาณเถ้าและเกลือของเค็มบักนัดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอัตราส่วนเนื้อปลากับสับปะรดและปริมาณเกลือ ความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์และอัตราการหมัก และยังมีผลต่อรสชาติและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ต่อการบริโภค (Kose and Hall, 2010) และจากผลการทดลองพบว่าปริมาณเถ้ามีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณเกลือในการผลิต เค็มบักนัดซึ่งจะสังเกตเห็นว่าตัวอย่าง K ซึ่งมีปริมาณเถ้าสูงจะมีปริมาณเกลือสูงกว่าตัวอย่างอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) Thongthai and Srisutipruti (1989) และ Phithakpol *et al.* (1995) รายงานองค์ประกอบทางเคมีของเค็มบักนัดว่ามีปริมาณความชื้นร้อยละ 57.3-74 โปรตีนร้อยละ 5.9-6.0 เถ้าร้อยละ 12.2-14 เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10.9-13.9 น้ำตาลร้อยละ 3.4 กรดแลกติกร้อยละ 1.0-1.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.3-4.6 และปริมาณน้ำอิสระ 0.83

การเปลี่ยนแปลงโปรตีนระหว่างกระบวนการหมักของเค็มบักนัด

ค่า pH เริ่มต้นของเค็มบักนัดก่อนการหมักมีค่าระหว่าง 4.90-5.23 ขณะที่ปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าระหว่าง 0.91-1.06 (ตารางที่ 1) สาเหตุที่ทำให้ค่า pH แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณโปรตีนซึ่งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ (buffering agent) และปริมาณเกลือ จากผลการทดลองจะเห็นว่าแม้ตัวอย่าง K มีปริมาณโปรตีนต่ำ แต่มีปริมาณเกลือสูงส่งผลให้ค่า pH สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ นอกจากนี้ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดยังขึ้นอยู่กับอัตราส่วนสับปะรดและความแก่-อ่อนของสับปะรดที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ตัวอย่าง K และตัวอย่าง R มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่าง A และ L อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าตัวอย่าง K และ R มีอัตราส่วนสับปะรดสูงกว่าตัวอย่างอื่น Tadpitchayangkoon *et al.* (2010) รายงานว่าอัตราส่วนสับปะรดต่อเนื้อปลาส่งผลต่อค่า pH ของตัวอย่างโดยตัวอย่างเค็มบักนัดที่มีอัตราส่วนเนื้อปลาต่อสับปะรด 30:70 มีค่า pH ต่ำกว่าตัวอย่างที่มีอัตราส่วนเนื้อปลาต่อสับปะรด 50:50 ค่า pH ของเค็มบักนัดลดลง เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วหลังเริ่มหมัก 1 เดือน เนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์กลุ่มแลกติก ค่า pH ลดลงต่ำสุดเมื่อเค็มบักนัดมีอายุการหมัก 3 เดือน (pH 3.81-4.40) เพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังการหมัก 4 เดือน และค่อนข้างคงที่ตลอดการหมัก 6 เดือน ขณะเดียวกันปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยเฉพาะในตัวอย่าง A และ L แสดงให้เห็นว่าตัวอย่างดังกล่าวเกิดกระบวนการหมักจากการผลิตกรดแลกติกโดยจุลินทรีย์มากกว่าตัวอย่างอื่น (ภาพที่ 2) การเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดเนื่องมาจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ตามธรรมชาติซึ่งติดมากับ

วัตถุดิบหรือระหว่างกระบวนการผลิต โดยการหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลในสับปะรดซึ่งเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตและเป็นกรดแลคติกโดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (สุวรรณ และคณะ, 2527)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R)

องค์ประกอบทางเคมี	ตัวอย่างเค็มบักนัด ¹			
	A	K	L	R
ความชื้น (%)	73.19±0.67 ^a	69.92±0.22 ^b	71.36±0.44 ^b	71.52±0.50 ^b
โปรตีน (%)	6.54±0.51 ^b	6.63±0.39 ^b	8.93±0.19 ^a	6.19±0.06 ^c
	(24.40±1.90)	(22.05±1.32)	(31.20±0.66)	(21.74±0.21)
ไขมัน (%)	1.96±0.13 ^b	2.49±0.20 ^a	1.53±0.10	1.92±0.35 ^b
	(7.32±0.51)	(8.28±0.69)	(5.04±0.35)	(6.78±1.24)
เถ้า (%)	9.16±0.30 ^c	13.75±0.22 ^a	9.51±0.23 ^b	9.10±0.15 ^c
	(34.17±1.14)	(45.72±0.74)	(33.23±0.81)	(31.95±0.54)
NaCl (%)	8.24±0.38 ^b	12.40±0.93 ^a	8.60±0.27 ^b	8.44±0.42 ^b
pH	4.90±0.14 ^c	5.23±0.07 ^a	4.97±0.07 ^b	4.93±0.06 ^c
Total acidity (% lactic acid) ^{ns}	0.92±0.06	1.06±0.04	0.91±0.01	1.0±0.10

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง % ฐานแห้ง

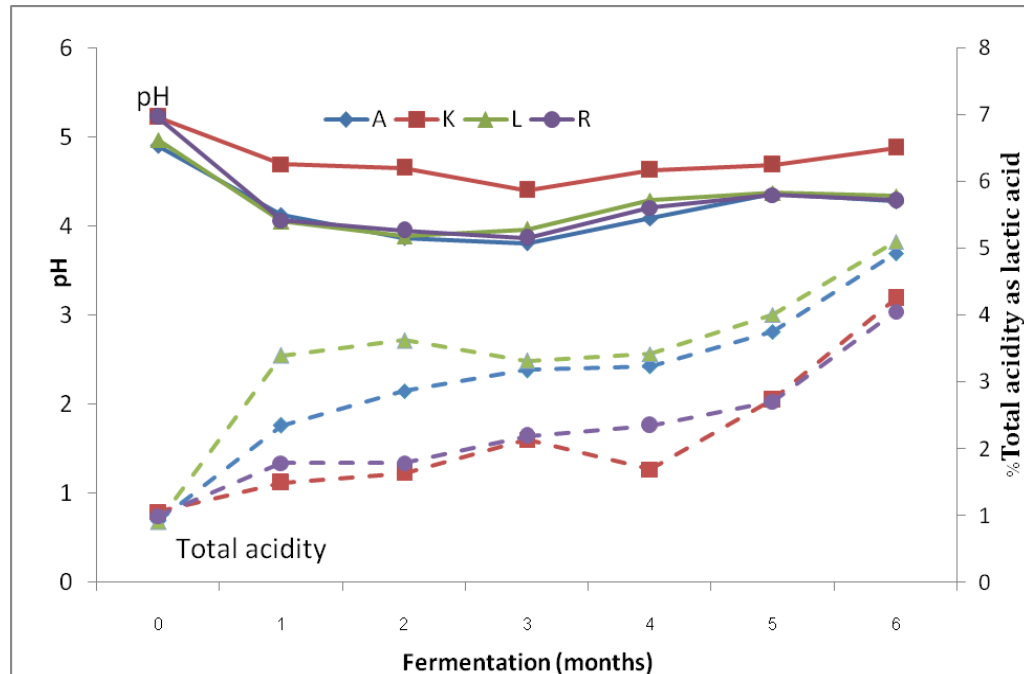
¹ ตัวอย่าง A K L และ R หมายถึงเค็มบักนัดแม่อารีย์ แม่กิมซัว ยายเล็ก และรัตนสินตามลำดับ

a,b,c,d ตามแนวนอนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 %

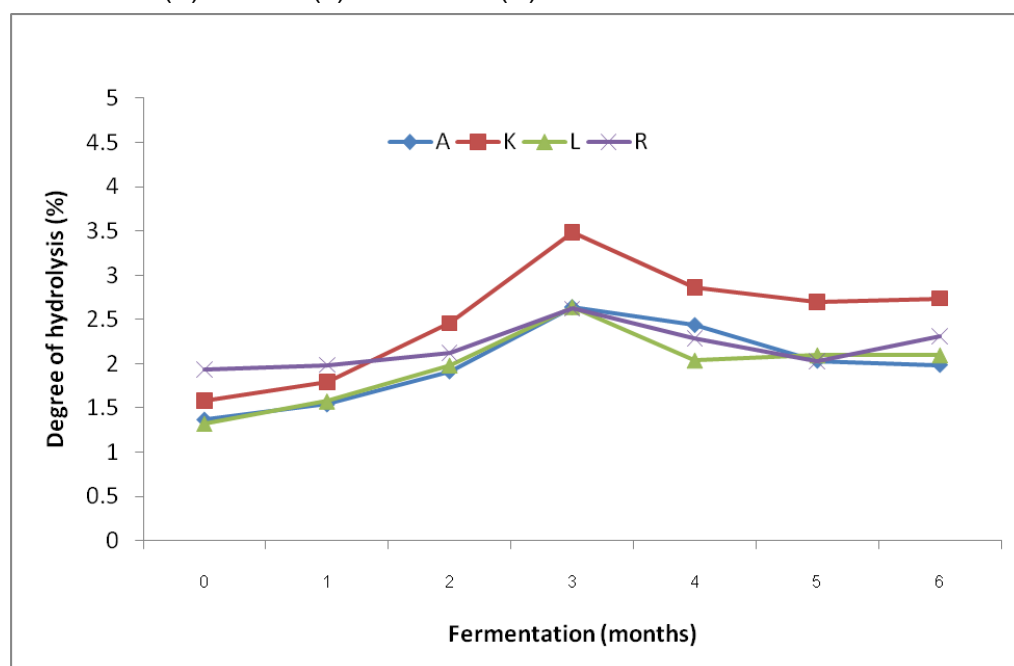
^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโปรตีนของเค็มบักนัดในระหว่างกระบวนการหมักแสดงดังภาพที่ 3-6 เค็มบักนัดเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนระหว่างกระบวนการหมักซึ่งแสดงให้เห็นจากผลของระดับการย่อยสลาย (ภาพที่ 3) อัตราการย่อยสลายของเค็มบักนัดเกิดขึ้นได้มากในระยะ 3 เดือนแรก จากนั้นกิจกรรมการย่อยสลายเค็มบักนัดค่อยๆ ลดระดับลง การลดลงของระดับการย่อยอาจเป็นไปได้ว่าโปรตีนเกิดการรวมตัวกันภายหลังการหมัก 3 เดือน ส่งผลให้โอลิโกเปปไทด์หรือกรดอะมิโนที่ละลายได้ในสารละลายโปรตีนส่วนใสลดลง แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนยังดำเนินต่อไปตลอดการหมัก 6 เดือน ซึ่งจะเห็นได้จากการลดลงของ pH ในระยะ 3 เดือนแรกและ pH ค่อนข้างคงที่ในช่วง 4-6 เดือน และขณะเดียวกันปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างยังคง

มีปริมาณเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของเค็มบักนัดตลอดระยะเวลาการหมัก 6 เดือน

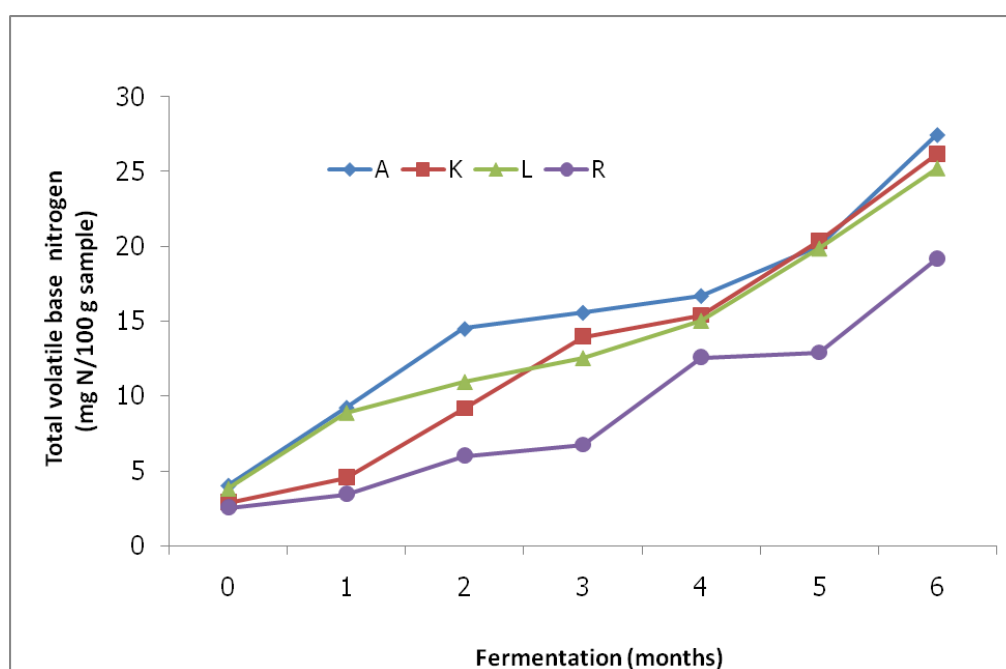


ภาพที่ 2 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด (% total acidity) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน



ภาพที่ 3 ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนในการหมักเค็มบักนัดส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณต่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) และปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจน (ภาพที่ 4 และ 5) ปริมาณ TVB-N ของเค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันคือมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TVB-N ตลอดระยะเวลาการหมัก 6 เดือน TVB-N แสดงถึงปริมาณแอมโมเนีย ไตรเมทิลเอมีน ไดเมทิลเอมีน เมทิลเอมีน และสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ (สุทรวัดน์, 2548) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนและองค์ประกอบอื่นเนื่องจากแบคทีเรียและเอนไซม์ในตัวปลา ปริมาณ TVB-N ยังสัมพันธ์กับระยะเวลาการหมัก สภาพการหมักและการเจริญของจุลินทรีย์ การเพิ่มขึ้นของปริมาณ TVB-N เกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก ผลการทดลองนี้แสดงถึงการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้นซึ่งสังเกตจากผลการย่อยสลายโปรตีนที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3 และ 4) ปริมาณ TVB-N ของตัวอย่างเค็มบักนัดมีค่าแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเทคนิคการผลิตของแต่ละแหล่ง เค็มบักนัดบางยี่ห้อมีการหมักปลา 1 คืนก่อนการบรรจุลงขวด หรือบางยี่ห้อหมักปลากับเกลือ 1 คืนก่อนการผสมกับสับปะรด ซึ่งกระบวนการดังกล่าวอาจทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนบางส่วน Xu *et al.* (2008) รายงานการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TVB-N ในน้ำปลาจาก 3 ชนิด ตลอดระยะเวลาการหมัก 30 วัน โดยตัวอย่างน้ำปลาที่มีการหมักโดยผ่านกระบวนการ autolysis มีปริมาณ TVB-N สูงกว่าตัวอย่างน้ำปลาอื่นอีก 2 ชนิดที่ไม่ผ่านกระบวนการ autolysis



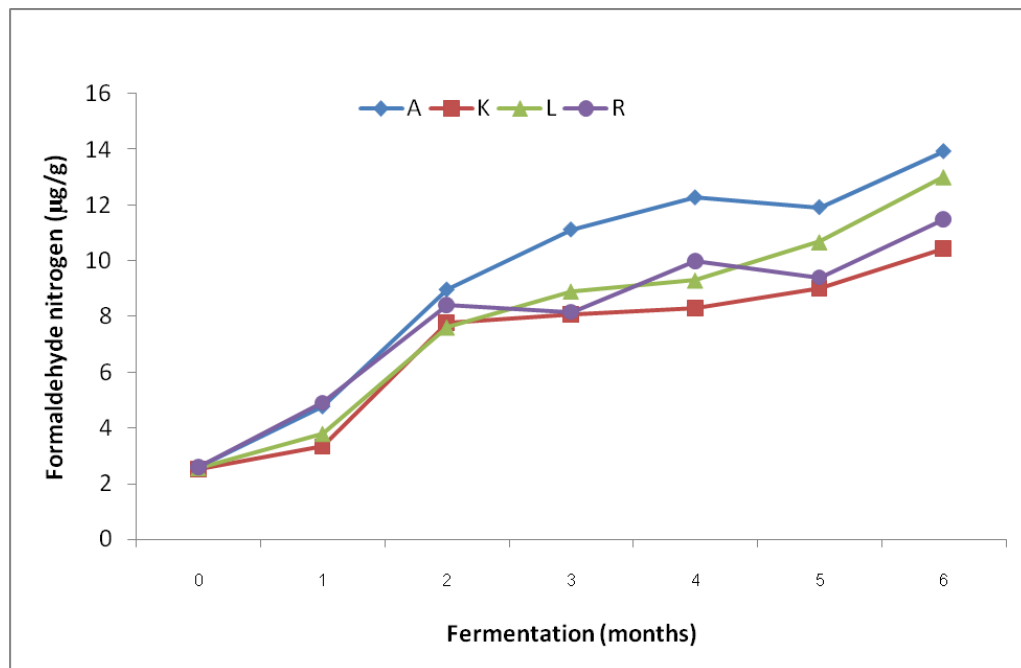
ภาพที่ 4 ปริมาณต่างที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจนแสดงถึงการย่อยสลายโปรตีนระหว่างการหมักเค็มบักนัด ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ในโตรเจนของเค็มบักนัดเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก (ภาพที่ 5) แม้ว่า

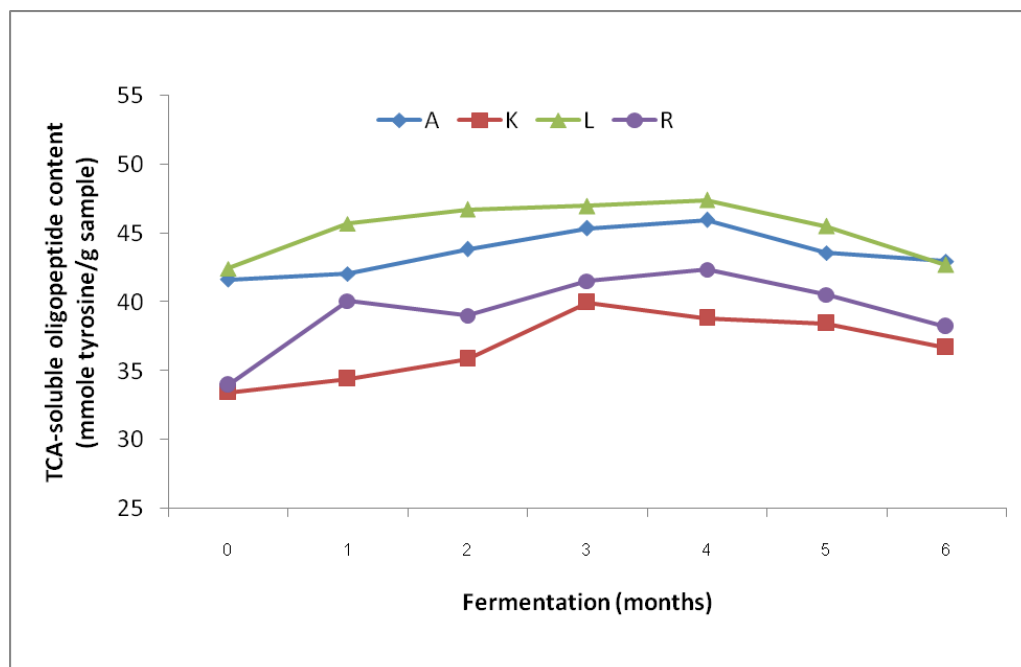
เค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างจะมีอัตราการย่อยสลายโปรตีนแตกต่างกันซึ่งแสดงให้เห็นจากปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ไนโตรเจนที่มีค่าแตกต่างกัน Jiang *et al.* (2007) รายงานว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ TVB-N และ ปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ในน้ำปลาจากปลากระดักมีความสัมพันธ์กับการย่อยสลายโปรตีนเนื่อปลาด้วยจุลินทรีย์และเอนไซม์ในตัวปลา ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเค็มบักนัดเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนตลอดระยะเวลาการหมักซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก (ภาพที่ 2)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (TCA-soluble oligopeptide) แสดงถึงเปปไทด์สายสั้นที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด จากผลการวิเคราะห์พบว่า ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide เริ่มต้นของเค็มบักนัดแต่ละตัวอย่างมีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 6) ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากเค็มบักนัดเริ่มหมักเดือนที่ 0 มีอายุการผลิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง แต่เนื่อปลาที่ใช้ผลิต เค็มบักนัดได้ผ่านกระบวนการหมักเกลือมาแล้วอย่างน้อย 24 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับกรรมวิธีการผลิตเค็มบักนัดของผู้ผลิตแต่ละรายซึ่งอาจส่งผลต่อการย่อยสลายโปรตีนและนอกจากนี้อาจเกิดเนื่องจากปริมาณโปรตีนเริ่มต้นของเค็มบักนัดแตกต่างกัน ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ในตัวอย่างสัมพันธ์ขึ้นอยู่กัส่วนผสมของวัตถุดิบเริ่มต้นและกระบวนการ proteolysis ของเอนไซม์ cathepsins (Vissesanguan *et al.*, 2004; Riebroy *et al.*, 2004) ปริมาณ TCA-soluble oligopeptide ของเค็มบักนัดทุกตัวอย่างมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0-4 เดือน ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงโปรตีน ได้แก่ ระดับการย่อย (ภาพที่ 3) ปริมาณ TVB-N (ภาพที่ 4) และ ปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ไนโตรเจน (ภาพที่ 5) แต่จะสังเกตเห็นว่า ปริมาณโอลิโกเปปไทด์มีแนวโน้มลดลงหลังการหมัก 4 เดือนซึ่งผลการทดลองนี้จะช่วยสนับสนุนผลของระดับการย่อยสลาย (ภาพที่ 3) ที่ลดลงภายหลังการหมัก 3 เดือน ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจจะมีนัยถึงการรวมตัวกันของโปรตีนภายหลังการหมัก 3-4 เดือน ซึ่งโดยปกติขั้นนี้การสิ้นสุดการหมักเค็มบักนัดที่พร้อมบริโภคหรือพร้อมจำหน่ายคือการเกิดเม็ดสีขาวลอยทั่วขวด มีสมมุติฐานว่า เม็ดกลมสีขาวดังกล่าวเกิดจากการรวมตัวกันของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเค็มบักนัด แต่อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้ยังไม่มีหลักฐานพิสูจน์แน่ชัด จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจในการศึกษาต่อไป

จากผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนจึงสามารถสรุปได้ว่าเค็มบักนัดเกิดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนตลอดระยะเวลาการหมัก 6 เดือน ดังแสดงโดยผลการเพิ่มขึ้นของ total acidity (ภาพที่ 2), ปริมาณ TVB-N (ภาพที่ 4) และปริมาณฟอर्मัลดีไฮด์ไนโตรเจน (ภาพที่ 5) และผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าการลดลงของระดับการย่อยและปริมาณโอลิโกเปปไทด์ภายหลังการหมัก 3-4 เดือน มีนัยถึงการรวมตัวกันของโปรตีนสายสั้น



ภาพที่ 5 ฟอรัลดีไฮด์ไนโตรเจน (Formaldehyde nitrogen) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

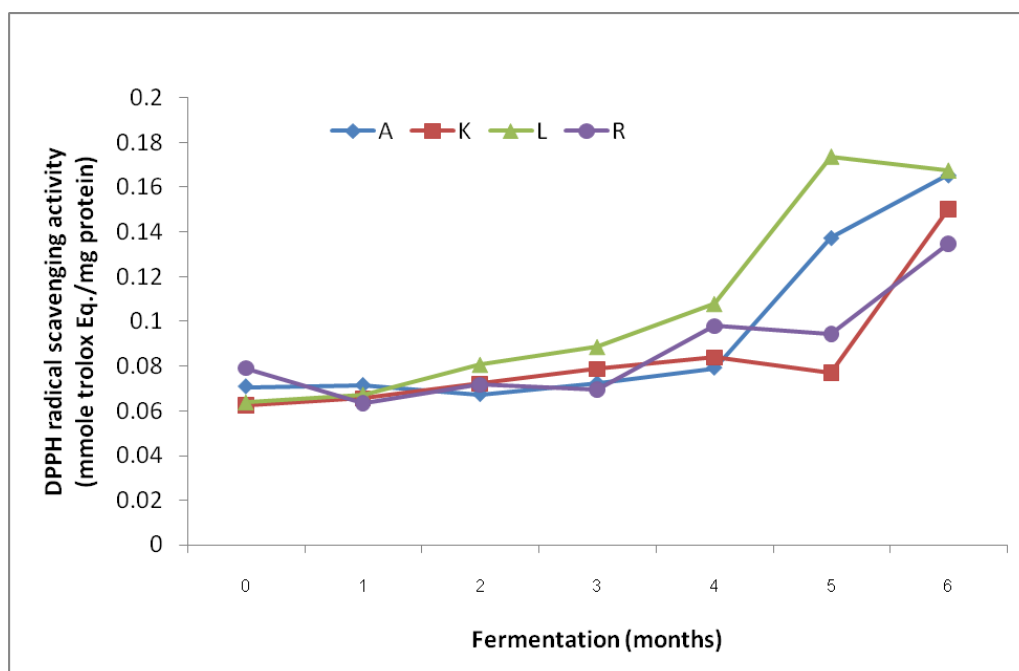


ภาพที่ 6 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ (TCA-oligopeptide content) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

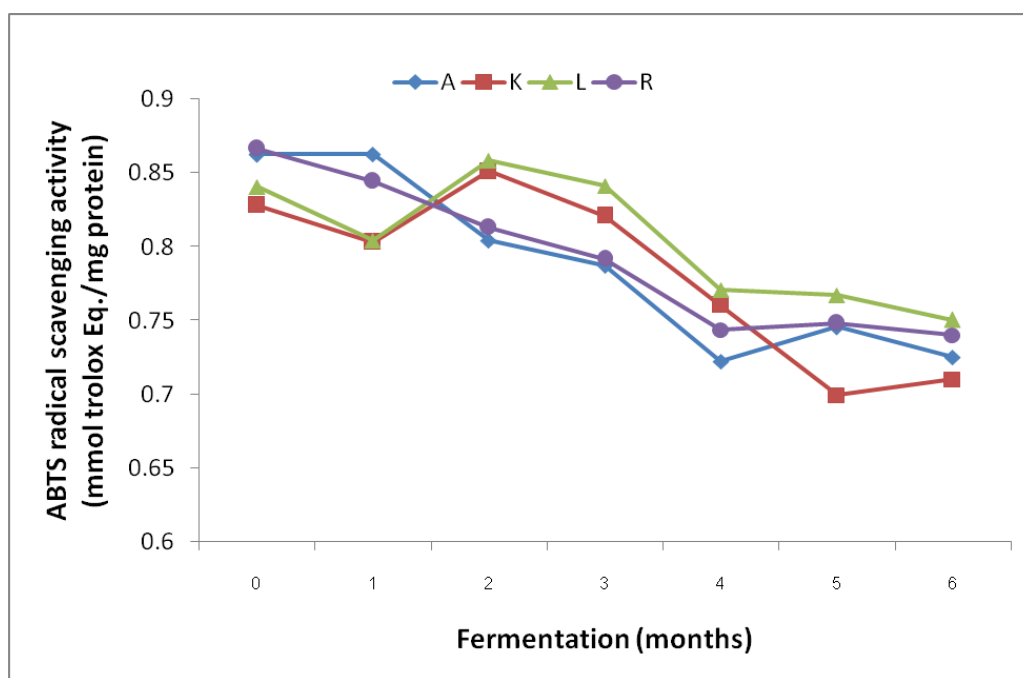
กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเค็มบักนัด

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของเค็มบักนัดโดยตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระซึ่งอาศัยการทำปฏิกิริยาระหว่างสารต้านอนุมูลอิสระในเค็มบักนัดกับอนุมูลอิสระของ DPPH[•] และ ABTS^{•+} แสดงดังภาพที่ 7 และ 8 สมบัติการรีดิวซ์และสมบัติการจับโลหะ แสดงดังภาพที่ 9 และ 10

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก สอดคล้องกับการย่อยสลายโปรตีนที่เกิดขึ้น โดยเฉพาะช่วงระยะเวลาการหมัก 4-6 เดือน ผลดังกล่าว สอดคล้องกับผลการทดลองของ Peralta *et al.* (2008) ซึ่งรายงานว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ของตัวอย่างกะปิกุ้งมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0 ถึง 190 วัน ความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมของเค็มบักนัดกับอนุมูลอิสระ DPPH[•] ขึ้นอยู่กับชนิด เพปไทด์สายสั้นและ/หรือกรดอะมิโนที่เกิดจากการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเค็มบักนัดมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] สูงกว่าผลิตภัณฑ์กุ้งส้ม จะลู่ และ กะปิซึ่งมีค่ากิจกรรมดังกล่าวเท่ากับ 2.72-3.02, 3.34-5.30 และ 2.14-7.05 $\mu\text{mol TE/g protein}$ ตามลำดับ (Faithong *et al.*, 2010)



ภาพที่ 7 DPPH radical scavenging activity ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน



ภาพที่ 8 ABTS radical scavenging activity ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม็กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของเค็มบักนัดมีค่าสูงสุดเมื่อเริ่มกระบวนการหมักและมีแนวโน้มลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก สาเหตุอาจเนื่องจากการย่อยสลายโปรตีนส่งผลต่อขนาดและลำดับเพปไทด์สายสั้น Chen *et al.* (1998) กล่าวว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโนและชนิดของกรดอะมิโน ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาหมอ (*Misgurnus anguillicaudatus*) ลดลงเมื่อระดับการย่อยสูงขึ้น (You *et al.*, 2009) Jun *et al.* (2004) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลา Yellowfin sole (*Limanda aspera*) ที่ระดับการย่อยต่ำสุดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระมากกว่าที่ระดับการย่อยอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามตลอดการหมัก 6 เดือน เค็มบักนัดมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ อยู่ระหว่าง 0.72-0.87 mmol TE/g protein ซึ่งถือว่ามีความสูงเมื่อเทียบกับ จะลู่ กุ้งส้มและ กะปิ ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ เท่ากับ 0.111-0.152, 0.0576-0.0679, 0.124-0.376 mmole TE/g protein ตามลำดับ (Faithong *et al.*, 2010)

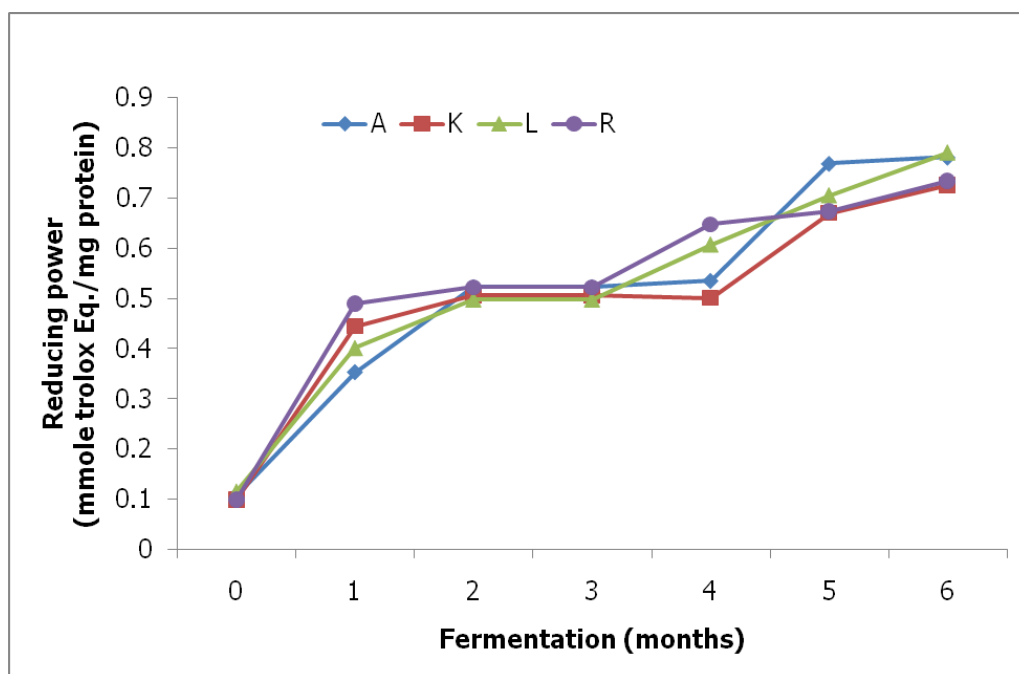
เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$ ของเค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่าเค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระแตกต่างกัน ตัวอย่าง L มีความสามารถความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ $ABTS^{\bullet+}$

สูงกว่าตัวอย่างอื่นๆ เค็มบักนัดมีค่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สูงกว่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับชนิดของเปปไทด์ที่สกัดได้จากเค็มบักนัด ชนิดของอนุมูลอิสระที่ใช้ในการทดสอบ ความสามารถในการละลายและกระจายตัวของสารละลายที่ใช้ในการทำปฏิกิริยา อนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ ใช้สำหรับวัดสมบัติต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม hydrophilic antioxidant ขณะที่ $ABTS^{\bullet+}$ ใช้ตรวจวัดสมบัติต้านอนุมูลอิสระในกลุ่ม hydrophobic และ hydrophilic antioxidant (Tang *et al.*, 2010) Binsan *et al.* (2008) พบว่าตัวอย่างมันกุ้งจากกะปิสกัดด้วยน้ำมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สูงกว่าตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอล และสารละลายผสมระหว่างเอทานอลผสมน้ำ Tang *et al.* (2010) รายงานว่าโปรตีนข้าวโพดที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\bullet+}$ สูงกว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองสามารถกล่าวได้ว่าเค็มบักนัดมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรมากขึ้นด้วยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการทำปฏิกิริยาออกซิเดชัน

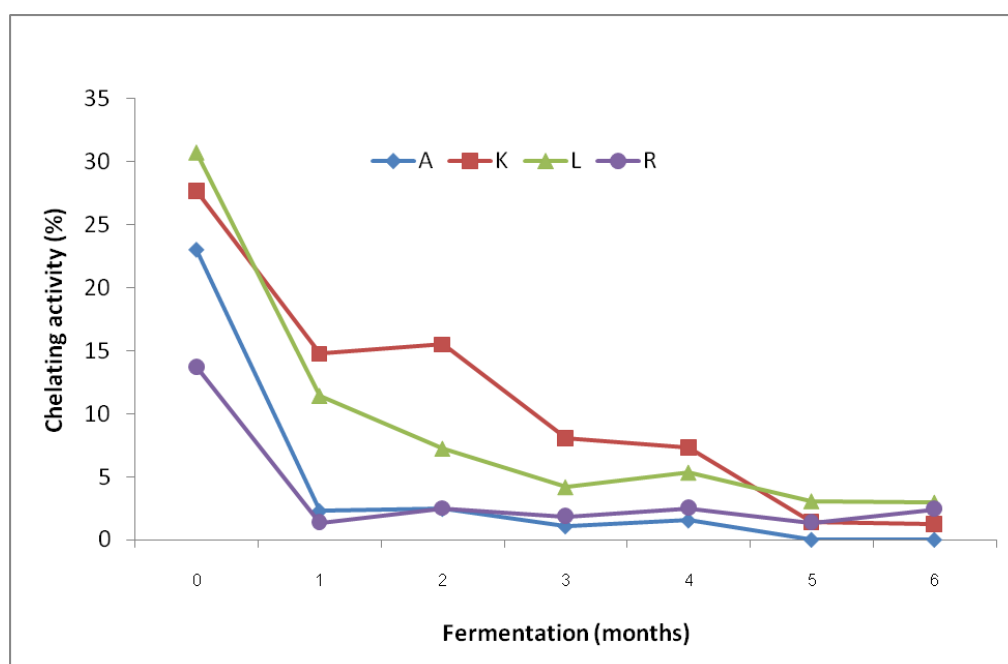
สมบัติการรีดิวซ์หรือ Reducing power แสดงถึงความสามารถในการรีดิวซ์หรือการให้อิเล็กตรอนของเค็มบักนัดแก่อนุมูลอิสระโดยอาศัยปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+} /ferricyanide complex ให้อยู่ในรูปของ Fe^{2+} /ferricyanide complex ผลการทดลองพบว่าเค็มบักนัดทุกตัวอย่างมีความสามารถในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9) ผลการทดลองดังกล่าวมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ Bougatef *et al.* (2010) รายงานว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $DPPH^{\bullet}$ และ reducing power ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายโปรตีน และนอกจากนี้ยังพบว่า reducing power ของเค็มบักนัดเพิ่มขึ้นประมาณ 7.7 เท่าจาก 0.09-0.11 เป็น 0.73-0.79 mmole Trolox equivalent/mg protein เมื่อสิ้นสุดการหมัก 6 เดือน

เค็มบักนัดแต่ละตัวอย่างแสดงสมบัติการจับโลหะแตกต่างกัน (ภาพที่ 10) ก่อนเริ่มการหมักเค็มบักนัดตัวอย่าง L มีความสามารถในการจับโลหะสูงสุด ขณะที่ตัวอย่าง R มีความสมบัติดังกล่าวต่ำสุด แต่เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นความสามารถในการจับโลหะของเค็มบักนัดลดลงอย่างเห็นได้ชัด และไม่พบสมบัติดังกล่าวในเค็มบักนัดตัวอย่าง A ภายหลังการหมัก 4 เดือน ความสามารถในการจับโลหะของโปรตีนขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ความยาวของเปปไทด์ และค่าความเป็นกรดต่างซึ่งมีบทบาทสำคัญในการจับโลหะที่มีประจุบวก โดยเฉพาะสมบัติประจุบวกและประจุลบของหมู่คาร์บอกซิลและหมู่อะมิโน (Saiga *et al.*, 2003) ค่า pH ของเค็มบักนัดลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ค่า

pH ที่เป็นการดส่งผลต่อประจุรวมของโปรตีนและอาจเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ความสามารถในการจับโลหะของเค็มบักนัตลดลง



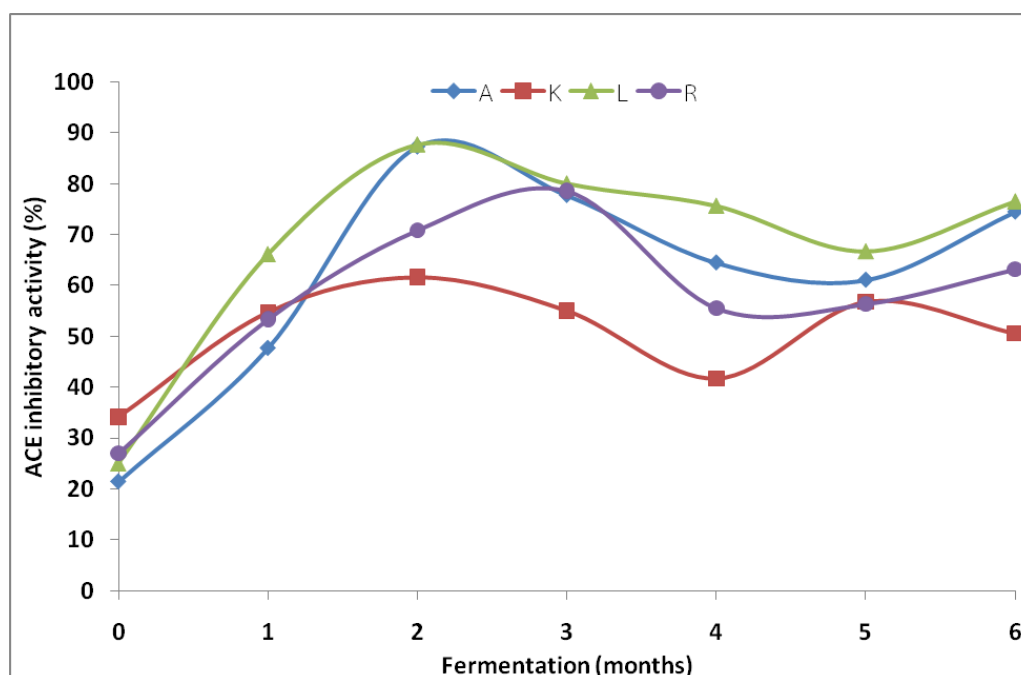
ภาพที่ 9 Reducing power ของเค็มบักนัตแม่อารีย์ (A) แม่กิมชัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน



ภาพที่ 10 Chelating activity ของเค็มบักนัตแม่อารีย์ (A) แม่กิมชัว (K) ยายเล็ก (L) และรัตนสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

กิจกรรมการยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) ของเค็มบักหนัด

ผลการวิเคราะห์การยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE) ของสารละลายส่วนใสของเค็มบักหนัด พบว่า เค็มบักหนัดทั้ง 4 ตัวอย่าง ประกอบด้วยเพปไทด์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรม ACE ได้ โดยการยับยั้ง ACE ของเค็มบักหนัดแตกต่างกันตามสูตรผสม กรรมวิธีการผลิต และระยะเวลาการหมัก ค่าการยับยั้ง ACE ของตัวอย่างเค็มบักหนัดเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะการหมักที่ระยะเวลา 2-3 เดือน และมีค่าค่อนข้างแปรปรวนภายหลังการหมัก 3 เดือน ที่ระยะเวลาการหมัก 3 เดือน เค็มบักหนัด L มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรม ACE สูงสุด รองลงมาคือ เค็มบักหนัด A R และ K ตามลำดับ กิจกรรมการยับยั้ง ACE ของเค็มบักหนัดระหว่างการหมัก 1-6 เดือนมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 41.69-87.65 Lertprakobkit *et al.* (2010) รายงานว่าเค็มบักหนัดมีค่าการยับยั้ง ACE ร้อยละ 49.14-49.69 แต่ค่าดังกล่าวเป็นค่าของตัวอย่างเค็มบักหนัดที่ไม่ระบุยี่ห้อและอายุการหมักของผลิตภัณฑ์ ในระหว่างการหมักเกิดการย่อยโปรตีนได้สายเพปไทด์ที่มีระดับการย่อยแตกต่างกัน การศึกษาผลของระดับการย่อยต่อการยับยั้ง ACE ของเศษปลาซาร์ดีน พบว่า เศษปลาซาร์ดีนที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มีค่าการยับยั้ง ACE ต่ำเพียงร้อยละ 3 กิจกรรมการยับยั้งดังกล่าวเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 6 แต่อย่างไรก็ตามที่ระดับการย่อยมากกว่าร้อยละ 6 ไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าความสามารถในการยับยั้ง ACE (Bougatef *et al.*, 2008) นอกจากนี้กิจกรรมการยับยั้ง ACE ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนและความเข้มข้นของโปรตีน โปรตีนไฮโดรไลเซตเข้มข้น 1 mg/ml ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ alcalase มีค่าการยับยั้ง ACE ร้อยละ 56.23 ขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเซตย่อยด้วย protamex และ pepsin มีค่าการยับยั้ง ACE ร้อยละ 50.24 และ 23.12 ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซตด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ได้แก่ Flavourzyme Neutrase และ Trypsin มีค่าการยับยั้ง ACE ต่ำกว่าร้อยละ 20 (Ahn *et al.*, 2012) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเค็มบักหนัดมีฤทธิ์ยับยั้ง ACE และยังพบว่าระยะเวลาการหมักมีผลต่อสมบัติดังกล่าว



ภาพที่ 11 ACE inhibitory activity (%) ของเค็มบักนัดแม่อารีย์ (A) แม่กิมซัว (K) ยายเล็ก (L) และ รตันสิน (R) ระหว่างการหมัก 6 เดือน

ปริมาณกรดอะมิโนในเค็มบักนัด

จากผลการศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมยับยั้ง ACE พบว่าเค็มบักนัด L มีแนวโน้มกิจกรรมดังกล่าวสูงกว่าเค็มบักนัดยี่ห้ออื่นๆ จึงเลือกเค็มบักนัด L เป็นตัวแทนในการศึกษาปริมาณกรดอะมิโนในตัวอย่างเค็มบักนัดระหว่างการหมัก 0-6 เดือน ผลการทดลองพบว่าปริมาณกรดอะมิโนมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงกระบวนการย่อยสลายโปรตีนระหว่างกระบวนการหมัก กรดอะมิโนหลักของเค็มบักนัดที่มีปริมาณสูงได้แก่ กลูตามิก (Glutamic) แอสปาทิก (Aspartic) ไลซีน (Lysine) และลิวซีน (Leucine) ส่วนปริมาณซิสเตอีน (Cysteine) และฮิสติดีน (Histidine) มีค่าต่ำ เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนของเค็มบักนัดที่ผ่านกระบวนการหมัก 3 เดือนซึ่งทางการค้าจัดเป็นเค็มบักนัดที่พร้อมจำหน่ายและบริโภคนั้น พบว่าเค็มบักนัดมีปริมาณกรดอะมิโนจำเป็น ได้แก่ ทรีโอนีน (Threonine) วาลีน (Valine) ไอโซลิวซีน (Isoleucine) Leucine และผลรวมของ Cysteine และเมทไธโอนีน (Methionine) และไทโรซีน (Tyrosine) กับฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) สูงกว่าปริมาณกรดอะมิโนจำเป็นในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ FAO/WHO กำหนด (ตารางที่ 2) เปปไทด์และกรดอะมิโนอิสระที่ได้จากการย่อยของเอนไซม์โปรติเอส เช่น ไทโรซีน เมทไธโอนีน ฮิสติดีน ไลซีน และทริปโตเฟน มีคุณสมบัติต้าน

อนุมูลอิสระ (Kitts and Weiller, 2003) ดังนั้นสมบัติทางชีวภาพของเค็มบักนัดทั้งกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระและยับยั้ง ACE ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

ตารางที่ 2 ปริมาณกรดอะมิโนของเค็มบักนัดระหว่างการหมัก 6 เดือน

กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/ กรัมโปรตีน)	เค็มบักนัด (เดือนที่)							FAO/WHO ¹ (มิลลิกรัม/ กรัมโปรตีน)
	0	1	2	3	4	5	6	
Aspartic	106.79	92.86	97.50	97.86	96.43	107.50	109.29	40
Serine	40.36	44.29	46.79	43.93	43.93	47.86	48.57	
Glutamic	154.64	133.57	114.29	144.29	143.21	159.29	163.21	
Glycine	60.36	60.71	65.36	60.71	62.14	62.86	80.71	
Histidine	21.79	15.00	22.14	20.00	20.36	21.07	29.64	
Arginine	67.14	64.64	65.71	67.50	67.86	75.00	76.79	
Threonine	45.00	38.21	43.21	41.43	41.43	46.07	46.79	
Alanine	62.14	57.86	68.21	61.43	61.43	65.71	71.07	
Proline	30.36	43.93	43.93	45.00	46.79	46.79	60.00	
Cysteine	9.64	9.29	7.86	8.57	7.86	9.64	6.43	35 ²
Tryrosine	32.86	33.21	40.36	35.36	37.86	41.43	32.50	60 ³
Valine	49.64	47.50	51.43	50.36	49.29	52.86	53.21	50
Methionine	30.00	26.43	30.00	30.71	30.36	32.86	36.79	35 ²
Lysine	82.14	71.07	78.57	80.00	77.14	84.64	85.36	55
Isoleucine	44.29	43.57	47.86	47.14	47.50	51.07	51.07	40
Leucine	73.93	68.57	75.00	75.71	75.36	82.50	85.00	70
Phenylalanine	32.50	38.21	38.93	40.36	40.71	43.21	47.14	60 ³

หมายเหตุ ¹ สำนักโภชนาการ (2553)

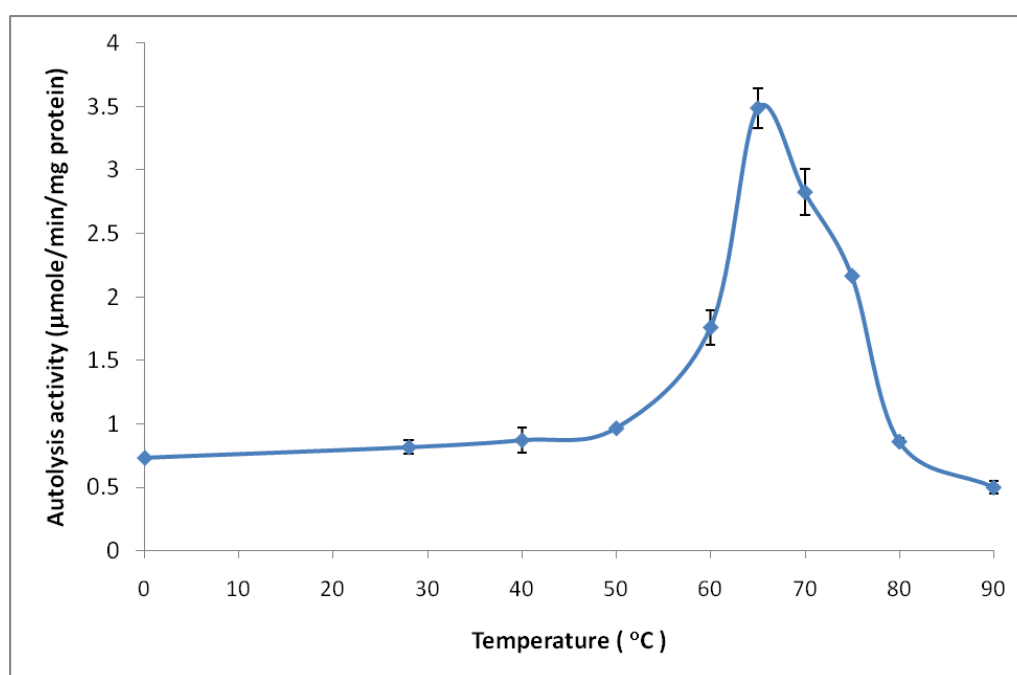
² ปริมาณ Methionine + Cystine

³ ปริมาณ Phenylalanine + Trysine

ส่วนที่ 2 ศึกษาบทบาทของเอนไซม์โปรติเนสต่อการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัด

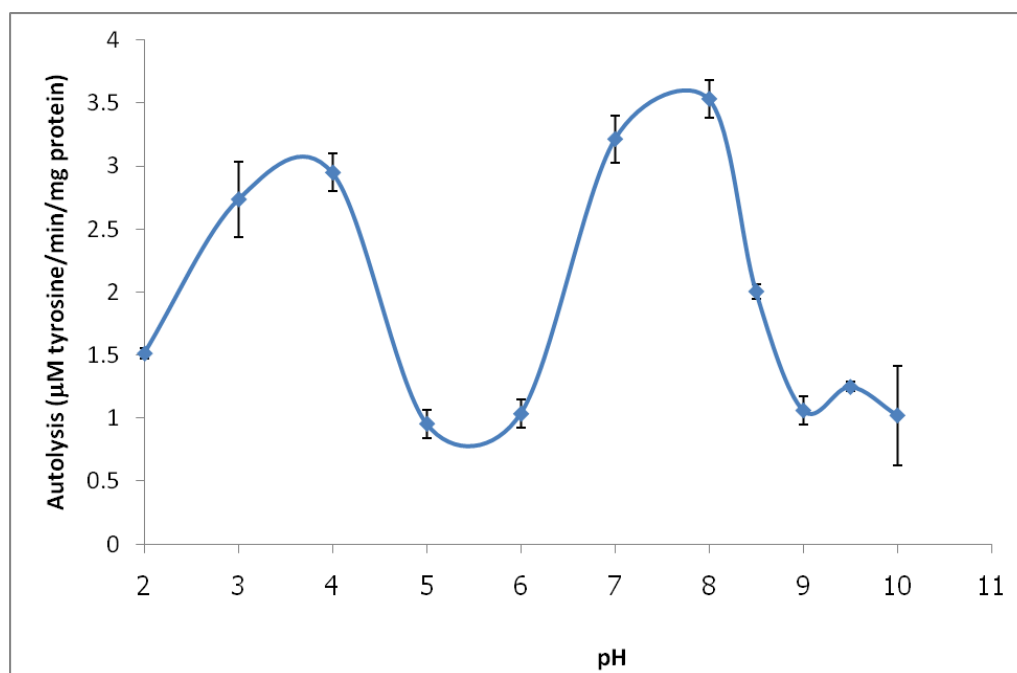
ผลของอุณหภูมิ pH และเกลือต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสด

ผลการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรติเนสในปลาสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเค็มบักนัดแสดงดังภาพที่ 12-14 ผลการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง (Autolysis activity) ของปลาสดเฉพาะในส่วนของเนื้อปลาที่อุณหภูมิ 0 28 40 50 60 65 70 75 80 และ 90 องศาเซลเซียส พบว่า ระดับการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสดมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และยังพบกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสซึ่งจัดว่าเป็นอุณหภูมิการย่อยสลายที่ค่อนข้างสูง กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียสแสดงถึงการเสียสภาพด้วยความร้อนของ Endogenous proteases กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาส่วนใหญ่มักจะพบที่อุณหภูมิ 50-65 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Choi *et al.*, 1999; Yongsawatdigul *et al.*, 2000; Yongsawatdigul and Piyadhamviboon, 2004; Mazorra-Manzano, 2008; Yarnpakdee *et al.*, 2009) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองของ Tadpitchayangkoon and Yongsawatdigul (2009) ซึ่งรายงานกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสดที่อุณหภูมิ 65-70 องศาเซลเซียส ผลดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่าอุณหภูมิที่ 65-70 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่แสดงกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสดและแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาสดเป็นโปรติเนสที่สามารถทนความร้อนได้



ภาพที่ 12 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาสด

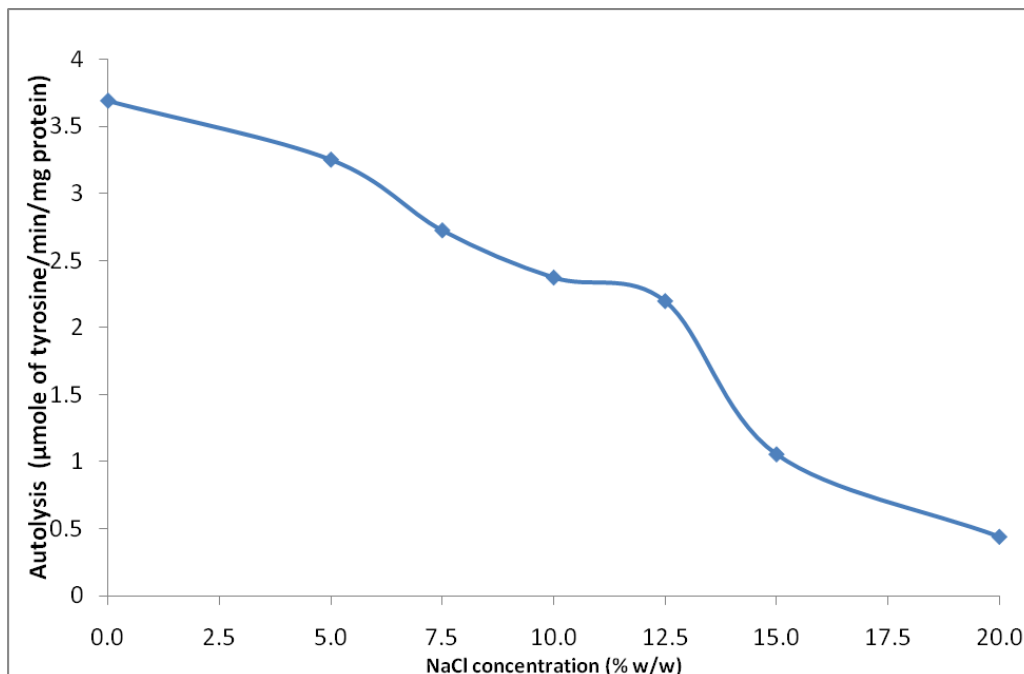
การย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาสวายที่ pH 2-10 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสแสดงดังภาพที่ 13 ผลการทดลองพบว่าระดับการย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาสวายมีค่าสูงสุดในสภาวะค่อนข้างเป็นด่าง (pH 7-8) เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่ม Alkaline proteinase นอกจากนี้ยังพบว่าปลาสวายเกิดการย่อยสลายตัวเองสูงที่พีเอช 3-4 ซึ่งแสดงถึงโปรตีนเอสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่สภาวะเป็นกรด (Acidic proteinase) Visessanguan *et al* (2001) รายงานว่าการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลา Arrowtooth flounder เกิดขึ้นเนื่องจากโปรตีนเอสที่ทนความร้อนและมีกิจกรรมทั้งที่พีเอช 5.5 และ 8 เช่นเดียวกับ Klomkiao *et al* (2008) รายงานกิจกรรมของโปรตีนเอสที่ทนความร้อนในปลาชาร์ดินซึ่งแสดงกิจกรรมได้ทั้ง pH 3.5 และ pH 9.0 ในสภาวะจริงของการหมักเค็มบักนัดเดือนที่ 1-6 ค่า pH ของระบบจะอยู่ในช่วง 3.5-4.5 ดังนั้น Acid proteinase น่าจะมีบทบาทในการย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาสวาย (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 13 ผลของ pH ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาสวาย

นอกจากนี้ยังพบว่าการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาสวายลดลงเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0-20 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงมากกว่าร้อยละ 75 ที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 20 เช่นเดียวกับการศึกษาของ Siringan *et al.* (2006) รายงานการลดลงของกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลากระดักเมื่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้นจาก 0 เป็นร้อยละ 25 ซึ่งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองมีค่าประมาณร้อยละ 52 เมื่อเทียบกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สภาวะไม่มีเกลือ กิจกรรมการย่อยสลายของปลาสวายมีค่าลดลงประมาณร้อยละ 50 ที่ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 10 ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับกระบวนการ

หมักเค็มบักนัด ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาสาวยังคงแสดงกิจกรรมที่ความเข้มข้นเกลือดังกล่าว



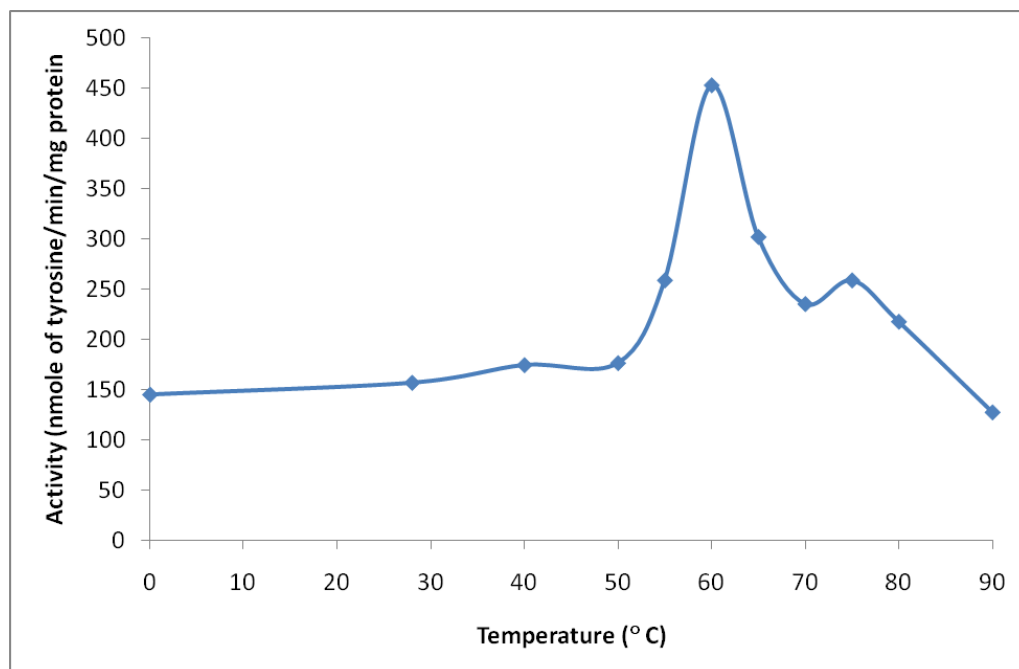
ภาพที่ 14 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาสาวย

ผลของอุณหภูมิ pH และเกลือด่อกิจกรรมโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสาวย

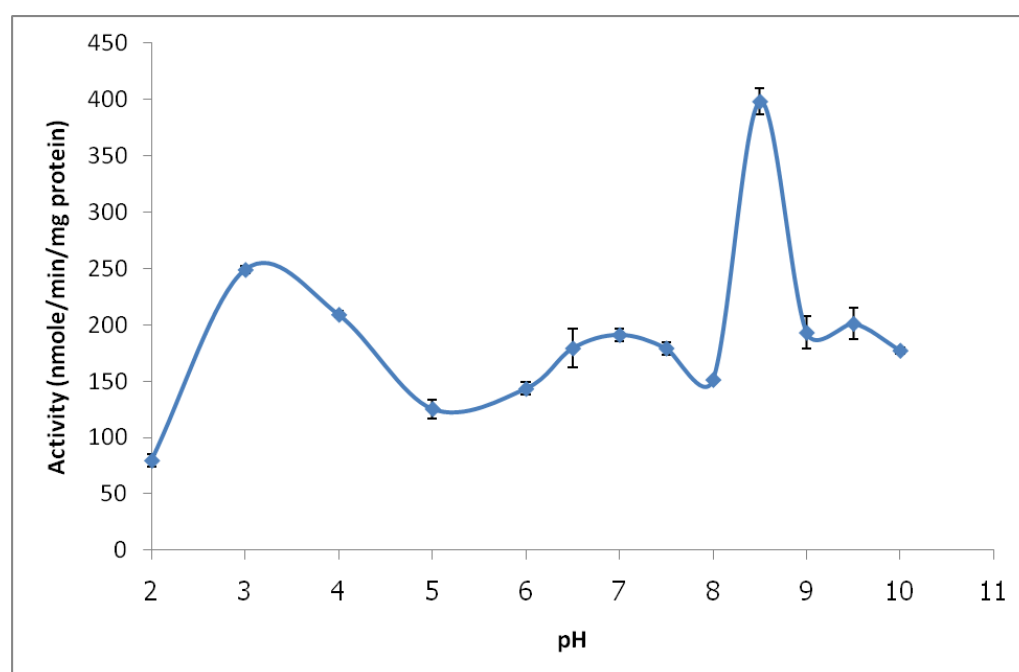
การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสาวยโดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนสกัดแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 15) ซึ่งใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่ 65 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิของกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาสาวย (ภาพที่ 12) ขณะที่พบกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของ Crude enzyme จากปลากระตักที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Siringan *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์โปรตีนสกัดมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 3 และ 8.5 (ภาพที่ 16) ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผล pH ของกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง (ภาพที่ 13) ซึ่งสามารถกล่าวได้ว่าทั้ง Acid และ Alkaline proteinase น่าจะเป็นกลุ่มโปรตีนหลักในกล้ามเนื้อปลาสาวย

ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนที่ความเข้มข้นเกลือ 0-3 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3 และ pH 8.5 โดยใช้เคซีนเป็นสารตั้งต้น พบว่ากิจกรรมของโปรตีนสกัดมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงขึ้นโดยเฉพาะที่สภาวะ pH 8.5 กิจกรรมโปรตีนสกัดที่ความเข้มข้นเกลือ 3 โมลาร์มีค่าลดลงประมาณร้อยละ 54 เมื่อเทียบกับกิจกรรมโปรตีนในสภาวะไม่มีเกลือ เกลือมีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เนื่องจากโปรตีนจะเกิดการเสียสภาพเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้นด้วยปรากฏการณ์ salting out อย่างไรก็ตามที่สภาวะ pH เป็นกรดกิจกรรมของเอนไซม์ค่อนข้างเสถียรมากกว่าที่สภาวะ pH เป็น

ต่าง ซึ่งมีนัยว่าเอนไซม์ในเค็มบักนัดซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม Acid proteinase มีความเสถียรต่อความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าเอนไซม์ในกลุ่ม Alkaline proteinase

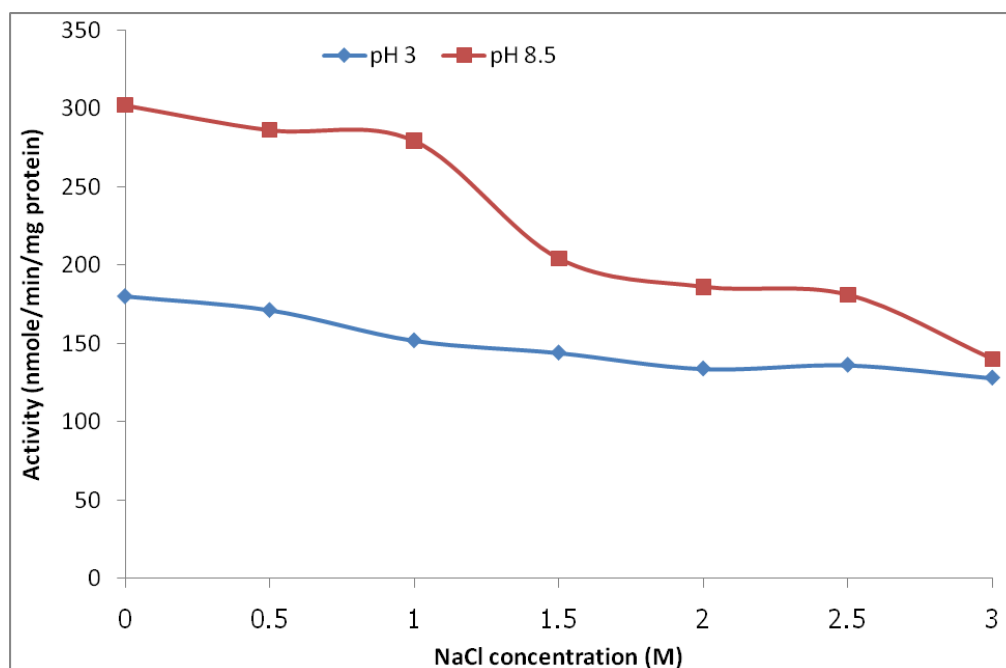


ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมโปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อปลาสวาย

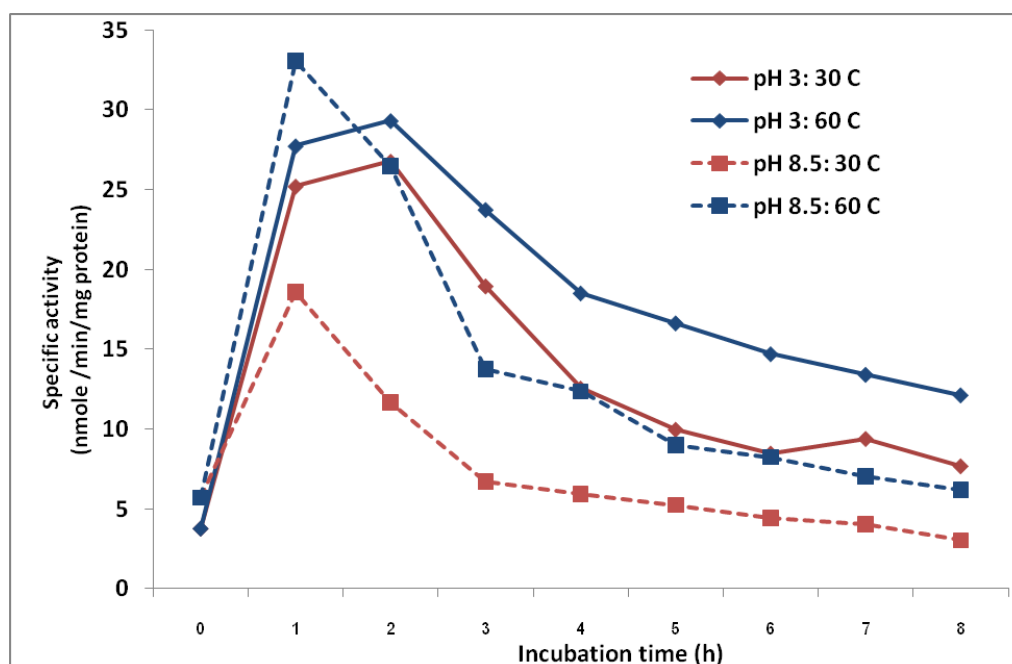


ภาพที่ 16 ผลของ pH ต่อกิจกรรมโปรตีนเอสจากกล้ามเนื้อปลาสวายปมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาเสถียรภาพของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีน โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ pH 3 และ pH 8.5 แสดงดังภาพที่ 18 ค่ากิจกรรมเริ่มต้นของเอนไซม์โปรตีนที่ pH 8.5 มีค่าสูงกว่าที่ pH 3 สอดคล้องกับการทดลองผลของ pH ต่อกิจกรรมของโปรตีน (ภาพที่ 16) ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิการบ่มเพิ่มขึ้นจาก 30 เป็น 60 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH 3 มีเสถียรภาพที่ดีกว่าที่ pH 8.5 กิจกรรมของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้น และมีค่าลดลงภายหลังการบ่ม 2 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามเอนไซม์โปรตีนสกัดจากปลาสวายมีเสถียรภาพที่ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสทั้งที่ pH 3 และ pH 8.5 ในช่วงเวลาการบ่ม 8 ชั่วโมง การทดลองนี้ยืนยันว่าหากต้องการเร่งการทำงานของเอนไซม์ที่ pH และอุณหภูมิดังกล่าวอาจสามารถทำได้ในช่วงเวลา 8 ชั่วโมง ดังนั้นทั้งสภาวะ pH และอุณหภูมิมีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนสกัดจากปลาสวาย



ภาพที่ 17 ผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8.5 และ pH 3



ภาพที่ 18 เกลียวกราฟต่ออุณหภูมิของโปรตีนสกัดจากปลาสาวยปม์ที่ pH 3 และ pH 8.5 อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส

กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกล้ามเนื้อปลาสาวยปม์และในกระบวนการหมักเค็มบักหน้ด

ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนโดยใช้ตัวอย่างโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสาวยปม์ เติมนสารยับยั้งโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน และบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว จากนั้นคำนวณระดับการยับยั้งกิจกรรม (Degree inhibition) เพื่อจำแนกประเภทของโปรตีนตามกลุ่มกรดอะมิโนทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาที่ Active site ผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนในกลุ่ม Chymotrypsin และ Trypsin-like proteinase ได้แก่ TPCK, STI และ Luepeptin สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนได้มากกว่า 76 % Benjakul *et al.* (2003) รายงานผลการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีนในโปรตีนซาร์โคพลาสไมคจาก *P. macracanthus* ว่าเอนไซม์ดังกล่าวสามารถยับยั้งโดย STI ร้อยละ 82.70 EDTA ร้อยละ 44.69 ส่วน Pepstatin A และ E-64 ไม่สามารถยับยั้งได้ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่แยกได้จากโปรตีนซาร์โคพลาสไมคของ *P. macracanthus* จัดอยู่ในกลุ่ม Serine proteinase เอนไซม์ Serine proteinase จาก Threadfin-bream สามารถถูกยับยั้งด้วย STI และ Leupeptin แต่ E-64 ไม่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว (Kinoshita *et al.*, 1990) Serine proteinase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีกรดอะมิโน Serine ที่ active site ที่มีบทบาทสำคัญในการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ Chymotrypsin, Thrombin, Subtilisin, Trypsin และ Elastase มีกิจกรรมในช่วง pH 7-9 นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนสกัดจากปลาสาวยปม์แสดงผลการยับยั้งด้วย Pepstatin ซึ่งแสดงถึงการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิด Acid proteinase

ผลการทดลองนี้มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่ pH เป็นกรด (ภาพที่ 16) ส่วนสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม Serine proteinase Cysteine proteinase และ Metallo proteinase ได้แก่ PMSF E-64 และ EDTA ตามลำดับ มีผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์สกัดได้น้อยมาก ดังนั้นผลการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายสามารถบ่งชี้ได้ว่าเอนไซม์หลักที่แสดงกิจกรรมในกล้ามเนื้อปลาสวายเป็นโปรตีนเอสในกลุ่ม Serine proteinase ประกอบด้วย Chymotrypsin-like และ Trypsin-like proteinase

ตารางที่ 3 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของโปรตีนเอสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวาย

Substrates	Final concentration	Targeted proteinase	Relative activity (%)
Pepstatin A	1 μ M	Acid proteinase	69.09 $\pm$ 16.24
E-64	10 μ M	Cysteine proteinase	11.70 $\pm$ 0.17
Leupeptin	100 μ M	Trypsin-like and cysteine proteinase	76.23 $\pm$ 2.80
Soybean Trypsin inhibitor	0.02 mg/ml	Trypsin-like proteinase	81.36 $\pm$ 1.25
TPCK	100 μ M	Chymotrypsin-like proteinase	97.91 $\pm$ 5.03
PMSF	1 mM	Serine proteinase	20.61 $\pm$ 2.38
EDTA	10 mM	Metallo proteinase	12.85 $\pm$ 2.26

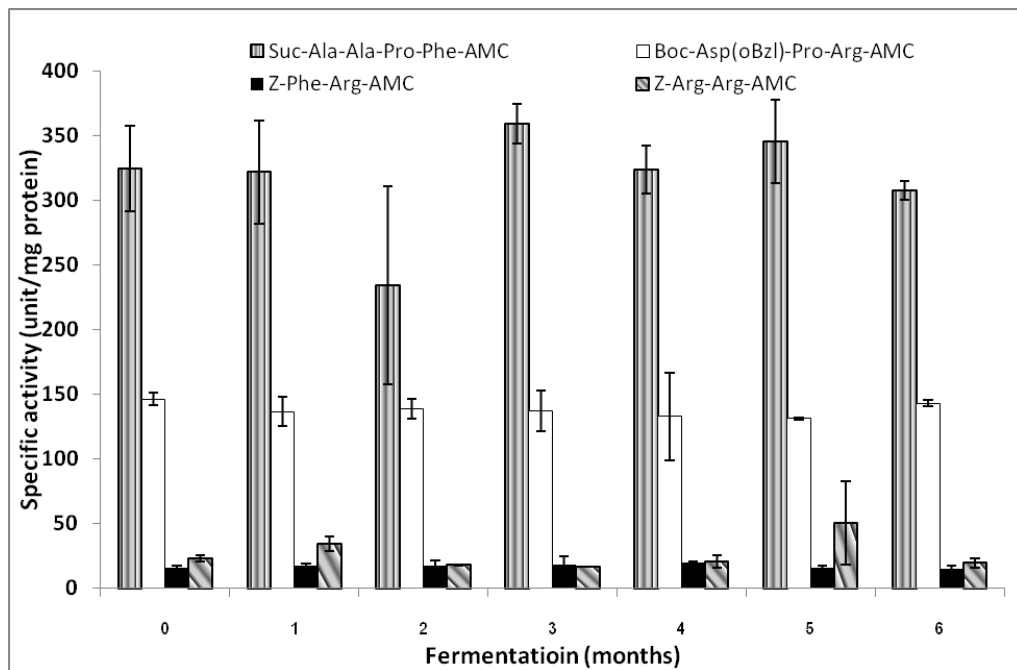
การศึกษาความจำเพาะต่อสารตั้งต้นของโปรตีนเอสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายโดยใช้สารสังเคราะห์ ได้แก่ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Suc-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC กิจกรรมโปรตีนเอสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายมีความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ชนิดต่างๆ แตกต่างกัน สารสังเคราะห์ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC เกิดการย่อยสลายโดยเอนไซม์สกัดสูงสุด (59.49 Units/mg protein) ซึ่งสารสังเคราะห์ดังกล่าวมีความจำเพาะเจาะจงต่อ Trypsin และ α -Thrombin รองลงมาคือสารสังเคราะห์ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC (40.18 Units/mg protein) ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Chymotrypsin ในขณะที่สารตั้งต้นสังเคราะห์ที่มีความจำเพาะต่อ Trypsin Plasmin Cathepsin B และ Cathepsin L ได้แก่ Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Boc-Val-Leu-Lys-AMC, Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ตามลำดับ เกิดได้ย่อยสลายได้ 18.8-24.86 Units/mg protein ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาสารยับยั้งต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (ตารางที่ 3) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเอสในกลุ่ม Serine proteinase ได้แก่

Trypsin-like proteinase α -Thrombin และ Chymotrypsin น่าจะมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาสวาย

ตารางที่ 4 ความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์ชนิดต่างๆของโปรติเนสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 8.5

Substrates	Targeted proteinase	Specific activity (Units/mg protein)
Boc-Gln-Ala-Arg-AMC	Trypsin	18.80±0.19
Boc-Val-Leu-Lys-AMC	Plasmin	22.00±2.08
Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC	Trypsin, α -Thrombin	59.49±5.33
Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC	Chymotrypsin	40.18±1.54
Z-Arg-Arg-AMC	Cathepsin B	24.86±2.91
Z-Phe-Arg-AMC	Cathepsin L	23.20±0.62

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในเค็มบักนัดระหว่างกระบวนการหมัก 6 เดือน โดยเลือกใช้สารตั้งต้น 4 ชนิด ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ในการทดสอบ พบว่าตัวอย่างโปรตีนสกัดจากเค็มบักนัดสามารถย่อยสลายสารตั้งต้น Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC และ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ได้สูง (ภาพที่ 19) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลความสามารถในการย่อยสลายสารตั้งต้นและผลของสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์สกัดจากปลาสวายข้างต้น (ตารางที่ 3 และ 4) ซึ่งอาจมีความเป็นไปได้ว่าโปรติเนสในกลุ่ม Chymotrypsin และ Trypsin-like proteinase สามารถแสดงกิจกรรมได้ในเกลือร้อยละ 10 ในช่วงการหมักเค็มบักนัด แต่อย่างไรก็ตาม pH ของเค็มบักนัดในช่วงการหมักมีค่าอยู่ระหว่าง pH 4-5 ซึ่งไม่เหมาะสมกับการทำงานของ Chymotrypsin และ Trysin-like proteinase ที่ทำงานได้ดีในช่วง pH 7-9 ซึ่งประเด็นนี้จำเป็นต้องได้รับการพิสูจน์เพื่อทราบให้แน่ชัดต่อไป ส่วนกิจกรรมการย่อยสลายสารตั้งต้น Z-Arg-Arg-AMC และ Z-Phe-Arg-AMC ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin B และ Cathepsin L มีค่าต่ำกว่ากิจกรรมของโปรติเนสในกลุ่ม Chymotrypsin และ Tyrpsin-like proteinase แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ดังกล่าวยังคงแสดงกิจกรรมตลอดระยะเวลาการหมักเค็มบักนัด 6 เดือน



ภาพที่ 19 กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในตัวอย่างเค็มบักนัดระหว่างการหมัก 6 เดือน

สรุปผลการทดลอง

เค็มบักนัดทั้ง 4 ตัวอย่างจากผู้ผลิตทางการค้าของจังหวัดอุบลราชธานี มีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน เค็มบักนัดมีปริมาณความชื้นร้อยละ 69.92-73.19 โปรตีนร้อยละ 6.19-8.93 ไขมันร้อยละ 1.53-2.49 เถ้าร้อยละ 9.10-13.45 และเกลือร้อยละ 8.24-12.40 ในระหว่างกระบวนการหมัก เค็มบักนัดเกิดการผลิตกรดแลกติกโดยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งแสดงผลการลดลงของค่า pH และการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดทั้งหมดตลอดการหมัก 6 เดือน เกิดการย่อยสลายโปรตีนซึ่งจะเห็นได้จากผลการเพิ่มขึ้นของระดับการย่อยเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นจาก 0 เป็น 3 เดือน ปริมาณต่างที่ระเหยได้ทั้งหมด ฟอสฟอรัส และโอไลโกเปปไทด์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ผลการย่อยสลายโปรตีนของเค็มบักนัดระหว่างกระบวนการหมักให้ผลสอดคล้องกับสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH[•] และสมบัติการรีดิวซ์ ซึ่งเพิ่มขึ้นตลอดการหมัก เค็มบักนัดมีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ตลอดระยะเวลาการหมักแม้ว่าค่าดังกล่าวจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น ขณะที่สมบัติการจับโลหะลดลงภายหลังการหมัก 1 เดือน เค็มบักนัดยังมีสมบัติการยับยั้ง ACE อยู่ระหว่างร้อยละ 41.69-87.56 โดยค่ากิจกรรมการยับยั้ง ACE เพิ่มขึ้นสูงสุดที่ระยะเวลาการหมัก 2-3 เดือน ข้อมูลองค์ประกอบทางเคมี สมบัติต้านอนุมูลอิสระ และการยับยั้ง ACE ของเค็มบักนัดเหล่านี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางกำหนดคุณภาพและส่งเสริมการบริโภคเค็มบักนัด

เอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาสวายจัดอยู่ในกลุ่ม Acid และ Alkaline proteinase ซึ่งมีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส pH 3-4 และ pH 7-8 และพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสสกัดจากกล้ามเนื้อปลาสวายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส pH 3 และ 8.5 เอนไซม์โปรติเนสทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมลดลงเมื่อค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น แต่ยังคงแสดงกิจกรรมได้ที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 10 ซึ่งเป็นความเข้มข้นเกลือที่ใกล้เคียงกับสภาวะการหมักเค็มบักนัด นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีเสถียรภาพที่ดีที่ pH 3 และ 8.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แนวทางในการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสปลาสวายในกระบวนการหมักเค็มบักนัดสามารถทำได้โดยการเร่งกิจกรรมโดยการปรับอุณหภูมิและ pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว เอนไซม์โปรติเนสสกัดจากปลาสวายจัดอยู่ในกลุ่ม Serine proteinase ซึ่งแสดงด้วยผลการยับยั้งสารสังเคราะห์ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC และ Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC ที่มีความจำเพาะต่อ Trypsin α -Thrombin และ Chymotrypsin นอกจากนี้ยังสามารถถูกยับยั้งด้วย TPCK STI และ Luepeptin ซึ่งมีความจำเพาะต่อ Chymotrypsin และ Trypsin-like proteinase และเอนไซม์โปรติเนสสกัดจากปลาสวายยังแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ Acid proteinase ด้วยผลการยับยั้งกิจกรรมด้วยสาร Pepstatin ในระหว่างกระบวนการหมักเค็มบักนัดพบกิจกรรมของ Chymotrypsin-like และ Trypsin-like proteinase และยังพบกิจกรรมของเอนไซม์ Cathepsin B และ Cathepsin L ตลอดระยะเวลาการหมักเค็มบักนัด 6 เดือน

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

1. การศึกษาแนวทางการแยกหรือการสกัดเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการยับยั้งกิจกรรม ACE และการต้านอนุมูลอิสระจากเค็มบักนัดเพื่อการใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อไปในอนาคต
2. การศึกษาการแยกและการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีนเนสจากกล้ามเนื้อปลาสร้อย และการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวเพื่อใช้เป็นแนวทางในการเร่งกระบวนการหมักเค็มบักนัดได้ต่อไปในอนาคต
3. การศึกษาการเร่งกระบวนการหมักเค็มบักนัดด้วยเอนไซม์ทางการค้าเพื่อลดระยะเวลาการหมัก
4. การศึกษาการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์โปรตีนเนสจากเค็มบักนัดเพื่อการใช้ผลิตถั่เชื้อเพื่อเร่งกระบวนการหมักเค็มบักนัด

เอกสารอ้างอิง

- จิตรา สิงห์ทอง, วชิราพรรณ บุญญาพุทธิพงศ์, ชุติมา ทองแก้ว, ปัญญภรณ์ ทัดพิชญางกูร, ธิติรัตน์ จุทอง, และนิภาพรณ สิงห์ทองลา. 2548. การเพิ่มศักยภาพสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ในจังหวัดอุบลราชธานี. รายงานโครงการวิจัย. โครงการตามแผนยุทธศาสตร์การพัฒนาจังหวัดอุบลราชธานี.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 336 หน้า
- สุวรรณ วิรัชกุล, สุเวทย์ นิงสานนท์ และประทุม สงวนตระกูล. 2527. การศึกษาคุณค่าทางอาหารและวิธีการหมักเค็มสับปะรดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (2) การปรับปรุงตำรับอาหารเค็มสับปะรด. แก่นเกษตร 12(6) : 285-293 น.
- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. Food Chemistry. 105:57-64.
- Ahn, C-B., Jeon, Y-J., Kim, Y-T., and Je, J-Y. 2012. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. Process Biochemistry.
- Anusha G.P. Samaranayaka, Eunice, C.Y. and Li-Chan. 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Food Chemistry. 107:768-776.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. Washington, D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Barrett, A.J and Kirschke, H. 1981. Cathipsin B, cathepsin H., and cathepsin L. In Methods in enzymology, vol 80. Pp.535-561. Academic Press, New York.
- Benjakul, S., and Morrissey, M. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3423-3430.
- Benjakula, S., Visessanguanb, W., Leelapongwattanaa, K. 2003. Purification and characterization of heat-stable alkaline proteinase from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 134: 579–591
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., and Kishimura, H. 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Food Chemistry. 106(1), 185–193.

- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Ple, R., Leroy, Y., Gullochon D., Barkia, A. and Nasri, M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. Food Chemistry. 111(2): 350-356.
- Choi, Y.J., Cho, Y.J. and Lanier, T.C. 1999. Purification and characterization of proteinase from Atlantic menhaden muscle. Journal of Food Science. 64:772-775.
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural Food Chemistry. 38:6674-677.
- Faithong, N., Benjakul, S., Phatcharat, S. and Binsan, W. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. Food Chemistry. 119:133-140.
- Geene, D.H and Babbitte, J.K. 1990. Control of muscle softening and proteinase parasite interaction in arrowtooth flounder (*Atherrestes stomias*) Journal of Food Science. 55: 579-580.
- Hajji, M., Masmoudi, O., Souissi, N. Triki, Y., Kammoun, S., Nasri, M. 2010. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Periploca laevigata* root barks. Food Chemistry. 121: 724–731
- Jiang, J., Zeng, Q., Zhu, Z. and Zhang, L. 2007. Chemical and sensory changes associated Yu-lu fermentation process a traditional Chinese fish sauce. Food Chemistry. 104:1629-1634.
- Jun SY, Park PJ, Jung WK and Kim SK. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology. 219: 20-26
- Kinoshita, M., Toyohara, H., and Shimizu, Y., 1990. Purification and properties of a novel latent proteinase showing myosin heavy chain degrading activity from threadfin bream muscle. Journal of Biochemistry. 107, 587–591.
- Kitts, D.D. and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food source. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design. 9(16):1309-1323.

- Klomklao, S., Kishimura, H. and Benjakul S. 2008. Endogenous Proteinases in True Sardine (*Sardinops Melanostictus*). Food Chemistry 107(1): 213–220.
- Kose, S., and Hall, G.M. 2010. Sustainability of fermented fish products. Fish Processing, 138-166.
- Lertprakobkit, W., Roytrakul, S., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2010. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity and antioxidant activity of peptides extracted from Thai traditional fermented fishery product. Proceedings of Food Innovation Asia Conference 2010. , June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, Thailand. Pp 260-269.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr,A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry, 193:265-275.
- Mazorra-Manzano, M.A, Pacheco-Aguilar, R, Ramirez-Suarez,J.C. and García-Sánchez, G 2008. Pacific Whiting (*Merluccius Productus*) Underutilization in the Gulf of California: Muscle Autolytic Activity Characterization. Food Chemistry 107(1): 106–111.
- Peralta, E.M., Hatate, H., Kawabe, D. Kuwahara, R., Wakamatsu, S., Yuki, T. and Murata, H. 2008. Improving antioxidant activity and nutritional components of Philippine salt-fermented shrimp paste through prolonged fermentation. Food Chemistry. 111 (1): 72-77.
- Phithakpol, B., Varanyanond, W., Reungmanee-paitoon, W. and Wood, H. 1995. The Traditional Fermented Foods of Thailand. Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok, Thailand.
- Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijrongrojana, K. and Munehiko, T. 2004. Some characteristics of commercial Som-fug produced in Thailand. Food Chemistry. 88, 527-535.
- 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.
- Siringan, P., Raksakulthai, N. and Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics endogenous proteinase in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. 98 (4): 678-684.

- Tadpitchayangkoon P. Tongrueng S., Chumpengpan M. and Phemphonr W. 2010. Improvement in antioxidant properties of Kem-Buk-Nut for health food market. Proceedings of Food Innovation Asia Conference 2010. , June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, Thailand. Pp 62-71.
- Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y.I., Xie, M. and Chen, J. 2010. Peptide fractionation and free radical scavenging activity of zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58:587-593.
- Thongthai, C. and Srisutipruti, A. 1989. Occurance of tyrosine crystals in Kam-Sapparods and in Rapidly processed Nam-Pla (Fish Sauce). In P.J.A. Reilly, R.W.H. Parry and L.E. Barile. Post-harvest Technology, Preservative and Quality of Fish in Southeast Asia. International Foundation for Science National Research Council of Thailand Mahidol University.
- Visessanguan, W., Menino, A.R., Kim, S.M. and An., H. 2001. Cathepsin L: A predominant heat-activated proteinase in arrowtooth flounder muscle. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49: 2633–2640
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S. and Thepkasikul, P. 2004. Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to Nham characteristics. Meat Science. 64, 579-588.
- Wiriyanphan, C., Chitsomboon, B. and Yongsawatdigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chemistry. 132: 104-111.
- Xu, W., Yu, G., Xue, C., Xue Y. and Ren, Y. 2008. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. Food Chem. 107: 1597-1604.
- Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Kijroongrjan, K. 2009. Autolysis of Goatfish (*Mulloidichthys Martinicus*) Mince: Characterisation and Effect of Washing and Skin Inclusion. Food Chemistry. 114(4): 1339–1344.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chemistry. 87:447-455.
- Yongsawatdigul, J., Worratao, A. and Park, J.W. 2000. Effect of endogenous transglutaminase of tropical *Tilapia*. Journal of Food Science. 65:129-133.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein

hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10 : 235-240.

Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X. and Zeng, M. 2007. Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*. 42: 1586–1591

ภาคผนวก

ร่างต้นฉบับที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ



The 14th FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2012

14th -15th June 2012

BITEC Bangna, Bangkok, Thailand

Antioxidant Activity of Kem-Buk-Nud, an Indigenous Fermented Fish Product

Panchaporn Tadpitchayangkoon^{1*}, Jirawat Yongsawatdigul²

¹Research and Development Unit of Indigenous Food Products, Department of Agro-Industry,
Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

²School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

* Corresponding author: (panchaporn@agri.ubu.ac.th)

Abstract

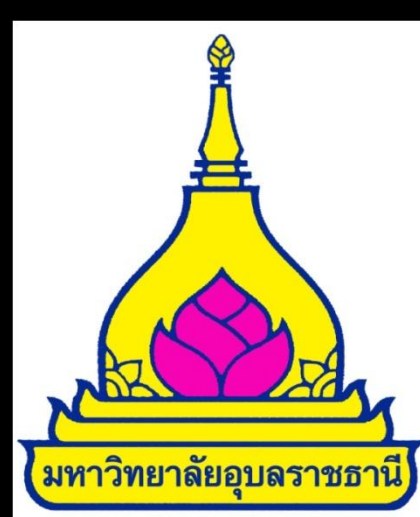
Kem-Buk-Nud is an indigenous product of North eastern part of Thailand. Unfortunately, the product is only available locally for consumption. This might be due to lack of scientific information about nutritional value for health promotion. Objective of this study was to investigate antioxidant activities of Kem-Buk-Nud.

Kem-Buk-Nud was processed by four different manufacturers (A, B, C and D samples) in Ubon Ratchathani in order to better assess their contribution. Kem-Buk-Nud made by mixing striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) with salt and pineapple before packing in crown-capped glass bottle and then left to ferment spontaneously in a dark room for up to 3 months. The antioxidant activities (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, reducing power and chelating activity) of Kem-Buk-Nud samples were investigated.

Peptide extracted from Kem-Buk-Nud samples exhibited DPPH and ABTS radical scavenging, reducing power and chelating activity. However, antioxidant activities of Kem-Buk-Nud from different manufacturers were varied. DPPH and ABTS radical scavenging activities of C samples were highest ($p < 0.05$), implying that these sample had more antioxidative peptide to terminate the radical chain reaction. Although chelating activity of all samples seemed to decrease with increasing fermentation period, an increase in reducing power was found. Reducing power of all samples was 498 ± 15.46 to 522 ± 19.99 μ mole Trolox equivalent/mg protein ($p > 0.05$).

The present study indicated that Kem-Buk-Nud possessed antioxidant activities and could be used as a functional food ingredient for health promotion.

Keywords: Kem-Buk-Nud, antioxidant, fermented fish



Antioxidant Activity of Kem-Buk-Nud, an Indigenous Fermented Fish Product

Panchaporn Tadpitchayangkoon^{1*}, Jirawat Yongsawatdigul²

¹Research and Development Unit of Indigenous Food Products, Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

²School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

* Corresponding author: (panchaporn@agri.ubu.ac.th)

ABSTRACT

Objective of this study was to investigate antioxidant activities of Kem-Buk-Nud, an indigenous fermented fish product, which processed by four different manufacturers (A, B, C and D samples) in Ubon Ratchathani. Peptide extracted from Kem-Buk-Nud samples exhibited DPPH and ABTS radical scavenging activities, reducing power and chelating activity. DPPH and ABTS radical scavenging activities of C samples were highest ($p < 0.05$), implying that these sample had more antioxidative peptide to terminate the radical chain reaction. Although chelating activity of all samples trended to decrease with increasing fermentation period, an increase in reducing power was found. Reducing power of samples were increased about 5 times throughout fermentation period.

INTRODUCTION

Kem-Buk-Nud is an indigenous product of North eastern part of Thailand. Unfortunately, the product is only available locally for consumption. This might be due to lack of scientific information about nutritional value for health promotion. During Kem-Buk-Nud fermentation, fish protein is hydrolyzed during fermentation and several low molecular weight compounds, such as oligopeptide and amino acids, are formed by microorganism and/or enzyme activities during fermentation. These low molecular weight compounds may offer biological activity potentially used as functional food ingredient, depending on their structural and sequential properties. It is possible that degree of protein hydrolysis during fermentation may contain some information antioxidant activities of Kem-Buk-Nud.

Objective of this study was to investigate antioxidant activities of Kem-Buk-Nud.

METHODOLOGY

Kem-Buk-Nud processed by four different manufacturers in Ubon Ratchathani (A, B, C and D samples)



Kem-Buk-Nud made by mixing striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) with salt and pineapple before packing in crown-capped glass bottle



Kem-Buk-Nud was left to ferment spontaneously in a dark room for up to 3 months.



Water soluble peptide of Kem-Buk-Nud was extracted



Antioxidant activity assay

- DPPH radical scavenging activity (Anusha *et al.*, 2008)
- ABTS radical scavenging activity (Wiriaphan *et al.*, 2011)
- Reducing power (Ahmadi *et al.*, 2007)
- Chelating activity (Decker and Welch, 1990)

RESULTS AND DISCUSSION

DPPH and ABTS radical scavenging activities

Peptide extracted from Kem-Buk-Nud samples exhibited DPPH and ABTS radical scavenging activities (Figure 1 and 2). DPPH and ABTS radical scavenging activities of C samples were higher than other samples during 3 months of fermentation ($p < 0.05$), implying that these sample had more antioxidative peptide to terminate the radical chain reaction.

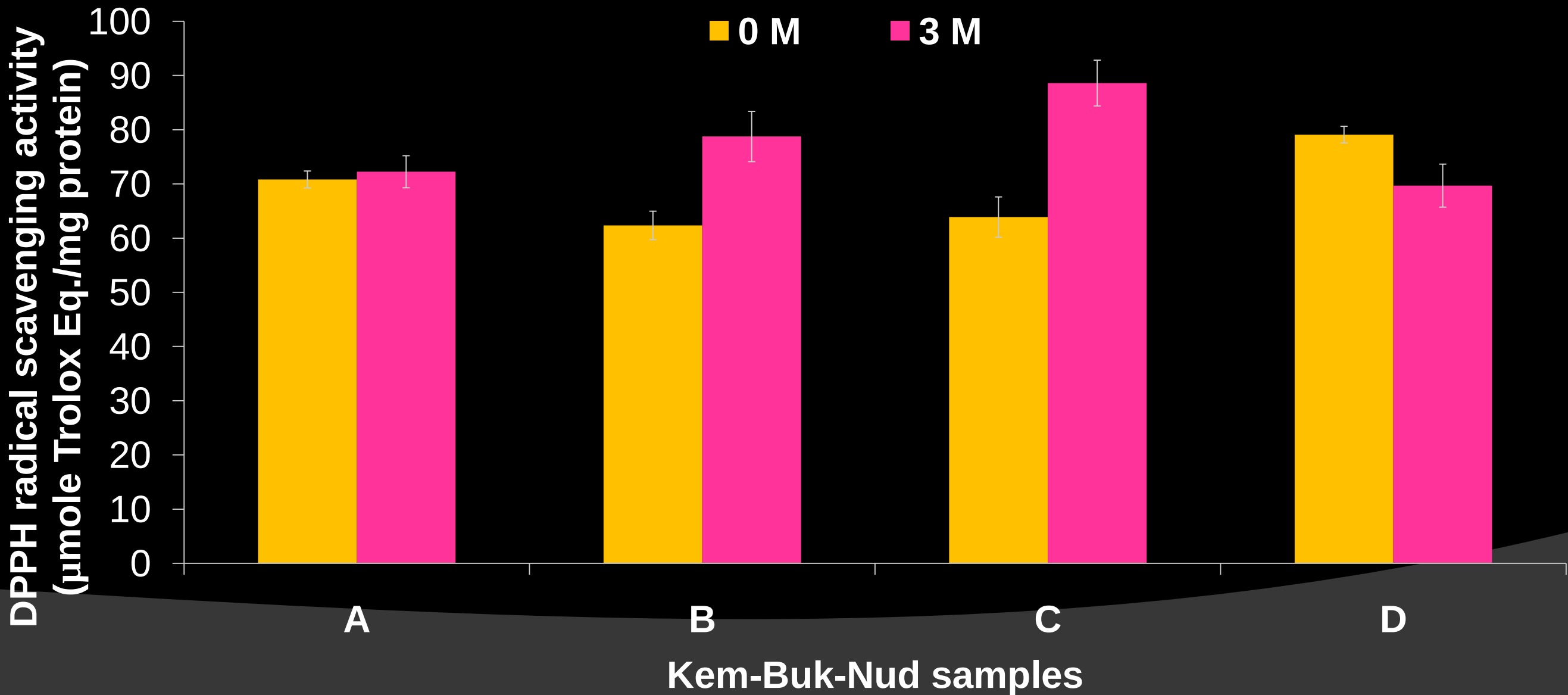


Figure 1. DPPH radical scavenging activity of Kem-Buk-Nud during 0 and 3 months of fermentation period.

DPPH radical scavenging activity was trended to increase while ABTS radical scavenging activity was decreased during fermentation. The different fermentation condition of Kem-Buk-Nud contributed to the specific olioepetide or amino acid composition, affecting radical scavenging activities.

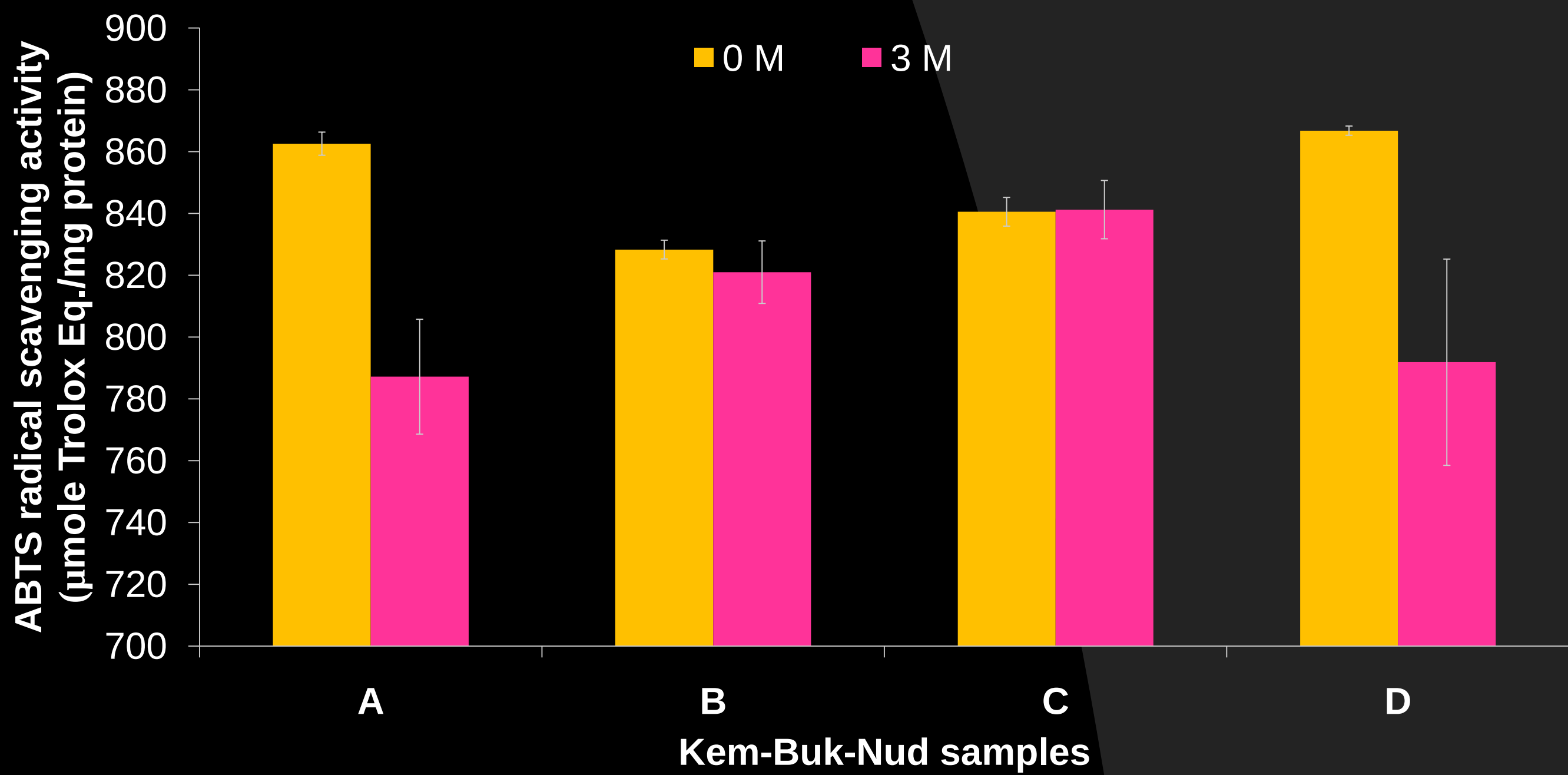


Figure 2. ABTS radical scavenging activity of Kem-Buk-Nud during 0 and 3 months of fermentation period.

Reducing power

The reducing power of Kem-Buk-Nud samples were increased significantly about 5 times from 99.93 ± 5.17 - 116.60 ± 4.17 to 498 ± 15.46 - 522 ± 19.99 $\mu\text{mole Trolox equivalent/mg protein}$ during 3 months of fermentation (Figure 3), presenting the antioxidant activity which reduces the Fe^{3+} /ferricyanind complex to ferrous form (You *et al.*, 2009).

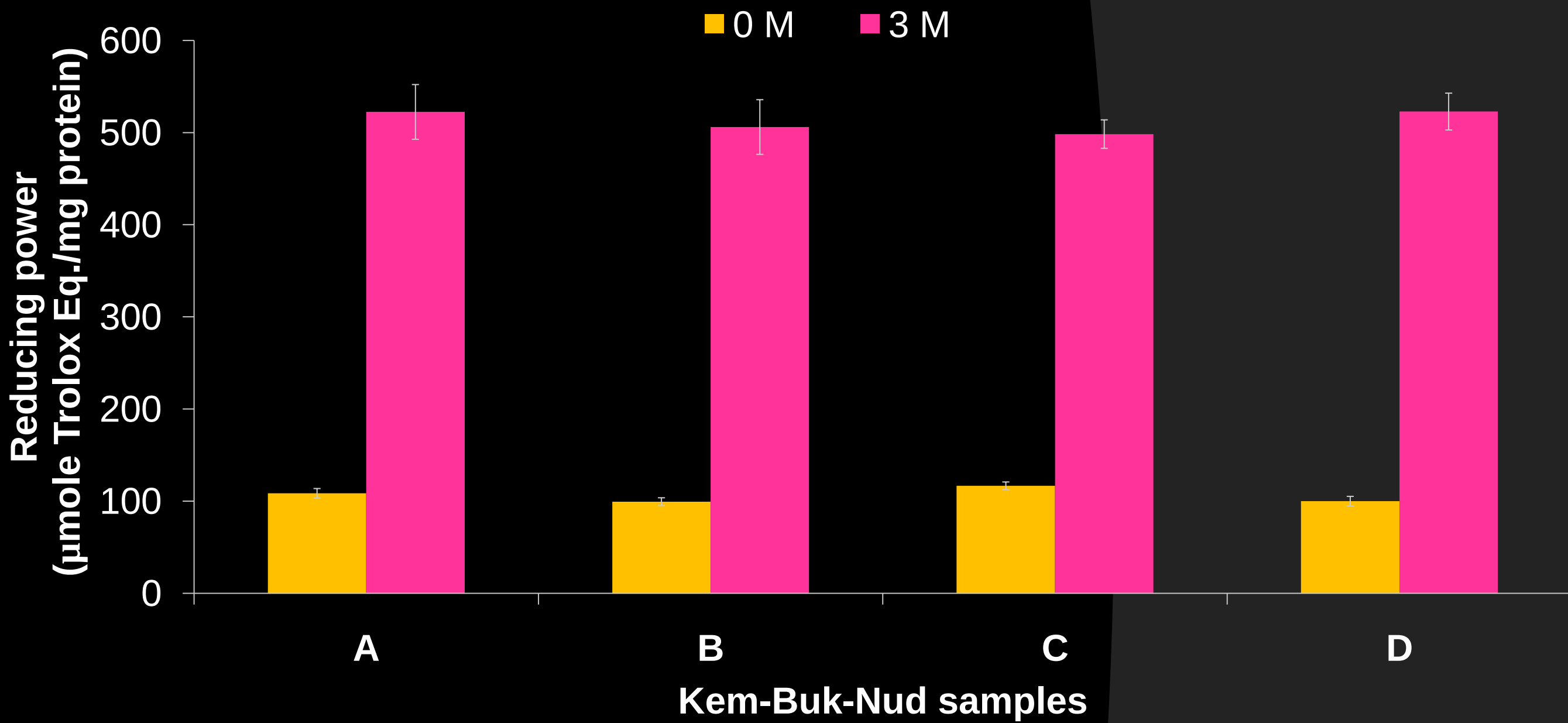


Figure 3. Reducing power of Kem-Buk-Nud during 0 and 3 months of fermentation period.

Chelating activity

Kem-Buk-Nud exhibited chelating activity (Figure 4). However, chelating activity of all samples was dramatically decreased throughout fermentation period. Acidic and/or basic amino acid, especially carboxyl and amino groups in branches of acidic and basic amino acids, respectively, plays an important role in the chelation by peptides (Saiga, *et al.*, 2003). Therefore, the rational explanation for decreasing chelating activity would be the decreasing pH during fermentation.

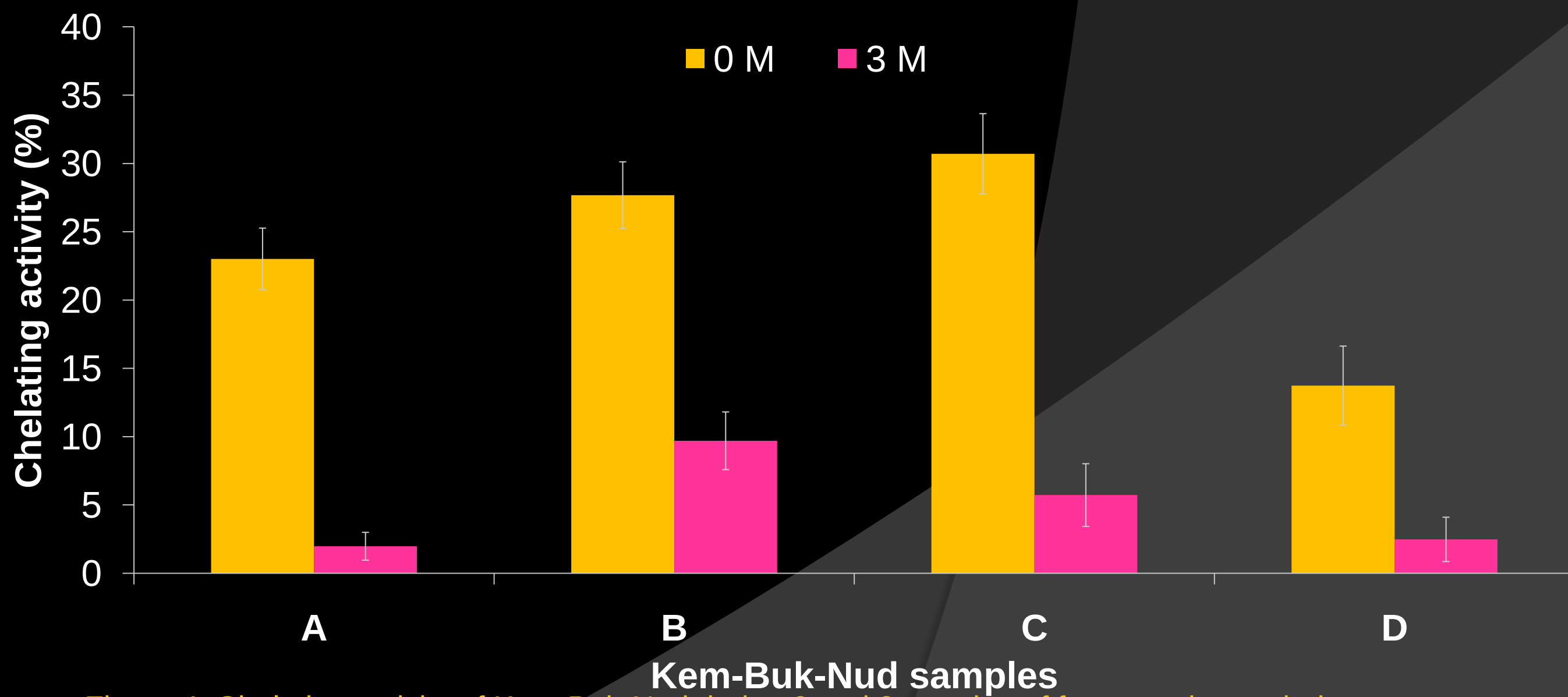


Figure 4. Chelating activity of Kem-Buk-Nud during 0 and 3 months of fermentation period.

CONCLUSIONS

The present study indicated that Kem-Buk-Nud possessed antioxidant activities throughout 3 months fermentation. Furthermore, Kem-Buk-Nud could be used as a functional food ingredient for health promotion.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (Grant No. MRG5480064). Partial funding was also obtained from the Office of the Higher Education Commission and Ubon Ratchathani University.

SELECTED REFERENCES

- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J Agric Food Chem.* 51: 3661-3667.
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Inn Food Sci Emer Tech.* 10: 235-540.

**Physicochemical Properties and Antioxidant Activities of Kem-buk-nud,
a Traditional Thai Low Salt-fermented Fish Product, during Fermentation**

Pan Promchote^{1*} and Jirawat Yongsawatdikul²

Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University,

Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

School of Food Technology, Suranaree University of Technology,

Nakhon Ratchasima, 3000, Thailand

*Corresponding author: Dr. Pan Promchote

Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University,

Warinchamrap, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

Tel: 66-45-353500 ext 3593 Fax: 66-45-288372

Email. pan.p@ubu.ac.th

Abstract

Changes in physical properties and antioxidant activities of Kem-buk-nud were investigated during fermentation for 6 months. During fermentation, a dramatic decrease in pH value was observed. This result highly related to the increasing of total acidity. Degree of protein hydrolysis increased rapidly during 3 months and then was slightly decreased over the fermentation period as well as the trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide which tended to be decrease after 4 months of fermentation period, indicating that protein aggregation would be occurred. However, protein was hydrolyzed throughout 6 months of Kem-buk-nud fermentation as the increasing of total volatile base nitrogen (TVB-N) and formaldehyde nitrogen were observed. Kem-buk-nud exhibited antioxidant activities over the fermentation period. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity increased while ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity decreased with increasing of Kem-buk-nud fermentation period. However, the higher ABTS^{•+} radical scavenging activity of all samples (0.72-0.87 mmole Trolox equivalent/mg protein) were found when compared to DPPH[•] radical scavenging activity (0.062-0.173 mmole Trolox equivalent/mg protein). Reducing power of Kem-buk-nud also increased with increasing fermentation period whereas a dramatic decrease in chelating activity of all samples was observed after 1 month of fermentation.

Keywords: Antioxidant activity, Fermented fish product, Fermentation period,

Indigenous food, Kem-buk-nud

1. Introduction

Thai traditional fermented foods are mostly produced according to family tradition and local geographic preference. Fishery fermented products can be categorized according to main processing techniques and ingredients used (Phitakpol *et al.*, 1995). Kem-buk-nud is an indigenous fermented fish product of North Eastern part of Thailand and a well known product of One Tambon One Product (OTOP). Kem-buk-nud is traditionally prepared from fresh waterfish, striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*), mixed with salt and pineapple before packing in glass bottle and then left to ferment spontaneously in a dark room for up to 3 months. Manufactures produce Kem-buk-nud without inoculation of microorganisms and with different salt concentrations, fish to pineapple ratio and fermentation period, resulting in products with variable quality (Tadpitchayangkoon *et al.*, 2010).

Fermentation is believed to enhance the nutraceutical value of fermented foods. Breakdown of fish protein by either endogenous or microbial proteinase may offer several low molecular weight compounds, such as oligopeptide and amino acids, with biological activities potentially used as functional food ingredients for health promotion, depending on their structural and sequential properties. It is possible that degree of protein hydrolysis during fermentation may contain some information regarding antioxidant activities of Kem-buk-nud. In addition, the basic knowledge of changes of protein degradation during Kem-buk-nud fermentation is presently lacking. Therefore, the aim of the present study was to investigate the antioxidant activities related to protein degradation of Kem-buk-nud during fermentation.

2. Materials and Methods

2.1 Sampling

Commercial Kem-Buk-Nud was produced through traditional fermentation technology by four different manufacturers, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), in Ubon Ratchathani, Thailand in order to better assess their contribution. It is traditionally prepared from freshwater fish, striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*). To make traditional Kem-Buk-Nud, striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) fillet was cleaned, mixed with salt and kept overnight. Then the mixture was mixed with pineapple before packing in crown-capped glass bottle. Samples were transferred to laboratory within 24 hr. after processing and then left to ferment spontaneously in a dark box for up to 6 months. Sample was randomized sampling for measuring physicochemical and antioxidant properties every month. Sample was blended using blender (Waring laboratory, Torrington, CT) set at speed 5 for 1 min and speed 10 for 30 sec and then used for further analysis.

2.2 Physicochemical analysis

2.2.1 Total acidity and pH value

Titratable acidity was determined by the method of AOAC (2000). The total acidity was calculated as lactic acid and expressed as % total acidity. pH was measured using a pH meter (Mettler Toledo, 8630, Switzerland).

2.2.2 Trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide

TCA-soluble oligopeptide concentrations were measured according to the method described by Yongsawatdigul and Piyadhamviboon (2004) with some modification. Three grams of gel were added to 27 ml of 5 % cold TCA solution. The mixtures were then homogenized at a speed of 11000 rpm for 1 min and centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4 C. The supernatants were collected and used for TCA-soluble oligopeptide

concentration using Lowry's assay (Lowry *et al*, 1951) with tyrosine as a standard. The samples were solubilized in 5 % hot sodium dodecylsulfate (SDS) solution (1:9) and determined for total soluble protein by Lowry's assay using bovine serum albumin (BSA) as a standard.

2.2.3 Degree of protein hydrolysis

Degree of hydrolysis (DH) is defined as the percentage of free amino groups cleaved from protein, which was calculated from ratio of α -amino acid and total α -amino acid. Benjakul and Morrissey (1997) were used to determine α -amino acid content. Properly diluted samples (125 μ l) were mixed well with 2.0 mL of 0.2125 M phosphate buffer, pH 8.2, followed by the addition of 1.0 mL of 0.01% TNBS solution. The mixtures were then placed in a water bath at 50 °C for 30 min in the dark. The reaction was terminated by adding 2.0 mL of 0.1 M sodium sulfite. The mixtures were cooled down at ambient temperature for 15 min. The absorbance was measured at 420 nm and R-amino acid was expressed in terms of L-leucine. Total α -amino acid obtained after acid hydrolysis. Sample was hydrolyzed using 6 N HCl. The tube with sample mixtures was flashed with nitrogen gas and sealed tightly with screw-cap. The hydrolysis was run at 100 °C for 24 h. The acid-hydrolyzed sample was filtered through Whatman paper no. 1 to remove the unhydrolyzed debris. The supernatant was neutralized with 6 N NaOH before α -amino acid determination.

2.2.4 Formaldehyde nitrogen

A sample (2.5 g) was added to 10 ml of 5% trichloroacetic acid and homogenised with a homogeniser at a speed of 11,000 rpm for 1 min. The homogenate was centrifuged at 3000g for 15 min and the supernatant was removed. To the pellet, a further 5 ml of 5% trichloroacetic acid were added and the mixture was homogenised as previously described. The supernatants were combined and neutralized to pH 6.0–6.5 and the final

volume was made up to 25 ml using distilled water. The supernatant was then used for formaldehyde determinations as described by Benjakul *et al.* (2004). Sample (1 ml) was mixed with 3 ml of acetylacetone reagent and then incubated at 60 °C for 15 min. The absorbance was measured at 412 nm. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The formaldehyde nitrogen was calculated from formaldehyde standard curve.

2.2.5 Total volatile basic nitrogen, TVB-N

TVB-N was determined according to the procedure of Siang and Kim (1992) with some modification by using Conway's microdiffusion Unit. The extract was prepared by mixing 2 g of the blended sample with 8 ml of 4% TCA and was homogenized properly. It was left for 30 minutes at ambient temperature. After then it was filtered through filter paper. Then the sample extract was kept and was labeled. Conway's units were taken which had been thoroughly cleaned with a neutral detergent to remove any containment. To the edge of the outer ring of each unit was applied sealing agent (Vaseline). Using a micropipette, 1ml of the solution (boric acid with indicator) was pipetted into the inner ring of each unit. In to the outer ring of each unit, 1 ml of the sample extract was pipetted. One ml of saturated K_2CO_3 solution was carefully pipetted into the outer ring of each unit carefully, to prevent any entering the inner ring, and immediately the units were covered and closed with clip. The solutions in the units were then mixed gently, to prevent any solution mixing from one ring to the other. The units were placed in an incubator at 37°C for 60 minutes. After that, the inner ring solution was titrated with 0.02N HCl. A blank test was also carried out using 1ml of 1% TCA, instead of sample extract. The TVB-N values were calculated and expressed in mg/100 g sample.

2.3 Antioxidation activity

The blended sample was homogenized at 1100 rpm for 1 min and then centrifuged at 3000 x g at 4 °C for 10 min. Then the supernatant was filtered through a filter paper (Whatman No. 1). The filtrate was collected for further analysis.

2.3.1 DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity

DPPH radical scavenging activity was measured as described by Anusha *et al.* (2008). An aliquot of 50 µl sample (3 mg protein/ml) was mixed with 1.95 ml of 0.1 mM DPPH in 95 % ethanol. The mixture was shaken and left for 30 min at room temperature. The absorbance was measured at 517 nm using a UV-spectrophotometer. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The DPPH radical scavenging activity was calculated from Trolox standard curve and expressed as mmol Trolox equivalents (TE)/ mg protein.

2.3.2 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical scavenging activity

ABTS radical scavenging activity was determined as described by Wiriyaphan *et al.* (2012). ABTS stock solution was prepared by mixing 7.4 mM ABTS^{•+} solution and 2.6 mM potassium persulfate solution, in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4), and kept in the dark for 16 h. Fresh ABTS^{•+} working solution was prepared by mixing ABTS^{•+} stock solution in 10 mM phosphate buffer (pH 7.4) to attain absorbance of 0.7 ± 0.02 , at 734 nm. Twenty microlitres of hydrolysate were mixed with 1980 µl of fresh ABTS^{•+} working solutions. Then, the reaction mixture was kept in the dark for 5 min and absorbance was monitored at 734 nm. Results were expressed as mmol Trolox equivalents (TE)/ mg protein.

2.3.3 Reducing power assay

The reducing power was carried out according to the method described by Ahmadi *et al.* (2007) with some modification. An aliquot of 250 µl sample was mixed

with 1.25 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 6.6) and 1.25 ml of potassium ferricyanide. Sample was incubated at 50 °C for 20 min, followed by addition of 1.25 ml of 10 % trichloroacetic acid and then centrifuged at 1500 g for 10 min. The supernatant thus collected (1.0 ml) was well mixed with 1.0 ml of distilled water and 0.2 ml of 0.1 % ferric chloride. Next it was allowed to stand at the room temperature for 10 min. Color changes were monitored at 700 nm. The reducing power was calculated from Trolox standard curve and expressed as mmol Trolox equivalents (TE)/ mg protein.

2.3.4 Metal chelating activity

Metal-chelating activity was performed according to Decker and Welch (1990). An aliquot of 1 ml sample was mixed with 3.7 ml of water, 0.1 ml of 2 mM ferrous chloride and 0.2 ml of 5 mM ferrozine. Sample was incubated at room temperature for 20 min. The absorbance was measured at 562 nm using a UV-spectrophotometer. The control was conducted in the same manner, except that distilled water was used instead of sample. The Metal chelating activity was calculated as follows:

$$\text{Metal chelating activity (\%)} = [1 - (A_{562} \text{ of sample} / A_{562} \text{ of control})] \times 100$$

2.4 Statistical analysis

Degree of variation and significance of difference were analyzed using an analysis of variance (ANOVA) that was made with General Linear Models (SPSS for window, version 10.01 SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Duncan's multiple-range test (DMRT) was applied to determine differences ($P \leq 0.05$) between treatment means.

3. Results and Discussion

3.1 Total acidity and pH value of commercial Kem-buk-nud during fermentation

Kem-buk-nud used in this study originated from four different manufactures in the North Southern part of Thailand. The initial pH values of Kem-buk-nud from different

manufactures were in the range of 4.8-5.3 (Figure 1). The significant difference was observed in the initial pH of samples between different manufactures ($P < 0.05$). The initial pH of Kem-buk-nud varied according to fish to pineapple ratio and salt concentration in the recipes of manufactures. Tadpitchayangkoon *et al.* (2010) reported that the ratio of fish to pineapple affected the initial pH of Kem-buk-nud which consequently influenced enzyme activity during fermentation. A similar trend of pH changes among four manufacturing technique of A, K, L and R was found. The pH decreased during first month and then slightly increased after 3 months fermentation and decreased again thereafter. The change of pH was probably due to produce acid and alkaline volatile base nitrogen during the fermentation (Xu *et al.*, 2008). The lowering pH was an important factor in the control spoilage and pathogen (Swetwathana *et al.*, 1999). Lactic acid bacteria (LAB) played an important role in pH reduction (Ostergaard *et al.*, 1998), representing total acidity of all samples increased throughout the fermentation time (Figure 1). Sample A and L showed the higher total acidity content when compared to others. Manufacturers produced Kem-buk-nud with different salt concentration, fish to pineapple ratio and pre-incubation time of fish with salt before mixing with pineapple and fermenting. Only the fish to pineapple ratio, not salt percentage, influenced the total acidity production during Kem-buk-nud fermentation (Tadpitchayangkoon, 2010). Thus the pH and total acidity influenced by the different manufacturing technique.

3.2 Protein degradation of commercial Kem-buk-nud during fermentation

Degree of protein hydrolysis (DH) indicated the extent of proteolysis or the percentage of peptide bonds cleaved during processing and fermentation. DH of Kem-buk-nud increased rapidly during 3 months of fermentation and then slightly decreased over the fermentation period (Figure 2). The same trend of DH was affected by raw materials and combined action of proteolytic enzyme endogenously present in the

materials and those derived from microorganisms involved (Faithong *et al.*, 2010). The resulting peptides are used as the substrate for the microorganism, which play an important role in further hydrolysis as well as the unique flavor development (Valyasevi and Rolle, 2002)

Trichloroacetic acid (TCA)-soluble oligopeptide in Kem-buk-nud trended to increase during fermentation. Among all samples tested, Sample L and A contained more TCA-soluble oligopeptide than sample K and R ($P < 0.05$, Figure 3). The marked difference was noticeable at the initial date of fermentation. Difference in TCA-soluble oligopeptide observed among samples was associated with the differences in initial raw mix ingredients and proteolysis induced by acidic condition (Matulis *et al.*, 1995; Visessanguan *et al.*, 2004). These results were thought to reflect the activity of proteinase, though it could be concluded that they were of microbial or indigenous raw material origin. The initial hydrolysis of muscle protein is attributed mainly to endogenous cathepsin and is followed by the action of microbial peptidases, which further degrade the protein fragments to small peptide and free amino acids (Molly *et al.*, 1997)

TVB-N content for samples of different manufactures is presented in Figure 3. TVB-N content showed a similar trend among four samples and increased gradually during 6 months fermentation. TVB-N, an indicator of fermentation in a protein-rich food, was high in samples A. It might be due to the difference in manufacturing technique because there was an autolysis process, producing some volatile base compounds. Proteolysis is an important biochemical change during the fermentation, influencing both texture and flavor development through the formation of several low-molecular weight compounds, mainly peptide, amino acids, aldehydes, organic acids and amines (Roseiro *et al.*, 2008)

Formaldehyde nitrogen content plays an important role as the indicator of degree of aging or putrefaction and optimum taste (Byun *et al.*, 2000). Formaldehyde nitrogen content exhibited a similar changes trend among samples (Figure 3). The formaldehyde nitrogen content increased quickly during 2 months fermentation but increased a little thereafter. The formaldehyde nitrogen content in sample A was higher than others as well as TVB-N value. However, the increase in formaldehyde nitrogen content of all samples was found, indicating that protein was hydrolyzed gradually by endogenous proteinase throughout fermentation period.

3.3 Antioxidant activity of commercial Kem-buk-nud during fermentation

DPPH radical scavenging activity is shown in Figure 4. DPPH is a stable free radical with maximum absorbance at 517 nm in ethanol. The radical is scavenged when DPPH encounters a proton-donating substance, resulting in a decrease in absorbance (Shimada *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 2008). The radical scavenging activity all samples significantly increased with increasing fermentation time. These results highly related to the results of protein degradation. The DPPH radical scavenging activity tended to be high in sample L and A rather than others. While the higher proteolytic activity induced protein degradation (Figure 3), the antioxidative peptides would be occurred at the same time. The different fermentation condition of Kem-buk-nud contributed to the specific oligopeptide or amino acid composition. These results suggested that Kem-buk-nud fermented more than 3 months possibly had more antioxidative peptides, which could react with free radicals to terminate the radical chain reaction.

ABTS radical scavenging activity assay is a colorimetric assay that evaluates the potential of an antioxidant to inhibit the formation of a colored radical cation $\text{ABTS}^{\bullet+}$, a blue-green chromophore with the characteristic absorption at 734 nm. The $\text{ABTS}^{\bullet+}$ is generated by the oxidation of ABTS with potassium persulphate and reduced in the

presence of hydrogen-donating antioxidants or of chain breaking antioxidant (Raghavan *et al.*, 2008). Commercial Kem-buk-nud showed varying ABTS radical scavenging activity (Figure 5). The activity of K and L samples was increased after 2 months fermentation while that of A and R was decreased. Peptide produced might be different in terms of amino acid composition, sequence and chain length. Li *et al.*(2012) reported the grass carp hydrolysate prepared using Alcalase with DH ranging from 10-20% had increased ABTS scavenging activity with increasing DH. However, the decreasing of activity was found in all samples throughout fermentation period. ABTS activity of Kem-buk-nud was in the range of 0.72-0.87 mmol TE/g protein which was higher than that of Jaloo (0.11-0.152 mmol TE/g protein), Koong-som (0.0576-0.0679 mmol TE/g protein) and Kapi (0.124-0.376 mmol TE/g protein) (Faithong *et al.*, 2010)

The reducing power presents the antioxidants in sample, which reduce the Fe^{3+} /fericyanind complex to the ferrous form (You *et al.*, 2009). The ferrous reducing power of Kem-buk-nud was increase throughout fermentation period, indicating that the reducing power was found in Kem-buk-nud during fermentation (Figure 6). The reducing power of all samples was highly related to the result of DPPH radical scavenging activity (Figure 4). At the end of fermentation period, the reducing power of all samples was increased about 7 times from 0.09-0.11 to 0.73-0.79 mmole TE/mg protein. Bougatef *et al* (2010) reported that DPPH activity and reducing power depended on the degree of hydrolysis of protein. The protein degradation of samples was found throughout fermentation period (Figure 3). The results indicated that the reducing power had increased with increasing protein degradation.

Metal chelating activity was determined by measurement of the formation of ferozine complex with ferrous ion. Ferrous ion is a pro-oxidant and can interact with

hydrogen peroxide in a Fenton reaction to produce reactive oxygen species and hydroxyl radical, leading to the initiation and/or acceleration of lipid oxidation (Binsan *et al.*, 2008). This complex is interrupted in the presence of a chelating agent, resulting in the decreasing of violet color. Most difference between metal chelating activity and ferrous reducing power were observed. The initial chelating activity of commercial Kem-buk-nud was varied (Figure 7). It could be observed that when fish meat was subjected to different pretreatments, the peptides generated showed varying chelating activity, though the different degree of protein hydrolysis was observed. Therefore, different antioxidant peptides were produced from the samples with different pretreatments. Khantaphant, *et al.* (2011) reported that pretreatment affect the structure of protein, in which hydrolysis could take place at different position in peptide chains. Metal chelating activity of all samples likely decreased after starting fermentation. This was possibly due to the changes of charge in peptides when the decreasing of pH was observed during fermentation. Yarnpakdee *et al.* (2014) reported that the metal chelating activity of peptides derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) decreased by 15.3-25.9% after pH adjustment to acidic and alkaline pH. The metal chelating activity of commercial Kem-buk-nud was decreased throughout fermentation period, indicating that the acidic pH affected the metal chelating activity in Kem-buk-nut during fermentation.

4. Conclusions

Our study first reported on the physicochemical properties and antioxidant activities of Kem-buk-nud, a Thailand indigenous low-salt fermented fish product. Changes in physicochemical properties during naturally prolonged fermentation of Kem-buk-nud could enhance antioxidant activities throughout the fermentation period. Protein degradation during fermentation led to the accumulation of short chain peptide which was

capable of reacting with oxidants. These results suggested that Kem-buk-nud had the potential to be an important source of natural antioxidants for health promotion. Further research should be done in order to indentify the peptide fractions responsible for the antioxidant potential.

Acknowledgements

The authors are grateful for the financial support from the Thailand Research Fund (TRF), the Commission on Higher Education, Ministry of Education and Ubon Ratchathani University, Thailand.

References

- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. Food Chemistry. 105:57-64.
- Anusha G.P. Samaranayaka, Eunice, C.Y. and Li-Chan. 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Food Chemistry. 107:768-776.
- AOAC. 2000. Official methods of analysis of AOAC international. Washington, D.C. Association of Official Analytical Chemists.
- Benjakul S., Visessaguan, W., Tanaka, M. 2004. Induced formation of dimethylamine and formaldehyde by lizardfish kidney trimethylamine-N-oxide demethylase. Food Chemistry. 84: 297-305.
- Benjakul, S., and Morrissey, M. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3423-3430.
- Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M., and Kishimura, H. 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the

- cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Food Chemistry. 106(1), 185–193.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Ple, R., Leroy, Y., Gullochon D., Barkia, A. and Nasri, M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. Food Chemistry. 111(2): 350-356.
- Byun, M.W., Lee, K.H., Kim, D.H., Kim, J.H., Yook, H.S. and Ahn, H.J. 2000. Effects of gamma radiation on sensory qualities, microbiological and chemical properties of salted and fermented squid. Journal of Food Protection. 63:934-939.
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. Journal of Agricultural Food Chemistry. 38:6674-677.
- Faithong, N., Benjakul, S., Phatcharat, S. and Binsan W. 2010. Chemical composition and antioxidant activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. Food Chemistry, 119:133-140.
- Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R. 2011. The effects of pretreatment on antioxidant activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstipe red snapper (*Lutjanus vita*). LWT-Food Science and Technology. 44:1139-1148.
- Li, X., Luo, Y., Shen, H., You J. 2012. Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. Journal of the Science Food and Agricultural. 92 (2):292-298.
- Matulis, R.J., Mekeith, F.K., Sutherland, J.W., and Susan, B.M. 1995. Sensory characteristics of frankfurters as affected by fat, salt, and pH. Journal of Food Science, 60:42-47.

- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G. Raemeakers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. 1997. The importance of meat enzyme in ripening and flavour generation in dry fermented sausage. *Food Chemistry*, 59: 539-545.
- Ostergaard, A., Emberk, P.K.B., Yamprayoon, J., Wedell-Neergaard, W. Huss, H.H. and Gram, L. 1998. Fermentation and spoilage of som fak, a Thai low-salt fish product. *Tropical Science*. 38:105-112.
- Phithakpol, B., Varayanond, W., Reungmaneevaitoon, S. and Wood, H. 1995. The traditional fermented foods of Thailand. Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University, Bangkok.
- Raghavan S. Kristinsson H.G. Leeuwenburgh. C. 2008. Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(21):10359-10367.
- Roseiro, L., Santos, C., Sol, M., Borges, M., Anjos, M., Gonçalves, H., *et al.* 2008. Proteolysis in Painho de Portalegre dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science*. 79:784-794.
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*. 31: 266-287.
- Siang, N.C. and Kim, L.L. 1992. Determination of trimethylamine oxide, trimethylamine and total volatile basic nitrogen by Conway's micro-diffusion method. In: *Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fisheries Products* (Miwa and Ji, eds.) Southeast Asia Fisheries Development Center. B3.1-B 3.6.
- Swetwathana, A., Leutz, U. and Fischer, A. 1999. Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures. *Fleischwirtschaft International*. 1: 26-29.

- Tadpitchayangkoon P. Tongrueng S., Chumpengpan M., Phemphonr W. 2010. Improvement in antioxidant properties of Kem-Buk-Nut for health food market. Oral presentation. Food Innovation Asia Conference 2010. , June 17-18, 2010, BITEC, Bangkok, Thailand.
- Valyisevi, R and Rolle, R.J. 2002. An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: Scope for their improvement. *International Journal of Food Microbiology*. 75:231-239.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Riebroy, S. and Thepkasikul, P. 2004. Changes in composition and functional properties of protein and their contribution to Nham characteristics. *Meat Science*. 64:579-588.
- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B. and Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*. 132: 104-111.
- Xu, W. Yu, G., Xue, C., Xue, Y., Ren, Y. 2008. Biochemical changes associated with fast fermentation of squid processing by-products for low salt fish sauce. *Food Chemistry*. 107:1597-1604.
- Yang, B., Zhao, M.M., Shi, J., Yang, N. and Jiang, Y.M. 2008. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chemistry*, 106: 685-690.
- Yarnpakdee S., Benjakul, S., Kristinsson, H.G. and Kishimura, H. 2014. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis. *Journal of Food Science and Technology*.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. *Food Chemistry*. 87:447-455.

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 10 : 235-240.

ร่างต้นฉบับ ห้าม่อเอง

Figure caption

Figure 1 Total acidity and pH value of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 2 Degree of hydrolysis (%) of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 3 Total volatile base nitrogen, Formaldehyde nitrogen and TCA-soluble oligopeptide content of of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 4 DPPH radical scavenging activity of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 5 ABTS radical scavenging activity of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 6 Reducing power of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

Figure 7 Chelating activity of Kem-buk-nud from four different manufactures, namely, Mae Aree (A), Mae Kimsur (K), Yae Lek (L) and Ratanasin (R), during fermentation.

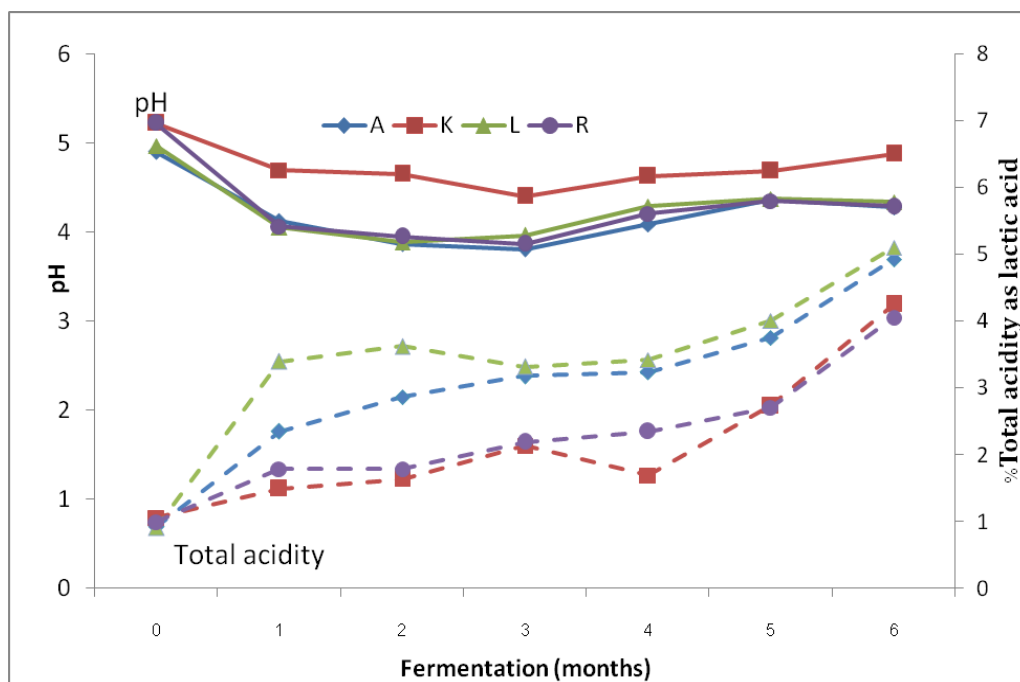


Figure 1

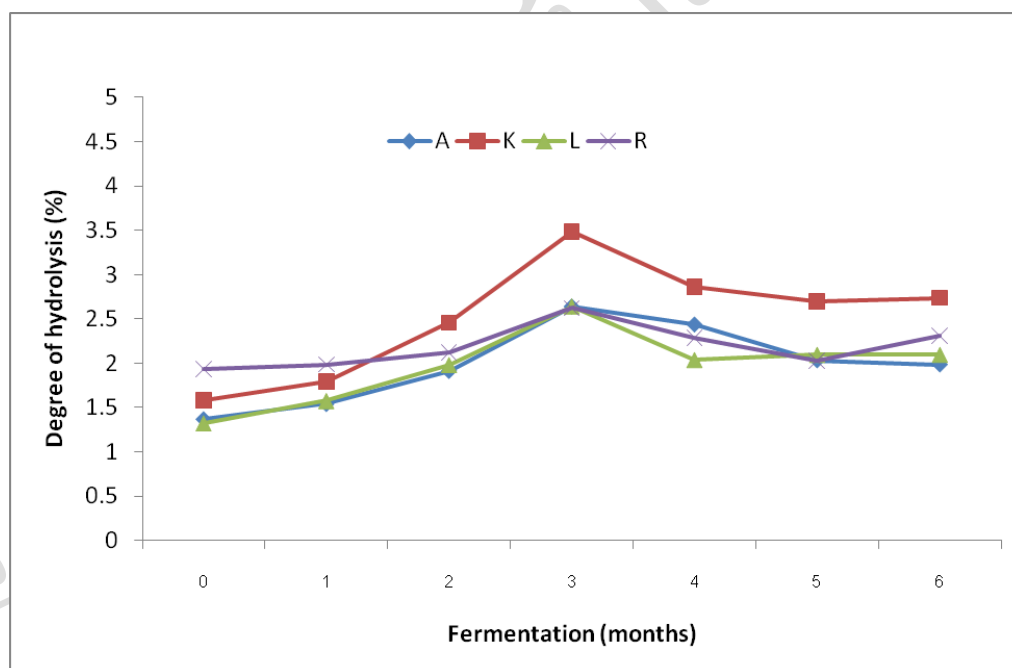


Figure 2

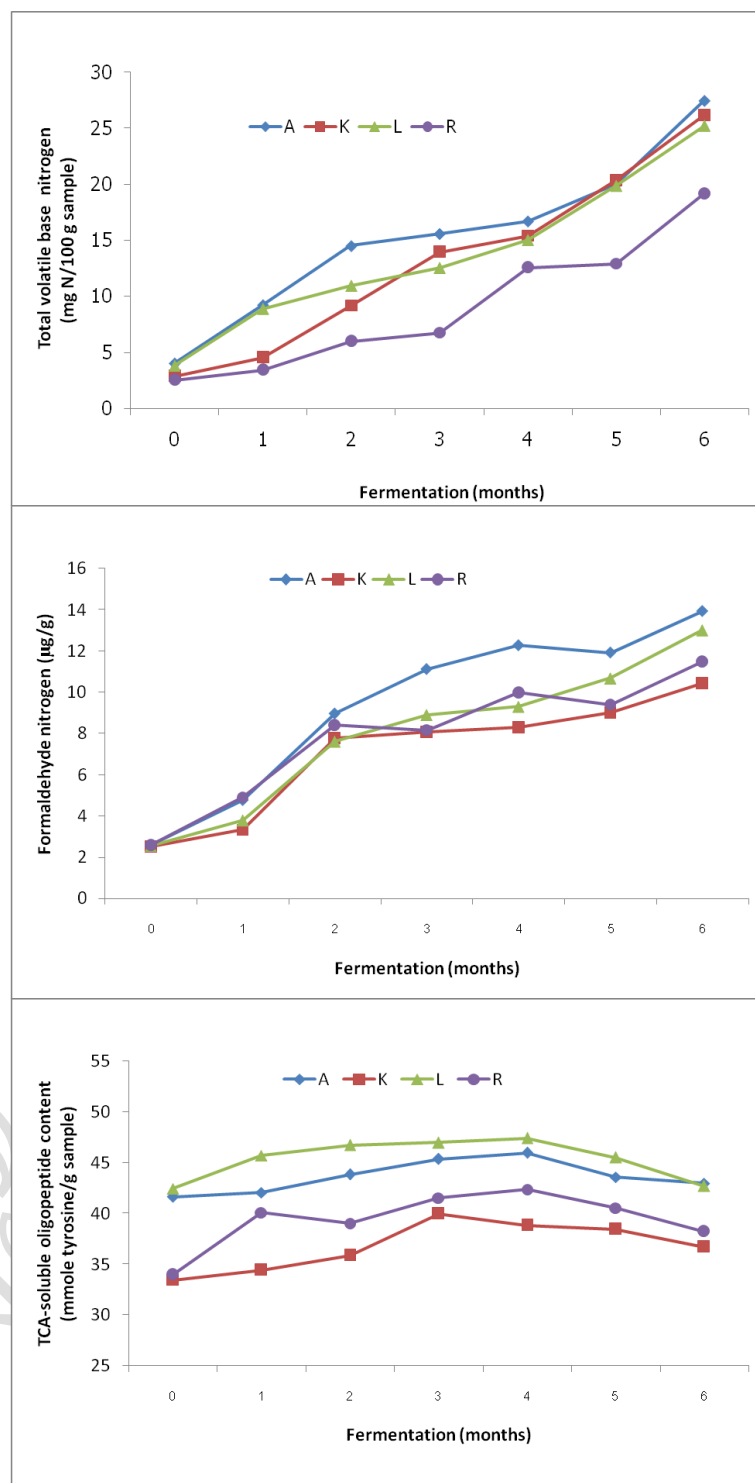


Figure 3

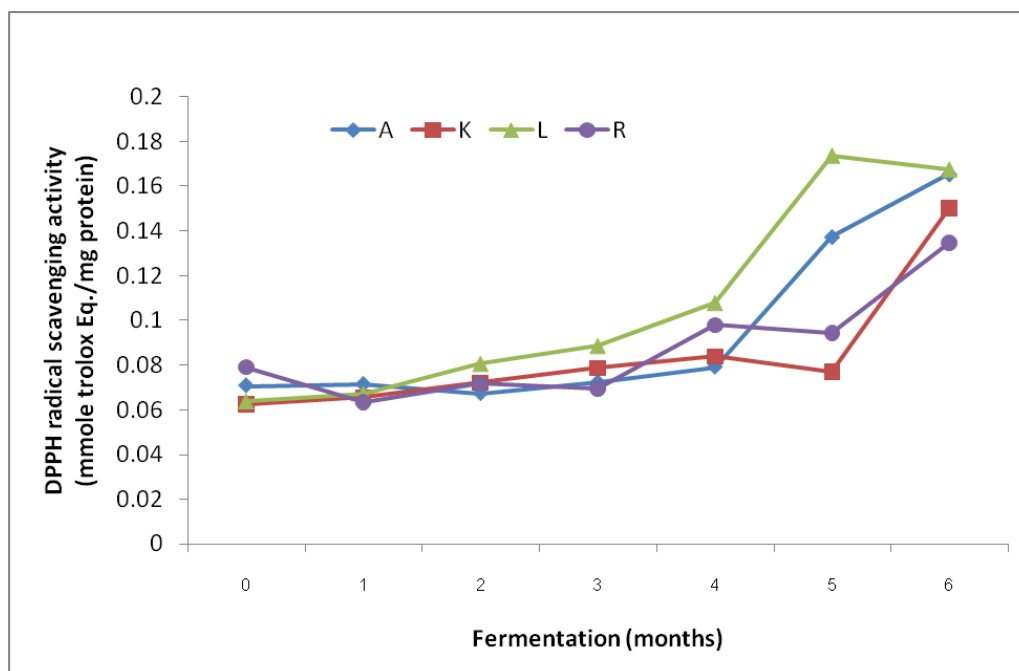


Figure 4

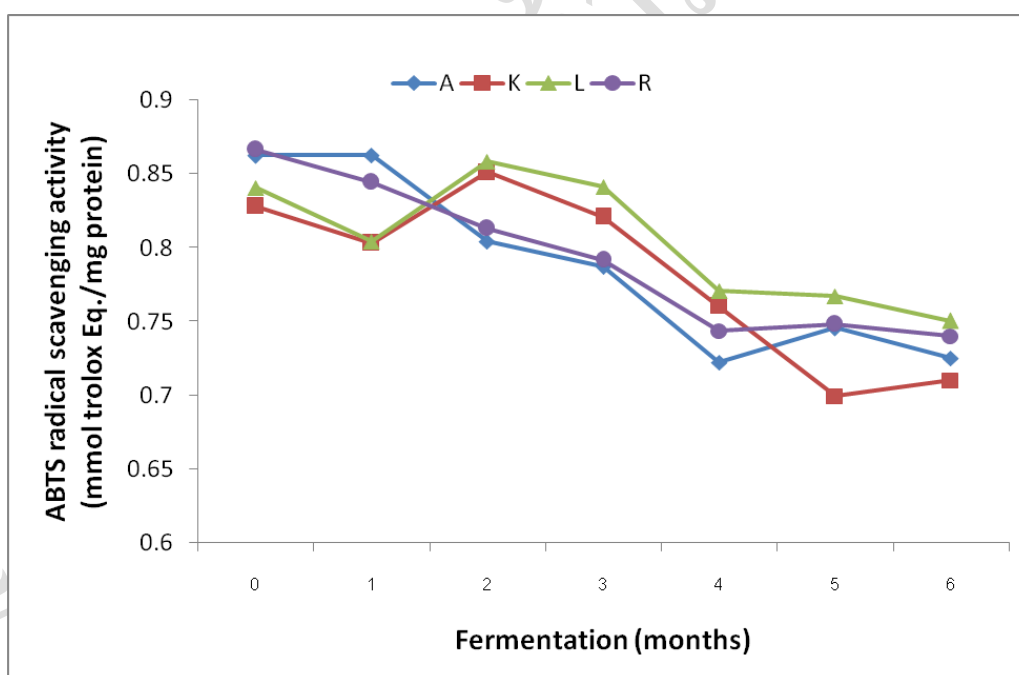


Figure 5

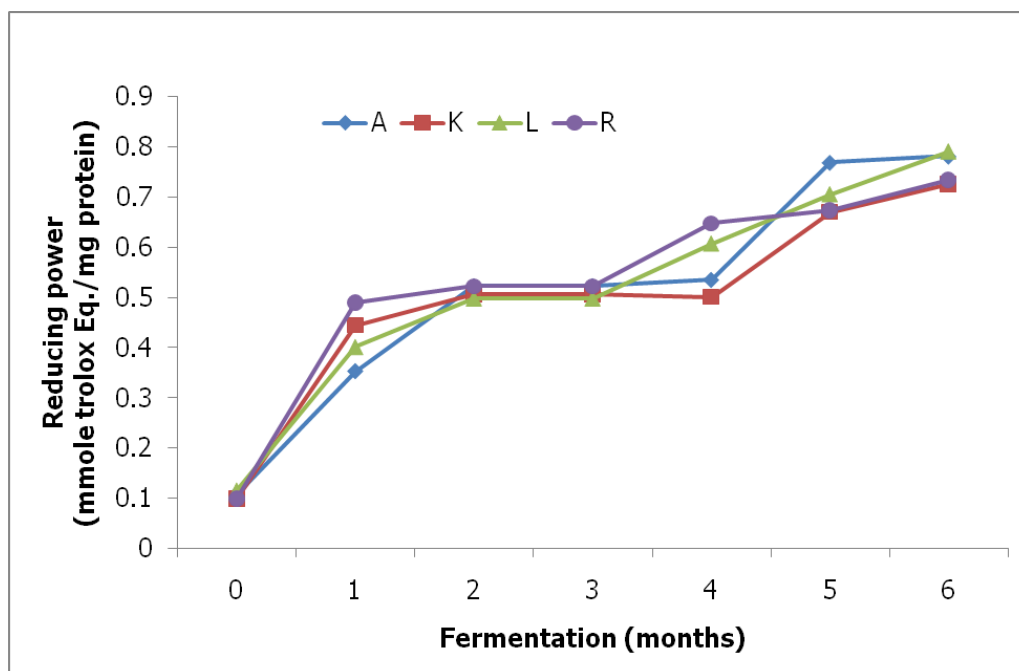


Figure 6

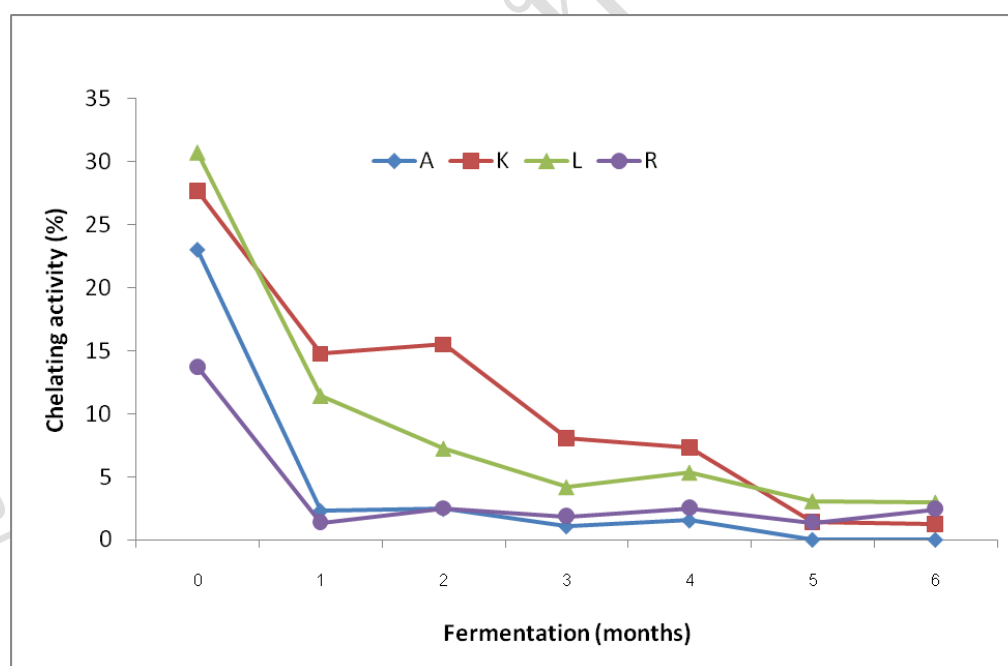


Figure 7

ภาคผนวก

ผลงานภาคโปสเตอร์

Abstract



Food Innovation Asia Conference 2012

14-15 June 2012

BITEC, Bangkok, THAILAND

PD – 120

Antioxidant Activity of Kem-Buk-Nud, an Indigenous Fermented Fish Product

Panchaporn Tadpitchayangkoon^{1,*}, Jirawat Yongsawatdigul²

¹Research and Development Unit of Indigenous Food Products, Department of Agro-Industry, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand

²School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

* Corresponding author: panchaporn@agri.ubu.ac.th

Abstract

Kem-Buk-Nud is an indigenous product of North eastern part of Thailand. Unfortunately, the product is only available locally for consumption. This might be due to lack of scientific information about nutritional value for health promotion. Objective of this study was to investigate antioxidant activities of Kem-Buk-Nud. Kem-Buk-Nud was processed by four different manufacturers (A, B, C and D samples) in Ubon Ratchathani in order to better assess their contribution. Kem-Buk-Nud made by mixing striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) with salt and pineapple before packing in crown-capped glass bottle and then left to ferment spontaneously in a dark room for up to 3 months. The antioxidant activities (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activity, reducing power and chelating activity) of Kem-Buk-Nud samples were investigated. Peptide extracted from Kem-Buk-Nud samples exhibited DPPH and ABTS radical scavenging, reducing power and chelating activity. However, antioxidant activities of Kem-Buk-Nud from different manufacturers were varied. DPPH and ABTS radical scavenging activities of C samples were highest ($p < 0.05$), implying that these sample had more antioxidative peptide to terminate the radical chain reaction. Although chelating activity of all samples seemed to decrease with increasing fermentation period, an increase in reducing power was found. Reducing power of all samples was 498 ± 15.46 to 522 ± 19.99 μ mole Trolox equivalent/mg protein ($p > 0.05$). The present study indicated that Kem-Buk-Nud possessed antioxidant activities and could be used as a functional food ingredient for health promotion.

Keywords: Kem-Buk-Nud, antioxidant, fermented fish