



กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูกปลานิล  
และผลต่อเซลล์สร้างกระดูก

**Biological Activity of Tilapia Bone Protein Hydrolysate and its Effects on  
Osteoblasts**

สุภาวดี จอดนาค

**Supavadee Jodnak**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาอาหารเพื่อสุขภาพและโภชนาการ  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partail Fulfillment of the Requirements for the Degree of  
Master of Nutraceutical and Functional Food  
Prince of Songkla University**

2556

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**ชื่อวิทยานิพนธ์**    กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากกระดูกปลานิลและผลต่อเซลล์  
สร้างกระดูก

**ผู้เขียน**            นางสาวสุภาวดี จอดนาค

**สาขาวิชา**         อาหารเพื่อสุขภาพและโภชนาการ

<b>อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก</b>	<b>คณะกรรมการสอบ</b>
.....	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรี ทองเรือง)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์)
	.....กรรมการ
<b>อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม</b>	(ศาสตราจารย์ ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ)
.....	.....กรรมการ
(ดร.ทพญ.กนกวรรณ ปัญญาขงค์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรี ทองเรือง)
	.....กรรมการ
	(ดร.ทพญ.กนกวรรณ ปัญญาขงค์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาอาหารเพื่อสุขภาพและ  
โภชนาการ

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ  
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรี ทองเรือง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุภาวดี จอดนาค)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวสุภาวดี จอดนาค)

นักศึกษา

**ชื่อวิทยานิพนธ์** กิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากกระดูกปลานิลและผลต่อเซลล์สร้างกระดูก

**สาขาวิชา** อาหารเพื่อสุขภาพและโภชนาการ

**ชื่อผู้เขียน** นางสาวสุภาวดี จอดนาค

**ปีการศึกษา** 2555

### บทคัดย่อ

องค์ประกอบหลักของกระดูกปลานิลคือเถ้าและโปรตีนในปริมาณร้อยละ 60.82 และ 24.43 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ การสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิลด้วยสารละลายกรดซิตริก (ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 75 นาที ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนร้อยละ 70.38 และ 38.15 ตามลำดับ การย่อยโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า อัตราการย่อยโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้สารละลายกรดมีค่าสูงสุด (ร้อยละ 45.48) ภายใน 2 ชั่วโมง และสูงกว่าอัตราการย่อยของโปรตีนสกัดที่ใช้น้ำร้อนประมาณ 2 เท่า การประเมินสมบัติด้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสทั้งสองชนิดด้วยค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS, ความสามารถรีดิวซ์ ความสามารถจับอ็อกซาลิโงและ ความสามารถจับแคลเซียม พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำร้อนมีค่าความสามารถต่างๆ สูงกว่าค่าความสามารถดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) การประเมินผลของโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ต่อเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิลโดยใช้น้ำร้อนเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สร้างกระดูกได้ ในขณะที่โปรตีนที่สกัดได้โดยใช้สารละลายกรดร้อนและโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำร้อนและย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเพิ่มการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุด เมื่อแยกโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลสดังกล่าวด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตัน พบว่า เปปไทด์ที่แยกได้มีความสามารถจับแคลเซียม ความสามารถจับอ็อกซาลิโงและ ความสามารถรีดิวซ์ สูงกว่าตัวอย่างเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการแยก ในขณะที่ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของตัวอย่างเริ่มต้นสูงกว่าเปปไทด์ที่แยกได้ ในขณะที่เปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำร้อนมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าเปปไทด์ที่แยก

(6)

จากโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรดร้อน โดยเฉพาะเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน ในขณะที่เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5 กิโลดาลตัน จากตัวอย่างทั้งสอง มีความสามารถดีวิสต์สูงกว่าตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการแยก

**Thesis Title** Biological Activity of Tilapia Bone Protein Hydrolysate and its Effects on Osteoblasts

**Author** Miss Supavadee Jodnak

**Major Program** Nutraceutical and Functional Food

**Academic Year** 2012

### **Abstract**

Principal compositions of tilapia bone were ash and protein with value of 60.82% and 24.43% of dried bone weight, respectively. Isolation of bone protein with 5% w/v citric acid and water at 121°C for 75 min yielded 70.38% and 38.15% of protein recovery. Hydrolysis of the isolated bone proteins was performed with pepsin for 6 h. The hydrolysate of acid-isolated bone protein (AIB) showed degree of hydrolysis about two times higher than that of the water-isolated bone protein (WIB) where the highest value (45.48%) occurred within 2 h. Evaluation of antioxidative activities of both protein hydrolysates by measurement of DPPH and ABTS radical scavenging activities, reducing power, iron chelating activity and calcium binding activity showed that the WIB hydrolysate exhibited all measured activities statistically significant higher than those of the AIB hydrolysate ( $p < 0.05$ ). As well, the WIB hydrolysate after 6-h hydrolysis could promote growth of MC3T3-E1 osteoblasts. The AIB and WIB hydrolysate after 1-h hydrolysis promoted alkaline phosphatase activity and enhanced mineralization of osteoblasts. Fractionation of the protein isolate and hydrolysates by using ultrafiltration with molecular weight cut-off 1 and 5 kDa provided fractionated peptides with strong activities; reducing power, iron chelating activity and calcium binding activity, with relative to those of the un-fractionated samples. The unfractionated samples showed, however, higher DPPH and ABTS radical scavenging activities. The fractionated peptides derived from WIB hydrolysate exhibited stronger antioxidative activity than those of the AIB hydrolysate, especially in the fraction with molecular weight lower than 1 kDa. The fractionated peptides with molecular weight higher than 5 kDa of both samples showed higher reducing power than their unfractionated counterparts.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีต้องขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จักรี ทองเรือง ประธานกรรมการที่ปรึกษา และ ดร.ทพญ. กนกวรรณ ปัญญาขงค์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำในเรื่องต่างๆ ตลอดระยะเวลาที่ศึกษาทำงานวิจัยและตรวจทานแก้ไขรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุปรียา ยืนยงสวัสดิ์ ประธานกรรมการ จาก คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ ศาสตราจารย์ ดร.นทีทิพย์ กฤษณามระ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรรมการจากบัณฑิตวิทยาลัย คณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณโรงงาน โกลเบท จังหวัดนครพนม ที่ให้ความอนุเคราะห์วัสดุดิบ เพื่อใช้ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณครูอาจารย์และผู้ให้ความรู้ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอน ตลอดมา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากรของคณะอุตสาหกรรมเกษตร คณะทันตแพทยศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

ขอขอบพระคุณคุณแม่คุณพ่อที่สนับสนุนในด้านการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจ ขอบคุณพี่ๆเพื่อนๆและน้องๆที่คอยให้คำแนะนำช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการศึกษาและทำการวิจัยรวมทั้งทุกท่านที่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

สุภาวดี จอดนาค



## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	(7)
กิตติกรรมประกาศ.....	(8)
สารบัญ.....	(9)
รายการตาราง.....	(10)
รายการภาพประกอบ.....	(11)
<b>บทที่</b>	
1 <b>บทนำ</b>	
บทนำต้นเรื่อง.....	1
การตรวจเอกสาร.....	3
วัตถุประสงค์.....	20
2 <b>วัตถุประสงค์และวิธีการ</b>	
วัตถุประสงค์.....	21
วิธีการ.....	24
3 <b>ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....</b>	
30	
4 <b>บทสรุป.....</b>	
58	
เอกสารอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	77

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 สารเคมี.....	
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	
2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	
3 องค์ประกอบทางเคมีของกระดุกปลานิล ( <i>Oreochormis niloticus</i> ).....	
<b>Error! Bookmark not defined.</b>	

## รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1	รูปร่างลักษณะปลานิลดำ..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
2	การดูดซึมแคลเซียม..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
3	ตัวอย่างของสมบัติของเปปไทด์..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
4	โครงสร้างของกระดูก..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
5	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation)..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
6	ขั้นตอนการสร้างของกระดูก..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
7	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรตีนของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำหรือกรด ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที ( <sup>a-d</sup> $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการสกัด และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
8	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละของผลผลิตที่ได้ของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยกรดหรือน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ( <sup>a-d</sup> $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการสกัด และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)..... <b>Error! Bookmark not defined.</b>
9	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) โดยเอนไซม์เปปซินที่ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (เอนไซม์/ สับเสตรท: 3/100) ( <sup>a-d</sup> $p < 0.05$ แสดงความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อย และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด).....

**Error! Bookmark not defined.**

- 10 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถจับแคลเซียมของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (<sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อย และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด).....

**Error! Bookmark not defined.**

- 11 กราฟค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถต้านอนุมูล DPPH (a) และ ABTS (b), ความสามารถรีดิวซ์ (c) และ ความสามารถจับโลหะ (d) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่เวลาต่างๆ (<sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อยและ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)...

**Error! Bookmark not defined.**

### รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่

หน้า

- 12 ผลของโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด(AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 cells หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 (a, c) และ 48 ชั่วโมง (b, d) และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที (\*  $P < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ).....

**Error! Bookmark not defined.**

- 13 ผลของโปรตีนสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) และกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก (MC3T3-E1 cells) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (a, c) และ 14 วัน (b, d) (\*  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)..

**Error! Bookmark not defined.**

- 14 ผลของโปรตีนสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) และกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-300

ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก (MC3T3-E1 cells) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (b, f) และ 14 วัน (c, g) และ ย้อมสี แคลเซียมด้วยอะลิซารีน เสดหลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (a) ,และ 14 วัน (d) (\*p < 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ).....

**Error! Bookmark not defined.**

- 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความสามารถจับแคลเซียมของโปรตีนสกัด ด้วยสารละลายกรดและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำที่ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการแยกด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (MW >5 kDa, 5–1 kDa, and <1 kDa) (<sup>a-d</sup> p < 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดโมเลกุล, <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด และ \*แสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างและ CPP).....

**Error! Bookmark not defined.**

- 16 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถต้านอนุมูล DPPH (a) และ ABTS (b), ความสามารถรีดิวส์ (c) และ ความสามารถจับโลหะ (d) ของโปรตีนสกัด ด้วยกรด และ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ เปปซินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแยกด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (<sup>a-d</sup> p < 0.05 แสดง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดโมเลกุล และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด).....

**Error! Bookmark not defined.**

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำตั้งเรื่อง

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่พบมากที่สุดในร่างกายของมนุษย์ ในเด็กแรกเกิดจะมีปริมาณแคลเซียมเฉลี่ย 28 - 30 กรัม ขณะที่ผู้ใหญ่จะมีปริมาณแคลเซียมระหว่าง 900 -1,000 กรัม โดยร้อยละ 99 ของแคลเซียมจะพบในกระดูกและฟันกระทรวงสาธารณสุข (2548) กำหนดให้ประชากรในวัยเด็ก 1-6 ปี และผู้ใหญ่ควรได้รับแคลเซียมเท่ากับ 800 มิลลิกรัมต่อวัน และสำหรับวัยรุ่น สตรีหมดประจำเดือนและสตรีระยะให้นมบุตรควรได้รับแคลเซียมไม่น้อยกว่า 1200 มิลลิกรัมต่อวัน อย่างไรก็ตามจากผลสำรวจ พบว่าคนไทยยังได้รับแคลเซียมจากอาหารน้อยกว่าปริมาณที่กำหนดไว้ ซึ่งการได้รับแคลเซียมในปริมาณน้อยเป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้ โดยเฉพาะในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือนที่พบว่าภาวะโรคกระดูกเสื่อมหรือโรคกระดูกพรุนเป็นปัญหาด้านสุขภาพที่สำคัญ (Stevenson *et al.*, 2005) แคลเซียมเป็นธาตุอาหารที่พบได้ในอาหารทั่วไป โดยแหล่งของแคลเซียมที่ดีที่สุดคือผลิตภัณฑ์นม การย่อยเคซีนโดยเอนไซม์ในทางเดินอาหารทำให้ได้เคซีนฟอสโฟเปปไทด์ที่สามารถส่งเสริมการดูดซึมแคลเซียมเข้าสู่ร่างกาย สะสมแคลเซียมในกระดูก อย่างไรก็ตามเนื่องจากประชากรของไทยบางกลุ่มไม่สามารถดื่มนมได้ เนื่องจากความผิดปกติในการย่อยและการแพ้น้ำตาลแลคโตส ในขณะที่แคลเซียมจากแหล่งอื่น เช่น จากเนื้อสัตว์ ผัก หรือผลไม้ ร่างกายจะดูดซึมได้ต่ำกว่า นอกจากนี้ในอาหารไทยส่วนใหญ่ยังมีแคลเซียมในปริมาณต่ำ คนไทยจึงมีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุน

การรับประทานอาหารเสริมแคลเซียมร่วมกับอาหารปกติ แม้จะเพิ่มปริมาณแคลเซียมในอาหาร แต่เนื่องจากร่างกายมีประสิทธิภาพในการดูดซึมแคลเซียมต่ำและมีความแปรปรวนสูง โดยเฉพาะการเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารจากความเป็นกรดไปเป็นกลางและด่างเล็กน้อย เมื่ออาหารเคลื่อนจากกระเพาะอาหารเข้าสู่ลำไส้เล็ก แคลเซียมไอออนที่แตกตัวในกระเพาะอาหาร ในสภาวะที่มีความเป็นกรดจะตกตะกอน โดยรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรือถูกจับไว้โดยองค์ประกอบอื่นของอาหารเมื่ออาหารเคลื่อนเข้าสู่ลำไส้เล็ก เนื่องจากการละลายของแคลเซียมเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการดูดซึมได้ของแคลเซียม ดังนั้นจึงมีการศึกษาการเพิ่มการละลายของแคลเซียมในสภาวะที่ค่าความเป็นกรดต่างเป็นกลางหรือเป็นด่างเล็กน้อยและการนำแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ โดยพบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนเคซีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน ที่เรียกว่าเคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (caseinphosphopeptide, CPP) มีความสามารถจับแคลเซียม และนำแคลเซียมไปใช้

ประโยชน์ทางชีวภาพได้ และได้นำมาทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์กระดูกพบว่าสามารถเพิ่มการเจริญของเซลล์ การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และมีปริมาณการสะสมแคลเซียมเพิ่มขึ้น

ปลานิล (Nile Tilapia) เป็นปลาที่เลี้ยงง่ายเจริญเติบโตเร็ว และเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทำให้อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงและแปรรูปปลานิลเติบโตอย่างรวดเร็ว ปัจจุบันผลผลิตปลานิลมีประมาณ 200,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 7,900 ล้านบาท โดยประเทศไทยส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์เป็นปริมาณ 12,764 ตัน มูลค่า 670.11 ล้านบาท เป็นการส่งออกในรูปปลานิลทั้งตัวแช่แข็งมากที่สุด รองลงมาเป็นเนื้อปลานิล แบบแล่สดหรือแช่เย็น ผลจากการขยายตัวของอุตสาหกรรมดังกล่าว ทำให้เกิดเศษเหลือ เช่น กระดูกปลาที่ยังไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือจึงเป็นแนวทางที่สามารถทำให้ต้นทุนของผลิตภัณฑ์ชนิดหลักลดลง โดยเฉพาะหากเป็นการนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพที่มีความต้องการของตลาดและมีมูลค่าเพิ่มสูง

## การตรวจเอกสาร

### 1. ปลานิล

ชื่อไทย	ปลานิล
ชื่อสามัญ	Nile tilapia
ชื่อวิทยาศาสตร์	<i>Oreochromis niloticus</i>
ถิ่นอาศัย	ทวีปแอฟริกา ทะเลสาบในประเทศชูดาน ยูกันดา แทนกันยิกา
ลักษณะจำเพาะ	เป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำจืดและน้ำกร่อย

### ถิ่นกำเนิด

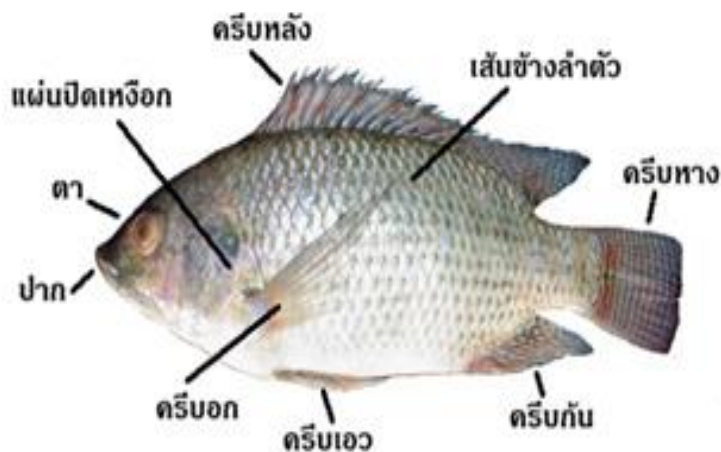
ปลานิลสามารถอาศัยอยู่ได้ในน้ำจืดและน้ำกร่อย มีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่ที่ทวีปแอฟริกา พบทั่วไปตามหนองบึง และทะเลสาบในประเทศชูดาน ยูกันดา และแทนกันยิกา ปลานิลเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมารแห่งประเทศญี่ปุ่น ซึ่งทรงจัดส่งเข้ามาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม พ.ศ. 2508 จำนวน 50 ตัว ครั้งนั้นได้โปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงปลานิลในบ่อสวนจิตรลดาเป็นหนึ่งในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

ผลการทดลองปรากฏว่าปลานิลที่ทรงโปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงได้เจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์ได้เป็นอย่างดี ต่อมาจึงได้พระราชทานชื่อว่า ปลานิล (โดยมีที่มาจากชื่อแม่น้ำไนล์ (Nile) ที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยดั้งเดิม หรือชื่อวิทยาศาสตร์ *Tilapia nilotica* และพระราชทานพันธุ์ปลาดังกล่าวให้กับกรมประมงจำนวนหนึ่ง เพื่อนำไปขยายพันธุ์และแจกจ่ายแก่พสกนิกร และปล่อยลงไว้ตามแหล่งน้ำต่าง ๆ ตามที่เห็นว่าเหมาะสม เนื่องจากปลานิลมีคุณลักษณะพิเศษหลายอย่าง เช่น กินอาหารได้ทุกชนิด เช่น ไรน้ำ ตะไคร่น้ำ ตัวอ่อนของแมลงและสัตว์น้ำเล็ก ๆ มีขนาดลำตัวใหญ่ แพร่ขยายพันธุ์ง่ายและมีรสชาติดี (มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ และคณะ 2536)

ปัจจุบันพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวยังโปรดเกล้าฯ ให้ทดลองเลี้ยงและแพร่ขยายพันธุ์ปลานิลในบ่อสวนจิตรลดาต่อไป ในทางวิชาการเรียกสายพันธุ์ปลานิลดังกล่าวว่า ปลานิลจิตรลดา ซึ่งยังคงเป็นปลานิลสายพันธุ์แท้ที่ประเทศไทยได้รับทูลเกล้าฯ ถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวจากพระจักรพรรดิอะกิฮิโตะ



## ลักษณะทั่วไป



รูปที่ 1 รูปร่างลักษณะปลานิลดำ

ที่มา: <http://www.การเกษตร.com>

รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศแต่ลักษณะพิเศษของปลานิลมีดังนี้คือ ปลานิลมีลายสีดำและจุดสีขาวสลับกันไป บริเวณครีบหลัง ครีบกันและลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายดำพาดขวางตามลำตัว มีความยาวประมาณ 10-30 เซนติเมตร ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวางจำนวน 9-10 แถบ นอกจากนี้ลักษณะทั่วไปมีดังนี้ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อน เป็นจำนวนมาก ครีบกันประกอบด้วยก้านครีบ แข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ตรงกลางเกล็ดมีสีเข้ม ที่กระดุก แก้มมีจุดสีเข้มอยู่จุดหนึ่ง บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบกัน และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาว และสีดำตัดขวาง คล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป ดังแสดงในรูปที่ 1 (เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว, 2543)

## อุตสาหกรรมการแปรรูปปลานิล

ปลานิล เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งของไทย ซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจนับตั้งแต่ปี พ.ศ. 2508 เป็นต้นมาจากคุณสมบัติของปลานิล ซึ่งเลี้ยงง่ายเจริญเติบโตเร็ว และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ทำให้เกษตรกรหันมานิยมเลี้ยงปลานิลอย่างกว้างขวาง ปัจจุบันปริมาณการเลี้ยงปลานิลประมาณ 200,000 ตัน มูลค่าประมาณ 7,900 ล้านบาท (คิดที่ราคาเฉลี่ยกิโลกรัมละ 39.32 บาท) ซึ่งปัจจุบันปริมาณการเลี้ยงปลานิลคิดเป็นร้อยละ 30.0 ของปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดของไทย ส่วนมูลค่าของปลานิลนั้นคิดเป็นร้อยละ 20.0 ของมูลค่าการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้งหมดของไทย ซึ่งการเพาะเลี้ยงปลานิลของไทยร้อยละ 81.9 เป็นการเลี้ยงในบ่อ ส่วนที่เหลือนั้นเลี้ยงในนาข้าวและร่องสวน โดยปลานิลที่บริโภคในประเทศนั้นมีวิถีตลาดโดยเกษตรกรขายให้กับผู้บริโภคโดยตรงหรือขายผ่านผู้รวบรวม ซึ่งจะส่งต่อไปให้บรรดาผู้ค้าปลาในตลาดสดหรือผู้ที่แปรรูปปลาแล้วจึงจำหน่ายต่อไปกับผู้บริโภค นอกจากนี้ยังมีการจำหน่ายปลานิลทั้งตัวและในรูปแช่แข็งแก่ภัตตาคารหรือร้านอาหารโดยตรง และประเทศไทยส่งออกปลานิลและผลิตภัณฑ์ปลานิลเป็นปริมาณ 12,764 ตัน มูลค่า 670.11 ล้านบาท เป็นการส่งออกในรูปแบบปลานิลทั้งตัวแช่แข็งมากที่สุด รองลงมาเป็นเนื้อปลานิล แล่สดหรือแช่เย็น และผลิตภัณฑ์แปรรูปอื่นๆ โดยตลาดสหภาพยุโรปมีส่วนสูงที่สุดร้อยละ 66 ของปริมาณส่งออกทั้งหมด รองลงมาคือประเทศในกลุ่มตะวันออกกลางและตลาดสหรัฐอเมริกา สัดส่วนร้อยละ 16 และ 6 ตามลำดับ (เบญจมาศ เอื้อพิพัฒน์, 2552)

## 2. แคลเซียม

แคลเซียมเป็นแร่ธาตุที่มีมากที่สุดในร่างกายคือประมาณร้อยละ 1.5 - 2 ของน้ำหนักตัว โดยในจำนวนนี้ประมาณร้อยละ 99 อยู่ที่กระดูกและฟัน อีกร้อยละ 1 ที่เหลือพบอยู่ในเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) และส่วนที่เป็นของเหลวเช่นในเลือดในซีรัม (serum) (เสาวนีย์ จักรพิทักษ์, 2541)

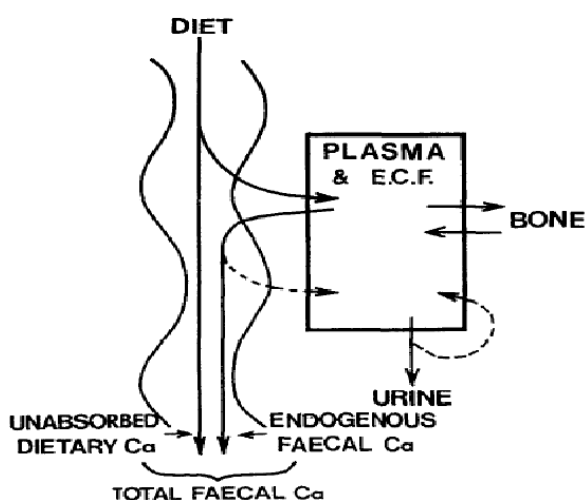
### การดูดซึมของแคลเซียม

มนุษย์สามารถดูดซึมแคลเซียมจากอาหารที่ได้รับเข้าไปประมาณร้อยละ 20- 40 แต่ในเด็กสามารถดูดซึมได้สูงถึงร้อยละ 75 (Eschleman, 1996) เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชของอาหารจากความเป็นกรดไปเป็นกลางและค่าเล็กน้อยเมื่ออาหารเคลื่อนเข้าสู่ลำไส้เล็ก ทำให้แคลเซียมไอออนที่แตกตัวในกระเพาะอาหารในสภาวะที่มีความเป็นกรดจะตกตะกอน และรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อน หรือถูกจับไว้โดยองค์ประกอบอื่นของอาหาร เมื่ออาหารเคลื่อนเข้าสู่

ลำไส้เล็กโดยแคลเซียมจะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายที่ลำไส้เล็กตอนต้นที่เรียกว่า ดูโอดินัม (duodenum) เป็นแบบที่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (active transport) และถูกดูดซึมแบบที่ไม่ต้องใช้พลังงาน (passive diffusion) ที่ลำไส้เล็กตอนกลางและตอนปลายที่เรียกว่า เจจูนัม (jejunum) และไอเลียม (ileum) แคลเซียมสามารถดูดซึมผ่านลำไส้ได้ตลอดความยาว แต่ต้องอยู่ในรูปที่ละลายเท่านั้น โดยจะถูกดูดซึมได้ดีบริเวณลำไส้เล็กตอนต้น (proximal small intestine) โดยเมื่อร่างกายได้รับแคลเซียมเข้าไปในปริมาณมากการดูดซึมจะเป็นแบบไม่จำเป็นต้องใช้พลังงาน (Bronner, 1987)

แคลเซียมที่อยู่ในอาหารมักจับตัวอยู่กับสารอินทรีย์ เช่น แคลเซียมในนมจะเกาะอยู่กับโปรตีนที่ชื่อว่า เคซีน (Casein) เมื่อโปรตีนถูกย่อยแคลเซียมจะถูกปล่อยเป็นอิสระที่อยู่ในรูปของอออน ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ทำให้สามารถดูดซึมเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งร่างกายจะพยายามรักษาแคลเซียมในเลือดไว้ประมาณ 9-11 มิลลิกรัมแคลเซียมต่อเลือด 100 กรัม โดยจะรวมตัวอยู่กับโปรตีน กลายเป็นแคลเซียมที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถผ่านออกจากหลอดเลือดได้

นอกจากนี้ Bronner (1987) ยังพบว่าเมื่อแคลเซียมเข้าสู่ร่างกายจะมีแคลเซียมส่วนหนึ่งที่ลำไส้เล็กไม่สามารถดูดซึมได้และขับออกมาพร้อมอุจจาระ ส่วนแคลเซียมที่ร่างกายสามารถดูดซึมได้จะถูกส่งไปยังระบบการไหลเวียนของเลือดเพื่อนำไปใช้ในส่วนต่างๆ ของร่างกาย โดยแคลเซียมที่ร่างกายดูดซึมได้นี้หากร่างกายได้รับแคลเซียมในปริมาณที่เพียงพอแล้วร่างกายก็จะขับแคลเซียมที่เกินความต้องการออกมาพร้อมปัสสาวะดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 2 การดูดซึมแคลเซียม

ที่มา : Bronner (1987)

### การดูดซึมแบบใช้พลังงาน (Active transport)

การลำเลียงแบบแอกทีฟ (active transport) เป็นกระบวนการลำเลียงสารผ่านเซลล์ โดยระบบที่ต้องใช้พลังงานจากเซลล์และขึ้นอยู่กับวิตามินดี (Bronner, 1987) กระบวนการนี้จะถูกควบคุมโดยความต้องการของร่างกายเมื่อได้รับอาหาร โดยแคลเซียมเคลื่อนที่ผ่านบริชบอร์ดอร์ (brush border) และเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยการไล่ระดับของความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ต่ำ และแคลเซียมเคลื่อนที่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทางแคลเซียมแชนแนล (calcium channels) และ โปรตีนขนส่งที่ยึดติดกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane bound transport protein) หลังจากเข้าสู่เซลล์จะจับกับโปรตีนที่สามารถจับกับแคลเซียม (calcium-binding protein) เคลื่อนมายังเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนฐานด้านข้าง (basolateral membrane) จากนั้นแคลเซียมจะถูกผลักออกจากเซลล์สู่เลือด โดยแคลเซียมปั๊ม (calcium pump) หรือแคลเซียมเอทีพีเอส (Ca-ATPase) และการแลกเปลี่ยนแคลเซียมโซเดียม (Ca-Na exchanger) (Gueguen และ Pointillart, 2000)

### การดูดซึมแบบไม่ใช้พลังงาน (Passive transport)

การลำเลียงแบบพาสซีฟ (passive transport) เป็นการลำเลียงสารจากบริเวณที่มีความเข้มข้นสูงไปยังที่ซึ่งมีความเข้มข้นต่ำ และเป็นกระบวนการที่ไม่ต้องใช้พลังงานสามารถเกิดขึ้นได้ตลอดความยาวของลำไส้เล็กและเป็นกลไกการขนส่งที่เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับแคลเซียมในปริมาณที่เพียงพอหรือปริมาณมาก ซึ่งส่วนใหญ่จะเกิดบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายและลำไส้ใหญ่เล็กน้อย (Bronner และ Pansu, (1999)

### แหล่งของแคลเซียมในอาหาร

สำหรับอาหารที่เป็นแหล่งที่ดีที่สุดของแคลเซียมนั้น ได้แก่ นม ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ ซึ่งองค์การอนามัยโลกใช้เป็นมาตรฐานในการประเมินคุณภาพของโปรตีนในอาหาร ทั้งนี้เพราะเมื่อร่างกายได้รับนม ร่างกายจะสามารถดูดซึมแคลเซียมได้ดีกว่าอาหารประเภทอื่น รวมทั้งสามารถดูดซึมโปรตีนจากนมไปใช้ได้มากด้วย นอกจากนี้ยังมี เต้าหู้ ผักใบเขียว ปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ ที่รับประทานได้ทั้งกระดูก เช่น ปลาชิว กุ้งฝอย กะปิ เป็นต้น เป็นแหล่งที่ดีของแคลเซียม ส่วนผักใบเขียว แม้มีแคลเซียมสูงแต่แคลเซียมในผักดูดซึมได้ไม่ดี เพราะแคลเซียมบางส่วนจะรวมกับกรดออกซาลิก (oxalic acid) หรือกรดไฟติก (phytic acid) ในผัก เป็นแคลเซียมออกซาลेट (calcium oxalate) และไฟเตตซึ่งเป็นเกลือที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble salt) ทำให้การดูด

ชิมเป็นไปได้ยาก ส่วนอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ เครื่องในสัตว์ และพืชต่างๆ เป็นอาหารที่มีแคลเซียมน้อยมาก (เสาวนีย์ จักรพิทักษ์, 2541)

### การขาดแคลเซียม

ผลการขาดแคลเซียมมีลักษณะคล้ายกับการขาดวิตามินดีเนื่องจากวิตามินดีจำเป็นต่อการดูดซึมแคลเซียม หากขาดวิตามินดีก็มักจะทำให้ขาดแคลเซียมด้วย ดังนั้นเมื่อร่างกายได้รับแคลเซียมไม่เพียงพอจะทำให้เกิดโรคกระดูกอ่อน (Rickets) ในเด็ก และเกิดโรคกระดูกอ่อนในผู้ใหญ่ (Osteomalacia) นอกจากนี้ยังอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคกระดูกพรุน

โดยพบว่าปัจจุบันคนไทยมีแนวโน้มเป็นโรคกระดูกพรุนกันมากขึ้น ดังเห็นได้จากรายงานการวิจัยพบว่า คนไทยได้รับแคลเซียมโดยเฉลี่ยร้อยละ 40.7 ของปริมาณที่ควรได้รับ (กรมอนามัย, 2530) และ พบว่า สตรีไทยวัย 55 ปี มีอัตราเป็นโรคกระดูกพรุนถึงร้อยละ 20 และมากขึ้นเป็นร้อยละ 60 ในสตรีไทยวัย 65 ปี อีกทั้งความหนาแน่นของกระดูกคนไทยต่ำกว่าคนอเมริกันผิวขาว ทำให้อัตราการหักจากโรคกระดูกพรุนสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของรองศาสตราจารย์นายแพทย์ณรงค์ บุญยรัตเวช เกี่ยวกับอุบัติการณ์ของกระดูกหักในคนไทยที่จังหวัดเชียงใหม่ ในระหว่างปีพ.ศ. 2540- 2541 พบอุบัติการณ์ของกระดูกสะโพกหัก 162 ครั้งต่อประชากรหนึ่งแสนคนที่มีอายุเกิน 50 ปีขึ้นไป และอุบัติการณ์จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 851 ครั้งต่อประชากรหนึ่งแสนคนที่มีอายุเกิน 75 ปีขึ้นไป ซึ่งอุบัติการณ์ของการเกิดกระดูกสะโพกหักของคนไทยนี้ยังถือว่าเป็นอุบัติการณ์ที่สูงมากเท่ากับประเทศต่างๆ ในแถบเอเชีย (สถาบันวิจัยโภชนาการ, 2543)

Feldman (1996) กล่าวว่า ในการเจริญเติบโตของคน จะมีการสะสมปริมาณของมวลกระดูกหรือเนื้อกระดูกอยู่ตลอดเวลาซึ่งจะเห็นได้จากการที่เด็กโตขึ้นจะสูงขึ้นนั่นเอง การสะสมของมวลกระดูกจะเร็วหรือช้าต่างกันในแต่ละช่วงอายุ ในช่วงก่อนเข้าสู่วัยรุ่นจะมีการเจริญและสะสมมวลกระดูกมากและเร็วที่สุด หลังจากนั้นการสะสมของมวลกระดูกจะเริ่มช้าลง จนเมื่อเข้าสู่ช่วงที่เป็นผู้ใหญ่เต็มที่ คือ อายุประมาณ 25-30 ปี การสะสมของมวลกระดูกจะหยุดลง ซึ่งเราจะเรียกระดับของมวลกระดูกในขณะนั้นว่า “ระดับมวลกระดูกสูงสุด” (peak bone mass) มวลกระดูกจะคงที่อยู่ช่วงเวลาหนึ่ง จนถึงช่วงอายุประมาณ 35-40 ปี ระดับมวลกระดูกก็จะลดลงอย่างช้าๆ ประมาณร้อยละ 0.5-1 ต่อปีทั้งในเพศหญิงและเพศชาย แต่ในเพศหญิงเมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน (อายุประมาณ 48 ปี) การสลายกระดูกจะสูงขึ้นถึงร้อยละ 3-5 ใน 5 ปีแรกของการหมดประจำเดือน เนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนซึ่งมีผลยับยั้งการสลายกระดูก ทำให้เนื้อกระดูก

ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่ออายุประมาณ 55 ปีขึ้นไปการสลายกระดูกจะลดลงแต่ยังคงมากกว่าการสร้าง ทำให้มวลกระดูกลดลงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคกระดูกพรุนได้

ในผู้สูงอายุ เมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้นความสามารถในการดูดซึมในลำไส้จะลดลงทำให้ร่างกายได้รับแคลเซียมน้อยกว่าปกติ แต่มีการขับแคลเซียมออกจากร่างกายเพิ่มขึ้น ถ้าผู้สูงอายุได้รับแคลเซียมไม่เพียงพอเป็นเวลานานจะทำให้เกิดโรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) ทำให้กระดูกเปราะบางแตกหักง่ายโดยเฉพาะกระดูกส่วนสะโพกและสันหลัง (นิธิยา รัตนานนท์ และ วิบูลย์ รัตนานนท์, 2537)

### 3. โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเสท (Protein hydrolysate) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของโปรตีน โดยตัดสายเปปไทด์ที่มีสายโซ่ยาว ให้เป็นกรดอะมิโนอิสระหรือเปปไทด์สายสั้น การเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสสามารถกระทำได้โดยการใช้กรด ค้าง หรือเอนไซม์ โดยควบคุมปฏิกิริยาด้วยตัวแปรกระบวนการต่างๆ เช่น ระยะเวลา อุณหภูมิ พีเอช เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามความต้องการ

#### 3.1 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการไฮโดรไลซิสโปรตีนด้วยเอนไซม์ หรือองค์ประกอบของเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทขึ้นกับ 3 ปัจจัยหลัก ๆ คือ ชนิดโปรตีน ชนิดของเอนไซม์ โปรติเอส และสภาวะในการไฮโดรไลซิส (ขวัญฤดี วชิรรัตนพงษ์เมธี, 2551)

**3.1.1 โปรตีน** ความเร็วในการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสและชนิดของเปปไทด์ที่ได้จากการไฮโดรไลซิสขึ้นกับโครงสร้างสามมิติของโปรตีน และ ลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างของโปรตีน

3.1.1.1 โครงสร้างสามมิติของโปรตีน พบว่าโปรตีนที่มีความยืดหยุ่น เช่น เคซีนจะถูกไฮโดรไลซ์ได้ง่าย ส่วนโปรตีนที่มีรูปร่างทรงกลมเอนไซม์โปรติเอสจะเข้าไปทำปฏิกิริยาได้ยาก แต่หากปรับสภาพโปรตีนโดยใช้ความร้อนจะเพิ่มความสามารถในการย่อยของเอนไซม์ เนื่องจากโปรตีนบางส่วนเกิดการเสียสภาพก่อนการย่อย

3.1.1.2 ลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกันของโปรตีน ส่งผลให้เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสเปปไทด์ที่ได้ก็จะมีลำดับกรดอะมิโนต่างกันการแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพก็จะแตกต่างกัน

**3.1.2 ชนิดของเอนไซม์โปรติเอส** ธรรมชาติของเอนไซม์เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสซึ่งจำแนกเอนไซม์โปรติเอสออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เอนโดโปร

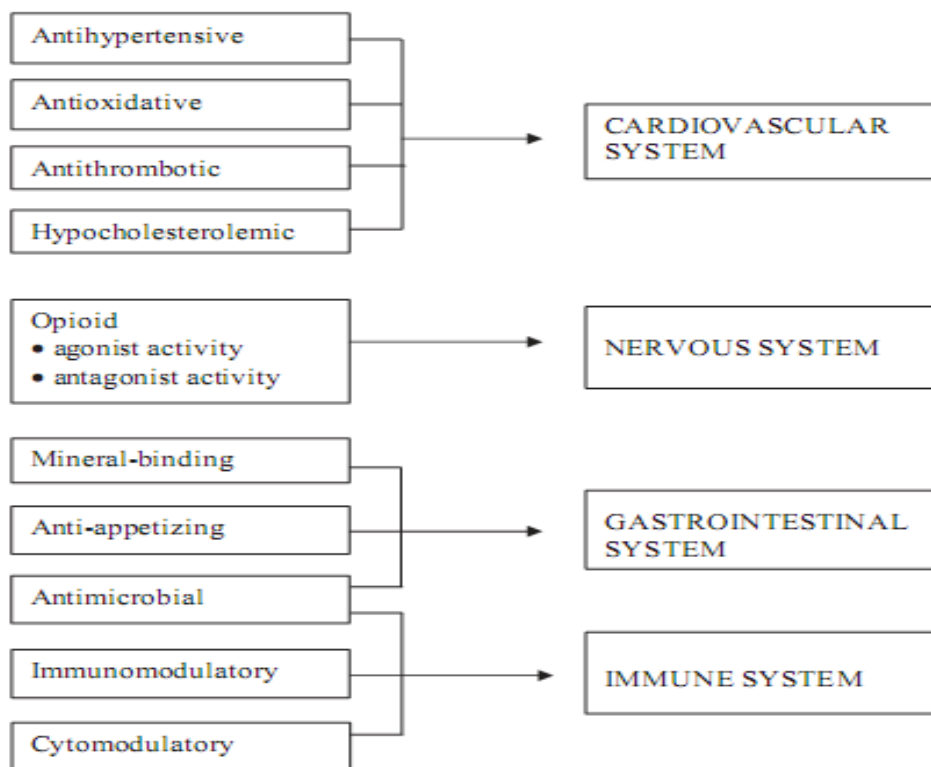
รติเอสจะตัดพันธะเอไมด์ในสายโปรตีน และเอกโซโปรติเอสจะตัดกรดอะมิโนที่ปลายคาร์บอกซิลิก (คาร์บอกซิเปปติเดส) หรือปลายของกรดอะมิโน (อะมิโนเปปติเดส) โดยพันธะเปปไทด์ที่เอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดเข้าย่อยจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ เช่น ฟลาโวไซม์แสดงกิจกรรมการย่อยพันธะเปปไทด์ทั้งที่อยู่ภายในและปลายสายของโพลีเปปไทด์ ในขณะที่เอนไซม์อัลคาเลสจะแสดงกิจกรรมแบบเอนโคเปปติเดส (Jung *et al.*, 2006) เป็นต้น

**3.1.1 สถานะในการไฮโดรไลซิส** ปัจจัยที่สำคัญที่ใช้ในการพิจารณาผลของการไฮโดรไลซิส ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่างหรือพีเอช อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท และระยะเวลาในการเกิดปฏิกิริยาซึ่งปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้นนี้จะสัมพันธ์กับการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีสถานะที่เหมาะสมในการทำงานที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์อัลคาเลสสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 8 และ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์เปปซินสามารถทำงานได้ดีที่พีเอช 2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Jung *et al.*, 2006) ส่วนเอนไซม์ปาเปนสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชช่วง 5-7 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Adler-Nissen, 1986)

### 3.2 เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (biologically active) เป็นเปปไทด์ที่มีผลต่อการทำงานของกลไกต่างๆ ในร่างกาย นอกเหนือจากการแสดงสมบัติเชิงหน้าที่และการเป็นสารอาหารที่เป็นสมบัติของโปรตีน/เปปไทด์ตามปกติ เปปไทด์ที่มีสมบัติดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภค เปปไทด์เหล่านี้สามารถตรวจพบในอาหารโปรตีนหลายชนิด เช่น นม ไข่ เนื้อ ปลา และโปรตีนจากพืช โดยจะไม่แสดงกิจกรรมทางชีวภาพในขณะที่เป็นส่วนหนึ่งของสายโซ่เปปไทด์ในโมเลกุลโปรตีนที่พบตามสภาพธรรมชาติ กระทั่งโปรตีนถูกย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้ หรือในระหว่างการแปรรูป โดยส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโนระหว่าง 2-20 เรซิดิว ภายหลังจากย่อยในร่างกาย เปปไทด์เหล่านี้จะถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายทางลำไส้เล็กและเข้าสู่กระแสเลือด ก่อนจะแสดงกิจกรรมต่อทั้งระบบของร่างกายและระบบใดระบบหนึ่งเป็นการจำเพาะ การแสดงกิจกรรมของเปปไทด์ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนในสายโซ่ของเปปไทด์เป็นสำคัญ ตัวอย่างของสมบัติของเปปไทด์เหล่านี้ (รูปที่ 3) ประกอบด้วยการทำให้เสพติด (opiate-like), การจับเกลือแร่ (mineral binding), การตัดแปลงระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory), การต้านการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial), การต้านออกซิเดชัน (antioxidative), การลดปริมาณคอเลสเตอรอล (hypocholesterolemic) และการลดความดัน (antihypertensive) เปปไทด์หลายชนิดพบว่าสามารถแสดงกิจกรรมได้หลายกิจกรรม ดังนั้นด้วยสมบัติที่มีต่อสุขภาพของร่างกายและความปลอดภัยต่อ

การบริโภค จึงมีความเป็นไปได้ที่ใช้เปปไทด์เหล่านี้เพื่อเป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ



รูปที่ 3 ตัวอย่างของสมบัติของเปปไทด์

ที่มา: Korhonen และ Pihlanto (2006)

### 3.2.1 เปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับแคลเซียม (Calcium binding peptides)

รายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับเปปไทด์ที่มีความสามารถจับแคลเซียมอออนเริ่มจากการพบว่า เปปไทด์ที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน ที่เรียกว่า เคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (caseinphosphopeptide, CPP) มีความสามารถในการจับแคลเซียมอออน และการนำแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ทางชีวภาพ

Jung และคณะ (2006) พบว่าไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยกระดูกปลา Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) ด้วยเอนไซม์เปปซิน สามารถเพิ่มการละลายของแคลเซียมและการนำแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเปปไทด์ดังกล่าวมีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้ Val-Leu-Ser-Gly-Gly-Thr-Thr-Met-Ala-Met-Tyr-Thr-Leu-Val ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนมีความคล้ายคลึงกับลำดับของกรดอะมิโนที่พบในโปรตีน actin ต่อมา Jung และคณะ (2006) ได้เตรียมเปปไทด์จาก



ก้างปลา hoki (*Johnius belengerii*) (FBP) โดยย่อยด้วย bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) intestine crude enzyme พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้อาจมีความสามารถในการจับแคลเซียมไอออน ซึ่งแยกโปรตีนไฮโดรไลสโดยใช้ hydroxyapatite affinity chromatography และเมื่อนำ FBP มาแยกส่วนด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน เมมเบรน (Ultrafiltration membrane) พบว่าสามารถแยกโปรตีนไฮโดรไลสออกได้เป็นสามส่วนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน คือ สูงกว่า 5 กิโลดาลตัน ระหว่าง 5 และ 1 กิโลดาลตัน และ ต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน และเมื่อกลุ่มเปปไทด์ที่แยกได้และสามารถจับแคลเซียมได้ดีที่สุด ไปศึกษาต่อในหนูที่ตัดรังไข่พบว่าหนูที่ได้รับเปปไทด์ร่วมกับแคลเซียมจะเพิ่มการใช้ประโยชน์แคลเซียมในเซลล์กระดูก

Bao และคณะ (2008) เตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากถั่วเหลือง โดยย่อยด้วยเอนไซม์ 4 ชนิดคือ โปรตีเอส (protease), เปปซิน (pepsin), นิวเทรส (neutrase) และ ฟลาโวไซม์ (flavozyme) เมื่อวิเคราะห์การจับกันระหว่างโปรตีนไฮโดรไลสกับแคลเซียมไอออนที่พีเอช 7.4 ด้วยเทคนิคต่างๆ ได้แก่ dialysis และ gel chromatography พบว่าปริมาณเปปไทด์ที่สามารถจับแคลเซียมไอออนในโปรตีนไฮโดรไลสขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ โดยการใช้เอนไซม์โปรตีเอส ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14.4 กิโลดาลตัน ที่สามารถจับกับแคลเซียมไอออนได้สูงสุด (66.9 มิลลิกรัมต่อกรัม) นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถจับแคลเซียมไอออนของเปปไทด์มีความสัมพันธ์กับปริมาณของหมู่คาร์บอกซิล โดยพบว่าหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน Asp หรือ Glu จะมีบทบาทต่อการจับกับแคลเซียมไอออน

Huang และคณะ (2011) เตรียมโปรตีนไฮโดรไลสจากเศษเหลือของกุ้ง โดยย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินนั้นมีความสามารถจับแคลเซียมไอออนได้

Daengprok และคณะ (2003) ใช้สารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 45 สกัดเปปไทด์ที่สามารถจับแคลเซียมไอออนจากเปลือกไข่ เมื่อใช้เปปไทด์ที่เตรียมได้ในระบบของเซลล์ Caco-2 พบว่าเปปไทด์ (100 ไมโครกรัมต่อหลุม) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการนำแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ได้ร้อยละ 64 เมื่อใช้เทคนิค reversed phase high-performance liquid chromatography แยกและทำบริสุทธิ์เปปไทด์ดังกล่าวพบว่ามีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 21 กิโลดาลตัน ปลายด้านไนโตรเจนของเปปไทด์นี้มีลำดับของกรดอะมิโนดังนี้ Met-Ala-Val-Pro-Gln-Thr-Met-Val-Gln

#### 4. การใช้เมมเบรนเทคโนโลยีในการกรองสารละลายโปรตีน

ปัจจุบันกระบวนการเมมเบรนได้รับการนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ ด้าน เช่น การบำบัดน้ำ การลดแบคทีเรียในน้ำดื่ม การแยกเกลือออกจากน้ำทะเล การทำให้เข้มข้นในผลิตภัณฑ์นม การผลิตน้ำผลไม้เข้มข้นและการทำน้ำผลไม้ให้มีความใส เป็นต้น ข้อดีของกระบวนการนี้คือสามารถแยกสารละลายโดยไม่ต้องใช้สารเคมีในกระบวนการแปรรูป สามารถกำจัดสิ่งปนเปื้อนได้หมด และค่าบำรุงรักษาต่ำ

หลักการของกระบวนการเมมเบรนที่ใช้ความดันเป็นแรงขับเคลื่อน คือสารละลายที่ประกอบด้วยสารโมเลกุลเล็กจะผ่านเมมเบรนโดยอาศัยแรงดันขับเคลื่อนสารเนื่องจากผลต่างของความดันระหว่างเมมเบรน (Transmembranepressure, TMP) ส่วนตัวถูกละลายจะถูกเมมเบรนกักไว้เรียกว่า “รีเทนเทท” หรือ “สารละลายเข้มข้น” ส่วนตัวทำละลายและตัวถูกละลายบางส่วนที่ประกอบด้วยสารโมเลกุลขนาดเล็กที่ผ่านเมมเบรนไปได้เรียกว่า “เพอมีเอท” ส่วนที่นำไปใช้ประโยชน์อาจเป็นรีเทนเทท หรือเพอมีเอท หรือทั้งสองส่วนขึ้นอยู่กับความต้องการ การกรองโดยใช้เมมเบรนระดับต่างๆ ได้แก่ ระดับไมโครฟิลเตรชัน (Microfiltration, MF) อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration, UF) นาโนฟิลเตรชัน (Nanofiltration, NF) และ ออสโมซิสผันกลับ (Reverse osmosis, RO) โดยระบบเมมเบรนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ อัลตราฟิลเตรชัน

กระบวนการเมมเบรนระดับอัลตราฟิลเตรชันเป็นกระบวนการแยกโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น คอลลอยด์ จุลินทรีย์ น้ำตาล และสารอื่นๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 300-500000 ดาลตัน (Dalton, Da) ออกจากน้ำหรือสารโมเลกุลอื่นๆ โดยใช้ความดันในช่วง 2-10 บาร์ (bar) ส่งสารผ่านเมมเบรน เมมเบรนที่ใช้ส่วนใหญ่เป็นเมมเบรนที่ไม่สมมาตร และเป็นเมมเบรนที่มีรูพรุน หรือ Molecular weight cut-off (MWCO) อยู่ในช่วง 1-300 กิโลดาลตัน

Jeon และคณะ (1999) ได้ทดลองนำโปรตีนปลาไฮโดรไลเสทที่ผลิตได้จากวัสดุเศษเหลือจากปลาสดมาผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่นกรองที่มีรูพรุนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคขนาดเท่ากับ 3, 5, 10 และ 30 กิโลดาลตัน พบว่า โปรตีนปลาไฮโดรไลเสทที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนขนาด 10 และ 30 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติในการทำให้เกิดอิมัลชันและโฟมได้ดี นอกจากนี้ โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านรูพรุนของเมมเบรนขนาด 10 กิโลดาลตัน ยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้อีกด้วย

Jung และคณะ (2005) เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโครงปลา hoki (*Johnius belengerii*) โดยใช้เอนไซม์เปปซิน ที่พีเอช 2 มาผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่น

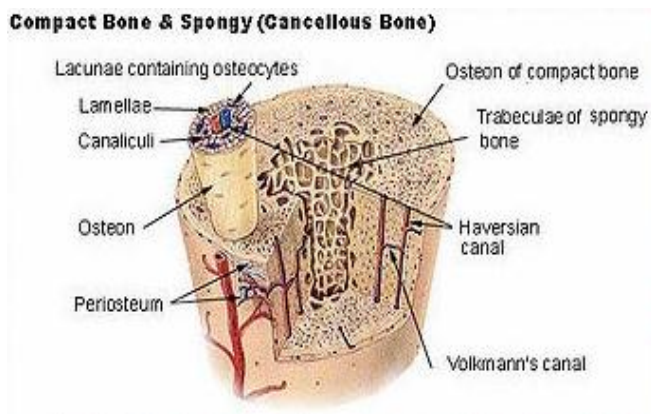
กรองที่มีรูพรุนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคขนาดเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตัน พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลในช่วง 1-5 กิโลดาลตัน มีความสามารถจับแคลเซียมไอออนที่พีเอช 7.8 ได้

Huang และคณะ (2011) นำโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากเศษเหลือจากกึ่งแปรรูปมาผ่านกระบวนการอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่นกรองที่มีรูพรุนที่มีความสามารถในการกรองแยกอนุภาคขนาดเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตันพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้ที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 1 กิโลดาลตัน มีความสามารถจับแคลเซียมไอออนได้

## 5. กระดูก

เป็นอวัยวะที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างแข็งภายใน (endoskeleton) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (รูปที่ 4) หน้าที่หลักของกระดูกคือ การค้ำจุนโครงสร้างของร่างกาย การเคลื่อนไหว การสะสมแร่ธาตุและการสร้างเซลล์เม็ดเลือด การเจริญพัฒนาของเนื้อเยื่อกระดูกในรูปแบบที่แตกต่างกัน ทำให้กระดูกเป็นอวัยวะที่มีหลายรูปร่างลักษณะ เพื่อให้สอดคล้องกันกับการทำงานของกระดูกในแต่ละส่วน เช่นกะโหลกศีรษะ (skull) ที่มีลักษณะแบนแต่แข็งแรงมาก เพื่อป้องกันการกระทบกระเทือนของสมอง หรือกระดูกต้นขา (femur) ที่มีลักษณะยาวเพื่อเป็นจุดเกาะของกล้ามเนื้อต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหว เป็นต้น (Marieb, 1998)

กระดูกเป็นแหล่งเก็บแคลเซียมที่สำคัญที่สุดในร่างกาย เซลล์ของกระดูกมีโปรตีนเป็นพื้นฐานให้แคลเซียมฟอสเฟตเข้าไปจับเกาะ การจับเกาะของแคลเซียมเรียกว่า Calcification ในวันหนึ่ง ๆ แคลเซียมและฟอสฟอรัสในกระดูกประมาณร้อยละ 1 จะแลกเปลี่ยนกับแคลเซียมและฟอสฟอรัสในเลือด ถ้าแคลเซียมในเลือดต่ำ แคลเซียมในกระดูกจะสลายตัวออกมาในเลือดทำให้กระดูกค่อย ๆ อ่อนตัวลงหรือเกิดกระบวนการ Decalcification เมื่อเป็นเช่นนี้เป็นเวลานานจะทำให้กระดูกอ่อนขึ้น โรคกระดูกอ่อนในเด็กเรียก Rickets ในหญิงให้นมบุตรเรียก Osteomalacia ส่วนในคนสูงอายุที่กระดูกเปราะหรือแตกง่ายนั้น เกิดจากโปรตีนในเซลล์ของกระดูกสลายตัวทำให้แคลเซียมจับเกาะได้ไม่เต็มที่ ซึ่งในปัจจุบันนี้ส่วนใหญ่คนไทยได้รับแคลเซียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในแต่ละวัน โดย Agustina (1996) พบว่าปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนมีสาเหตุมาจากการได้รับแคลเซียมไม่เพียงพอตั้งแต่วัยเด็ก นอกจากนี้ วิไลวรรณ ทองเจริญ และคณะ (2539) พบว่าสตรีวัยหมดประจำเดือนส่วนใหญ่มีปัจจัยเสี่ยงของภาวะกระดูกพรุนมากเนื่องจากไม่ได้รับฮอร์โมนเพศเสริมและได้รับแคลเซียมในปริมาณที่ไม่เพียงพอ



รูปที่ 4 โครงสร้างของกระดูก

ที่มา: <http://th.wikipedia.org>

### เซลล์กระดูก (Bone cell)

เซลล์กระดูกมีอยู่ด้วยกัน 3 กลุ่ม ได้แก่

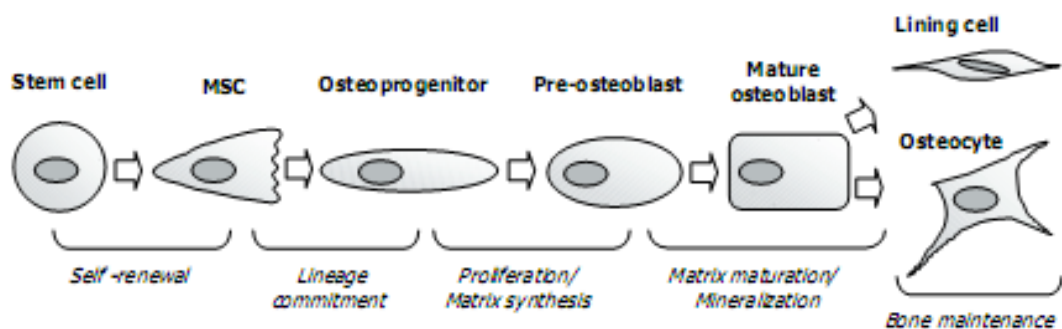
1. เซลล์ละลายกระดูก (Osteoclast) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส และเจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดโมโนไซต์ (monocyte stem cells) เซลล์นี้มีหน้าที่สำคัญในกระบวนการสลายและสร้างกระดูก (bone remodeling) โดยอาศัยการผลิตเอนไซม์แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase) ในการละลายกระดูก และทำให้กระดูกมีลักษณะที่เหมาะสม นอกจากนี้กระบวนการดังกล่าวยังทำให้มีการนำแคลเซียมออกสู่กระแสเลือดด้วย

2. เซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast) เป็นเซลล์สร้างเนื้อกระดูกที่เจริญพัฒนามาจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal stem cell) เซลล์นี้จะอยู่บนผิวของกระดูก และสร้างโปรตีนที่เรียกว่า ออสติอยด์ (osteoid) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวนี้จะมีสารอนินทรีย์มาสะสมและกลายเป็นเนื้อกระดูก นอกจากนี้เซลล์สร้างกระดูกยังสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างกระดูก

3. เซลล์ออสติโอไซต์ (Osteocyte) เป็นเซลล์ที่เจริญต่อมาจากออสติโอบลาสต์ที่ได้สร้างเนื้อกระดูกจนล้อมรอบตัวเซลล์ และเป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเต็มที่แล้ว ไม่สามารถสร้างสารเมทริกซ์หรือแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้ รอบๆเซลล์จะเป็นช่องที่เรียกว่า ลากูนา (lacuna) และแต่ละลากูนาจะติดต่อกันด้วยช่องทางผ่านเล็กๆที่เรียกว่า คานาลิคูล (canaliculi) ซึ่งทำให้แต่ละออสติโอไซต์มีการติดต่อสื่อสารกันได้ ออกซิเจนและสารอาหารก็จะถูกส่งจากหลอดเลือดภายในช่องฮาวเวิร์เซียนเข้ามายังแต่ละเซลล์ผ่านทางช่องดังกล่าวนี้ แม้ออสติโอไซต์จะเป็นเซลล์กระดูกที่โตเต็มที่ แต่มันยังมีหน้าที่ในการควบคุมระดับแคลเซียมและสารนอกเซลล์อื่นๆด้วย

เซลล์สร้างกระดูกมีสารบ่งชี้ (marker) คือ เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งเอนไซม์นี้สามารถใช้ในการประเมินการสร้างกระดูก (osteogenesis) ได้ นอกจากนี้ยังมีออสติโอแคลซิน (osteocalcin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่เซลล์สร้างกระดูกสร้างขึ้น และมีความจำเพาะกับกระดูกเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถใช้เป็นสารบ่งชี้ในการระบุการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูกได้ (Chen *et al.*, 2003)

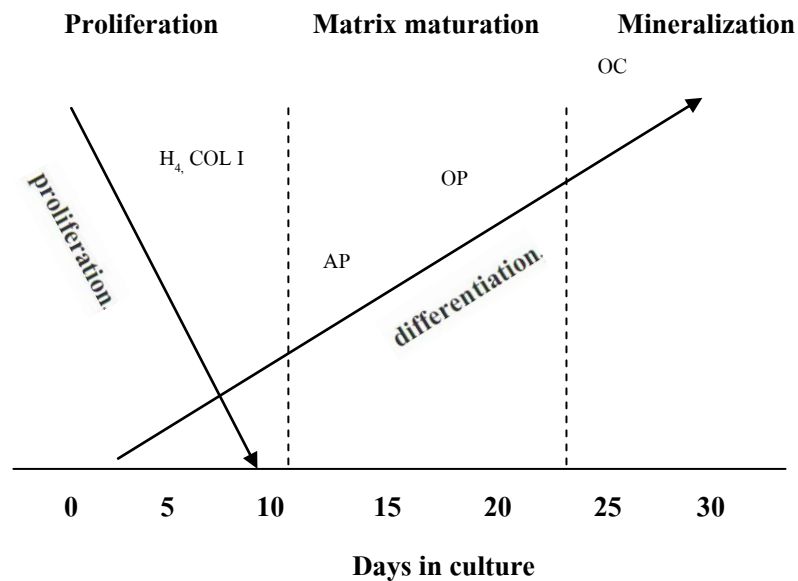
กระบวนการเกิดการสร้างกระดูกประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆคือการเจริญเติบโตของเซลล์ (proliferation), การสร้างเมทริกซ์ (matrix maturation) และ การสะสมแร่ธาตุ (mineralization) โดยเริ่มต้นจากเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคมอล (mesenchymal) ของเซลล์สร้างกระดูก จากนั้นก็จะทำให้เกิดเซลล์สร้างกระดูกที่เรียกว่า เซลล์ออสติโอโปรเจนิเตอร์ (osteoprogenitor cell) ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะเจริญเติบโตและเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น ปรีโอสติโอ بلاสต์ (pre-osteoblast) และจะผลิตสารเมทริกซ์นอกเซลล์ (extracellular matrix หรือ ECM) และเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์สร้างกระดูกที่เจริญเต็มวัย จากนั้นจะสังเคราะห์สารเมทริกซ์ต่อไป และจะเริ่มมีการสะสมของแร่ธาตุเกิดขึ้น (Eijken, 2007) ดังแสดงในรูปที่ 5 ซึ่งในแต่ละขั้นตอนของการเปลี่ยนแปลงของขบวนการเกิดการพัฒนาของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblastogenesis) จะถูกควบคุมโดยปัจจัยต่างๆ เช่น โบนมอร์ฟोजีนิกโปรตีน (bone morphogenic protein หรือ BMPs), ทรานสฟอร์มมิง โกรทแฟคเตอร์ (transforming growth factor หรือ TGF- $\beta$ ), อินซูลิน ไลค์โกรทแฟคเตอร์ (insulin-like growth factor หรือ IGF) ฮอร์โมน ไตแกเอสโตเจน (estrogen), พาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) เป็นต้น (Hollinger *et al.*, 2004)



รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast differentiation)

ที่มา: Eijken (2007)

ในขั้นตอนการเจริญเติบโตของเซลล์ การแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรก โดยพบการผลิตคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type I) ร่วมด้วย หลังจากนั้นเซลล์จะเข้าสู่ระยะที่สองคือ ขั้นตอนการสร้างเมทริกซ์ โดยขั้นนี้จะพัฒนาเปลี่ยนแปลงจากเซลล์ตั้งต้นเป็นเซลล์สร้างกระดูกสมบูรณ์ โดยอัตราการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนจะลดลง และจะมีการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมากขึ้นซึ่งจะมีการแสดงออกมาเป็นอันดับแรก จากนั้นจะมีการแสดงออกของยีนอื่นๆที่เป็นส่วนประกอบของสารอินทรีย์ของกระดูก เช่น ออสติโอพอนติน (osteopontin) และ ออสติโอแคลซิน (osteocalcin) หลังจากนั้นเซลล์จะเริ่มเข้าสู่ระยะสุดท้าย ซึ่งเป็นระยะของการตกตะกอนของสารอนินทรีย์หรือตะกอนแคลเซียม (mineralization) โดยจะพบการสะสมของผลึกไฮดรอกซีอะพาไทต์บนสารเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะถูกควบคุมด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นของแคลเซียมและฟอสเฟต กิจกรรมของเอนไซม์ และองค์ประกอบของสารเมทริกซ์อินทรีย์ เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ขั้นตอนการสร้างของกระดูก

ที่มา: Hollinger และคณะ (2004)

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส คือเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการสร้างของเนื้อเยื่อแข็ง ซึ่งอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นตัวเร่งการย่อยของฟอสเฟตเอสเตอร์ที่สภาวะเป็นด่าง และมีความสำคัญในกระบวนการสะสมแร่ธาตุ โดยเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจะไฮโดรไลซ์ฟอสเฟตอินทรีย์เพื่อปลดปล่อยฟอสเฟตอนินทรีย์อิสระออกมา แล้วดึงแคลเซียมมาจับไว้ (Harris, 1989) ในมนุษย์เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ถูกสร้างจากลำไส้เล็กในครรภ์ กระดูก ไต และตับ โดยอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สร้างจากกระดูกและตับ สามารถใช้ประโยชน์ในการวินิจฉัยการสร้างกระดูกและโรคโคเลสเตอรอลในตับ ตามลำดับ (Epstein *et al.*, 1985) สำหรับในระดับเซลล์ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่เซลล์กระดูกสร้างขึ้นจะเป็นสารบ่งชี้ที่สำคัญของการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูก (differentiation) (Ecarot-Charrier *et al.*, 1988) ซึ่งการแสดงออกสามารถใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเซลล์สร้างกระดูกที่เพาะเลี้ยงได้

Matsui และคณะ (2007) ได้เตรียมเคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (casein phosphopeptide, CPP) จากเอนไซม์ทริปซิน พบว่า CPP สามารถจับแคลเซียมไอออนและการเพิ่มการสะสมของแร่ธาตุในตัวอ่อนของหนู Tulipano และคณะ (2010) จึงนำมาศึกษาผลโดยตรงของ CPP ต่อเซลล์สร้างกระดูก ที่คัดเลือก CPP จากการสังเคราะห์ทางเคมี ซึ่งมีด้วยกัน 2 ชนิด คือ  $\beta$ -casein และ  $\alpha_2$ -casein ที่มีลำดับของกรดอะมิโน 4 ลำดับที่มีจำนวนของ phosphorylated sites แตกต่างกันไปประเมินประสิทธิภาพต่อเซลล์กระดูกพบว่า CPP มีผลโดยตรงกับการดูดซึมแคลเซียมเข้าสู่เซลล์และมีผลต่อการสะสมของแคลเซียมในสารเมทริกซ์นอกเซลล์ ซึ่ง CPP ที่มี phosphorylated sites อยู่ในลำดับกรดอะมิโนจะมีผลต่อเซลล์กระดูกโดยพบว่าลำดับกรดอะมิโนที่มี phosphorylated sites มากจะแสดงคุณสมบัติได้ดีกว่าที่มี phosphorylated sites น้อยหรือไม่มีในลำดับของกรดอะมิโน

Donida และคณะ (2009) ได้ศึกษาโดยมีการศึกษาใน human primary osteoblast-like cell พบว่า CPP สามารถกระตุ้นการนำแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มการแสดงออกและการทำงานของกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ชนิดนี้อีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นการยืนยันสมมุติฐานที่ว่า CPP มีบทบาทต่อกิจกรรมของเซลล์สร้างกระดูก และมีความสามารถในการเป็นตัวพาแคลเซียมเข้าสู่เซลล์ได้

Behera และคณะ (2013) ได้ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน เป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้ที่ความเข้มข้น 50-250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ไขกระดูก (Bone marrow cells) จากกระดูกต้นขา ของหนูตัวเมีย และยังสามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส โปรตีนออสติแคลซิน และออสติโอโพเทเจริน (osteoprotegerin) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การ differentiation ของเซลล์สร้างกระดูก และนอกจากนี้ ที่ความ

เข้มข้น 50 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โปรตีนไฮโดรไลสสามารถเพิ่มการสะสมแร่ธาตุได้ (mineralization)



## วัตถุประสงค์

1. เพื่อผลิตโปรตีนสกัดและผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูกปลานิลที่มีความสามารถจับแคลเซียมและต้านออกซิเดชัน
2. เพื่อศึกษาผลของโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูกปลานิลต่อการเจริญและการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างกระดูก
3. เพื่อแยกโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูกปลานิลที่สามารถจับอออนแคลเซียมและต้านออกซิเดชันด้วยเทคนิคอัลตราฟิเตรชันเมมเบรน (Ultrafiltration membrane)

## ขอบเขตการวิจัย

คัดเลือกวิธีสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิลระหว่างการใช้น้ำและสารละลายกรดซัลฟิวริกที่อุณหภูมิสูง ใช้โปรตีนที่สกัดได้เตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ในสถานะที่เอนไซม์แสดงกิจกรรมได้ดีที่สุด คัดเลือกสถานะการย่อยที่เหมาะสมจากความสามารถจับแคลเซียมอออน และระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพื่อประเมินผลต่อการเจริญและการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างกระดูก และคัดเลือกโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีผลต่อเซลล์สร้างกระดูกไปแยกโดยใช้เทคนิคอัลตราฟิเตรชันเมมเบรน

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

#### วัตถุดิบ

กระดุกปลานิลดำ (*Oreochromis niloticus*) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงาน โกลเบท จังหวัดนครพนม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาเตรียมตัวอย่างต่อไป

#### สารเคมีและอุปกรณ์

สารเคมีและอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ระบุใน ตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 สารเคมี

Chemical	Brand and company
1. Pepsin from porcine gastric mucosa	Sigma, Germany
2. BSA (Bovine serum albumin)	Sigma, USA
3. Folin-Ciocalteus phenol	Merck, Germany
4. Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
5. Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Thailand
6. OPA (o-phthalaldehyde )	Sigma, Germany
7. L-serine	Sigma, Germany
8. Sodium tetraborate	Ajax Fine Chem, Australia
9. DL-dithiothreitol	Sigma, Germany
10. Calcium chloride	Ajax Fine Chem, Australia
11. ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))	Sigma, Germany
12. DPPH (2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl)	Sigma, Germany
13. Trolox	Sigma, Germany

ตารางที่ 1 สารเคมี (ต่อ)

<b>Chemical</b>	<b>Brand and company</b>
14. Citric acid	Ajax Fine Chem, Australia
15. Casein phosphopeptide (CPP)	LUBON INDUSTRY, China
16. Ferrozine	Sigma, Germany
17. EDTA	Ajax Fine Chem, Australia
18. 3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma, Germany
19. $\alpha$ -MEM (Alpha Minimum Essential Medium)	Life Technologies Corporation, IL, USA Life Technologies Corporation, IL, USA
20. Trypsin-EDTA	Sigma, Germany
21. Ascorbic acid	Fluka
22. Triton X-100	Sigma, USA
23. 4-nitrophenylphosphate (4NPP)	Life Technologies Corporation, IL, USA
24. $\beta$ -glycerophosphate	Sigma, Germany
25. Alizarin red	Sigma, Germany
26. Sodium dodecyl sulfate	Ajax Fine Chem, Australia

ตารางที่ 2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

	<b>Instrument</b>	<b>Model</b>	<b>Company/country</b>
1.	Autoclave	LAC-5060s	LabTech, Korea
2.	microplate reader	Power wave X	Biotek, USA
3.	pH meter	SevenGo SG2	Schott, USA
4.	Water bath	W350	Memmert, Germany
5.	Vortex Mixer	-	Labnet, USA
6.	Centrifuge	Mikro 22 R	HettichZentrifugen, Germany
7.	Spectrophotometer	UV-16001	Shimadzu, Kyoto, Japan
8.	Blender	TYPE 276	Moulinex, France
9.	Oil bath	B-490	BUCHI, Flawil, Switzerland
10.	Overhead stirrer	RW 20.n	IKA LABORTECHNIK, Stanfen, Germany
11.	Incubater	HERAcell 240	Heraeus, Germany
12.	ICP mass spectrometer	-	-

## วิธีการวิจัย

### ตอนที่ 1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูกปลานิลโดยใช้เอนไซม์

#### 1.1 ผลของการให้ความร้อนและสารละลายกรดต่อประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิล

นำกระดูกปลานิลน้ำหนัก 5 กิโลกรัม มาล้างทำความสะอาด สะเด็ดน้ำบนตะแกรงจนกระดูกปลาสะเด็ดน้ำ สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี AOAC (2000) จากนั้นทุบแกนกลางของกระดูกปลานิลให้พอแตกเติมน้ำชาดำเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (w/v) ปริมาตร 4 เท่า ของน้ำหนักกระดูกปลา นำไปให้คลื่นเหนือเสียงที่ความถี่ 60 Hz เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เติสารละลายออก จากนั้นล้างต่อด้วยน้ำร้อนอีก 2 – 3 ครั้ง สะเด็ดน้ำบนตะแกรงทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที หรือจนกระดูกปลานิลสะเด็ดน้ำ สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี AOAC (2000) และแบ่งกระดูกปลานิลออกเป็น 2 ชุด เพื่อทดลองดังต่อไปนี้

##### 1. การสกัดโปรตีนด้วยสารละลายกรดชนิดกร่วมกับการให้ความร้อน

เติมสารละลายกรดชนิดกร่วม ซึ่งเป็นกรดอ่อน และมีความรุนแรงน้อย (Sadowska *et al.*, 2003) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พีเอช 2.2 ปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักกระดูกปลานิล นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง oil bath เป็นเวลา 30, 45, 60 หรือ 75 นาที ตามลำดับ กรองกระดูกปลานิลออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปหมუნเหวียง เก็บส่วนใสสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

##### 2. การสกัดโปรตีนด้วยน้ำร่วมกับการให้ความร้อนภายใต้ความดัน

เติมน้ำกลั่นปริมาตรเป็น 3 เท่าของน้ำหนักกระดูกปลานิล จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยหม้อนึ่งด้วยแรงดันไอน้ำ เป็นเวลา 30, 45, 60 หรือ 75 นาที ตามลำดับ กรองกระดูกปลานิลออกด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปหมუნเหวียง เก็บส่วนใสสำหรับวิเคราะห์ต่อไป

เก็บสารละลายส่วนใสที่ได้ทั้ง 2 วิธี ไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณ โปรตีน ตามวิธีของ kjeldahl method (AOAC, 2000)
2. วิเคราะห์ปริมาณแคลเซียม ด้วยเครื่อง ICP mass spectrometry

ทำ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ ปริมาณ โปรตีนและร้อยละผลผลิตของโปรตีนสกัดที่ได้

โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS เพื่อเลือกวิธีการสกัดโปรตีนที่มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด สำหรับใช้ย่อยด้วยเอนไซม์ต่อไป

## 1.2 ผลของการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อสมบัติการจับแคลเซียมของโปรตีนไฮโดรไลเสท

นำตัวอย่างจากข้อ 1.1 ที่คัดเลือกแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินทางการค้าจาก porcine gastric mucosa ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน ที่สภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเติมเอนไซม์ลงไปที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 (เอนไซม์/สารตั้งต้นเท่ากับ 3/100) ย่อยเป็นเวลา 1- 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไปวิเคราะห์ค่าต่างๆ เพื่อคัดเลือกสภาวะที่ใช้ในการย่อยที่เหมาะสม ดังนี้

1. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธีของ kjeldahl method (AOAC, 2000)
2. ศึกษาระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis) (Wanasundara et al., 2002)
3. วิเคราะห์ความสามารถจับแคลเซียม

เพื่อประเมินความสามารถจับแคลเซียมของโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยวัดจากปริมาณแคลเซียมที่ละลายอยู่ในสารละลาย โดยที่ไม่ตกตะกอน ในสภาวะที่เป็นกลางถึงค่าเล็กน้อยที่จำลองสภาวะในลำไส้เล็ก (Jung *et al.*, 2005) เปรียบเทียบกับประสิทธิภาพของ Casein phosphopeptide (CPP) ทางการค้า ที่ได้จากบริษัท LUBON INDUSTRY CO., LTD โดยเตรียมสารละลายของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นเติมลงในสารละลาย  $\text{CaCl}_2$  ความเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ และ sodium phosphate buffer (พีเอช 7.8) ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นปรับให้ค่าพีเอชเท่ากับ 7.8 พร้อมกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส เหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ให้ได้สารละลายใส แล้ววัดปริมาณแคลเซียมในสารละลาย (soluble calcium) ด้วยเครื่อง ICP mass spectrometry

### 4. วิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน

4.1 ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ DPPH ตามวิธี Orhan และคณะ(2007) เพื่อประเมินความสามารถของสารที่ต้องการทดสอบในการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ DPPH

4.2 ความสามารถจับอนุมูลอิสระของ ABTS ตามวิธี Re และคณะ (1999) เพื่อประเมินความสามารถของสารที่ต้องการทดสอบในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ ABTS

4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระของเหล็ก ตามวิธี Decker และคณะ (1990) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการหาความสามารถในการต้านออกซิเดชันของสารที่ต้องการทดสอบ เพราะ

โลหะไอออนเป็นตัวการสำคัญในการเร่งปฏิกิริยาทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆ มากมายหลายชนิด

4.4 ความสามารถเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (reducing power) ตามวิธี Yildirim และคณะ (2001) ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารที่ต้องการทดสอบ

ทำ 3 ซ้ำ เพื่อหาค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของข้อมูล และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของ ระดับการย่อยสลาย ความสามารถจับแคลเซียมไอออน และ ความสามารถต้านออกซิเดชัน โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS เลือกวิธีการที่ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสัทที่มีความสามารถในการจับแคลเซียมที่ดีที่สุด เพื่อวิเคราะห์ต่อไป

## ตอนที่ 2 ผลของโปรตีนไฮโดรไลสัทที่จับกับแคลเซียมไอออนได้ต่อการใช้ประโยชน์ในระดับเซลล์

### 2.1 การเตรียมโปรตีนไฮโดรไลสัทสำหรับใช้ทดสอบในเซลล์

นำตัวอย่างจากข้อ 1.1 ที่คัดเลือกแล้วมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินทางการค้าจาก porcine gastric mucosa ของบริษัท Sigma ประเทศเยอรมัน ที่สภาวะที่เหมาะสมคือ พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเติมเอนไซม์ความเข้มข้นร้อยละ 3 (เอนไซม์/สารตั้งต้น เท่ากับ 3/100) ย่อยเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสทดสอบในเซลล์

### 2.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblasts) MC3T3-E1 ในอาหารเลี้ยงเซลล์  $\alpha$ -MEM (Alpha Minimum Essential Medium) ที่มี Fetal bovine serum ร้อยละ 10 ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน (Penicillin), สเตรปโตมัยซิน (Streptomycin) และยาต้านเชื้อรา และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเซลล์ที่มีความชื้นและมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5% ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2-3 วัน จนกระทั่งมีปริมาณของเซลล์ประมาณร้อยละ 90 ของพื้นที่ในขวดเลี้ยงเซลล์จากนั้นทำการแยกเซลล์โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน-อีดีทีเอ (Trypsin-EDTA) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์และนำไปหว่านลงในหลุมเลี้ยงเซลล์ก่อนนำไปทดสอบกับโปรตีนไฮโดรไลสัทต่อไป

### 2.3 การวัดค่าการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธีเอ็มทีที (MTT)

ทำการทดลองโดยใช้วิธี MTT ซึ่งวัดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โดยสาร 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็นสารสีเหลืองละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน โดยการทดลองเริ่มโดยเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 จำนวน

$1 \times 10^3$  เซลล์ ในหลุมเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุมเป็นเวลา 4 วัน จากนั้นเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเจือจางในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีฟิโธลโบวายซีรัม (Fetal bovine serum) ร้อยละ 1 แล้วเลี้ยงเซลล์ไว้เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปวัดปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้วิธีเอ็มทีทีซึ่งโดยหลักการเป็นการวัดการทำงานของเอนไซม์ไมโทคอนเดรีย ดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ในเซลล์ที่มีชีวิตในการเปลี่ยนสารเอ็มทีทีซึ่งมีสีเหลืองให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (formazan) ที่มีสีม่วง จากนั้นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานจะถูกละลายด้วยแอซิดิกไอโซโพรพานอล (acidic isopropanol) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ซึ่งค่าที่ได้จะแปรผันตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต นำค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบที่ได้รับแปลไปหาค่าที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน มาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

## 2.4 ผลโดยตรงของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่จับอออนแคลเซียมได้ต่อการ differentiation ของเซลล์กระดูก

### 2.4.1 การวัดระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1

เพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 ในหลุมเลี้ยงเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น และเสริมด้วยกรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรร่วมกับโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในระดับที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ดังที่ได้คัดเลือกจากข้อ 2.2 จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน  $5 \times 10^3$  เซลล์ ในหลุมเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม เป็นเวลา 7 และ 14 วัน (Lian *et al.*, 1998) ก่อนนำไปวัดการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ (Marker) ในการเกิด early differentiation ของเซลล์สร้างกระดูก ด้วยการย้อมสี คงสภาพเซลล์ด้วยสารละลายที่ประกอบด้วยซิเตรท (citrate), อะซิโตน (acetone) และ ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างด้วยน้ำ จากนั้นเติมสารละลายที่ประกอบด้วย โซเดียมไนไตรต์ (sodium nitrite), เอฟอาร์วี-อัลคาไลน์ (FRV-alkaline) และ แนฟทอล เอเอส-บีไอ (Naphthol AS-BI alkaline) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทำให้แห้งและถ่ายภาพ ปริมาณสีม่วงแดงที่เกิดขึ้นจะแสดงถึงปริมาณของเอนไซม์ในเซลล์ ในการวัดกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากไลเซสของเซลล์ เซลล์จะถูกนำไปละลายด้วยบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย ไตรตอนเอ็กซ์-100 (Triton X-100) ร้อยละ 1, แมกนีเซียมคลอไรด์ 2 มิลลิโมลาร์, ทริส-ไฮโดรคลอริก 10 มิลลิโมลาร์ ปรับค่าความเป็นกรดต่างที่ 10 นำเซลล์ที่ละลายไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14000 x g เป็นเวลา 10 นาทีและเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป BCA protein assay เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในแต่ละตัวอย่างและ ปริมาณเอนไซม์ โดยนำไปทำปฏิกิริยากับพาราไนโตรฟีนิลฟอสเฟต (p-nitrophenyl phosphate substrate) เพื่อให้ได้สารละลายที่มีสีเหลือง ซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของ



เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตรและนำค่าที่ได้มาคำนวณเปรียบเทียบกับปริมาณอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสต่อปริมาณโปรตีน

#### 2.4.2 การวัดปริมาณของการเกิดการสะสมแคลเซียม

ในการวัดปริมาณของการเกิดการสะสมแคลเซียม ซึ่งเป็นการแสดงถึงการเกิดคิฟเฟอเรนซิเอชันอย่างสมบูรณ์ของเซลล์สร้างกระดูกและการเกิดการสะสมแร่ธาตุในเมทริกซ์ที่เซลล์สร้างขึ้นมาโดยการย้อมอะลิซารินเรด (Alizarin red) ตามวิธีของ Gregory และคณะ (2004) เพื่อดูปริมาณของแคลเซียมที่สะสมบนเซลล์ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ MC3T3-E1 จำนวน  $5 \times 10^3$  เซลล์ ในหลุมเลี้ยงเซลล์แบบ 24 หลุม โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น และเสริมด้วยกรดแอสคอร์บิก 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและเบต้ากลีเซอโรฟอสเฟต ( $\beta$ -glycerophosphate) 5 ไมโครโมลาร์ร่วมกับ โปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 7 และ 14 วัน โดยคงสภาพเซลล์ด้วยฟอร์มัลดีไฮด์ร้อยละ 10 จากนั้นย้อมแคลเซียมด้วยสารละลายอะลิซารินเรดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำให้แห้งและถ่ายภาพ ในการวัดเชิงปริมาณทำได้โดยสกัดสีแดงของอะลิซารินเรด ที่ย้อมออกมาโดยการละลายสีด้วย สารละลายเฮกซะเดซิลไพริดีเนียมคลอไรด์ (Hexadecylpyridinium chloride monohydrate) นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

ในการวิเคราะห์ผล นำค่าที่ได้จากการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต, การวัดปริมาณเอนไซม์, และปริมาณแร่ธาตุที่สะสมบนเซลล์ มาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในแต่ละกลุ่มมากกว่าหรือเท่ากับ 3 และทดสอบซ้ำอย่างน้อย 2 ครั้ง)

#### ตอนที่ 3 การแยกโปรตีนไฮโดรไลสด้วยการกรองแบบอัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration membrane)

กรองแยกโปรตีนไฮโดรไลสที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1 เพื่อคัดแยกเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลที่มีความสามารถจับแคลเซียมอ่อนและด้านออกซิเดชันสูงสุด โดยใช้ระบบการกรองแบบอัลตราฟิวเตรชันด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตัน เพื่อแยกให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสที่มีการกระจายของน้ำหนักโมเลกุลดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนไฮโดรไลสที่ไม่ผ่านการกรอง (Whole fraction)

กลุ่มที่ 2 โปรตีนไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 5 กิโลดาลตัน (MW > 5 kDa)

กลุ่มที่ 3 โปรตีนไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 1 กิโลดาลตัน และ 5 กิโลดาลตัน (MW 1-5 kDa)

กลุ่มที่ 4 โปรตีนไฮโดรไลสที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 1 กิโลดาลตัน (MW < 1 KDa)

ตรวจสอบความสามารถจับแคลเซียมไอออนและความสามารถในการต้านออกซิเดชันตามวิธีที่กล่าวมาของเปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลสจากแต่ละกลุ่ม

### บทที่ 3

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

##### 1. องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลานิล

องค์ประกอบเคมีของกระดูกปลานิล (*Oreochormis niloticus*) แสดงดังตารางที่ 3 ผลวิเคราะห์พบว่ากระดูกปลานิลมีปริมาณเถ้าสูงที่สุด รองลงมาคือ โปรตีน ความชื้น และไขมัน ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วกระดูกปลา มีโปรตีนประมาณร้อยละ 13.6-22.9 (Faivishevskii *et al.*, 1992) และมีแร่ธาตุประมาณร้อยละ 55-65 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีแคลเซียมเป็นองค์ประกอบสูงสุด รองลงมาคือ ฟอสฟอรัส และแร่ธาตุอื่นๆ เช่น แมกนีเซียม เหล็ก โซเดียม เป็นต้น จากการศึกษาองค์ประกอบเคมีในกระดูกปลานิล โดย Vignesh และ Srinivasan (2012) พบว่ามีปริมาณโปรตีนร้อยละ 31.52 ซึ่งสูงกว่าที่พบในการทดลองครั้งนี้ แต่มีปริมาณความชื้น ปริมาณเถ้า และ ปริมาณไขมันต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของวัตถุดิบ การเลี้ยงปลา และการเตรียมตัวอย่างเริ่มต้น นอกจากนี้ Vignesh และ Srinivasan (2012) ยังใช้วิธีวิเคราะห์ไขมันด้วยวิธี Bligh and Dryer ซึ่งต่างจากการทดลองในครั้งนี้ใช้วิธี Soxhlet สำหรับการศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบเคมีของกระดูกปลาชนิดอื่น เช่น กระดูกปลาตะเพียน วิศรา สุวรรณ (2545) พบว่ามีโปรตีนร้อยละ 20.5 เถ้าร้อยละ 44.8 ความชื้นร้อยละ 28.6 และไขมันร้อยละ 5.78 ของน้ำหนักเปียก หรือในกระดูกปลาชนิด Toppe และคณะ (2007) รายงานว่ามีโปรตีนร้อยละ 35.7 และเถ้าร้อยละ 52.6 ความชื้นร้อยละ 7.7 และไขมันร้อยละ 1.4 ของน้ำหนักแห้ง และกระดูกปลาแซลมอน มีโปรตีนร้อยละ 29.2 และเถ้าร้อยละ 26.3 ความชื้นร้อยละ 5 และไขมันร้อยละ 38.1 ของน้ำหนักแห้ง

ตารางที่ 1 องค์ประกอบทางเคมีของกระดูกปลานิล (*Oreochormis niloticus*)

Compositions	Percent (dry basis)
Protein	24.43 <sup>a</sup> ± 0.0615
Fat	3.34 ± 0.0266
Moisture	7.65 ± 0.0261
Ash	60.82 ± 0.0064

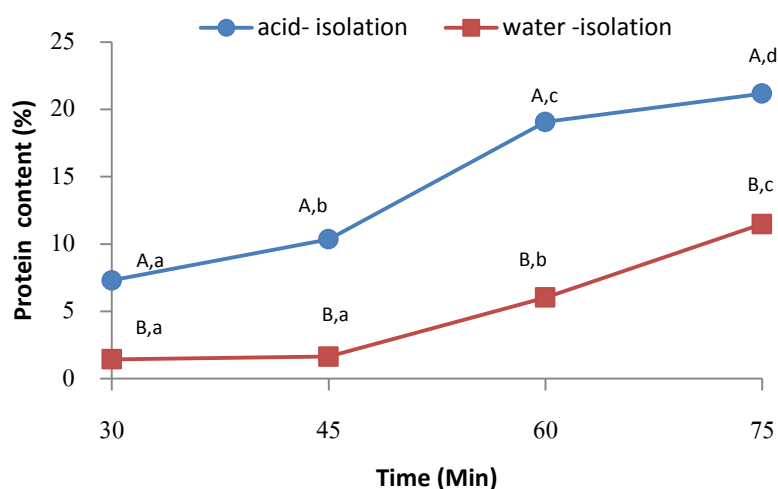
<sup>a</sup> Based on nitrogen content (N x 6.25)

ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n=3)

## 2. ประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิล

### 2.1 การให้ความร้อนและสารละลายกรดต่อปริมาณโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิล

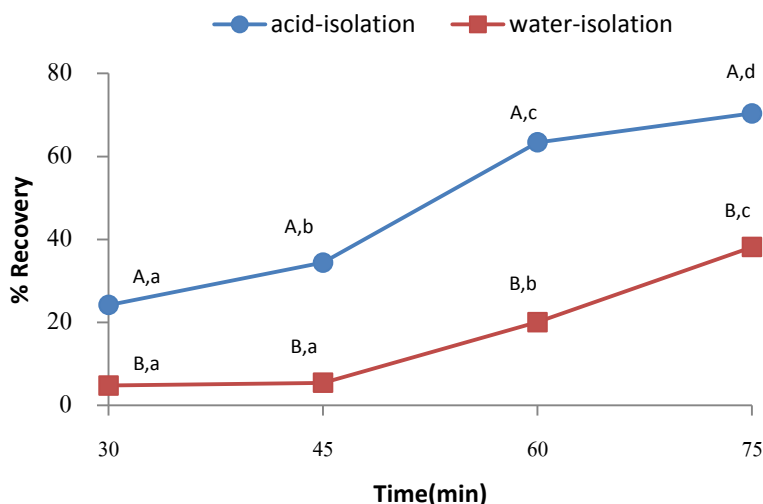
ปริมาณโปรตีนในสารละลายโปรตีนสกัดที่เตรียมโดยการต้มกระดูกปลานิลในสารละลายกรดซัลฟิวริกหรือน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 7 พบว่าการใช้สารละลายกรดทำให้สามารถสกัดโปรตีนได้มากกว่าการใช้ความร้อน การเพิ่มระยะเวลาให้ความร้อนทำให้ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้เพิ่มขึ้น ทั้งนี้พบว่าปริมาณโปรตีนที่สกัดได้จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 45 นาที โดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำร้อนในการสกัด ในการสกัดโปรตีนเจลาตินจากกระดูกปลาพบว่า ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการประกอบด้วยความเป็นกรดต่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาให้ความร้อน กล่าวคือหากสกัดโดยใช้อุณหภูมิสูง จะทำให้ได้เจลาตินในปริมาณสูง (Harris, 1990) เช่นเดียวกับการเพิ่มระยะเวลาก็ก่อผลให้ได้เจลาตินในปริมาณสูงเช่นกัน (Ward และ Courts, 1977) ข้อสังเกตที่พบจากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า โครงสร้างกระดูกปลานิลมีความแข็งแรงมาก การทำลายโครงสร้างของกระดูกปลานิลเพื่อปลดปล่อยโปรตีนโดยใช้ความร้อนอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอ ดังนั้นจะเห็นได้จากปริมาณโปรตีนที่สกัดได้สูงสุดมีค่าเท่ากับร้อยละ 21.18 เมื่อใช้ความร้อนร่วมกับสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 5 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในสารละลายสกัดได้ ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่ากรดทำให้กระดูกปลานิลพองตัวและไปทำลายพันธะของโครงสร้างสารเมทริกซ์อินทรีย์ (Jung *et al.*, 2006) โดยปกติคอลลาเจนไม่สามารถละลายได้ในน้ำ โดยเฉพาะน้ำเย็น เนื่องจากคอลลาเจนจะมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนชนิดโพรลีนในปริมาณสูง ดังนั้นในการสกัดโปรตีนเจลาตินจะต้องใช้ความร้อนเพื่อทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติของโปรตีน และการใช้กรดจะส่งผลในการทำลายพันธะที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลบางส่วน ส่งผลให้คอลลาเจนบางส่วนเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้ได้โปรตีนเจลาตินที่ละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น



รูปที่ 1 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของปริมาณโปรตีนของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำหรือกรด ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่เวลา 30, 45, 60 และ 75 นาที (<sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการสกัด และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

## 2.2 ผลผลิตของโปรตีนสกัด

ผลของวิธีการสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิลโดยการต้มในสารละลายกรดซิตริกหรือน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสต่อการผลิตโปรตีน แสดงดังรูปที่ 8 พบว่า การใช้สารละลายกรดซิตริกทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนสูงกว่าการใช้น้ำตลอดช่วงระยะเวลาของการศึกษา โดยมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาให้ความร้อน และมีค่าสูงสุดเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลา 75 นาที ซึ่งสกัดโปรตีนได้ร้อยละ 70.38 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่พบในกระดูกปลานิล ขณะที่การต้มกระดูกปลาในน้ำที่เวลาเดียวกัน สามารถสกัดโปรตีนได้เพียงร้อยละ 38.15 ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารละลายกรดที่อุณหภูมิสูงมีความสามารถทำลายโครงสร้างของกระดูกปลาได้ดีกว่าน้ำร้อน จึงส่งผลให้สารละลายโปรตีนละลายออกมามากกว่า โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์ (2549) ที่สกัดคอลลาเจนจากเกล็ดปลากระพงโดยใช้สารละลายกรดรวมกับการให้ความร้อน ที่พบว่าทำให้ได้ปริมาณโปรตีนสูงถึง ร้อยละ 91.76 ของน้ำหนักเกล็ดปลาแห่งที่ผ่านการกำจัดแคลเซียม



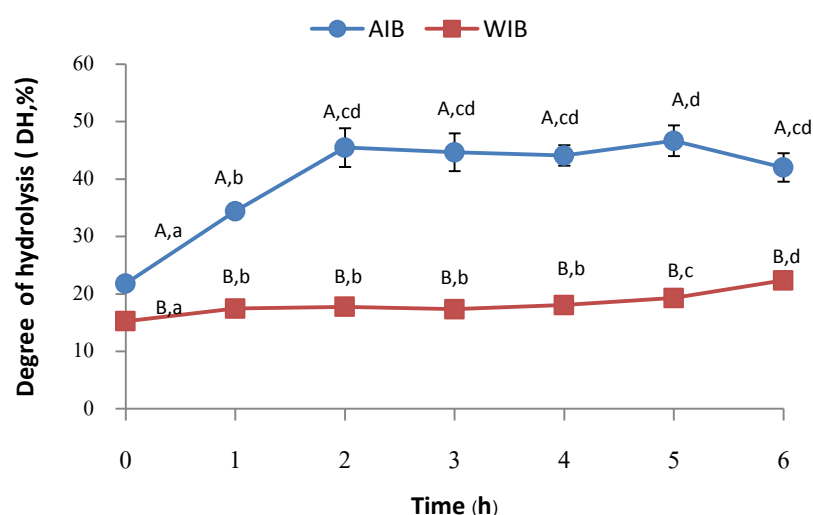
รูปที่ 2 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของร้อยละของผลผลิตที่ได้ของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยกรดหรือน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส (<sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการสกัด และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

### 3. กระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนสกัดของกระดูกปลานิลโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า

#### 3.1 ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH)

ระดับการย่อยสลายซึ่งแสดงถึงสัดส่วนระหว่างจำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยไปและพันธะเปปไทด์ทั้งหมดในโปรตีนเริ่มต้น ซึ่งเป็นค่าที่นิยมใช้ติดตามการย่อยโปรตีนในระหว่างกระบวนการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (Adler-Nissen, 1986) เนื่องจากขนาดโมเลกุลเปปไทด์และตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ถูกสลายมีความสำคัญต่อคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้ การนำสารละลายโปรตีนสกัดที่เตรียมโดยวิธีที่ต่างกันมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน ที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 9) พบว่าวิธีที่ใช้สกัดโปรตีนต่างกัดังกล่าว ทำให้การย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์เกิดขึ้นต่างกัน กล่าวคือโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้สารละลายกรดจะถูกย่อยโดยเอนไซม์ได้ง่าย โดยพบว่าภายใน 2 ชั่วโมงแรกจะมีระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัว ในขณะที่โปรตีนที่สกัดด้วยน้ำไม่เพียงแต่มีระดับการย่อยสลายที่คงที่ในช่วงเวลาเดียวกันแต่

ยังคงที่ตลอดช่วงเวลา 4 ชั่วโมงแรกของการย่อย และค่อยๆ เพิ่มขึ้นเมื่อการย่อยครบ 6 ชั่วโมง ทั้งนี้ อาจเป็นผลจากกรดที่สกัดโปรตีนทำให้โมเลกุลโปรตีนอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ทำให้ง่ายต่อการถูกย่อย อย่างไรก็ตามพบว่าหลังจาก 2 ชั่วโมง ระดับการย่อยโปรตีนมีแนวโน้มคงที่ โดยอาจเป็นผลจากข้อจำกัดบางประการ เช่น เนื่องจากเอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะต่อพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุล โดยเฉพาะที่มีกรดอะมิโน Phe, Tyr และ Tryp ดังนั้นหากพันธะเหล่านี้ลดลงการย่อยโดยเอนไซม์จึงอาจลดลงได้ (Jung *et al.*, 2006) รวมทั้งอาจจะมีข้อจำกัดในการเข้าถึงพันธะดังกล่าว ผลการศึกษานี้พบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ Jung และคณะ (2005) พบว่าการใช้กรดร่วมกับเอนไซม์เปปซินย่อยกระดูกปลาโฮกิ สามารถย่อยสลายโปรตีนได้สูงกว่า การใช้เอนไซม์เปปซินเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 3 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) โดยเอนไซม์เปปซิน ที่ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (เอนไซม์/ สับเสตรท: 3/100) ( $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อย และ  $A-B$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

### 3.2 ความสามารถจับแคลเซียมไอออน (Calcium binding activity)

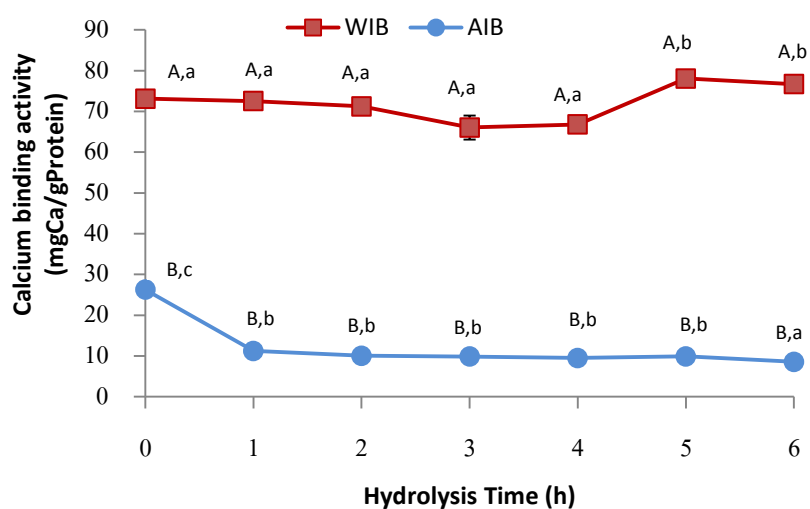
ความสามารถจับแคลเซียมไอออนของโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิลโดยใช้ น้ำ และ สารละลายกรด และ โปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดโดยสองวิธีดังกล่าว แสดงดังรูปที่ 10 พบว่าโปรตีนที่สกัดได้ด้วยน้ำมีความสามารถจับแคลเซียมไอออนได้สูงกว่าโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรด ประมาณ 3 เท่า

เมื่อย่อยโปรตีนที่สกัดได้ทั้งสองวิธีดังกล่าวด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำมีความสามารถจับแคลเซียมได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลโดยใช้สารละลายกรด นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการย่อยโปรตีนมีผลต่อคุณสมบัติการจับแคลเซียม กล่าวคือ คุณสมบัติดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำจะมีแนวโน้มคงที่ตลอดช่วงเวลา 4 ชั่วโมงแรกของการย่อย หลังจากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเวลาการย่อยผ่านไป 5 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลายที่มีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาการย่อยช่วง 4 ชั่วโมงแรก และจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นหลังจากนั้น ซึ่งต่างจากโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยกรด พบว่า ความสามารถในการจับแคลเซียมลดลงเมื่อเวลาการย่อยผ่านไป 1 ชั่วโมง และหลังจากนั้นจะคงที่ตลอดการทดลอง ซึ่งตรงกันข้ามกับระดับการย่อยสลายที่เมื่อเวลาการย่อยผ่านไป 1 ชั่วโมง จะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การศึกษาของ Charoenphun และคณะ (2013) รายงานว่า การย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลกระทั้งมีค่าระดับการย่อยสลายในช่วงร้อยละ 25-30 ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลสที่มีความสามารถในการจับแคลเซียมที่ดี ซึ่งคณะวิจัยได้อธิบายว่า กรณีที่ความสามารถจับแคลเซียมลดลง เมื่อค่าระดับการย่อยสลายสูงขึ้น อาจเนื่องจากการตัดพันธะเปปไทด์ที่มากเกินไป จนมีผลต่อขนาดและลำดับกรดอะมิโน กระทั่งทำให้ได้เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวลดลง ในขณะที่ Jung และคณะ (2005) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากโครงปลาโกลีที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับสารละลายกรดอะซิติก มีความสามารถจับแคลเซียมได้ดีกว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินอย่างเดียว หรือโปรตีนร่วมกับกรดอะซิติกอย่างเดียว ต่อมา Jung และคณะ (2006) ยังพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากโครงปลาออสก้า พอลเลค ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินมีความสามารถจับแคลเซียมได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดอื่นๆ จึงอาจเป็นไปได้ว่า เมื่อย่อยโปรตีนสกัดที่ได้จากการต้มในสารละลายกรด โดยเอนไซม์เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ซึ่งค่าระดับการย่อยสลายมากกว่าร้อยละ 30 นั้นอาจทำให้ได้เปปไทด์ที่จับกับแคลเซียมไอออนได้น้อยลง จึงทำให้ปริมาณแคลเซียมที่อยู่ในสารละลายลดลง นอกจากนี้อาจเนื่องจากว่า ระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลสที่



ได้จากทั้งสองวิธีต่างกัน ซึ่งบ่งบอกถึงความแตกต่างในปริมาณการตัดหมู่อะมิโนที่เกิดขึ้นโดยทั้งสองวิธี จึงอาจทำให้ความสามารถดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลสจากทั้งสองวิธีดังกล่าวต่างกัน

โปรตีนไฮโดรไลสที่สามารถจับอออนของแคลเซียมที่ดีอาจไม่ได้ช่วยให้การดูดซึมแคลเซียมเพิ่มขึ้น เนื่องจากการดูดซึมของแคลเซียมจะเกิดขึ้นที่ลำไส้เล็ก จะเกิดได้เมื่อแคลเซียมอยู่ในรูปที่สามารถละลายได้หรืออยู่ในรูปแคลเซียมอิสระ (Bronner and Pansu, 1999) แต่เนื่องจากในลำไส้เล็กมีค่าความเป็นกรดต่างประมาณ 7.80 ทำให้แคลเซียมส่วนใหญ่ที่แตกตัวและละลายในอาหารตกตะกอน จึงทำให้ร่างกายไม่สามารถดูดซึมแคลเซียมเหล่านั้นได้ (Allen, 1982) อย่างไรก็ตามมีแนวความคิดที่ได้รับการนำเสนอโดยนักวิจัยหลายคนว่าการจับตัวกันระหว่างแคลเซียมและเปปไทด์ เช่น เคซีนฟอสโฟเปปไทด์ โดยที่ทำให้แคลเซียมยังคงละลายในสภาวะที่พีเอชมีความเป็นด่างเล็กน้อยนั้น อาจช่วยร่างกายดูดซึมแคลเซียมได้เพิ่มขึ้น (Lee *et al.*, 1980) ในทางตรงข้ามในกรณีของไฟเตท (Phytate) ที่พบว่าสามารถจับกับอออนแคลเซียมได้ดี แต่สารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นกลับมีทำให้การดูดซึมแคลเซียมลดลง (Kumar *et al.*, 2009)



รูปที่ 4 ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถจับแคลเซียมของโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ( $^{a-d} p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อย และ  $^{A-B}$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

### 3.3 ความสามารถต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity)

กิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดุกปลานิลโดยใช้ น้ำ และ สารละลายกรด และ โปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัด โดยสองวิธีดังกล่าว โดยประเมินจากค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ความสามารถรีดิวส์ และ ความสามารถจับอออนของโลหะ แสดงดังรูปที่ 11 พบว่าโปรตีนสกัดจากกระดุกปลานิลด้วยน้ำมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของ DPPH และ ABTS และความสามารถจับอออนของโลหะ ได้ดีกว่าโปรตีนสกัดที่เตรียมโดยใช้สารละลายกรด สำหรับความสามารถรีดิวส์ของโปรตีนทั้งสองชนิดนั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

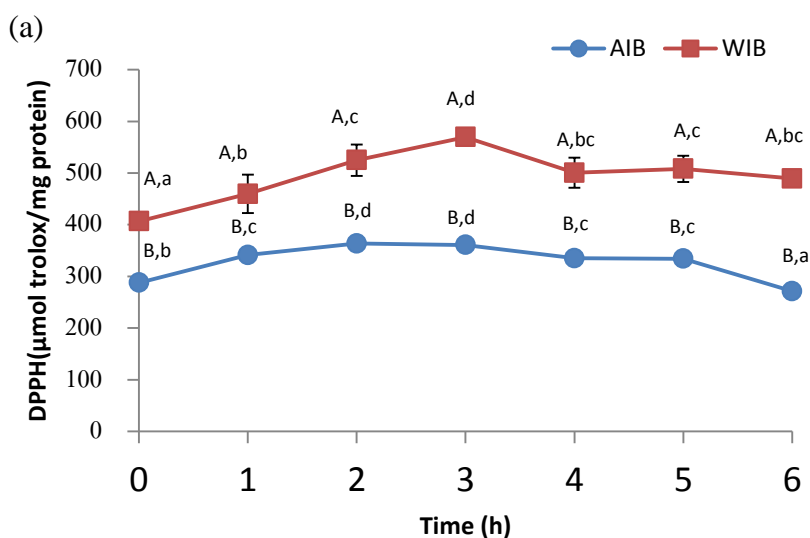
เมื่อนำโปรตีนสกัดทั้งสองชนิดมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดุกปลานิลด้วยน้ำร้อนมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดุกปลานิลโดยใช้สารละลายกรดร้อน นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาในการย่อยโปรตีนมีผลต่อกิจกรรมต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน กล่าวคือคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ DPPH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย และเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเวลาการย่อยผ่านไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ความสามารถดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลสจะลดลง

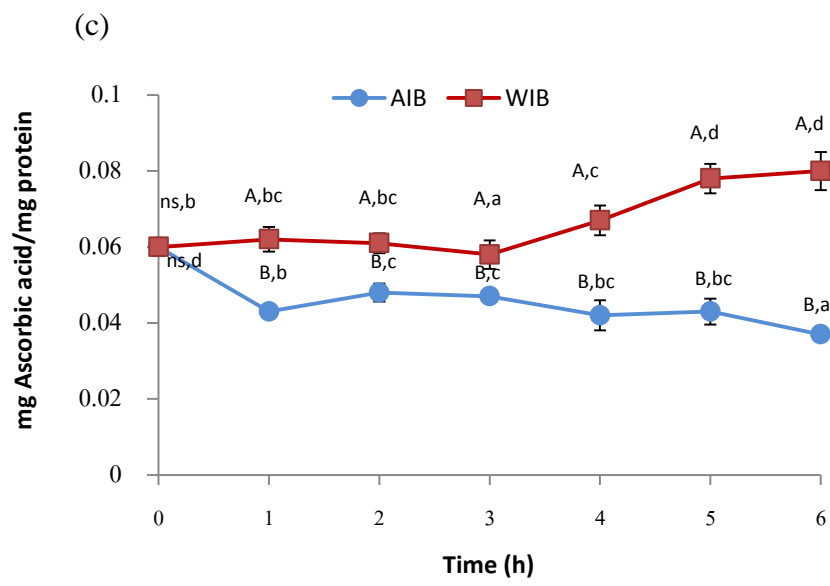
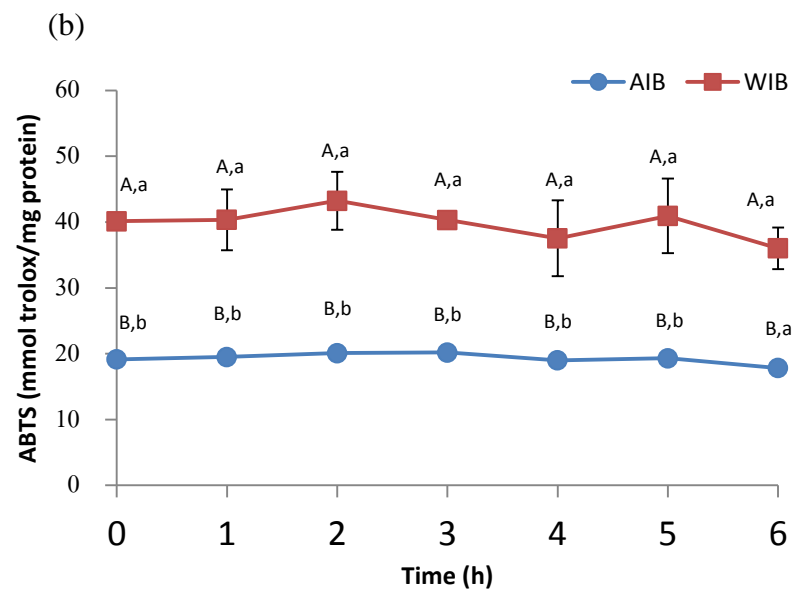
รายงานการศึกษาที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่าระดับการย่อยสลาย และ สมบัติต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลสยังมีความหลากหลาย เช่น การศึกษาของ Nalinanon และคณะ (2011) พบว่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลสจากปลาทรายแดงไม่มีความสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย โดยความสามารถในการจับเรดิคัล DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่อค่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง ความสามารถในการจับอนุมูล DPPH ก็จะลดลง อย่างไรก็ตาม Klompong และคณะ (2007) พบว่าความสามารถจับอนุมูล DPPH ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นระหว่างร้อยละ 5-25 นอกจากนี้ Centenaro และคณะ (2011) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากกระดุกปลาและไก่ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ฟลาโวไซม์มีความสามารถจับอนุมูล DPPH เพิ่มขึ้น เมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น

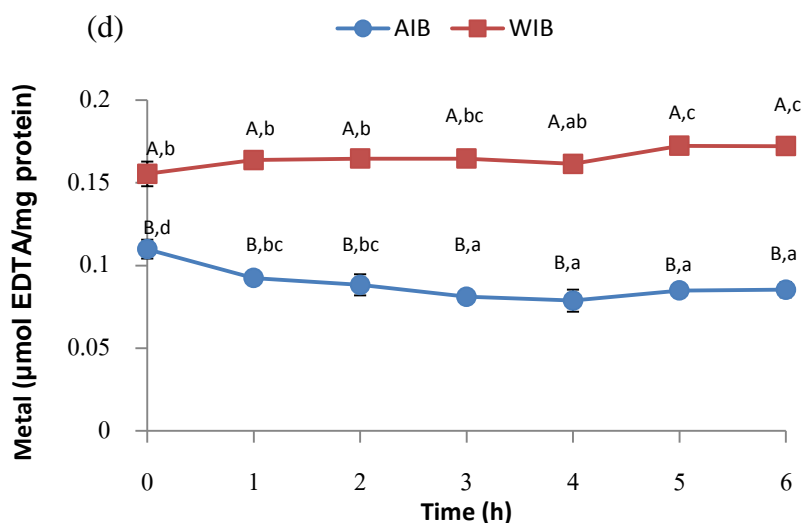
สำหรับคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ ABTS มีแนวโน้มคงที่ตลอดระยะเวลาย่อยของโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดุกปลานิลทั้งสองวิธี ส่วนความสามารถรีดิวส์ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชันของสารที่ต้องการทดสอบ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดุกปลานิลด้วยน้ำร้อนในช่วง 3 ชั่วโมงแรกของการย่อยมีแนวโน้มคงที่ แต่หลังจากนั้นพบว่าฤทธิ์ดังกล่าวเพิ่มขึ้น และ

เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น ซึ่งต่างจากความสามารถรีดิวส์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยสารละลายกรด ที่พบว่ามีความไวต่อความเปลี่ยนแปลงของระยะเวลาการย่อยและลดลงเมื่ออัตราการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น จนถึงระดับหนึ่งความสามารถดังกล่าวจะคงที่ซึ่งสัมพันธ์กับระดับการย่อยสลาย ที่พบว่าเมื่อระยะเวลาการย่อยผ่านไปประยะหนึ่งระดับการย่อยสลายก็จะคงที่ สำหรับความสามารถในการจับไอออนของโลหะ ของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากโปรตีนสกัดทั้งสองวิธีก็มีผลในลักษณะเดียวกันกับความสามารถรีดิวส์ เช่นเดียวกับที่ Klompong และคณะ (2007) และ Thiansilakul และคณะ (2007) พบว่าความสามารถรีดิวส์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลาข้างเหลืองเพิ่มขึ้น เมื่ออัตราการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น แต่ความสามารถในการจับไอออนของโลหะลดลง เมื่ออัตราการย่อยโปรตีนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้มีการศึกษาของ Centenaro และคณะ (2011) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากกระดูกปลาซึ่งมีความสามารถรีดิวส์สูงสุดจะมีค่าระดับการย่อยโปรตีนสูงสุดเช่นกัน

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิลโดยใช้น้ำแล้วย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเพื่อให้ค่าระดับการย่อยสลายอยู่ในช่วงร้อยละ 18-22 ทำให้ได้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีกิจกรรมต้านออกซิเดชันได้ดี







รูปที่ 5 กราฟค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถต้านอนุมูล DPPH (a) และ ABTS (b), ความสามารถรีดิวส์ (c) และ ความสามารถจับโลหะ (d) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่เวลาต่างๆ ( $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างเวลาการย่อย และ  $A-B$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

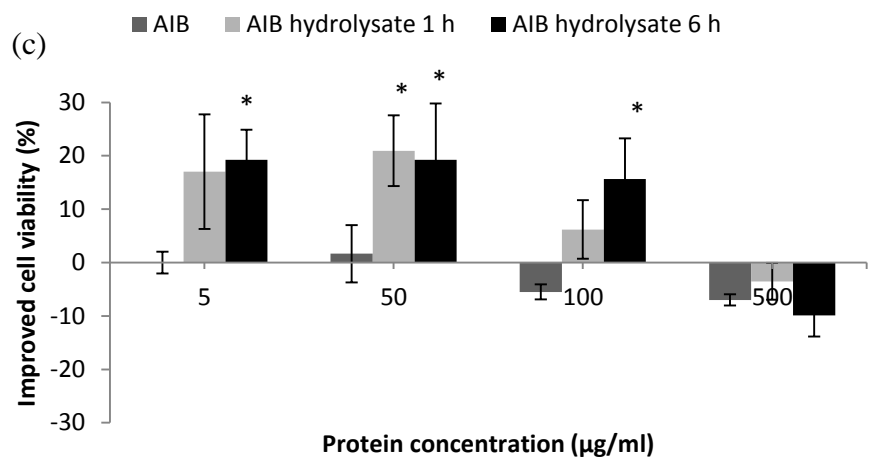
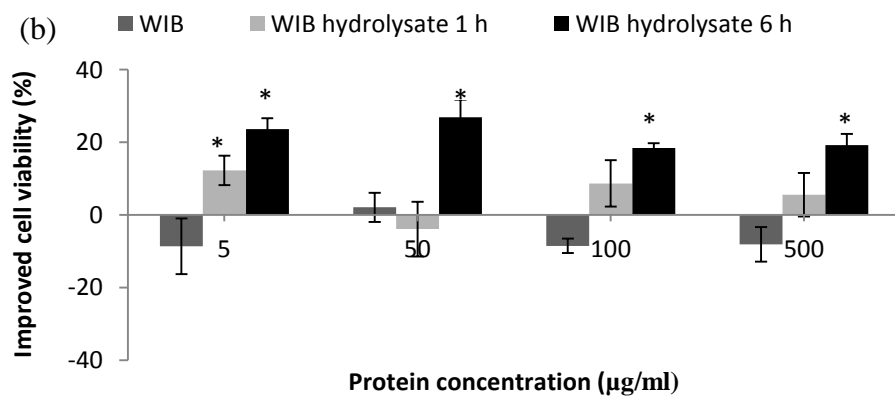
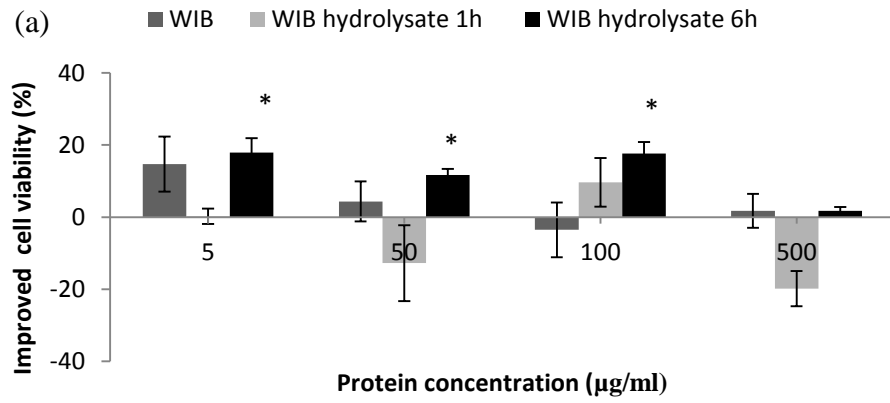
#### 4. ผลของโปรตีนไฮโดรไลสที่จับกับอออนแคลเซียมได้ต่อการใช้ประโยชน์ในระดับเซลล์

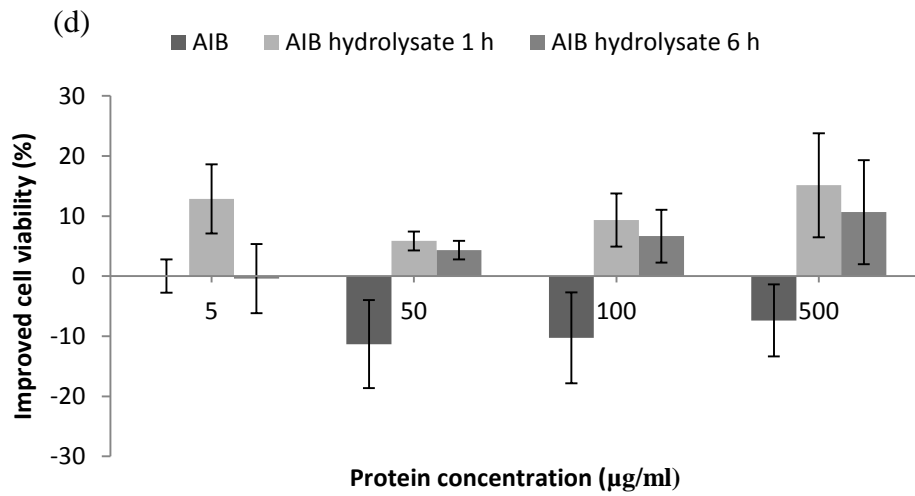
##### 4.1 การอยู่รอดและการเจริญเติบโตของเซลล์สร้างกระดูก

ผลของโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากกระดูกปลานิลต่อการอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยวิธีเอ็มทีที (MTT) แสดงดังรูปที่ 12 พบว่า โปรตีนสกัดที่ได้จากน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ไม่มีผลกระทบต่อเจริญของเซลล์ทั้งทางบวกและทางลบ และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) ทั้งที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อนำสารละลายโปรตีนสกัดมาย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 1 หรือ 6 ชั่วโมงมาทดสอบ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ ที่ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการตายของเซลล์ เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ ในส่วนโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ ที่ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 5, 50 และ

100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 5, 50, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อทดสอบโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรดซิตริก พบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญและการตายของเซลล์ ทั้งที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อนำโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรด ที่ย่อยเป็นเวลา 1 หรือ 6 ชั่วโมง ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรด ที่ย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 5, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการตายของเซลล์สร้างกระดูก เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การศึกษาของ Fu และ Zhao (2012) พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาแซลมอนที่ไม่ผ่านการย่อย ที่ความเข้มข้น 0, 5, 10, 20, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของเซลล์สร้างกระดูก hFoB 1.19 แต่เมื่อย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ปาเปน หรือนิวเทรส พบว่าเจลาตินไฮโดรไลเสทที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์ปาเปนย่อยเป็นเวลา 7 ชั่วโมง ที่มีค่าระดับย่อยสลายร้อยละ 10.7 มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ hFoB1.19 ได้ดีที่สุดใน อาจเป็นผลจากการย่อยในสภาวะนี้ ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Fu and Zhao, 2012) นอกจากนี้ Ravallec-Ple และคณะ (2000) พบว่าการย่อยโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาคอด เป็นเวลา 20 และ 60 นาที และใช้ที่ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ 3T3 fibroblasts ได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่โปรตีนไฮโดรไลเสทซึ่งย่อยเป็นเวลา 120 นาที ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของเซลล์ได้สูงสุด คณะวิจัยได้อธิบายว่า อาจเป็นผลจากในระหว่างการย่อยโปรตีนนาน 120 นาที มีการปลดปล่อยโพลีเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้เซลล์แบ่งตัวและเพิ่มจำนวน ที่เรียกว่า โกรทแฟกเตอร์ (Growth factor) ซึ่งมีอยู่หลายกลุ่มด้วยกัน โดยในชั้นการเจริญของเซลล์ โกรทแฟกเตอร์ที่กระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นอยู่ในกลุ่มของ Transforming growth factor- $\beta$ , Fibroblast growth factor, Insulin-like growth factor และ Platelet-derived growth factor (Hughes *et al.*, 2006; Wildemann *et al.*, 2007) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโปรตีนสกัดด้วยน้ำหรือสารละลายกรด โดยไม่ผ่านการย่อย ไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 6 ชั่วโมงพบว่าทั้งโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำหรือสารละลายกรดไม่เพียงแต่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์แล้วแต่ยังกระตุ้นการเจริญของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุด





รูปที่ 6 ผลของโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) หรือกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 cells หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 (a, c) และ 48 ชั่วโมง (b, d) และทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที (\*  $P < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)



## 4.2 ผลโดยตรงของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่จับแคลเซียมอ่อนได้ต่อการดิฟเฟอเรนชิเอชัน (differentiation) ของเซลล์สร้างกระดูก

### 4.2.1 ระดับเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1

ผลของโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิลโดยใช้ น้ำร้อนและกรรไกร และโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมจากโปรตีนสกัดที่ระดับความเข้มข้น 0, 5, 10, 50, 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์กระดูก MC3T3-E1 แสดงดังรูปที่ 13 พบว่าโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิลโดยใช้ น้ำ ไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) เมื่อทดสอบที่ใช้ระยะเวลา 7 วัน ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน พบว่าที่ความเข้มข้น 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีผลให้กิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเพิ่มขึ้น เมื่อย่อยโปรตีนสกัดด้วยน้ำร้อนด้วยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 7 วัน หรือ ที่ความเข้มข้น 5, 10, 50, 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้สูงกว่ากิจกรรมที่พบในชุดควบคุม ในขณะที่การย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ทั้งในการทดสอบที่ใช้ระยะเวลา 7 และ 14 วัน

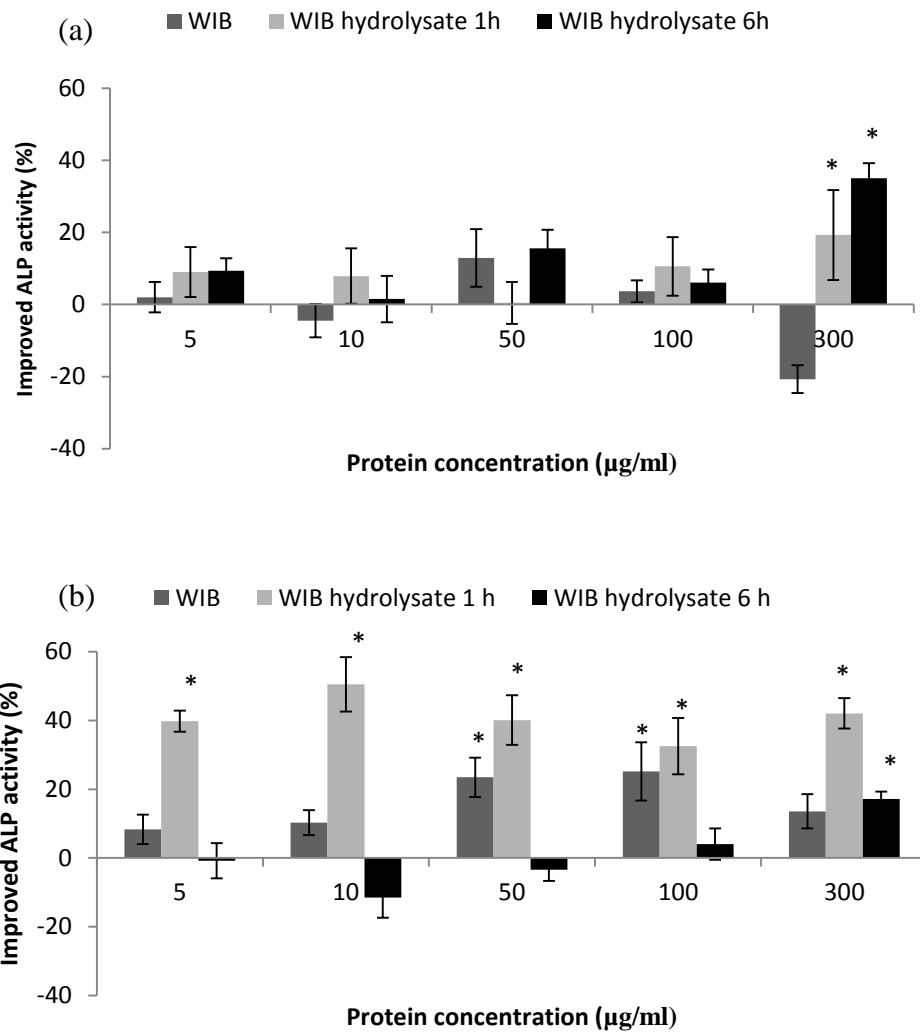
ในส่วนของโปรตีนที่สกัดจากกระดูกปลานิลโดยใช้สารละลายกรดซิดริก ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) โดยตรวจพบเฉพาะในการทดสอบที่ใช้ระยะเวลา 7 วันเท่านั้น ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน ที่ความเข้มข้นเดียวกันกลับไม่มีผลต่อกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่กลับส่งผลให้ลดกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเตสลง เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรด เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนั้น พบว่าไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส แต่กลับทำให้ลดกิจกรรมเอนไซม์ฟอสฟาเตสลง เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในระยะเวลา 7 วัน หรือที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เมื่อทดสอบเป็นเวลา 14 วัน แต่เมื่อย่อยโปรตีนดังกล่าวเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ในระยะเวลา 14 วัน สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ ในขณะที่เมื่อทดสอบเป็นเวลา 7 วัน ไม่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส การศึกษาของ Lee และคณะ (2011) พบว่าโปรตีน

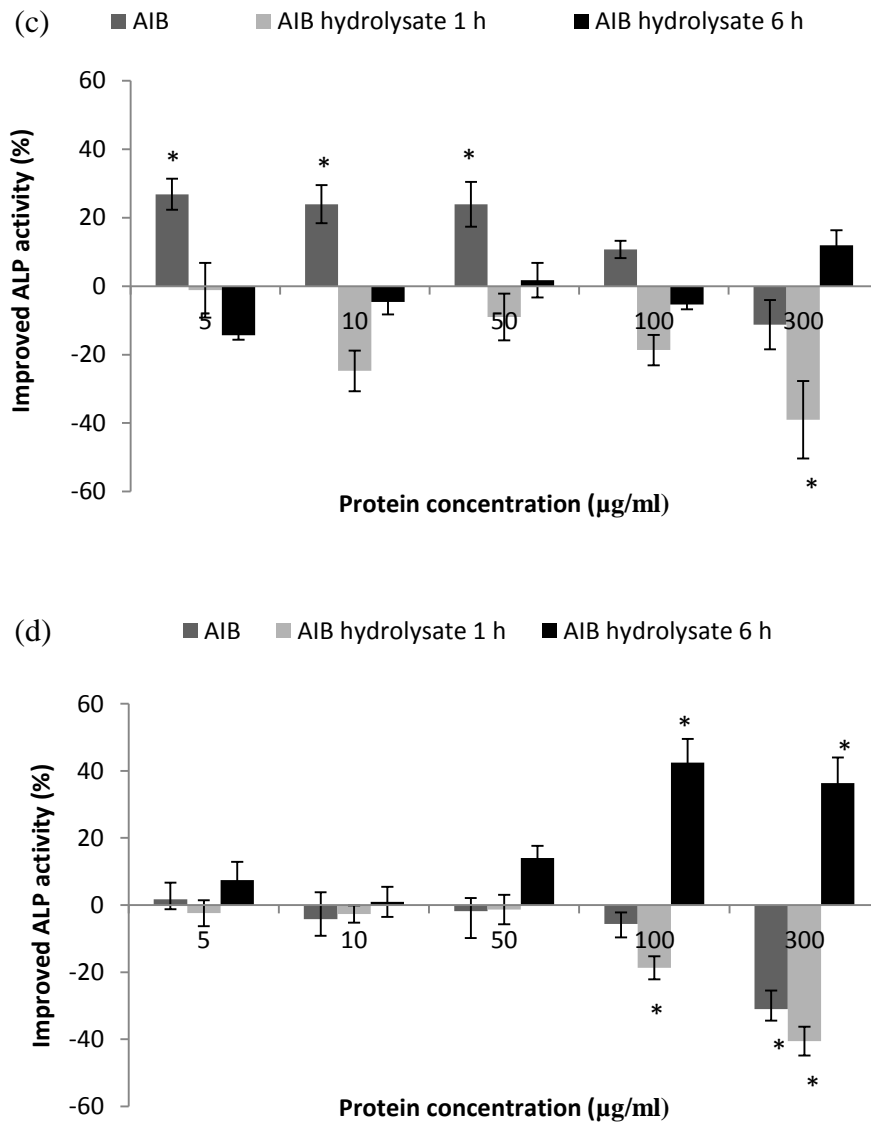
ไฮโดรไลสจากยีสต์ ที่ความเข้มข้นระหว่าง 25-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ได้

การศึกษาการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างกระดูกเป็นอีกวิธีหนึ่งในการประเมินความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลสในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างกระดูก ในการศึกษาครั้งนี้ได้วิเคราะห์การดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์สร้างกระดูกโดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารที่เติมโปรตีนไฮโดรไลสเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์สร้างกระดูกมีการสร้างเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในปริมาณสูงและเข้าสู่กระบวนการหลั่งสารเมทริกซ์ที่จำเป็นต่อการสร้างกระดูกออกมา การศึกษา เคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (casein phosphopeptide, CPP) ที่ได้จากการย่อยโปรตีนนม โดย Tulipano และคณะ (2010) พบว่า CPP จาก  $\alpha$ -casein ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนทรีโอนีน (threonine) และมี phosphorylated sites อยู่ในสายเปปไทด์มาก จะมีความสามารถกระตุ้นกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ได้ นอกจากนี้ Ryu และคณะ (2011) พบว่า เปปไทด์ที่เตรียมจากโปรตีนม้าน้ำ (*Hippocampus kuda Bleeker*) โดยใช้เอนไซม์โปรตีนเอส-อี ซึ่งประกอบด้วย ลิวซีน กรดกลูตามิก โพรลีน ฟีนอลานีน แอสปาราจีน กรดแอสพาทิก ไลซีน และ ทรีปโทเฟน สามารถเพิ่มกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเซลล์ MG-63 (human osteoblast-like cell line) ได้

การศึกษาครั้งนี้พบว่าโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำและย่อยเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง มีผลเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ได้ดีกว่าโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรดและย่อยในระยะเวลาเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นผลจากความแตกต่างของเปปไทด์ที่ปลดปล่อยออกมาจากการย่อย โดยเฉพาะการทำให้ได้เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นโกรทแฟกเตอร์ที่แตกต่างกัน ในขั้นตอนการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์กระดูกนี้มีโกรทแฟกเตอร์ที่แสดงบทบาทที่สำคัญประกอบด้วย Bone morphogenic protein (BMP) เช่น BMP-2, BMP-4 และ BMP-7 (Hughes *et al.*, 2006) การศึกษาบทบาทของโกรทแฟกเตอร์ชนิดต่างๆ ต่อการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ HBMS (human bone marrow stromal cells) โดย Chaudhary และคณะ (2004) พบว่า BMP-7 สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับโกรทแฟกเตอร์ตัวอื่นๆ แต่ BMP-7 กลับไม่มีผลต่อการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ และเมื่อศึกษาผลร่วมของโกรทแฟกเตอร์ที่เรียกว่า Fibroblast growth factor (FGF 2) กับ BMP-7 พบว่า ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับระบบของเซลล์กระดูกที่มี BMP-7 เพียงชนิดเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โกรทแฟกเตอร์ บางชนิดไม่เพียงแต่ไม่มีผลต่อการส่งเสริมการดิฟเฟอเรนซิเอชัน แต่ยังแสดงผลยับยั้งอีกด้วย จากผลศึกษาที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสของกระดูกปลานิลที่เตรียมจากโปรตีนซึ่งสกัดด้วยน้ำและย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์

ฟอสฟาเตสสูงสุดนั้น แสดงให้เห็นว่า เปปไทด์ที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสได้ดี แม้ว่าการศึกษานี้จะไม่สามารถตรวจสอบกลไกการทำงานของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสทนี้ก็ตาม





รูปที่ 7 ผลของโปรตีนสกัด และโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) และกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อ มิลลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสของเซลล์สร้าง กระดูก (MC3T3-E1 cells) หลังทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (a, c) และ 14 วัน (b, d) (\*  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

#### 4.2.2 การสะสมแคลเซียม

ผลของโปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิล โดยใช้น้ำและสารละลายกรดและโปรตีนไฮโดรเสทที่เตรียมจากโปรตีนสกัดโดยสองวิธีดังกล่าวต่อปริมาณแคลเซียมที่สะสมรอบโครงข่าย (extracellular cell matrix) ของเซลล์กระดูก MC3T3-E1 แสดงดังรูปที่ 14 พบว่า โปรตีนสกัดที่เตรียมจากกระดูกปลานิล โดยใช้น้ำ ไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมที่สะสมนอกเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) ในการทดสอบที่ใช้ระยะเวลา 7 วัน แต่เมื่อใช้ที่ความเข้มข้นที่ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และทดสอบเป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีผลให้การสะสมแคลเซียมมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเสทมาทดสอบ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนที่สกัดโดยใช้น้ำร้อนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลให้การสะสมของแคลเซียมเพิ่มขึ้นสูงกว่าที่พบในชุดควบคุม เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน และไม่มีผลให้ปริมาณสะสมแคลเซียมแตกต่างจากชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) เมื่อทดสอบเป็นเวลา 7 วัน แต่เมื่อใช้โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลต่อปริมาณแคลเซียมดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p > 0.05$ ) ยิ่งกว่านั้นการเพิ่มความเข้มข้นเป็น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยังมีผลให้ปริมาณของแคลเซียมดังกล่าวลดลงต่ำกว่าชุดควบคุม เมื่อทดสอบเป็นเวลา 7 วัน

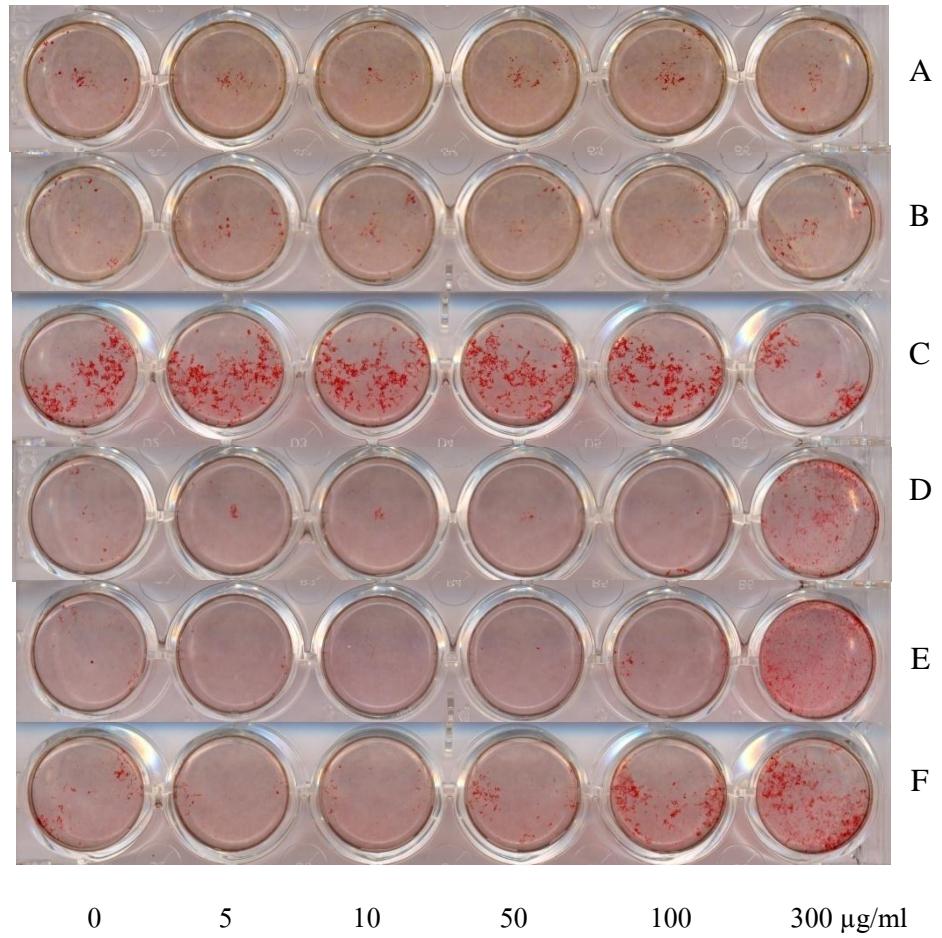
ในขณะที่ในระบบที่ใช้โปรตีนที่สกัดจากกระดูกปลานิลโดยสารละลายกรดชนิดริกที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อการทดสอบใช้ระยะเวลา 7 และ 14 วัน ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณแคลเซียมเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) ในส่วนของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยสารละลายกรดชนิดริกเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบซึ่งใช้ระยะเวลา 7 วัน และที่ความเข้มข้น 100 และ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบซึ่งใช้ระยะเวลา 14 วัน สามารถเพิ่มการสะสมแคลเซียมได้ ส่วนการย่อยที่ 6 ชั่วโมงที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบซึ่งใช้ระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดสอบซึ่งใช้ระยะเวลา 14 วัน สามารถเพิ่มการสะสมแคลเซียมในเซลล์สร้างกระดูกดังกล่าวได้สูงกว่าที่พบในชุดควบคุม การศึกษาของ Lee และคณะ (2011) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากยีสต์ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มการสะสมของแคลเซียมในเซลล์สร้างกระดูก MC3T3-E1 ได้ และที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีปริมาณการสะสมของแคลเซียมถึงร้อยละ  $118.4 \pm 1.2$  เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้ Wildemann และคณะ (2007) ได้ศึกษาผลของโกรทแฟกเตอร์ทางการค้า 3 ชนิด คือ Insulin growth factor-I (IGF-I), Bone morphogenic protein (BMP-2) และ Platelet

derived growth factor (PDGFbb) ต่อการเจริญและการดิฟเฟอเรนซิเอชันของเซลล์ myoblast ของหนู (C2C12) พบว่า IGF-I และ PDGFbb สามารถกระตุ้นให้เซลล์เจริญและมีจำนวนเพิ่มขึ้น ในขณะที่ BMP-2 มีผลให้การสะสมแร่ธาตุเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบเป็นระยะเวลา 15 วัน แต่ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของเซลล์ นอกจากนี้ Chaudhary และคณะ (2004) ซึ่งศึกษาผลของโกรทแฟกเตอร์ต่อการดิฟเฟอเรนซิเอชันของ HBMS cell พบว่า BMP-7 มีผลกระตุ้นกิจกรรมอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และการสะสมของแคลเซียมได้สูงสุด และ FGF-2 และ FGF2 ร่วมกับ BMP-7 มีผลต่อการสะสมแคลเซียมรองลงมา อย่างไรก็ตาม โกรทแฟกเตอร์นี้ไม่มีผลกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

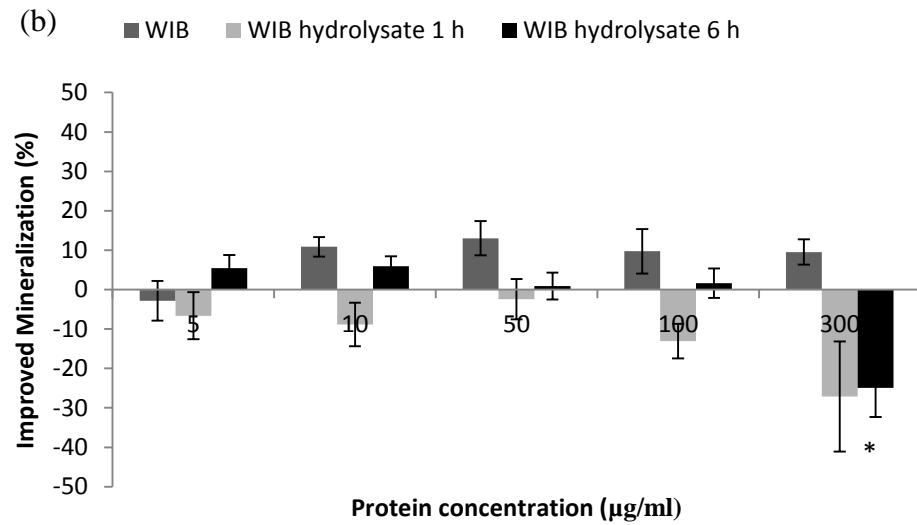
จากรายงานการศึกษาโดยกลุ่มวิจัยต่างๆที่กล่าวมา ประกอบกับผลการศึกษาในครั้งใหม่ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมจากโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรดและผ่านการย่อยเป็นเวลา 1 หรือ 6 ชั่วโมง สามารถส่งเสริมการสะสมแคลเซียมของเซลล์ได้ดีกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมด้วยสถานะเดียวกันแต่ใช้น้ำในการสกัด แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีในโปรตีนไฮโดรไลเซสทั้งสองชนิดแม้จะมีคุณสมบัติเป็นโกรทแฟกเตอร์ แต่อาจมีผลต่อพัฒนาการของเซลล์สร้างกระดูกในขั้นตอนที่ต่างกัน กล่าวคือโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมจากโปรตีนที่สกัดได้ด้วยสารละลายกรดอาจมีเปปไทด์ที่เป็นโกรทแฟกเตอร์ ที่สามารถเพิ่มการสะสมแคลเซียมนอกเซลล์ได้ดี ในทางกลับกันโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมจากโปรตีนที่สกัดได้ด้วยน้ำอาจประกอบด้วยเปปไทด์ที่สามารถทำหน้าที่เป็นโกรทแฟกเตอร์ โดยไม่มีผลกระตุ้นการสะสมแร่ธาตุ

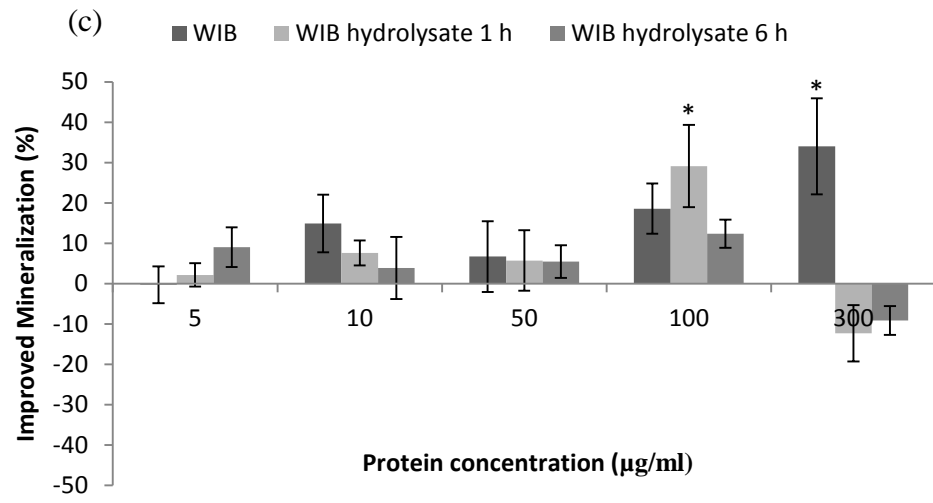
เนื่องจากการสะสมแร่ธาตุเป็นขั้นตอนสุดท้ายในการสร้างกระดูก ที่เกิดขึ้นโดยแคลเซียมจากภายนอกเซลล์รวมตัวกับฟอสเฟตอิสระกลายเป็นแคลเซียมฟอสเฟต แล้วเกาะตามโครงสร้างร่างแหที่อยู่นอกเซลล์ เนื่องจากการศึกษาของ Donida และคณะ (2009) โดยเลี้ยง human primary osteoblast-like cell โดยอาหารที่มีเคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (CPP) ทางการค้ำจาก 2 แหล่ง พบว่าการใช้ CPP ที่มีแคลเซียมร้อยละ 6.6 โดยน้ำหนัก (w/w) ทำให้การสะสมแคลเซียมของเซลล์มีปริมาณสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเกลือ โดยใช้อาหารที่มี CPP ซึ่งปราศจากแคลเซียม ประกอบผลการศึกษานี้ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เตรียมจากโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรดพบว่ามีแคลเซียมในปริมาณสูงนั้นสามารถกระตุ้นการสะสมของแร่ธาตุได้ดี จึงมีความเป็นไปได้ที่แคลเซียมในตัวอย่างนี้อาจมีส่วนต่อการส่งเสริมกระบวนการสะสมแคลเซียมของเซลล์ ซึ่งการตรวจสอบความเป็นไปได้ของข้อสมมุติฐานนี้อาจทำได้โดยการตรวจสอบการสะสมแคลเซียมของเซลล์ในระบบที่มีเติมแคลเซียมโดยไม่ใช้โปรตีนไฮโดรไลเซสดังกล่าว

(a)

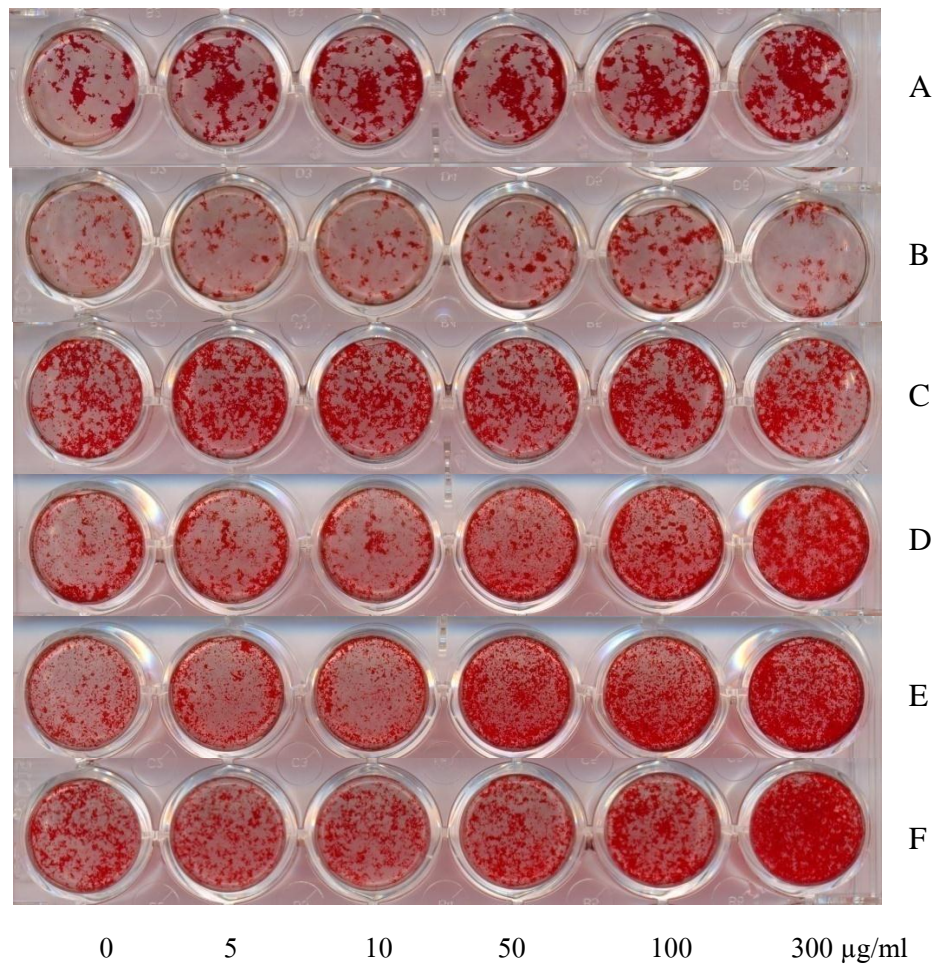


(b)

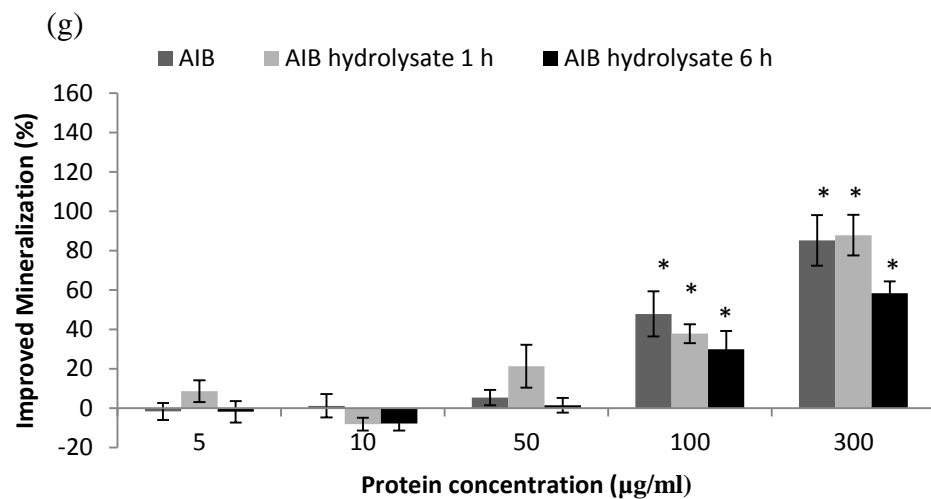
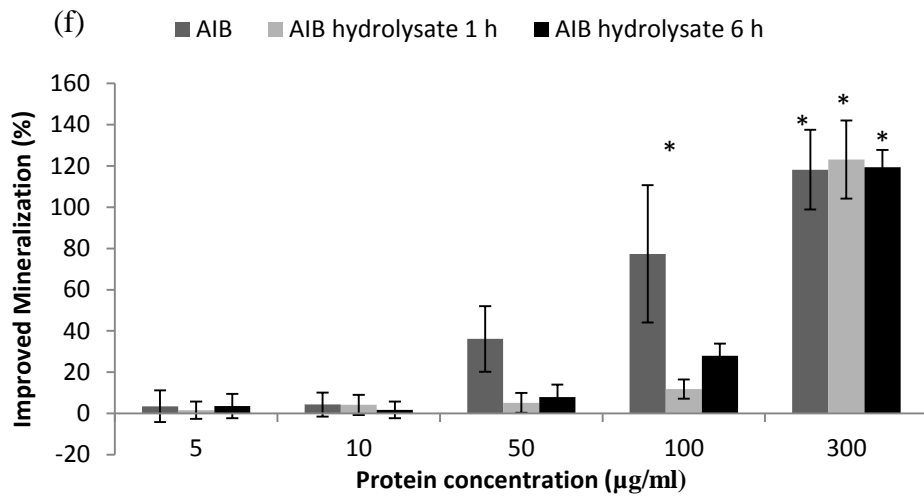




(d)







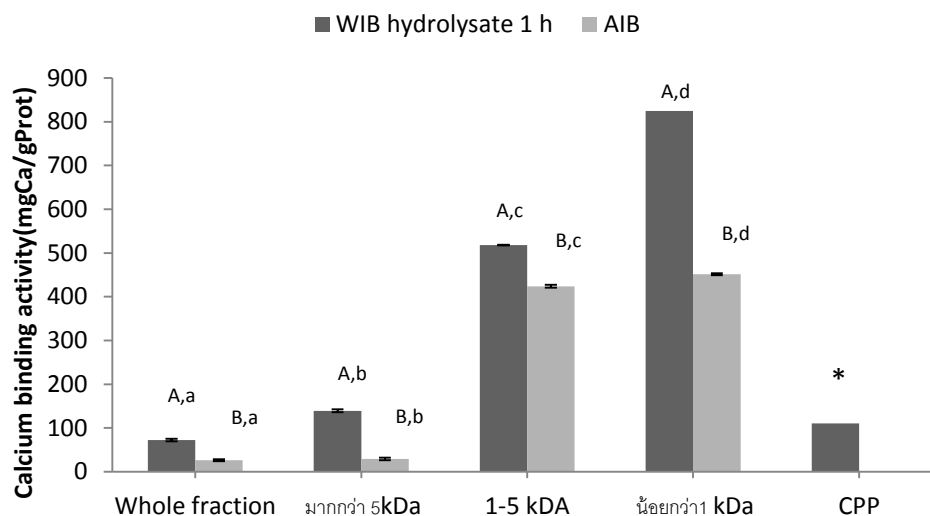
รูปที่ 8 ผลของโปรตีนสกัด และโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำ (WIB) และกรด (AIB) และย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0-300 ไมโครกรัมต่อ มิลลิตรต่อเปอร์เซ็นต์การเพิ่มการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูก (MC3T3-E1 cells) หลัง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (b, f) และ 14 วัน (c, g) และ ย้อมสีแคลเซียมด้วยอะลิซาริน เรดหลัง ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน (a), และ 14 วัน (d) (\* $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ)

A: WIB, B: WIB hydrolysate 1 h, C: WIB hydrolysate 6 h, D: AIB, E: AIB hydrolysate 1 h, F: AIB hydrolysate 6 h

## 5. การแยกโปรตีนไฮโดรไลสด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration membrane)

### 5.1 ความสามารถจับแคลเซียมไอออน (Calcium binding activity)

ความสามารถจับแคลเซียม โดยเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนกระดูกปลาที่สกัดที่เตรียมโดยใช้สารละลายกรดร้อนและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และที่แยกจากโปรตีนไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยโปรตีนกระดูกปลาที่สกัดโดยใช้น้ำร้อน แสดงดังรูปที่ 15 ในภาพรวมพบว่าเปปไทด์ที่แยกได้ทั้งจากโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลสดังกล่าว โดยเฉพาะเปปไทด์ในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน และที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 1-5 กิโลดาลตัน สามารถจับไอออนแคลเซียมได้ดีกว่าตัวอย่างที่ยังไม่ผ่านการกรองแยก และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพบว่า เปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนกระดูกปลาที่สกัดด้วยน้ำร้อนสามารถจับไอออนแคลเซียมได้ดีกว่า ( $p < 0.05$ ) เปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรดร้อน และเคซีนฟอสโฟเปปไทด์ (CPP) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เปปไทด์ทางการค้าที่ได้จากการย่อยเคซีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน ในกรณีนี้พบว่ามี ความแตกต่างจากรายงานการศึกษาของ Jung และคณะ (2005) ที่พบว่า CPP มีความสามารถจับแคลเซียมได้สูงกว่าเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนไฮโดรไลสจากโครงปลาโฮกิด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตัน ความแตกต่างดังกล่าวนี้อาจเป็นผลรวมของปัจจัยหลายประการ อาทิ ความแตกต่างในแหล่งของ CPP วัตถุดิบเริ่มต้น และสภาวะการย่อย เป็นต้น นอกจากนี้รายงานการศึกษาที่กล่าวถึงนี้ยังพบว่า เปปไทด์ของกระดูกปลาโฮกิที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 1-5 กิโลดาลตัน สามารถจับแคลเซียมได้สูงสุด ในขณะที่ผลการศึกษาในครั้งนี้ (รูปที่ 15) พบว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 kDa สามารถจับแคลเซียมได้สูงสุด (824.6 มิลลิกรัมแคลเซียมต่อกรัมโปรตีน) โดยเฉพาะเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนไฮโดรไลสของโปรตีนกระดูกปลาที่สกัดด้วยน้ำ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาโดยใช้โปรตีนไฮโดรไลสจากเศษเหลือของกุ้งที่ดำเนินการโดย Huang และคณะ (2011) ที่ระบุว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน สามารถจับแคลเซียมได้สูงสุด (0.445 มิลลิโมลต์ต่อกรัมโปรตีน) อย่างไรก็ตามด้วยความแตกต่างในหน่วยที่ใช้รายงานความสามารถจับไอออนแคลเซียมของรายงานการศึกษาที่กล่าวถึง ประกอบกับการขาดความชัดเจนในส่วนของวิธีการเตรียมตัวอย่างในบางส่วนของรายงานการศึกษาทั้ง 2 ฉบับนี้ จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบลำดับความสามารถจับของแคลเซียมโดยเปปไทด์จากทั้ง 3 แหล่งข้างต้นได้ อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาความสามารถจับไอออนแคลเซียมโดยเปปไทด์ที่เตรียมจากชีววัสดุชนิดต่างๆ พบว่าเป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งมีกรดอะมิโนระหว่าง 3-20 เรซิดิว เป็นเปปไทด์ชนิดหลักที่มีความสามารถจับกับไอออนแคลเซียม (Di Bernardini *et al.*, 2011)



รูปที่ 9 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ความสามารถจับแคลเซียมของโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรดและโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดด้วยน้ำที่ย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ผ่านการแยกด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (MW >5 kDa, 5–1 kDa, and <1 kDa) (<sup>a-d</sup> p < 0.05 แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดโมเลกุล, <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด และ \*แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างและ CPP)

## 5.2 ความสามารถต้านออกซิเดชัน (Antioxidant activity)

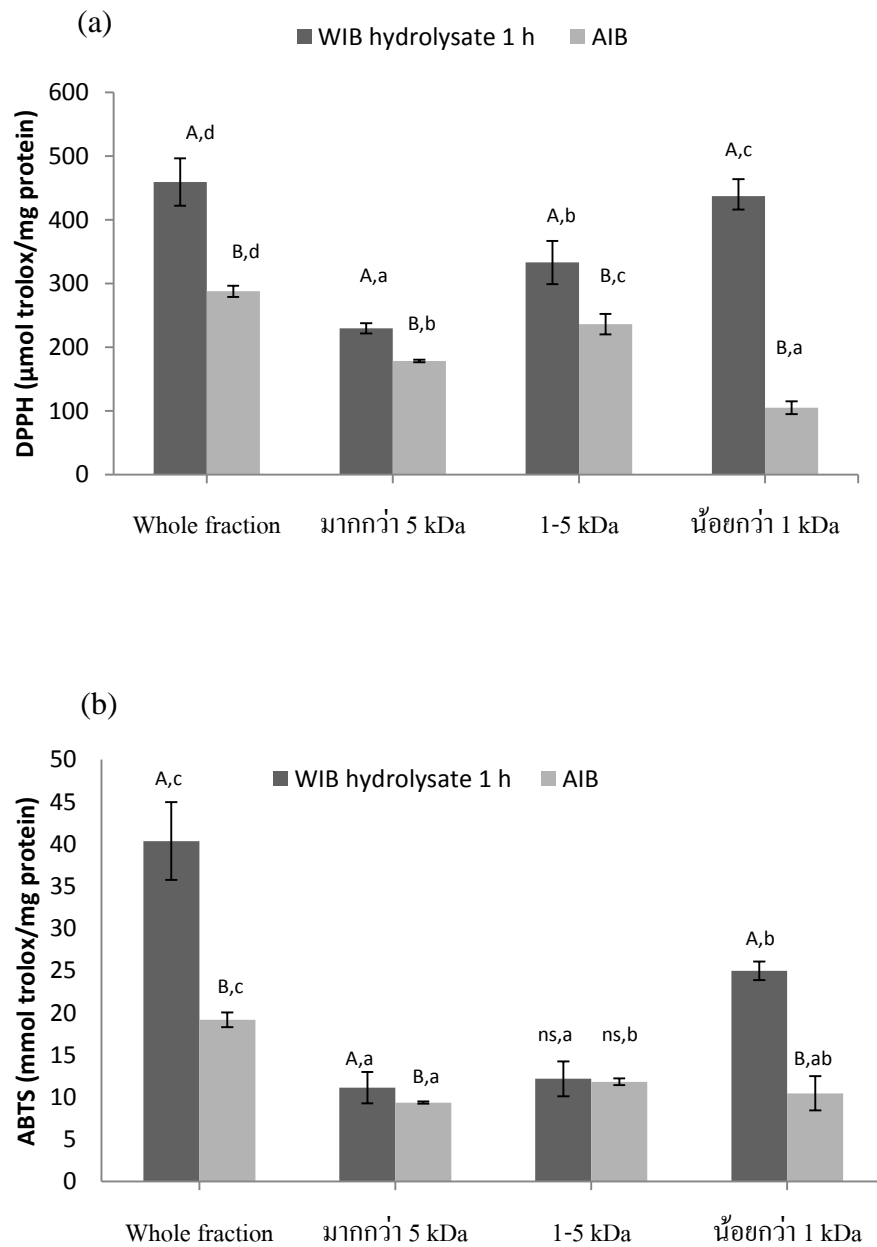
ความสามารถต้านออกซิเดชันของเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนสกัดที่เตรียมโดยใช้สารละลายกรดร้อนและไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และที่แยกจากโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนกระดูกปลาที่สกัดโดยใช้น้ำร้อน เมื่อประเมินจากค่าความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ความสามารถรีดิวซ์และความสามารถจับไอออนของโลหะ ที่แสดงดังรูปที่ 16 พบว่าความสามารถรีดิวซ์และความสามารถจับไอออนของโลหะโดยเปปไทด์ที่แยกได้ทั้งจากโปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรองแยก ในขณะที่ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของตัวอย่างเริ่มต้นมีค่าสูงกว่าเปปไทด์ที่แยกได้ในกรณีนี้พบว่ามีแตกต่างจากรายงานการศึกษาของ Ajibola และคณะ (2011) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทของ African Yam Bean Seed มีความสามารถจับอนุมูลอิสระ DPPH ต่ำกว่า เปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสทนี้ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน โดยเฉพาะในกลุ่มเปปไทด์ที่ขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน ในขณะที่ความสามารถจับไอออนของโลหะนั้นโปรตีนไฮโดรไลเสทเริ่มต้นที่ไม่ผ่านการแยกกลับสูงกว่าเปปไทด์ที่แยกได้ ในขณะที่ผลการศึกษานี้

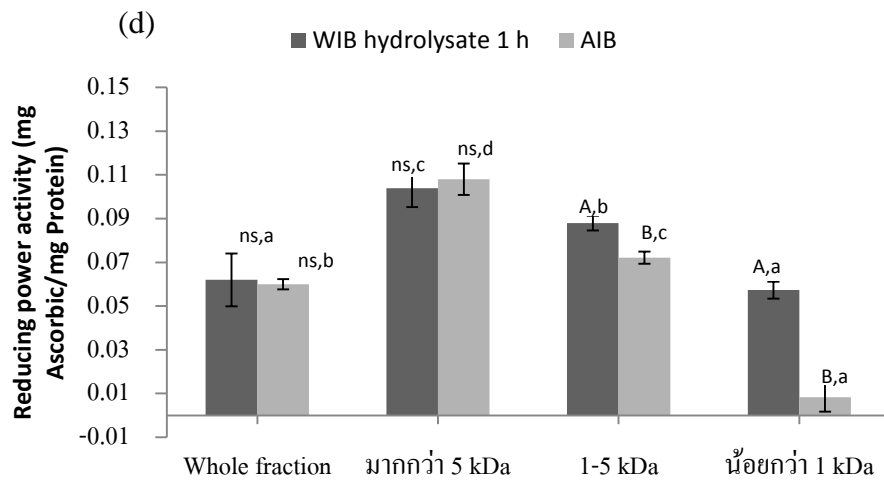
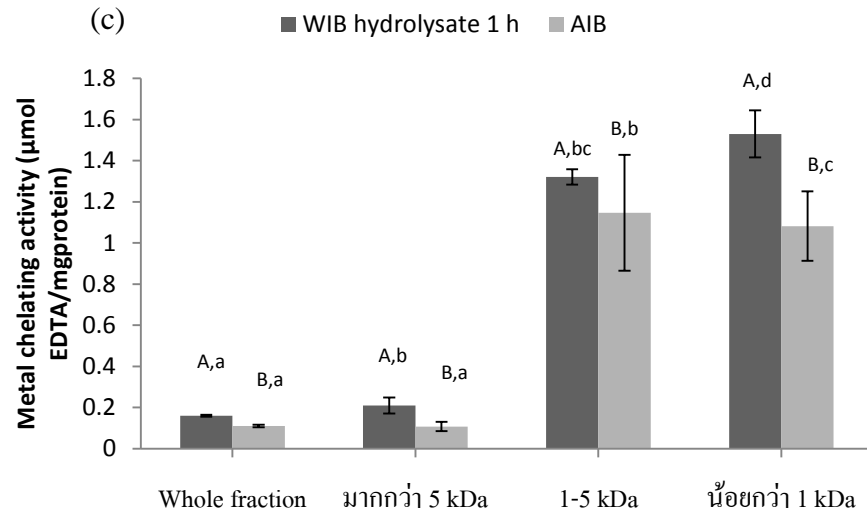
สอดคล้องกับการศึกษาของ Tang และคณะ (2009) ที่พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทของ zein เริ่มต้นที่ไม่ผ่านการแยก มีความสามารถจับอนุมูลอิสระ ABTS ได้สูงกว่าเปปไทด์ที่ได้จากการแยกด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันที่มี MWCO 10, 5, 3 และ 1 กิโลดาลตัน

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างตัวอย่างพบว่าเปปไทด์กลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 5 กิโลดาลตัน ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำร้อนมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีกว่าเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนสกัดที่เตรียมด้วยสารละลายกรดร้อน เมื่อประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ความสามารถจับไอออนของโลหะ โดยเฉพาะกลุ่มเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน ในขณะที่ความสามารถรีดิวซ์ของเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5 กิโลดาลตัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $p > 0.05$ ) กับเปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนทั้งสอง ยิ่งกว่านั้นเปปไทด์ในกลุ่มนี้ยังมีความสามารถรีดิวซ์สูงสุดด้วย

รายงานการศึกษาที่กล่าวถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดโมเลกุลของเปปไทด์และสมบัติต้านออกซิเดชันมีความหลากหลายเช่น Mendis และคณะ (2005) พบว่าเปปไทด์ที่แยกได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสทจากหนังปลาหมึกที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 3 กิโลดาลตัน มีความสามารถสูงสุดในการจับอนุมูลอิสระ DPPH นอกจากนี้ Fan และคณะ (2012) พบว่าเปปไทด์ที่แยกจากโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโครงปลานิลด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน สามารถจับอนุมูล DPPH ได้สูงสุด ซึ่งคณะวิจัยได้อธิบายว่ากรณีที่เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำมีความสามารถต้านออกซิเดชันได้ดีกว่านั้น อาจจะเป็นไปได้ว่าเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลต่ำประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จับกับอนุมูลอิสระได้ง่าย ในขณะที่ Je และคณะ (2005) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโครงปลาโกลิที่ข่อยด้วยเอนไซม์เปปซินที่ขนาดโมเลกุลระหว่าง 1-3 กิโลดาลตัน มีความสามารถจับอนุมูล DPPH และความสามารถจับ superoxide anion ได้สูงสุด นอกจากนี้ Girgih และคณะ (2011) พบว่าเปปไทด์ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสทของเมล็ดป่านที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 5-10 กิโลดาลตัน มีความสามารถรีดิวซ์และความสามารถจับไอออนของโลหะได้สูงสุด ในขณะการศึกษาของ Foh และคณะ (2010) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมได้จากกล้ามเนื้อปลานิลที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน มีความสามารถจับไอออนของโลหะ และความสามารถรีดิวซ์สูงสุด โดยเฉพาะในกลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุล 1 กิโลดาลตัน อย่างไรก็ตามความหลากหลายของรายงานการศึกษาดังที่กล่าวมานั้น อาจมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความแตกต่างของวัตถุดิบเริ่มต้น สภาพของการย่อยโปรตีน และชนิดและลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ เป็นต้น อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันส่วนใหญ่

จะมีขนาดโมเลกุลระหว่าง 500 - 3000 ดาลตัน ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนระหว่าง 5-16 เรซิดิว (Chen *et al.*, 1998)





รูปที่ 10 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของความสามารถต้านอนุมูล DPPH (a) และ ABTS (b), ความสามารถรีดิวส์ (c) และ ความสามารถจับโลหะ (d) ของโปรตีนสกัดด้วยกรด และ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำ ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแยกด้วยการกรองแบบอัลตราฟิลเตรชัน (น้ำหนักโมเลกุล มากกว่า 5 kDa, 1-5 kDa, และ น้อยกว่า 1 kDa) (<sup>a-d</sup>  $p < 0.05$  แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดโมเลกุล และ <sup>A-B</sup> แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มวิธีการสกัด)

## บทที่ 4

### บทสรุป

1. องค์ประกอบเคมีของกระดูกปลานิลประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน ความชื้น และเถ้า ในปริมาณร้อยละ 24.43, 3.34, 7.65 และ 60.82 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ
2. การสกัดโปรตีนจากกระดูกปลานิลที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ด้วยสารละลายกรดซิตริก (ร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) นาน 75 นาที ทำให้ได้ผลผลิตโปรตีนสูงสุด (ร้อยละ 70.38)
3. การย่อยโปรตีนสกัดของกระดูกปลานิลโดยเอนไซม์เปปซิน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า อัตราการย่อยโปรตีนที่สกัดได้โดยใช้สารละลายกรดมีค่าสูงสุด และสูงกว่าอัตราการย่อยของโปรตีนสกัดที่ใช้น้ำร้อนประมาณ 2 เท่า
4. โปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากโปรตีนสกัดด้วยน้ำร้อน มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS, ความสามารถรีดิวซ์ ความสามารถจับอ็อกซิจิน และความสามารถจับแคลเซียมได้สูงกว่าความสามารถดังกล่าวของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่เตรียมจากโปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรด
5. โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลโดยใช้น้ำ นาน 6 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างกระดูก (MC3T3-E1) เพิ่มจำนวนได้
6. โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำร้อนและย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และโปรตีนที่สกัดด้วยสารละลายกรด และย่อยเป็นเวลา 1 และ 6 ชั่วโมง สามารถเพิ่มการสะสมแคลเซียมของเซลล์สร้างกระดูกได้ดีที่สุด
7. โปรตีนสกัดและโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากโปรตีนที่สกัดด้วยน้ำและย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่แยกด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชันที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1 และ 5 กิโลดาลตัน พบว่า เปปไทด์ที่แยกได้มีความสามารถจับแคลเซียม และความสามารถต้านออกซิเดชัน เมื่อประเมินจากความสามารถจับอ็อกซิจินของโลหะ และความสามารถรีดิวซ์ ที่มีค่าสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการกรองแยก ในขณะที่ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ของตัวอย่างเริ่มต้นสูงกว่าเปปไทด์ที่แยกได้
8. เปปไทด์ในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 5 กิโลดาลตัน ที่แยกได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสทของโปรตีนสกัดจากกระดูกปลานิลด้วยน้ำมีความสามารถจับแคลเซียม และ ความสามารถต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS และความสามารถจับอ็อกซิจินของเหล็ก ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่แยกจาก

โปรตีนสกัดด้วยสารละลายกรด โดยเฉพาะเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตัน ในขณะที่เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5 กิโลดาลตัน จากตัวอย่างทั้งสอง มีความสามารถรีดิวซ์สูงสุด



## เอกสารอ้างอิง

กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข. 2530. ตารางแสดงคุณค่าอาหารไทยในส่วนของที่กินได้ 100 กรัม. โรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพฯ.

กระทรวงสาธารณสุข. 2548. แคลเซียมต้านโรคกระดูกพรุน (ออนไลน์). สืบค้นจาก:  
<http://www.ecookingfood.com> (16 พฤศจิกายน 2554)

ขวัญฤดี วชิรรัตนพงษ์เมธี. 2551. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากโครงปลา ดูดซับก๊วยบดที่ผ่านการสกัดโดยใช้สภาวะต่าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ฉลองขวัญ พิพัฒน์เจริญวงศ์ วรรณวิบูลย์ กาญจนกฤษ และ วรรณิ จิรภาคย์กุล. 2549. การสกัด คอลลาเจนจากเกล็ดปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*)

นิธิยา รัตนานนท์ และ วิบูลย์ รัตนานนท์. 2537. โภชนศาสตร์เบื้องต้น. โอ.เอส.พรินติ้งเฮาส์, กรุงเทพฯ.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณวุฒิ วีระ วัชรกร โยธิน และวิมล จันทโรทัย. 2536. การพัฒนาการเลี้ยงปลานิล. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 18 หน้า

วิศรา สุวรรณ. 2545. การผลิตเจลาตินจากกระดูกปลากะพงแดง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิไลวรรณ ทองเจริญ, สมจินต์ เพชรพันธุ์ศรี, แวนใจ นาคะสุวรรณ และ อุษา ชูสังข์. 2539. ปัจจัยเสี่ยง ความรู้และพฤติกรรมการป้องกันภาวะกระดูกพรุนของสตรีวัยหมดประจำเดือนและสตรีวัยสูงอายุ. สารสภากาการพยาบาล. 11 (3): 77-78.

เบญจมาศ เอื้อพิพัฒน์. 2552. ปลานิล สัตว์เศรษฐกิจใหม่ของไทย. ฝ่ายวิจัยธุรกิจ สายงานบริหารความเสี่ยงและบรรษัทภิบาล บมจ.ธนาคารกรุงไทย.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว. 2543. สถานภาพการเพาะเลี้ยงปลานิลในประเทศไทย. ว.แก่นเกษตร

28(4): 173-181.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์.2541.เกลือแร่ .หลักโภชนาการปัจจุบัน. พิมพ์ครั้งที่ 8. หน้า 64-83.

สำนักพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช กรุงเทพฯ.

สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2543. โครงการอบรมวิชาการเรื่อง โภชนาการทันยุค

สถาบันวิจัยโภชนาการ, นครปฐม.

Adler-Nissen, J. 1986 . Enzymic Hydrolysis of Food Proteins. London; Elsevier Applied Science.

Agustina, E. 1996. Calcium intake, attitudes toward calcium containing foods, and number of risk factors for osteoporosis in two groups of 18-35 year old women.

Nutr Res. 16 (8): 1313-1329.

Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N. and Aluko, R.E. 2011. Effect of Peptide Size on Antioxidant Properties of African Yam Bean Seed (*Sphenostylis stenocarpa*) Protein Hydrolysate Fractions. Int J Mol Sci. 12: 6685-6702.

Allen, L.H. 1982. Calcium bioavailability and absorption: a review. Am J Clin Nutr. 35: 783-808.

AOAC, 2000. Official method of analysis.15th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC.

Bao, X.L., Lv, Y., Yang, B.C., Ren, C.G.and Guo, S.T. 2008. A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. J Food Sci. 73: 117-121.

Behera, P., Kumar, R., Sandeep, I.V.R., Kapila, R., Dang, A.K.and Kapila, S. 2013. Casein hydrolysates enhance osteoblast proliferation and differentiation in mouse bone marrow culture. Food Biosci. 2: 24-30.

Bronner, F. 1987. Intestinal calcium absorption: Mechanisms and applications. J Nutr. 117: 1347-1351.

Bronner F. and Pansu D. 1999. Nutritional Aspects of Calcium Absorption. J Nutr. 129: 9-12.

- Centenaro, G.S., Mellado, M.S. and Hernández, P.C. 2011. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates of Fish and Chicken Bones. *Advance J Food Sci Technol.* 3(4): 280-288.
- Charoenphun, N., Cheirsilp, B., Sirinupong, N. and Youravong W. 2013. Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol.* 236: 57-63.
- Chaudhary, L.R., Hofmeister, A.M. and Hruska, K.A. 2004. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone.* 34:402-411.
- Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. 1998. Antioxidative Properties of Histidine-Containing Peptides Designed from Peptide Fragments Found in the Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem.* 46: 49-53.
- Chen, X., Garner, S.C., Quarles, L.D. and Anderson, J.J.B. 2003. Effects of genistein on expression of bone markers during MC3T3-E1 osteoblastic cell differentiation. *J Nutr Biochem.* 14: 342-349.
- Daengprok, W., Garnjanagoonchorn, W., Naivikul, O., Pornsinlpatip, P., Issigonis, K. and Mine, Y. 2003. Chicken eggshell matrix proteins enhance calcium transport in the human intestinal epithelial cells, Caco-2. *J Agric Food Chem.* 51: 6056-6061.
- Decker, E.A. and Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem.* 38: 674-677.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A.M. and Hayes M. 2011. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chem.* 124: 1296-1307.
- Donida, B.M., Mrak, E., Gravaghi, C., Villa, I., Cosentino, S., Zacchi, E., Perego, S., Rubinacci, A., Fiorilli, A., Tettamanti, G. and Ferraretto A. 2009. Casein phosphopeptides promote calcium uptake and modulate the differentiation pathway in human primary osteoblast-like cells. *Peptides.* 30: 2233-2241.

- Ecarot-Charrier, B., Shepard, N., Charette, G., Grynepas, M. and Glorieux, F. H. 1988. Mineralization in osteoblast cultures: A light and electron microscopic study. *Bone*.9: 147-154.
- Eijken, M. 2007. Human Osteoblast Differentiation and Bone Formation: Growth Factors, Hormones and Regulatory Networks. Haveka BV. Alblasterdam. The Netherlands.
- Epstein, E., Keichie, F.L., Zak, B. 1985. Alkaline phosphatase isoenzyme. *Clin Chem News*.11: 6-7.
- Eschleman, M.M. 1996. Introductory Nutrition and Nutrition Therapy. 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott Raven Publishers, Philadelphia.
- Faivishevskii, M.L., T.N. Lisina, S.I. Khvyiya and T.G. Kuznetsova. 1992. Utilization of bone protein fractions. *Myasnaya Promyshlennost*. 2: 14-15.
- Fan, J., He, J., Zhuang, Y. and Sun, L. 2012. Purification and Identification of Antioxidant Peptides from Enzymatic Hydrolysates of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Frame Protein. *Molecules*. 17: 12836-12850.
- Feldman, D. 1996. Vitamin D: Metabolism and Action. In : Marcus R. editor. Osteoporosis. New York: Academic Press. 205- 235.
- Felix, B. and Danielle, P. 1998. Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr*. 129: 9-12.
- Foh, M.B.K., Qixing, J., Amadou, I. and Xia, S.W. 2010. Influence of Ultrafiltration on Antioxidant Activity of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Hydrolysate. *Adv J Food Sci Technol*. 2(5): 227-235.
- Fu, Y. and Zhao, X.H. 2012. In vitro responses of hFOB1.19 cells towards chum salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. *J Funct Foods*. 5: 279-288.
- Girgih, A., Udenigwe, C. and Aluko, R. 2011. In Vitro Antioxidant Properties of Hemp Seed (*Cannabis sativa L.*) Protein Hydrolysate Fractions. *J Am Oil Chem Soc*. 88:381-389.

- Giron-Calle, J., Alaiz, M. and Vioque J. 2010. Effect of chickpea protein hydrolysates on cell proliferation and in vitro bioavailability. *Food Res Int.* 43:1365-1370.
- Gregory, C.A., Gunn, W.G., Peister, A. and Prockop, D.J. 2004. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: Comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem.* 329: 77-84.
- Gueguen, L. and Pointillart, A. 2000. The Bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr.* 19:119-136.
- Harris, H. 1989. The human alkaline phosphatase : what we know and what we don't know. *Clin Oral Impl Res.* 7: 38-47.
- Harris, P. 1990. *Food Gel: Gelatin.* Elsevier Applied Science, London. 476p.
- Hollinger, O.J., Einhorn, A.T., Doll, A.B., and Sfeir, C. 2004. *Bone tissue engineering.* CRC Press. United States of America.
- Huang, G., Ren, L. and Jiang, J. 2011. Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. *Eur Food Res Technol.* 232: 281-287.
- Hughes, F.J., Turner, W., Belibasakis, G. and Martuscelli G. 2006. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000.* 41: 48-72.
- Je, J.Y., Kim, S.Y. and Kim, S.K. 2005. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. *Eur Food Res Technol.* 221: 157-162.
- Jeon, Y.J., Byun, H.G. and Kim, S.K. 1999. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Proc Biochem.* 35: 471-478.
- Jung, W.K., Karawita, R., Heo, S.J., Lee, B.J., Kim, S.K. and Jeon Y.J. 2006. Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Proc Biochem.* 41: 2097-2100.

- Jung, W.K., Park, P.J., Byun, H.G., Moon, S.H. and Kim, S.K. 2005. Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. Food Chem. 91: 333-340.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem. 102: 1317-1327.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. Int Dairy J. 16: 945-960.
- Kumar, V., Sinha, A.K., Makkar, H.P.S. and Becker, K. 2009. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. Food Chem. 120: 945-959.
- Lee, H.S., Jung, E.Y., Bae, S.H., Kwon, K.H., Kim, J.M. and Suh, H.J. 2011. Stimulation of osteoblastic differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells by yeast hydrolysate. Phytother Res. 25: 716-723.
- Lee, Y.S., Noguchi, T. and Naito, H. 1980. Phosphopeptides and soluble calcium in the small intestine of rats given a casein diet. British J Nutr. 43: 457-467.
- Lian, J.B., Stein, G.S., Stein, J.L. and van Wijnen, A.J. 1998. Transcriptional control of osteoblast differentiation. Biochem Soc trans. 26: 15-21.
- Marieb, E.N. (1998). Human Anatomy & Physiology, 4<sup>th</sup> ed. Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Science Publishing.
- Matsui, T., Yano, H., Awano, T., Harumoto, T. and Saito, Y. 2007. The influences of casein phosphopeptides on metabolism of ectopic bone induced by decalcified bonematrix implantation in rats. J Nutr Sci Vitaminol. 40: 137-145.

- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G. and Kim S.K. 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sci.* 77: 2166-2178.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 124: 1354-1362.
- Orhan, I., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., ener B. Iqbal. and Choudhary, M. 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chem.* 103: 1247-1254.
- Ravallec-Plé, R., Gilmartin, L., Van Wormhoudt, A. and Le Gal Y. 2000. Influence of the hydrolysis process on the biological activities of protein hydrolysates from cod (*Gadus morhua*) muscle. *J Sci Food Agric.* 80: 2176-2180.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. and Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 26: 1231-1237.
- Ryu, B., Qian, Z.J. and Kim, S.K. 2011. Purification of a peptide from seahorse, that inhibits TPA-induced MMP, iNOS and COX-2 expression through MAPK and NF-B activation, and induces human osteoblastic and chondrocytic differentiation. *Chem Biol Interact.* 184: 413-422.
- Sadowska, M., Koodziejska, I. and Niecikowska, C. 2003. Isolation of collagen from the skins of Baltic cod (*Gadus morhua*). *Food Chem.* 81: 257-262.
- Stevenson, M.D., Brazier, J.E., Calvert, N.W., Lloyd-Jones, M., Oakley, J. and Kanis, J.A. 2005. Description of an individual patient methodology for calculating the cost effectiveness of treatments for osteoporosis in women. *J Oper Res Soc.*56: 214-221.
- Tang, X., He, Z., Dai, Y., Xiong, Y.L., Xie, M. and Chen, J. 2009. Peptide Fractionation and Free Radical Scavenging Activity of Zein Hydrolysate. *J Agric Food Chem.* 58: 587-593.

- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative Activity of Protein Hydrolysate From Round Scad Muscle using Alcalase and Flavourzyme. *J Food Biochem.* 31: 266-287.
- Toppe, J., Albrektsen, S., Hope, B. and Aksnes, A. 2007. Chemical composition, mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species. *Com Biochem Phys B.* 146: 395-401.
- Tulipano, G., Bulgari, O., Chessa, S., Nardone, A., Cocchi, D. and Caroli, A. 2010. Direct effects of casein phosphopeptides on growth and differentiation of in vitro cultured osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Regul Peptides.* 160: 168-174.
- Vignesh, R. and Srinivasan, M. 2012. Nutritional quality of processed head and bone flours of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*, Peters 1852) from Parangipettai estuary, South East Coast of India. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2: 368-372.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Amarowicz, R., Pegg, R.B. and Shand, P.J. 2002. Preparation and Characterization of Hydrolyzed Proteins from Defibrinated Bovine Plasma. *J Food Sci.* 67: 623-630.
- Ward, A.G. and Courts, A. 1977. The science and technology of gelatin. Academic Press, London. 564p.
- Wildemann, B., Burkhardt, N., Luebberstedt, M., Vordemvenne, T. and Schmidmaier, G. 2007. Proliferating and differentiating effects of three different growth factors on pluripotent mesenchymal cells and osteoblast like cells. *J Orthop Surg Res.* 2: 27-35.
- Yildirim, A., Mavi, A. and Kara, A.e.A. 2001. Determination of Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Rumex crispus L.* Extracts. *J Agric Food Chem.* 49: 4083-4089.



## ภาคผนวก

### วิธีการวิเคราะห์

#### การเตรียมตัวอย่าง

นำโครงปลานิลที่ได้ มาทำละลาย โดยให้น้ำไหลผ่านถุงที่บรรจุโครงปลา จากนั้น สับโครงปลาให้ได้ขนาดประมาณ 1 เซนติเมตร นำมาล้างทำความสะอาด วางให้สะเด็ดน้ำที่ อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที ก่อนนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า เพื่อนำส่วนของโปรตีน ไฮโดรไลสจากเนื้อปลาที่ติดกับโครงกระดูกปลาไปทดสอบต่อไป นำส่วนที่เป็นกระดูกปลามา ล้างน้ำทำความสะอาด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### 1. การวิเคราะห์หึ่งค์ประกอบทางเคมี

##### 1.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น โดยวิธี AOAC (2000)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
2. ภาชนะอลูมิเนียม (Moisture can) พร้อมฝาปิด
3. ตู้อบไฟฟ้าที่ควบคุมอุณหภูมิได้
4. โถดูดความชื้นที่มีสารดูดความชื้น

#### วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่างประมาณ  $2.0000 \pm 0.05$  กรัมที่เหมาะสมให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน
2. ใส่ในภาชนะอลูมิเนียมโดยเปิดฝาเล็กน้อย ซึ่งผ่านการอบ 30 นาทีและทราบน้ำหนัก ที่แน่นอน
3. อบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ  $102 \pm 3$  องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง
4. จากนั้นนำภาชนะออกจากตู้อบไฟฟ้า ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น
5. ชั่งน้ำหนัก นำไปอบซ้ำอีกครั้ง ครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งได้น้ำหนักที่คงที่
6. นำผลที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณความชื้นดังนี้

$$\text{วิธีคำนวณ} \quad \text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{100 \times (w_1 - w_2)}{w_1 - w}$$

เมื่อ	w	=	น้ำหนักของงานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด (กรัม)
	w <sub>1</sub>	=	น้ำหนักของงานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)
	w <sub>2</sub>	=	น้ำหนักของงานอลูมิเนียมพร้อมฝาปิด และตัวอย่างหลังอบ (กรัม)

## 1.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธีเจลดาคาร์ด (AOAC, 2000)

### อุปกรณ์

1. อุปกรณ์การย่อย
2. อุปกรณ์การกลั่น
3. อุปกรณ์การไตเตรท

### สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลาย NaOH 40%
3. สารละลายบอริก 4%
4. Catalyst (ตัวเร่งปฏิกิริยา) ประกอบด้วย K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% และ CuSO<sub>4</sub> 2%
5. สารละลายอินดิเคเตอร์ เมธิลเรด
6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N

### วิธีการ

#### เตรียมตัวอย่าง

1. ชั่งตัวอย่างมาประมาณ 0.5 – 1.0 กรัม อย่างละเอียดใส่ลงในหลอดย่อย
2. ใส่กระดาษลิตมัส ประมาณ 10 กรัม
3. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น ลงไปประมาณ 10 – 15 มิลลิลิตร

#### การย่อย

4. เปิดเครื่องย่อย แล้วตั้งหลอดย่อยในเครื่อง สวมเครื่องดักจับไอกรดลงบนส่วนบนของหลอดย่อย และเปิด Power ของเครื่องดักจับไอกรด โดยทำการย่อยในตู้ดูดควัน
5. กดปุ่ม Start ที่เครื่องย่อย เมื่ออุณหภูมิได้ 420 องศาเซลเซียสแล้ว เครื่องจะทำการย่อยต่อไปอีก 1 ชั่วโมง จนตัวอย่างเป็นสารละลายสีเขียวใส (หากเมื่อครบ 1 ชั่วโมงแล้วยังไม่เป็นสีเขียวใสให้ทำการย่อยต่อ)
6. ยกหลอดย่อยออกมาตั้งพักไว้ให้เย็น
7. ปิด Power เครื่องย่อย แต่ยังคงเปิดเครื่องดักจับไอกรดไว้เพื่อดักจับไอกรดที่ยังคงเหลืออยู่

### การกลั่น

8. เปิด Power เครื่องหล่อเย็น แล้วเปิดเครื่องกลั่นทำการล้างระบบด้วยการล้างน้ำกลั่น
9. ตวงกรดบอริก 4% 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร พร้อมหยดอินดิเคเตอร์ นำหลอดหยดยุ่ประกอบเข้ากับเครื่องกลั่น และวางไว้บริเวณ Platform ให้แห้งแก้วจุ่มอยู่ที่กรดบอริก
10. ปิด Safety door ลง เครื่องกลั่นจะทำการกลั่นเป็นเวลาประมาณ 4 นาที
11. เมื่อกลั่นเสร็จแล้ว เอาขวดรูปชมพู่ และหลอดหยดยุ่ออกจากเครื่อง
12. นำสารละลายในขวดรูปชมพู่ไปไทเทรตกับสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 N จนได้สารละลายเป็นสีชมพูอ่อน
13. คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ในไตรเจน} = \frac{14 \times (v_1 - v_2) \times \text{Normality of HCL (mol / L)} \times 100}{\text{Weight of Sample (g)} \times 1000}$$

เมื่อ  $v_1$  = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรตตัวอย่าง

$v_2$  = ปริมาตรของกรดไฮโดรคลอริกที่ไทเทรต blank

เปอร์เซ็นต์โปรตีน = เปอร์เซ็นต์ในไตรเจน  $\times$  conversion factor

เมื่อ Conversion factor = 6.25

### 1.3 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยวิธีของ AOAC (2000)

#### อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตู้อบลมร้อน
2. เครื่องสกัดไขมันแบบ soxhlet
3. ปีโตรเลียมอีเทอร์
4. ตัวอย่างอาหาร

#### วิธีการ

1. อบขวดกันกลมสำหรับหาปริมาณไขมัน ซึ่งมีขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร ในตู้อบไฟฟ้าที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำออกจากตู้อบไฟฟ้าใส่ไว้ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็นอุณหภูมิของภาชนะลดลงเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

2. ชั่งตัวอย่างอาหาร 5 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ลงในกระดาษแล้วห่อให้มิดชิดใส่ลงในหลอดสำหรับใส่ตัวอย่าง คลุมด้วยสำลีเพื่อให้สารละลายกระจายตัวสม่ำเสมอ
3. เติมปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในขวดสำหรับหาไขมัน 150 มล. แล้ววางบนเตา
4. ประกอบชุดสกัดไขมัน พร้อมเปิดน้ำหล่อเย็น อุปกรณ์ควบแน่น และเปิดสวิตช์ให้ความร้อน
5. สกัดไขมันนาน 14 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำหลอดตัวอย่างออกจากชอคเลต และกลับเก็บสารทำละลายจนเหลือสารละลายในขวดเล็กน้อย
6. อบขวดหาไขมันในตู้อบไฟฟ้าที่ 105 องศาเซลเซียส จนแห้งนำออกจากตู้ใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้ไขมันอุณหภูมิจนเย็นลงเท่าอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก
7. คำนวณหาปริมาณไขมัน

$$\% \text{ ไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างอาหาร}} \times 100$$

#### 1.4 การวิเคราะห์หาปริมาณเถ้า (Ash) โดยวิธี AOAC (2000)

##### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งชนิดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. เตาไฟฟ้า
3. เตาเผา (muffle furnace)
4. ถ้วยสำหรับเผาเถ้า (porcelain dish)
5. โถดูดความชื้น (dessicator)

##### วิธีการ

1. นำถ้วยเปล่าอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เอาออกใส่ในโถดูดความชื้นปล่อยให้เย็น แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน
2. ชั่งตัวอย่างใส่ลงในถ้วยที่ทราบน้ำหนักแน่นอน ประมาณ 2 กรัม นำไปเผาบนเตาไฟฟ้าจนหมดควัน
3. นำตัวอย่างที่เผาไล่ควันแล้วไปเผาต่อในเตาเผา (Muffer furnace) อุณหภูมิ 600 องศาเซลเซียส นาน 5-12 ชั่วโมง แล้วปิดสวิตช์เตาเผา เปิดฝาเตาออกรอจนอุณหภูมิจนเย็นในเตา ลดเหลือประมาณ 100 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันมิให้ถ้วยสัมผัสอากาศเย็นกะทันหัน ซึ่งอาจทำให้ถ้วยแตกได้

4. นำถ้วยออกมาใส่ในโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก

การคำนวณ

$$\% \text{ ฝ้า} = \frac{(W2 - W1) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

W1 คือ น้ำหนักถ้วย

W2 คือ น้ำหนักถ้วย + น้ำหนักตัวอย่างหลังการเผา

## 2. การวิเคราะห์ความสามารถต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity)

### 2.1 การตรวจสอบประสิทธิภาพการต้านออกซิเดชัน DPPH

อุปกรณ์

1. ไมโครปิเปตขนาด 10-200 และ 100-1000 ไมโครลิตร
2. Microplate ขนาด 96 หลุม
3. เครื่อง microplate reader

สารเคมี

1. Absolute methanol
2. DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl)
3. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic)

วิธีการ

การเตรียมสารละลายของ DPPH ในเมทานอล

เตรียม DPPH ให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยชั่งน้ำหนัก DPPH 0.0039 กรัม ละลายด้วยเมทานอล โดยกวนต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ชั่วโมงเพื่อให้ DPPH ละลายหมด

วิธีการทดสอบ

1. สารละลายตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐาน 100 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของ DPPH 100 ไมโครลิตร
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ในที่มืด
3. เตรียมแบลนด์โดยใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง

4. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้สารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครโมลาร์
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตรและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

## 2.2 การตรวจสอบกิจกรรมการต้านออกซิเดชัน ABTS

### สารเคมี

1. ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))
2. Potassium persulphate
3. Trolox
4. Absolute Methanol
5. Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic)

### วิธีการ

#### การเตรียมสารละลาย ABTS

1. เตรียม ABTS ให้มีความเข้มข้น 7.4 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง ABTS 0.0203 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 มิลลิลิตร
2. เตรียม potassium persulphate ให้มีความเข้มข้น 2.6 มิลลิโมลาร์ โดยชั่ง potassium persulphate 0.0035 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 5 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายในข้อ 1.1 และ 1.2 ผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง
4. ปิเปิดสารละลาย ABTS 1 มิลลิลิตร ลงในเมทานอลปริมาตร 25 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน
5. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร ปรับสารละลายจนกว่าจะได้ค่าการดูดกลืนแสงในช่วง  $1.1 \pm 0.02$

### วิธีการทดสอบ

1. สารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน 150 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายของ ABTS ที่เตรียมไว้ 2850 ไมโครลิตร
2. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในที่มืด
3. เตรียมแบลนด์โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่าง
4. เตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลาย Trolox ที่ความเข้มข้น 10-100 ไมโครโมลาร์
5. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

### 2.3 การตรวจสอบความสามารถรีดิวซ์ (reducing power activity)

#### สารเคมี

1. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์, พีเอช 6.6
2. สารละลาย potassium ferricyanide เข้มข้นร้อยละ 1
3. สารละลาย trichloroacetic acid เข้มข้นร้อยละ 10
4. สารละลาย  $FeCl_3$  เข้มข้นร้อยละ 0.1
5. สารมาตรฐาน Ascorbic acid

#### วิธีการ

1. ผสมตัวอย่าง โปรตีน ไฮโดรไลเสท ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสารละลาย potassium ferricyanide ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที
3. เติมสารละลาย trichloroacetic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
4. แบ่งส่วนผสมออกมา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร และสารละลาย  $FeCl_3$  200 ไมโครลิตร
5. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 700 นาโนเมตร และเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน

## 2.4 การตรวจสอบความสามารถในการจับโลหะ (Metal chelating activity)

### สารเคมี

1. สารละลาย  $\text{FeCl}_2$  เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์
2. สารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์
3. สารละลาย EDTA

### วิธีการ

1. ผสมตัวอย่าง โปรตีนไฮโดรไลเสท 1 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น 3.7 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย  $\text{FeCl}_2$  0.1 มิลลิลิตร และ สารละลาย ferrozine 0.2 มิลลิลิตร
3. วางทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
4. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 นาโนเมตรและเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐาน



### 3. การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis)

#### สารเคมี

1. สารมาตรฐาน L-serine
2. สารละลาย OPA (o-phthalaldehyde) ความเข้มข้น 6 มิลลิโมลาร์
3. สารละลาย DL-dithiothreitol ความเข้มข้น 5.7 มิลลิโมลาร์
4. สารละลาย Sodium tetraborate ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์
5. สารละลาย SDS (sodium dodecyl sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 2

#### วิธีการ

1. ดูดตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทมา 0.4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย OPA 3 มิลลิลิตร
2. วางทิ้งไว้ 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. นำตัวอย่างไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร
4. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณเป็นค่าระดับการย่อยสลาย

#### การคำนวณ

$$DH = [(L_t - L_0) / (L_{total} - L_0)] \times 100$$

เมื่อ  $L_t$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -amino ทั้งหมดในตัวอย่างที่ย่อยเป็นเวลา  $t$   
 $L_0$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -amino ทั้งหมดในตัวอย่างเริ่มต้น  
 $L_{total}$  คือ จำนวนหมู่  $\alpha$ -amino ทั้งหมดในตัวอย่างเริ่มต้นที่ผ่านการย่อยโดยสมบูรณ์แล้ว (ย่อยในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ความเข้มข้น 6 นอร์มอล ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อสกุล นางสาวสุภาวดี จอดนาค

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5311020040

วุฒิการศึกษา

วุฒิ

ชื่อสถาบัน

ปีที่สำเร็จการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต

มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

2551

(วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร)

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jodnak, S., Thongraung, C. and Punyayong, K. 2012. Antioxidative and calcium binding activities of tilapia bone protein hydrolysate. In Proceeding of The Fourth International Conference on Natural Products for Health and Beauty (NATPRO4). Chiang Mai, Thailand. 28-30 November 2012.