การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินของปลาส้มในระหว่างการหมัก

Changes in Antioxidant Activity and Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibition of *Plaa-som* During Fermentation

ชมภูนุช ฆ้องลา[1*] สุมาลี มุสิกา[1] อารยา รานอก[1] ชนิดา กุประดิษฐ์[1] และเสกสรร มังคลานันท์[1]
Chompoonuch Khongla[1*] Sumalee Musika[1] Araya Ranok[1] Chanida Kupradit[1] and Seksan Mangkalanan[1]

Received: May 25, 2019; Revised: November 11, 2019; Accepted: November 12, 2019

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟา-อะมิโน คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและการยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน (ACE) ของปลาส้มที่ได้จากการหมักปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 0 3 และ 4 วัน รวมทั้งศึกษาประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระของปลาส้มที่ผ่านการย่อยในทางเดินอาหารแบบจำลอง ซึ่งพบว่า ปลาส้มที่หมักนาน 3 และ 4 วัน มีปริมาณแอลฟา-อะมิโน คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกสูงกว่าปลาส้มวันที่ 0 ปลาส้มที่ได้จากปลาสร้อยขาวและปลาสร้อยเกล็ดถี่ที่ระยะเวลาการหมัก 3 และ 4 วัน มีปริมาณแอลฟา-อะมิโน และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยนกเขาและปลาสร้อยลูกกล้วย เมื่อเลือกปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวไปวิเคราะห์สมบัติการยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า ปลาส้มที่หมักเป็นระยะเวลา 3 วัน มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE มากสุด ดังนั้นเลือกปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวที่ระยะเวลาการหมัก 3 วัน ไปวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-อะมิโนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ หลังจากย่อยด้วยระบบทางเดินอาหารแบบจำลองพบว่า ปริมาณแอลฟา-อะมิโนเพิ่มขึ้น ส่วนคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง เมื่อเปรียบเทียบกับปลาส้มที่ไม่ผ่านการย่อย ผลจากการศึกษานี้บ่งชี้ได้ว่าปลาส้มที่ได้จากปลาสร้อยขาวที่หมักนาน 3 วัน เป็นแหล่งเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ดี

คำสำคัญ : ปลาส้ม; สมบัติต้านอนุมูลอิสระ; สมบัติยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน; การย่อยในทางเดินอาหารแบบจำลอง

[1] *คณะวิทยาศาสตร์และศิลปศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา*
[1] *Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan*
[*] *Corresponding Author E - mail Address: chompoonuch.2840@gmail.com*

Abstract

The objective of this research was to study the changes in α-amino acid content, antioxidant and angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activities of *Plaa-som* obtained from fermentation of various types of freshwater fish for 0, 3 and 4 days, including study the antioxidant activity of *Plaa-som* after the simulated gastrointestinal (GI) digestion. The results found that *Plaa-som* at 3 and 4 days of fermentation contained higher α-amino acid content, $ABTS^{\bullet+}$ cation radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power than that of day 0. *Plaa-som* obtained from *Henicorhynchus siamensis* and *Thynnicnthys thynnoides* at 3 and 4 days of fermentation had higher α-amino acid content and antioxidant activities than that *Osteochilus hasseltii* and *Labiobarbus siamensis*. *Plaa-som* obtained from *Henicorhynchus siamensis* was selected for determination of ACE-inhibitory activity. The results found that *Plaa-som* at 3 day of fermentation exhibited the highest ACE-inhibitory activity. Thus, *Plaa-som* obtained from *Henicorhynchus siamensis* at 3 day of fermentation was selected for determination of α-amino acid content and $ABTS^{\bullet+}$ cation radical scavenging activity after simulated gastrointestinal (GI) digestion. The results found that α-amino acid content increased, while antioxidant activity did not change after simulated gastrointestinal (GI) digestion when compared with undigested *Plaa-som*. The results of this study indicate that *Plaa-som* obtained from *Henicorhynchus siamensis* at 3 day of fermentation is a good source of natural antioxidant and ACE-inhibitory peptides.

Keywords: *Plaa-som*; Antioxidant Activity; Angiotensin I-Converting Enzyme-Inhibitory Activity; Simulated Gastrointestinal (GI) Digestion

บทนำ

ปลาส้มจัดเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการ เนื่องจากมีโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุสูง นิยมบริโภคในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและแพร่หลายไปสู่ภาคอื่น ๆ ปัจจุบันมีการผลิตปลาส้มกันอย่างแพร่หลายทั้งในระดับครัวเรือนและระดับอุตสาหกรรม อุตสาหกรรมการผลิตแปรรูปปลาน้ำจืดในรูปของปลาส้มในภาคอีสานมีปริมาณการผลิตประมาณ 1.35 ล้านกิโลกรัมต่อปี หรือเป็นมูลค่าประมาณ 100 ล้านบาทต่อปี ซึ่งนับว่าเป็นรายได้ที่สร้างเม็ดเงินให้กับผู้ประกอบการได้เป็นอย่างดี [1] ปลาส้ม คือ ผลิตภัณฑ์ปลาที่ผ่านกระบวนการหมักด้วยเกลือ คาร์โบไฮเดรต (ข้าวเจ้าสุกหรือข้าวเหนียวนึ่ง) และกระเทียม คลุกเคล้าให้เข้ากัน จากนั้นหมักที่อุณหภูมิห้อง (25 – 30 °C) นาน 3 – 5 วัน ในบรรจุภัณฑ์ปิดสนิท จนกระทั่งผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวพอเหมาะ ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำกว่า 4.5 ปลาส้มอาจทำมาจากปลาทั้งตัวหรือเฉพาะเนื้อปลาก็ได้ [2] – [3] ในระหว่างการหมักเอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์จะย่อยสลายโปรตีน และไขมัน ทำให้ได้เพปไทด์ กรดอะมิโน และกรดไขมัน ก่อให้เกิดกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์

ต่างไปจากเดิม [3] ปลาส้มนิยมทำจากปลาน้ำจืด เช่น ปลาตะเพียน ปลานวลจันทร์ ปลายี่สก ปลาเทโพ ปลาสร้อย ปลากราย และปลาจีน ส่วนปลาในวงศ์ปลาตะเพียน (*Cyprinidae*) เช่น ปลาสร้อยนกเขา (*Osteochilus hasseltii*) ปลาสร้อยเกล็ดถี่ (*Thynnicnthys thynnoides*) ปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) และปลาสร้อยลูกกล้วย (*Labiobarbus siamensis*) เป็นปลาที่หาได้ง่ายและเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของภาคอีสาน โดยนิยมนำมาแปรรูปเป็นปลาส้ม ปลาร้า และน้ำปลา ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ในตัวอย่างปลาส้มที่ทำจากปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ อาจเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์ปลาส้มอีกทางหนึ่งและเป็นการสร้างความเข้าใจใหม่และเปลี่ยนมุมมองแนวความคิดของผู้บริโภคที่เคยมองว่าอาหารหมักดองไม่ดีต่อสุขภาพว่าอาหารหมักดองก็สามารถเป็นอาหารที่มีหน้าที่ส่งผลดีต่อสุขภาพได้เช่นกัน นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลสำหรับผู้บริโภคในการเลือกบริโภคผลิตภัณฑ์จากปลาส้ม รวมทั้งอาจเป็นข้อมูลที่ใช้สร้างเอกลักษณ์ และจุดเด่นของผลิตภัณฑ์สำหรับผู้ผลิตปลาส้มอีกด้วย

เพปไทด์อิสระที่ปลดปล่อยออกมาจากโปรตีนของเนื้อปลาหรือของเนื้อสัตว์หรือของถั่วเหลืองนั้นเป็นเพปไทด์เชิงหน้าที่ซึ่งมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เรียกว่า เป็นเพปไทด์เชิงหน้าที่ (Functional Peptides) ซึ่งถูกจัดอยู่ในกลุ่ม "ไบโอแอคทีฟเพปไทด์" (Bioactive Peptide) เช่น เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Peptides) ยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial Peptide) และลดความดันโลหิตสูง (Antihypertensive Peptide) ซึ่งเป็นผลมาจากความสามารถของเพปไทด์ในการยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) ส่งผลให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดที่เป็นผลมาจากความดันโลหิตสูง [1] ซึ่งเป็นหนึ่งในปัญหาสุขภาพที่ใหญ่ที่สุดในโลก โดยโรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นสาเหตุการเสียชีวิตทั่วโลกสูงถึง 17.5 ล้านคนต่อปี [4] เอนไซม์ ACE ทำหน้าที่เปลี่ยนชื่อ Angiotensin I ให้เป็น Angiotension II ซึ่งสาร Angiotensin II มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัว ส่งผลให้ความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้น [5] นอกจากนี้เอนไซม์ ACE ยังมีผลในการลดปริมาณ Bradykinin ซึ่ง Bradykinin เป็นเพปไทด์ที่มีผลลดความดันโลหิต [6] ดังนั้นหากสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ก็อาจจะลดความดันโลหิตได้ [7] มีรายงานว่าเพปไทด์จากผลิตภัณฑ์หมักดอง เช่น หอยนางรม [8] และน้ำปลา [9] มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE

อนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของโรคต่าง ๆ มากมาย เช่น มะเร็ง [10] หัวใจ [11] และโรคอัลไซเมอร์ [12] เป็นต้น อนุมูลอิสระเกิดขึ้นโดยปฏิกิริยาในร่างกายและมาจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย เช่น การติดเชื้อ รังสี สารเคมี ยา ควันเสีย เขม่าจากเครื่องยนต์ ควันบุหรี่ อาหารย่าง และอาหารที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นต้น ปกติร่างกายของคนเรามีสารต้านอนุมูลอิสระทำหน้าที่ป้องกันเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะจากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ [13] แต่อย่างไรก็ตามเมื่อร่างกายได้รับอนุมูลอิสระมากเกินไปหรือระบบต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายเสื่อมลง ทำให้อนุมูลอิสระเป็นปัญหาต่อสุขภาพได้ มีรายงานว่าเพปไทด์ที่ได้จากหอยแมลงภู่หมักดอง [14] น้ำปลา [15] กะปิกุ้ง [16] Fish Past [17] และปลาร้า [18] - [19] มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ที่กล่าวมาข้างต้น ได้แก่ ระดับการย่อยสลายโปรตีน ปริมาณเพปไทด์ ชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเพปไทด์ ซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการหมักชนิดวัตถุดิบ และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอาจถูกย่อยในระหว่างที่ผ่านไปในระบบการย่อยในทางเดินอาหาร (Gastrointestinal (GI) Tract) ก่อนที่จะถูกดูดซึมในเยื่อบุผิวลำไส้ [20] เนื่องจากเอนไซม์ที่ทำหน้าที่

ย่อยอาหาร และสภาวะความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะอาหารอาจมีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเพปไทด์ [21] มีรายงานว่าเพปไทด์จากนมถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในระบบการย่อยในทางเดินอาหาร ได้แก่ เอนไซม์เพปซิน ทริปซิน และแพนครีเอติน มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นร้อยละ 11 - 35 เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ผ่านการย่อย [22] ดังนั้น งานวิจัยนี้มุ่งศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี (pH ความชื้น และปริมาณแอลฟา-อะมิโน) คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ และคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ในระหว่างกระบวนการหมัก และศึกษาปริมาณแอลฟา-อะมิโนและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของปลาส้มหลังผ่านการจำลองในระบบการย่อยในทางเดินอาหารด้วย

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี (pH ความชื้น และปริมาณแอลฟา-อะมิโน) และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดปลาส้มที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ ACE
3. เพื่อศึกษาผลการย่อยต่อปริมาณแอลฟา-อะมิโนและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของปลาส้มด้วยระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. **วัสดุ และอุปกรณ์**

ปลาน้ำจืดวงศ์ปลาตะเพียน (ปลาสร้อยนกเขา ปลาสร้อยเกล็ดถี่ ปลาสร้อยขาว และปลาสร้อยลูกกล้วย) จากตลาดซีพี อำเภอโชคชัย จังหวัดนครราชสีมา สาร 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) สาร Trolox จากบริษัท Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, ประเทศสหรัฐอเมริกา สาร 2, 2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) จากบริษัท Biochemika, Buchs, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

2. **กระบวนการหมักปลาส้ม**

ทำการหมักปลาส้มโดยใช้ปลา 4 ชนิด ได้แก่ ปลาสร้อยนกเขา (*Osteochilus hasseltii*) ปลาสร้อยเกล็ดถี่ (*Thynnicnthys thynnoides*) ปลาสร้อยขาว (*Henicorhynchus siamensis*) และปลาสร้อยลูกกล้วย (*Labiobarbus siamensis*) โดยนำปลามาขอดเกล็ด ควักไส้ ล้างด้วยน้ำให้สะอาด ประมาณ 4 ครั้ง จากนั้นนำปลาใส่ตะกร้าทิ้งไว้ให้สะเด็ดน้ำและนำปลาไปแช่ในน้ำเกลืออัตราส่วนปลาต่อเกลือต่อน้ำเปล่าเท่ากับ 4 : 1 : 4 ส่วน ประมาณ 2 - 3 ชั่วโมง จนกระทั่งเนื้อปลาแข็ง จากนั้นนำปลามาคลุกเคล้ากับข้าวเหนียวสุกและกระเทียมในอัตราส่วนปลาต่อข้าวสุกต่อกระเทียม 10 : 1 : 1 และบรรจุใส่ถุงพลาสติก ปิดถุงให้สนิท หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 3 และ 4 วัน การเตรียมตัวอย่างปลาส้มในถุงพลาสติกทำสภาวะละ 2 ซ้ำ และเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และความชื้น ส่วนการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-อะมิโน และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนั้นนำตัวอย่างปลาส้มในถุงพลาสติกแต่ละซ้ำทำการวิเคราะห์อีก 2 ซ้ำ

3. **ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)**

ชั่งตัวอย่างปลาส้มที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 0 3 และ 4 วัน ปริมาณ 3 กรัม และเติมน้ำกลั่น

ปราศจากไอออน 17 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 1 นาที และนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter ตามวิธีดัดแปลงจาก AOAC [23]

4. ความชื้น

เก็บตัวอย่างปลาส้มที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 0 3 และ 4 วัน มาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธี AOAC [23]

5. แอลฟา-อะมิโนและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

ชั่งตัวอย่างปลาส้มที่ผ่านการหมักเป็นระยะเวลา 0 3 และ 4 วัน ปริมาณ 3 กรัม และเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออน 17 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 1 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตัวอย่างส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณ α-Amino Acid โดยใช้วิธี Trinitrobenzene Sulfonic acid (TNBS) [24] นำตัวอย่างส่วนใสมาวิเคราะห์คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และคุณสมบัติในรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกตามวิธีของ Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., and Yongsawadigul, J. [25] คุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระแสดงในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของโทรลอกซ์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง (mg Trolox eq./g dry basis)

6. คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE

เลือกปลาส้มที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูงมาวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ตามวิธีของ Cushman, D. W. and Cheung, H. S. [26] โดยการเติมสารละลายส่วนใสของปลาส้มปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ ACE ความเข้มข้น 25 mU ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้นปริมาตร 150 ไมโครลิตร (ส่วนประกอบของสารตั้งต้น คือ Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) ความเข้มข้น 8.3 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายบอเรทบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.3) และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 250 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดกรด Hippuric โดยเติมสารละลายเอทิลอะซิเตต (Ethyl Acetate) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 800 ×g เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายชั้นบนซึ่งมีกรด Hippuric ละลายอยู่ใส่ในหลอดทดลองและนำไประเหยโดยใช้กระบะทราย ควบคุมความร้อนของทรายที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายกรด Hippuric และกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรด Hippuric ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ Photodiode Array Detector (DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) ฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C_{18} Column (4.6×150 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) จากนั้นชะโดยใช้สารละลาย Mobile phase (A) ซึ่งประกอบไปด้วย 0.05 % TFA ในน้ำ และ (B) 0.05 % TFA ในอะซิโตไนไตรล์ด้วยอัตรา 0.5 มิลลิลิตร/นาที ช่วงของการแยกทำโดยการเพิ่มสัดส่วนของ Mobile phase (B) ที่ 20 - 60 % ที่ช่วงเวลา 13 นาทีแรก จากนั้นคงความเข้มข้นของ Mobile phase (B) ที่ 60 % เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของ Mobile phase (B) เป็น 20 % เป็นเวลา 2 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร และคำนวณความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE แสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (% Inhibition)

7. **การจำลองการย่อยปลาส้มในระบบทางเดินอาหาร (*In Vitro* Simulated Gastrointestinal (GI) Digestion of *Plaa-som*)**

เลือกตัวอย่างปลาส้มที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงมาศึกษาการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ตามวิธีดัดแปลงของ Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E.A., and Yongsawatdigul, J. [27] โดยชั่งตัวอย่างปลาส้ม 3 กรัม จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 17 มิลลิลิตร นำไปปั่นผสมด้วยเครื่องโฮโมจิไนส์ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 1 นาที ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2.0 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 6 นอร์มอล จากนั้นเติมเอนไซม์เพปซินในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อปลาส้ม 1 : 100 เก็บตัวอย่างเริ่มต้น 1 มิลลิลิตร สำหรับวิเคราะห์เพปไทด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ($ABTS^{\bullet+}$) จากนั้นย่อยตัวอย่างเป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แบ่งเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เพื่อวิเคราะห์เพปไทด์และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ สำหรับตัวอย่างที่เหลือปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7.4 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 6 นอร์มอล จากนั้นเติมเอนไซม์แพนครีเอตินในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อตัวอย่าง 2 : 100 ย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยที่ระยะเวลาเริ่มต้น ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน และเอนไซม์แพนครีเอตินไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณเพปไทด์และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระบวก $ABTS^{\bullet+}$ ตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 5

8. **สถิติที่ใช้ในงานวิจัย**

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยใช้โปรแกรม PASW Statistics 18 Release 18.0.0 Software

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. **ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)**

ปลาส้มที่หมักตอนเริ่มต้น (0 วัน) มีค่า pH อยู่ในช่วง 6.34±0.01 - 6.52±0.02 เมื่อระยะเวลาการหมักปลาส้มเพิ่มขึ้นเป็น 3 และ 4 วัน ส่งผลให้ค่า pH ลดลงอยู่ในช่วง 4.35±0.08 - 4.81±0.04 โดยปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวมีค่า pH ต่ำสุดมีค่าเท่ากับ 4.35±0.08 ในวันที่ 4 ของการหมัก (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาน้ำจืดสกุลปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)			
	ปลาสร้อยเกล็ดถี่	ปลาสร้อยลูกกล้วย	ปลาสร้อยนกเขา	ปลาสร้อยขาว
0	6.47±0.07	6.52±0.02	6.37±0.14	6.34±0.01
3	5.12±0.06	4.83±0.04	4.91±0.05	4.86±0.11
4	4.81±0.04	4.49±0.10	4.57±0.04	4.35±0.08

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 2)

การที่ pH ลดลงเนื่องจากกิจกรรมการหมักจากจุลินทรีย์กลุ่มแลคติก (Lactic Acid Bacteria) ที่มีสมบัติเฉพาะตัวในการเปลี่ยนรูปกลูโคสที่ได้มาจากการย่อยของส่วนผสมที่มีองค์ประกอบที่เป็นสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก หรือกรดซิตริก [3] ค่า pH ที่วิเคราะห์ได้จากงานวิจัยนี้ที่ระยะเวลาการหมัก 4 วัน สอดคล้องกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน [28] โดยระบุว่าผลิตภัณฑ์ปลาส้มจะต้องมีค่า pH ไม่เกิน 4.6 เมื่อถึงกำหนดวันที่เริ่มบริโภค ยกเว้นปลาส้มจากปลาสร้อยเกล็ดถี่ที่ค่า pH สูงกว่าค่ามาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนเล็กน้อย (4.81±0.04) ในวันที่ 4 ของการหมัก กรดเหล่านี้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรค และทำให้ปลาส้มมีรสเปรี้ยว Chaikham, P. and Kaewjinda, R. [3] รายงานว่าปลาส้มที่หมักจากปลาตะเพียนที่ระยะเวลาการหมัก 3 วัน มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.03 - 4.49 ในขณะที่ Onsa-ard, E., Promchote, P. T., and Maweang, M. [29] รายงานว่าปลาส้มที่หมักจากปลาตะเพียนและปลาสวายมีค่า pH อยู่ในช่วง 5.79 - 6.32 การที่ค่า pH ของปลาส้มมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ ชนิด และขนาดของปลา ปริมาณจุลินทรีย์ที่ติดมากับตัวปลา เกลือ ข้าวนึ่ง และระยะเวลาในการหมัก

2. ความชื้น

ปริมาณความชื้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ถ้าความชื้นสูงส่งผลให้อายุการเก็บรักษาสั้นลง จากผลการทดลองหาความชื้นในตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาน้ำจืดสกุลปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน พบว่า ปลาส้มที่ระยะเวลาการหมักเริ่มต้น (0 วัน) มีค่าความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 68.69±1.51 - 73.17±1.89 เมื่อหมักปลาส้มนาน 3 วัน ค่าความชื้นในปลาส้มที่ทำจากปลาสร้อยทุกชนิดเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย ยกเว้นตัวอย่างปลาสร้อยลูกกล้วยที่มีค่าความชื้นลดลงเหลือร้อยละ 69.95±1.34 หลังจากหมักนาน 4 วัน ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยทุกชนิดมีค่าความชื้นลดลงอยู่ในช่วงร้อยละ 66.70±1.02 - 70.85±0.32 โดยปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยนกเขามีค่าความชื้นลดลงมากสุด (ตารางที่ 2) การที่ความชื้นในปลาส้มลดลงเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นเนื่องจากเกลือไปดึงน้ำออกจากตัวปลา นอกจากนี้ยังเป็นผลจากค่า pH ลดลงใกล้เคียงกับจุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric Point) ของโปรตีนปลา ส่งผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของปลาส้มลดลง [30] - [31] ซึ่งค่าความชื้นของปลาส้มจากงานวิจัยนี้ใกล้เคียงกับปลาส้มฟัก Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemeakers, M., Ghistelinck, M., and Geenen, I. [32] รายงานว่าปริมาณความชื้นในปลาส้มฟัก

ทางการค้ามีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 69.66 - 77.08 ในขณะที่ Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K., and Kongbangkerd, T. รายงานว่าปลาส้มที่หมักเป็นเวลา 168 ชั่วโมง มีค่าความชื้นอยู่ในช่วงร้อยละ 60.76±0.20 - 60.80±0.20 [31]

ตารางที่ 2 ปริมาณความชื้นของตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาน้ำจืดสกุลปลาสร้อยชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

ระยะเวลาในการหมัก (วัน)	ความชื้น (%wet basis)			
	ปลาสร้อยเกล็ดถี่	ปลาสร้อยลูกกล้วย	ปลาสร้อยนกเขา	ปลาสร้อยขาว
0	73.17±1.89	74.86±1.22	68.69±1.51	70.44±1.86
3	72.73±0.10	69.95±1.34	70.23±0.39	70.29±1.77
4	70.85±0.32	69.17±0.52	66.70±1.02	67.88±1.69

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 2)

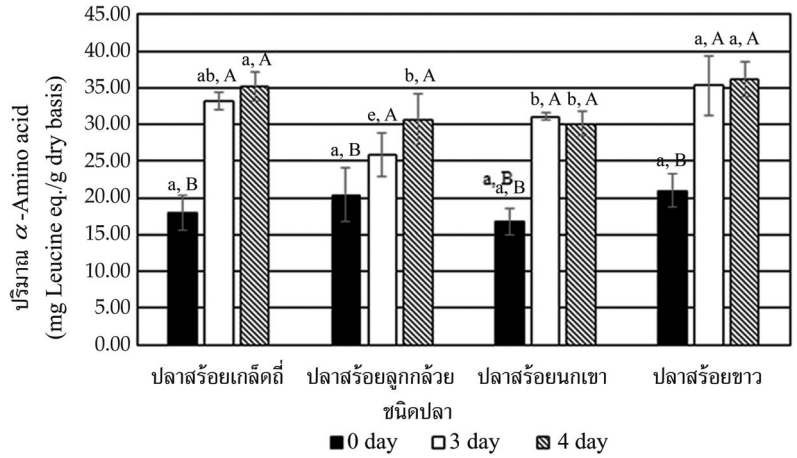
3. **แอลฟา-อะมิโน (*α*-Amino acid) และคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ**

จากการวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-อะมิโนที่ละลายในน้ำของตัวอย่างปลาส้ม โดยวิธี TNBS พบว่า ปริมาณแอลฟา-อะมิโนของตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด ที่ระยะเวลาการหมักวันที่ 3 และ 4 สูงกว่าวันเริ่มต้น (วันที่ 0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 1) แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณแอลฟา-อะมิโนไม่แตกต่างกันระหว่างวันที่ 3 และ 4 ($p > 0.05$) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 25.84 - 35.29 และ 30.12 - 36.11 มิลลิกรัมสมมูลของลิวซีนต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ การที่ปริมาณแอลฟา-อะมิโนเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของปริมาณเพปไทด์และกรดอะมิโน ซึ่งเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีนจากเอนไซม์โปรติเนสในตัวปลา และจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่พบในเนื้อปลา [19]

นอกจากนี้ การที่ปริมาณแอลฟา-อะมิโนที่ระยะเวลาการหมักที่ 3 และ 4 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าปริมาณเพปไทด์ในตัวอย่างปลาส้มที่หมักเป็นเวลา 3 และ 4 วัน มีค่าไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากกรดอะมิโนเปลี่ยนเป็นเอมีน กรดที่ระเหยได้ และสารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ หรือการย่อยสลายของเอนไซม์ [17]

เมื่อพิจารณาชนิดของปลาน้ำจืดที่ใช้หมักพบว่า ที่วันแรกของการหมัก ค่าแอลฟา-อะมิโนไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$, รูปที่ 1) เมื่อหมักปลาส้มนาน 3 และ 4 วัน พบว่าปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาว และปลาสร้อยเกล็ดถี่มีค่าแอลฟา-อะมิโนสูงสุด ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 1) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 35.29±4.08 33.23±1.16 และ 36.11±2.35 35.12±2.03 มิลลิกรัมสมมูลของลิวซีนต่อกรัมน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ รองลงมาคือปลาสร้อยนกเขา และปลาสร้อยลูกกล้วย การที่ปริมาณแอลฟา-อะมิโนแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากชนิดปลาที่แตกต่างกัน และปริมาณโปรติเนสที่มีอยู่ในตัวปลา และโปรติเนสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ติดมากับตัวปลามีปริมาณแตกต่างกัน [32] Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijrongrojana, K., and Tanaka, M. รายงานว่าในช่วงเริ่มต้นการย่อยกล้ามเนื้อปลาเป็นผลมาจากเอนไซม์คาเทปซินที่อยู่ในตัวปลา และตามด้วยกิจกรรมของเอนไซม์เพปทิเดสที่สร้างจาก

จุลินทรีย์จะย่อยชิ้นส่วนของโปรตีนเป็นเพปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโน การย่อยสลายโปรตีนมากส่งผลในการพัฒนากลิ่นรสและกลิ่นในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก การย่อยสลายโปรตีนในปลาส้มฟักขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สูตรที่ใช้ในการหมัก จุลินทรีย์ที่อยู่ภายในตัวปลา และสภาวะในการหมัก [33]

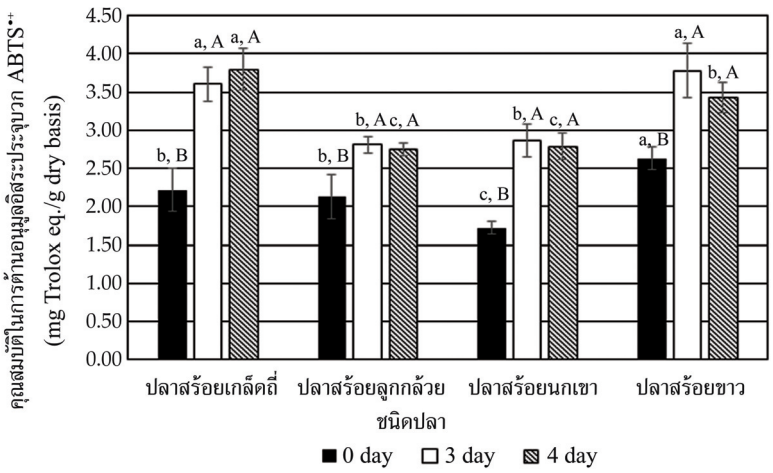


รูปที่ 1 ปริมาณ α-Amino acid ในตัวอย่างปลาส้มจากปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

หมายเหตุ * ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างปลาแต่ละชนิดที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน

** ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างระยะเวลาการหมักต่างกัน ของปลาชนิดเดียวกัน; ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 4)

คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ เป็นการวัดสมบัติต้านอนุมูลอิสระทางอ้อม โดยการออกซิไดซ์สาร ABTS ด้วยโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟตให้กลายเป็นอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ที่มีสีฟ้าเขียว และสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร หากเพปไทด์มีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอน/โปรตอน กับอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ค่าดูดกลืนแสงจะลดลง [19] จากผลการทดลองพบว่า คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ของตัวอย่างปลาส้มที่ทำจากปลาน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด ที่ระยะเวลาการหมักวันที่ 3 และ 4 สูงกว่าวันเริ่มต้น (วันที่ 0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 2) แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ไม่แตกต่างกันระหว่างวันที่ 3 และ 4 ($p > 0.05$, รูปที่ 2) ซึ่งคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับปริมาณแอลฟา-อะมิโนที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1) เมื่อปริมาณแอลฟา-อะมิโนเพิ่มขึ้นบ่งชี้ได้ว่าเกิดการย่อยสลายโปรตีนในตัวปลาเพิ่มขึ้นได้เพปไทด์หรือกรดอะมิโนเพิ่มขึ้นส่งผลให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ เพิ่มขึ้นด้วย



รูปที่ 2 คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS•+ ของตัวอย่างปลาส้มจากปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

หมายเหตุ * ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างปลาแต่ละชนิดที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน

** ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างระยะเวลาการหมักต่างกันของปลาชนิดเดียวกัน; ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 4)

เมื่อพิจารณาชนิดของปลาน้ำจืดที่ใช้หมักพบว่า ที่ระยะเวลาการหมักปลาส้มที่ 3 และ 4 วัน ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาว และปลาสร้อยเกล็ดถี่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS•+ สูงที่สุด ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 2) มีค่าเท่ากับ 3.78±0.36 3.60±0.22 และ 3.44±0.20 3.80±0.27 มิลลิกรัมสมมูลของโทลอกร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ตามลำดับ

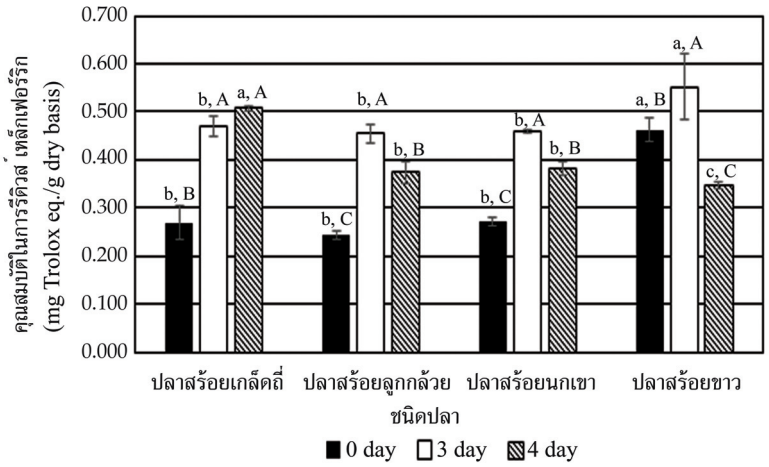
งานวิจัยนี้บ่งชี้ได้ว่าคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS•+ ของตัวอย่างปลาส้มขึ้นกับปริมาณโปรตีนที่ถูกย่อยสลายในปลาแต่ละชนิดและระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ซึ่งการที่คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS•+ แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมาจากตัวปลาและเอนไซม์ที่มีอยู่ภายในตัวปลามีความแตกต่างกันทำให้อัตราการย่อยสลายโปรตีนของปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันส่งผลให้ได้ขนาดเพปไทด์ และจำนวนกรดอะมิโนและชนิดกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายเพปไทด์แตกต่างกัน ส่งผลให้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก ABTS•+ แตกต่างกันด้วย

เพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2 – 20 ตัว จะแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ลดความดันเลือด ต้านจุลินทรีย์ และต้านมะเร็ง เป็นต้น [34] – [35] ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโน ชนิดกรดอะมิโนและความยาวของสายเพปไทด์ [36]

คุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกเป็นการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนของเพปไทด์/กรดอะมิโนกับเหล็กเฟอร์ริก [19] จากการทดลองพบว่า คุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกของตัวอย่างปลาส้มที่ทำจากปลาน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด ที่ระยะเวลาการหมักวันที่ 3 และ 4 สูงกว่าวันเริ่มต้น (วันที่ 0) อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 3) ยกเว้นปลาสร้อยขาวที่หมักเป็นระยะเวลา 4 วัน เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักปลาส้มระหว่างวันที่ 3 และ 4 พบว่า คุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกลดลง โดยปกติแล้วคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระดับการย่อยสลายโปรตีน กล่าวคือถ้าระดับการย่อยสลายของโปรตีนสูงบ่งชี้ถึงพันธะเพปไทด์ในสายโปรตีนถูกตัดจำนวนมาก ทำให้ได้เพปไทด์และกรดอะมิโนจำนวนมากส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น [37] แต่อย่างไรก็ตามจากรูปที่ 1 ปริมาณแอลฟา-อะมิโนของปลาส้มทั้ง 4 ชนิด ที่หมักไว้เป็นระยะเวลา 3 และ 4 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยทั่วไปแล้วเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างวงอะโรมาติกเป็นองค์ประกอบ เช่น ไทโรซีน (Tyr) ฮิสทิดีน (His) ทริปโตแฟน (Trp) และฟีนิลอะลานีน (Phe) จะมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนและ/หรือโปรตอนกับอนุมูลอิสระได้ง่าย [38] - [39] กรดอะมิโนซีสเตอีน (Cys) ซึ่งประกอบด้วยหมู่ “ซัลไฮดริล” มีความสามารถในการให้โปรตอนกับอนุมูลอิสระได้ง่ายเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลำดับของกรดอะมิโนที่อยู่ภายในสายเพปไทด์มีผลต่อคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ หากกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีนหรือฮิสทิดีนอยู่ในตำแหน่งปลายสายด้าน N-terminus เพปไทด์จะมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระสูง [40] - [41] หรือหากกรดอะมิโนทริปโตแฟนหรือไทโรซีนอยู่ที่ปลายสายของเพปไทด์ด้าน N-terminus หรือ C-terminus เพปไทด์ก็จะมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงเช่นเดียวกัน [42] นอกจากนี้พันธะเพปไทด์หรือโครงสร้างของเพปไทด์มีผลในการเสริมฤทธิ์และลดฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนอิสระ [43] ดังนั้นจากผลการทดลองนี้การที่คุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกของตัวอย่างปลาส้มจากปลาสร้อยลูกกล้วย ปลาสร้อยขาว และปลาสร้อยนกเขาที่หมักไว้เป็นระยะเวลา 4 วัน มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 3 อาจเนื่องมาจากตัวอย่างปลาส้มดังกล่าวประกอบด้วยเพปไทด์ที่มีชนิดและลำดับกรดอะมิโนแตกต่างกัน งานวิจัยนี้บ่งชี้ได้ว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระนอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณเพปไทด์แล้วยังขึ้นกับชนิดและลำดับกรดอะมิโนในสายเพปไทด์ด้วย

เมื่อพิจารณาชนิดของปลาน้ำจืดที่ใช้หมักพบว่า ที่ระยะเวลาการหมักปลาส้มที่ 3 วัน ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวมีคุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกสูงที่สุด ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 3) มีค่าเท่ากับ 0.551±0.069 มิลลิกรัมสมมูลของโทลอกร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง ในขณะที่วันหมักที่ 4 วัน ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยเกล็ดถี่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกสูงที่สุดมีค่าเท่ากับ 0.507±0.006 มิลลิกรัมสมมูลของโทลอกร์ต่อกรัมน้ำหนักแห้งตัวอย่าง



รูปที่ 3 ความสามารถในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกของตัวอย่างปลาส้มจากปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ ที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

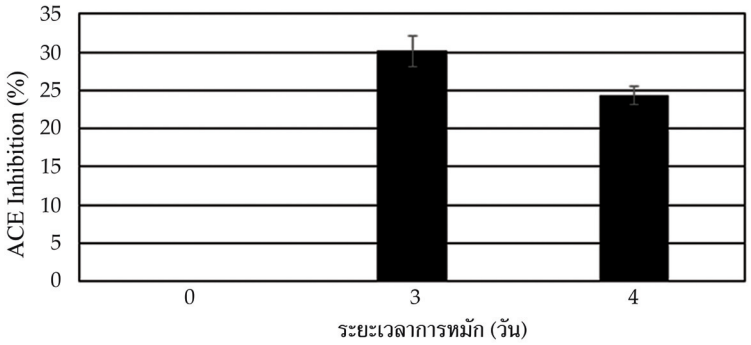
หมายเหตุ * ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกัน หมายถึงค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างปลาแต่ละชนิดที่ระยะเวลาการหมักเดียวกัน;

** ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกัน หมายถึง ค่าที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$) ระหว่างระยะเวลาการหมักต่างกัน ของปลาชนิดเดียวกัน; ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 4)

4. คุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE

จากการทดลองวิเคราะห์สมบัติการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ในตัวอย่างปลาส้มจากปลาสร้อยขาวที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน พบว่า ที่วันเริ่มต้นของการหมัก (0 วัน) ไม่มีการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE เนื่องจากที่วันแรกของการหมักโปรตีนยังไม่ถูกย่อยสลายทำให้มีโครงสร้างขนาดใหญ่ ส่งผลให้ไม่สามารถจับกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ ACE ได้ (รูปที่ 4)

ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับ Jemil, I., Mora, L., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M. C., Hajji, M., Nasri, M., and Toldrá, F. [44] ซึ่งรายงานว่าโปรตีนจากปลาซาร์ดีนที่ไม่ได้ผ่านการย่อยไม่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE เมื่อหมักปลาส้มนาน 3 และ 4 วัน การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ 0 วัน ซึ่งมีค่าเท่ากับร้อยละ 30.13±1.97 และ 24.36±1.19 ตามลำดับ ผลการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่า เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE ซึ่งอยู่ภายในสายโปรตีนถูกปลดปล่อยออกมาโดยเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนในตัวปลาและจากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Jemil, I., Mora, L., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M. C., Hajji, M., Nasri, M., and Toldrá, F. [44] ซึ่งรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ได้จากการหมักปลาซาร์ดีนด้วยเชื้อ B. *subtilis* A26 (CTM50700) และ B. *amyloliquefaciens* An6 เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE ร้อยละ 45 - 50 Nasri, R., Jridi, M., Lassoued, I., Jemil, I., and Ben Slama-Ben Salem, R. รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีระดับการย่อยสลายของสูงมีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงด้วย [45]



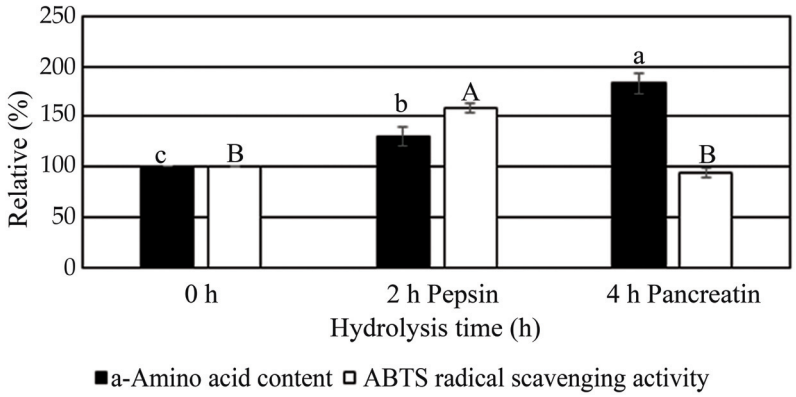
รูปที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของตัวอย่างปลาส้มจากปลาสร้อยขาวที่ระยะเวลาการหมัก 0 3 และ 4 วัน

หมายเหตุ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (n = 2)

5. **การจำลองการย่อยปลาส้มในระบบทางเดินอาหาร (*In Vitro* Simulated Gastrointestinal (GI) Digestion of *Plaa-som*)**

ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวเป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณแอลฟา-อะมิโน คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และคุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกสูง ดังนั้น จึงเลือกปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวเป็นเวลา 3 วัน มาทดสอบการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-อะมิโนและคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ พบว่า ปริมาณแอลฟา-อะมิโนเพิ่มขึ้นเมื่อย่อยปลาส้มด้วยเอนไซม์เพปซินและแพนครีเอตินร้อยละ 30 และ 83 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างปลาส้มที่ไม่ผ่านการย่อย (0 ชั่วโมง) ($p \leqslant 0.05$, รูปที่ 5) การที่ปริมาณแอลฟา-อะมิโนเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นถึงการย่อยสลายโปรตีนได้เพปไทด์ และกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อย่อยปลาส้มด้วยเอนไซม์เพปซิน (ร้อยละ 58) และลดลงเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน (ร้อยละ 5) แต่อย่างไรก็ตามคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปลาส้มที่ไม่ได้ผ่านการย่อย (0 ชั่วโมง, $p > 0.05$) การที่คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ของปลาส้มที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แพนครีเอตินมีค่าลดลงอาจเนื่องมาจากเอนไซม์แพนครีเอตินย่อยสลายเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ส่งผลให้ลำดับกรดอะมิโนในสายเพปไทด์เปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 5 ปริมาณ α-Amino acid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ของปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวนาน 3 วัน หลังจากผ่านการจำลองการย่อยในระบบทางเดินอาหาร

หมายเหตุ * อักษรพิมพ์เล็กที่แตกต่างกันระหว่างบาร์แสดงถึงความแตกต่างกันของปริมาณ α-Amino Acid อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$)

** อักษรพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันระหว่างบาร์แสดงถึงความแตกต่างกันของปริมาณฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leqslant 0.05$); ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 4 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n = 4$)

สรุป

ค่า pH และความชื้นของตัวอย่างปลาส้มที่หมักจากปลาน้ำจืดทั้ง 4 ชนิด เป็นเวลา 3 และ 4 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 4.35±0.08 - 5.12±0.06 และร้อยละ 66.70±1.02 - 72.73±0.01 ตามลำดับ ปลาส้มที่หมักจากปลาสร้อยขาวเป็นเวลา 3 วัน มีปริมาณแอลฟา-อะมิโน คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ และคุณสมบัติในการรีดิวส์เหล็กเฟอร์ริกสูง รวมทั้งมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE นอกจากนี้คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระประจุบวก $ABTS^{\bullet+}$ ของตัวอย่างปลาส้มหลังผ่านย่อยในระบบทางเดินอาหารด้วยเอนไซม์เพปซินตามด้วยเอนไซม์แพนครีเอตินมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบปลาส้มที่ไม่ได้ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ดังนั้น ควรบริโภคปลาส้มที่ทำจากปลาสร้อยขาวที่ระยะเวลาในการหมัก 3 วัน เพื่อให้ได้เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระสูง และคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ทั้งนี้งานวิจัยในอนาคตควรศึกษาคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระและสมบัติในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของตัวอย่างปลาส้มที่ผ่านการให้ความร้อนด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เอื้ออำนวยอุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน นครราชสีมา ที่สนับสนุนสถานที่ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย

References

[1] Pongrut, S. (2017). **Strategic Management of Plaa Som Products in Yala**. An Independent Study Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master of Business Administration. Faculty of Management Science, School Yala Rajabhat University

[2] Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratanakorkit, M., and Sikkhamondhol, C. (2010). Use of a Starter Culture of Lactic Acid Bacteria in *Plaa-Som*, a Thai Fermented Fish. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 110, Issue 5, pp. 553-557. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2010.06.004

[3] Chaikham, P. and Kaewjinda, R. (2017). Quality Changes of *Plaa-Som* during Fermentation Along with Difference Levels of Probiotic *Lactobacillus casei* 01. **VRU Research and Development Journal Science and Technology**. Vol. 12, No. 3, pp. 37-53 (in Thai)

[4] WHO (2018). **Noncommunicable Diseases**. Access (11 June 2018). Available (http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/noncommunicable-diseases)

[5] Mentz, R. J., Bakris, G. L., Waeber, B., McMurray, J. J. V., Gheorghiade, M., Ruilope, L. M., and Pitt, B. (2013). The Past, Present and Future of Renin-Angiotensin Aldosterone System Inhibition. **International Journal of Cardiology**. Vol. 167, Issue 5, pp. 1677-1687. DOI: 10.1016/j.ijcard.2012.10.007

[6] Villadóniga, C. and Cantera, A. M. B. (2019). New ACE-Inhibitory Peptides Derived from α-Lactalbumin Produced by Hydrolysis with *Bromelia antiacantha* Peptidases. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. Vol. 20, DOI: 10.1016/j.bcab.2019.101258

[7] FitzGerald, R. J., Murray, B. A., and Walsh, D. J. (2004). Hypotensive Peptides from Milk Proteins. **The Journal of Nutrition**. Vol. 134, Issue 4, pp. 980-988. DOI: 10.1093/jn/134.4.980S

[8] Je, J. Y., Park, J. Y., Jung, W. K., Park, P. J., and Kim, S. K. (2005). Isolation of Angiotensin I Converting Enzyme (ACE) Inhibitor from Fermented Oyster Sauce, *Crassostrea gigas*. **Food Chemistry**. Vol. 90, Issue 4, pp. 809-814. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.05.028

[9] Ichimura, T., Hu, J., Aita, D. Q., and Maruyama, S. (2003). Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Activity and Insulin Secretion Stimulative Activity of Fermented Fish Sauce. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. Vol. 96, Issue 5, pp. 496-499. DOI: 10.1016/S1389-1723(03)70138-8

[10] Goodman, M., Bostick, R. M., Kucuk, O., and Jones, D. P. (2011). Clinical Trials of Antioxidants as Cancer Prevention Agents: Past, Present, and Future. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 51, Issue 5, pp. 1068-1084. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.018

[11] Sugamura, K. and Keaney, J. F. Jr. (2011). Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Disease. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 51, Issue 5, pp. 978-992. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.004

[12] Butterfield, D. A. and Lauderback, C. M. (2002). Lipid Peroxidation and Protein Oxidation in Alzheimer's Disease Brain: Potential Causes and Consequences Involving Amyloid β-peptide-Associated Free Radical Oxidative Stress. **Free Radical Biology and Medicine**. Vol. 32, Issue 11, pp. 1050-1060. DOI: 10.1016/S0891-5849(02)00794-3

[13] Samaranayaka, A. G. P. and Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-Derived Peptidic Antioxidants: A Review of Their Production, Assessment, and Potential Applications. **Journal of Functional Foods**. Vol. 3, Issue 4, pp. 229-254. DOI: 10.1016/j.jff.2011.05.006

[14] Jung, W. K., Rajapakse, N., and Kim, S. K. (2005). Antioxidative Activity of a Low Moecular Weight Peptide Derived from the Sauce of Fermented Blue Mussel, *Mytilus edulis*. **European Food Research and Technology**. Vol. 220, pp. 535-539. DOI: 10.1007/s00217-004-1074-3

[15] Harada, K., Okano, C., Kadoguchi, H., Okubo, Y., Ando, M., and Kitao, S. (2003). Peroxyl Radical Scavenging Capability of Fish Sauces Measured by the Chemiluminescence Method. **International Journal of Molecular Medicine**. Vol. 12, Issue 4, pp. 621-625. DOI: 10.3892/ijmm.12.4.621

[16] Peralta, E. M., Hatate, H., Kawabe, D., Kuwahara, R., Wakamatsu, S., Yuki, T., and Murata, H. (2008). Improving Antioxidant Activity and Nutritional Components of Philippine Salt-Fermented Shrimp Paste through Prolonged Fermentation. **Food Chemistry**. Vol. 111, Issue 1, pp. 72-77. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.03.042

[17] Anggo, A. D., Ma'ruf, W. F., Swastawati, F., and Rianingsih, L. (2015). Changes of Amino and Fatty Acids in Anchovy (*Stolephorus* sp). Fermented Fish Paste with Different Fermentation Periods. **Procedia Environmental Sciences**. Vol. 23, pp. 58-63. DOI: 10.1016/j.proenv.2015.01.009

[18] Sawatdichaikul, O., Madmanee, W., Tangkanakul, P., and Trakoontivakorn, G. (2014). *In vitro* Antioxidant Activity of Peptide Fragments from Fermented *Channa striata*. **The 4th International Biochemistry and Molecular Biology Conference**. April 2-3, Bangkok, Thailand

[19] Promchote, P. T. (2017). Chemical Compositions and Antioxidant Properties of *Pla-ra* Thai Indigenous Fermented Fish Product. **Journal of Science and Technology Ubon Ratchathani University**. Vol. 19, No. 2, pp. 159-172 (in Thai)

[20] Picariello, G., Ferranti, P., Fierro, O., Mamone, G., Caira, S., and Di Luccia, A. (2010). Peptides Surviving the Simulated Gastrointestinal Digestion of Milk Proteins: Biological and Toxicological Implications. **Journal of Chromatography B**. Vol. 878, Issue 3-4, pp. 295-308. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.11.033

[21] Ao, J. and Li, B. (2013). Stability and Antioxidative Activities of Casein Peptide Fractions During Simulated Gastrointestinal Digestion *In Vitro*: Charge Properties of Peptides Affect Digestive Stability. **Food Research International**. Vol. 52, Issue 1, pp. 334-341. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.03.036

[22] Singh, B. P. and Vij, S. (2018). *In vitro* Stability of Bioactive Peptides Derived from Fermented Soy Milk Against Heat Treatment, pH and Gastrointestinal Enzymes. **LWT**. Vol. 91, pp. 303-307. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.01.066

[23] AOAC (2000). **Official Methods of Analysis (17th ed.)**. Gaithersburg, MD, USA: Association of Official Chemists

[24] Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the Degree of Hydrolysis of Food Protein Hydrolyzates by Trinitrobenzenesulfonic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 27, Issue 6, pp. 1256-1262. DOI: 10.1021/jf60226a042

[25] Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., and Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Derived from Threadfin Bream Surimi Byproducts. **Food Chemistry**. Vol. 132, Issue 1, pp. 104-111. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.10.040

[26] Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric Assay and Properties of the Angiotensin-Converting Enzyme of Rabbit Lung. **Biochemical Pharmacology**. Vol. 20, Issue 7, pp. 1637-1648. DOI: 10.1016/0006-2952(71)90292-9

[27] Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E.A., and Yongsawatdigul, J. (2015). Chemical and Cellular Antioxidative Properties of Threadfin Bream (*Nemipterus* spp.). Surimi Byproduct Hydrolysates Fractionated by Ultrafiltration. **Food Chemistry**. Vol. 167, pp. 7-15. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.06.077

[28] Thai Community Product Standard (TCPS). (2014). **Standard for Fermented Fish, Pla-Som no. 26/2014**. Thai Industrial Standards Institute. Ministry of Industry, Bangkok

[29] Onsa-ard, E., Promchote, P. T., and Maweang, M. (2011). **A Study of Cultural Local Fermented Food Production in Ubon Ratchathani**. Final Report Project of Culture and Arts Preservation and Maintainace. p. 65 (in Thai)

[30] Huff-Lonergan, E. and Lonergan, S. M. (2005). Mechanisms of Water-Holding Capacity of Meat: the Role of Postmortem Biochemical and Structural Changes. **Meat Science**. Vol. 71, Issue 1, pp. 194-204. DOI: 10.1016/j.meatsci.2005.04.022

[31] Jittrepotch, N., Rojsuntornkitti, K., and Kongbangkerd, T. (2015). Physico-Chemical and Sensory Properties of *Plaa-som*, a Thai Fermented Fish Product Prepared by using Low Sodium Chloride Substitutes. **International Food Research Journal**. Vol. 22, Issue 2, pp. 721-730

[32] Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemeakers, M., Ghistelinck, M., and Geenen, I. (1997). The Importance of Meat Enzymes in Ripening and Flavour Generation in Dry Fermented Sausages. First Results of a European Project. **Food Chemistry**. Vol. 59, Issue 4, pp. 539-545. DOI: 10.1016/S0308-8146(97)00004-6

[33] Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijrongrojana, K., and Tanaka, M. (2004). Some Characteristics of Commercial Som-fug Produced in Thailand. **Food Chemistry**. Vol. 88, Issue 4, pp. 527-535. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.01.067

[34] Shahidi, F. and Zhong, Y. (2008). Bioactive Peptides. **Journal of AOAC International**. Vol. 91, Issue 4, pp. 914-931. DOI: 10.1093/jaoac/91.4.914

[35] Ryan, J. T., Ross, R. P., Bolton, D., Fitzgerald, G. F., and Stanton, C. (2011). Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish. **Nutrients**. Vol. 3, Issue 9, pp. 765-791. DOI: 10.3390/nu3090765

[36] Meisel, H. and FitzGerald, R. J. (2003). Biofunctional Peptides from Milk Proteins: Mineral Binding and Cytomodulatory Effects. **Current Pharmaceutical Design**. Vol. 9, Issue 16, pp. 1289-1295. DOI: 10.2174/1381612033454847

[37] Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Roytrakul, S. (2010). Use of Pyloric Caeca Extract from Bigeye Snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the Production of Gelatin Hydrolysate with Antioxidative Activity. **LWT- Food Science and Technology**. Vol. 43, Issue 1, pp. 86-97. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.010

[38] Qian, Z. L., Jung, W. K., and Kim, S. K. (2008). Free Radical Scavenging Activity of a Novel Antioxidative Peptide Purified from Hydrolysate of Bullfrog Skin, *Rana catesbeiana Shaw*. **Bioresource Technology**. Vol. 99, Issue 6, pp. 1690-1698. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.005

[39] Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., and Kim, S. K. (2005). Purification of a Radical Scavenging Peptide from Fermented Mussel Sauce and Its Antioxidant Properties. **Food Research International**. Vol. 38, Issue 2, pp. 175-182. DOI: 10.1016/j.foodres.2004.10.002

[40] 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 Sciences**. Vol. 77, Issue 17, pp. 2166-2178. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.03.016

[41] Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, S. K. (2005). Antioxidant Properties of a Radical-Scavenging Peptide Purified from Enzymatically Prepared Fish Skin Gelatin Hydrolysate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 53, Issue 3, pp. 581-587. DOI: 10.1021/jf048877v

[42] Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M. A., Gaillard, J. L., Girardet, J. M., and Miclo, L. (2011). Isolation and Identification of Antioxidative Peptides from Bovine α-Lactalbumin. **International Dairy Journal**. Vol. 21, No. 4, pp. 214-221. DOI: 10.1016/j.idairyj.2010.11.011

[43] Hernández-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of Antioxidant Ensymatichydrolysates from α-Lactalbumin and β-Lactoglobulin. Identification of Active Peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Vol. 53, Issue 3, pp. 588-593. DOI: 10.1021/jf048626m

[44] Jemil, I., Mora, L., Nasri, R., Abdelhedi, O., Aristoy, M. C., Hajji, M., Nasri, M., and Toldrá, F. (2016). A Peptidomic Approach for the Identification of Antioxidant and ACE-Inhibitory Peptides in Sardinelle Protein Hydrolysates Fermented by *Bacillus subtilis* A26 and *Bacillus amyloliquefaciens* An6. **Food Research International**. Vol. 89, Part 1, pp. 347-358. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.08.020

[45] Nasri, R., Jridi, M., Lassoued, I., Jemil, I., and Ben Slama-Ben Salem, R. (2014). The Influence of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Antioxidative Properties and ACE-Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates from Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) Muscle. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. Vol. 173, pp. 1121-1134. DOI: 10.1007/s12010-014-0905-3