

ผลของเปปซินและระยะเวลาต่อความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง

มัธยาณี โลมจะบก นิสานารถ กระแสร์ชล* และ สามารถ สายอุต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทรศัพท์ 0 3810 3137 อีเมล: nisanart@go.buu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2020.12.005

รับเมื่อ 23 เมษายน 2563 แก้ไขเมื่อ 22 พฤษภาคม 2563 ตอรับเมื่อ 29 พฤษภาคม 2563 เผยแพร่ออนไลน์ 14 ธันวาคม 2563

© 2021 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

บทคัดย่อ

เท้าไก่ใช้เป็นแหล่งของคอลลาเจนและเจลาตินที่มีคุณภาพสูง ซึ่งนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นการทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น โดยการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปริมาณเปปซิน (0.02–5% w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย (2–8 ชั่วโมง) เพื่อผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ต่อความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนอง (Response Surface Methodology) ซึ่งออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) จากผลการวิจัยพบว่า ปริมาณเปปซินร่วมกับระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนและปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำโดยจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซิน อีกทั้งยังสัมพันธ์กับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่จะเพิ่มมากขึ้นในระดับหนึ่งและลดลงเมื่อปริมาณเปปซินและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น และเมื่อนำมาทวนสอบความแม่นยำของสมการจะเห็นได้ว่าทั้ง 3 ค่าตอบสนองมี Error (%) ต่ำ เนื่องจากค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองมีค่าใกล้เคียงกับการทำนาย โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด คือการใช้เปปซิน 2.08% (w/w) ร่วมกับใช้ระยะเวลาในการย่อย 4.48 ชั่วโมง

คำสำคัญ: คอลลาเจนไฮโดรไลเสต เท้าไก่ เปปซิน ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ



Effect of Pepsin and Hydrolysis Time on Antioxidative Activity of Collagen Hydrolysate from Chicken Feet through Response Surface Methodology

Mattayanee Lomjabok, Nisanarth Krasaechol* and Samart Sai-Ut

Department of Food science, Faculty of Science, Burapha university, Chon Buri, Thailand

* Corresponding Author, Tel. 0 3810 3137, E-mail: nisanart@go.buu.ac.th DOI: 10.14416/j.kmutnb.2020.12.005

Received 23 April 2020; Revised 22 May 2020; Accepted 29 May 2020; Published online: 14 December 2020

© 2021 King Mongkut's University of Technology North Bangkok. All Rights Reserved.

Abstract

Chicken feet contain high quality collagen and gelatin, which can produce proteins hydrolysate with bioactivity, resulting in higher value-added products. The objective of this study was to study the effect of pepsin content (0.02–5% w/w) in combination with digestion time (2–8 hours) to produce collagen hydrolysate from chicken feet with antioxidative activities through Response Surface Methodology (RSM). The experiment was Central Composite Design (CCD). The results showed that pepsin concentration and digestion time were related to the protein content and the hydrophobicity protein content. Increasing in pepsin concentration made protein content and hydrophobicity value of collagen hydrolysate higher. In addition, ABTS radical scavenging activity increased up to a certain level, and then, decreased when the pepsin concentration and digestion time increased more. To confirm the validity of the statistical model, all responses had low error value (%) because the observation values were close to the predicted values. Optimization by RSM showed that using 2.08% (w/w) pepsin with the digestion time of 4.48 hours could produce collagen hydrolysate with the highest ABTS radical scavenger activity.

Keywords: Collagen Hydrolysate, Chicken Feet, Pepsin, Antioxidant Ability

Please cite this article as: M. Lomjabok, N. Krasaechol, and S. Sai-Ut, "Effect of pepsin and hydrolysis time on antioxidative activity of collagen hydrolysate from chicken feet through response surface methodology," *The Journal of KMUTNB*, vol. 31, no. 2, pp. 367–377, Apr.–Jun. 2021 (in Thai).

1. บทนำ

เท้าไก่เป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นประมาณ 3.9 ล้านตันต่อปี [1] ซึ่งถือว่าเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญ [2] โดยผลพลอยได้จากเท้าไก่มีองค์ประกอบของคอลลาเจนและเจลาตินที่มีมูลค่าสูง [3] การพัฒนาให้มูลค่าสูงขึ้นอีก คือการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตซึ่งมีแนวโน้มเติบโตขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากกระบวนการย่อยโปรตีนสามารถปรับปรุงคุณสมบัติของโปรตีนให้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ [4] เช่นฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ การต้านจุลินทรีย์ การต้านความดันโลหิตสูง และการชะลอวัย [5] ปัจจุบันมีการใช้แหล่งโปรตีนจากสัตว์หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเปปไทด์หรือโปรตีนไฮโดรไลเสตมาใช้ประโยชน์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ [6] โดยชนิดของเอนไซม์โปรติเอสที่ใช้ในการย่อยมีประสิทธิภาพในการย่อยที่แตกต่างกัน ซึ่งส่งผลต่อขนาดของโปรตีน และลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ [7] โปรติเอสที่นิยมใช้ ได้แก่ เปปซิน ทริปซิน โคโมทริปซิน อัลคาเลส ฟลาโวไซม์ และนิวเทรส [8] นอกจากนี้ความเข้มข้นของเอนไซม์ ชนิดของซับสเตรตและสภาวะในการย่อยส่งผลต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยจากการรายงานของ Lee และคณะ [9] ศึกษากิจกรรมทางชีวภาพจากการย่อยเจลาตินจากหนังเป็ดโดยใช้เอนไซม์หลายชนิด ใช้ปริมาณเอนไซม์ 0.02% w/w และระยะเวลาในการย่อย 8 ชั่วโมง พบว่า เปปซินมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าทริปซิน ปาเปน อัลคาเลส ฟลาโวไซม์ นิวเทรส คอลลาจีเนส โปรทามิกซ์ และโคโมทริปซิน อีกทั้ง Mokrejs และคณะ [10] ศึกษาเท้าไก่ซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่เป็นแหล่งโปรตีนในการย่อยคอลลาเจนไฮโดรไลเสต โดยใช้โปรติเอสของ Bacillus Family ใช้ปริมาณเอนไซม์ 5% w/w และระยะเวลาในการย่อย 2 ชั่วโมง พบว่า คอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ได้มีสีสว่าง ละลายน้ำได้ดี และกระบวนการย่อยง่าย คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะนำเท้าไก่มาเพิ่มมูลค่าให้เกิดประโยชน์มากยิ่งขึ้นโดยการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถนำไปประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารในอนาคต ดังนั้นเพื่อหาคอบคลุมกระบวนการย่อยคอลลาเจนไฮโดรไลเสตและนำเท้าไก่มาเพิ่มมูลค่า งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา

ผลของปริมาณเปปซิน (0.02-5% w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย (2-8 ชั่วโมง) ต่อคุณภาพของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองออกแบบการทดลองแบบ CCD

2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัตถุดิบและสารเคมี

เท้าไก่จากตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี แข่งขันในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ เปปซิน (EC 3.4.23.1) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี สารละลายเอทานอล บริษัทเพาเวอร์ จี คลีนนิ่ง ประเทศไทย โซเดียมไฮดรอกไซด์ บริษัท Univar ประเทศออสเตรเลีย และกรดอะซิติก บริษัท Quality Reagent Chemical (QREC) ประเทศนิวซีแลนด์

2.2 การสกัดเจลาตินจากเท้าไก่

เท้าไก่ถูกนำมาบดลดขนาดด้วยเครื่องบดเนื้อสัตว์ที่มีขนาดของรูหน้าแปลน 5 มิลลิเมตร ก่อนนำมาเริ่มขั้นตอนการสกัดเป็นเจลาตินโดยในระบบจะกวนตลอดเวลา นำเท้าไก่บดมาแช่น้ำในอัตราส่วน 1 : 6 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วนำตัวอย่างเท้าไก่มาแช่ด้วยสารละลายเอทานอลเพื่อกำจัดไขมันในอัตราส่วน 1 : 10 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง ก่อนนำของแข็งมาแช่ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจนที่ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ในอัตราส่วน 1 : 6 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างเท้าไก่ที่ได้มาล้างน้ำจนมีค่ากรด-ด่างเป็นกลาง จากนั้นนำมาแช่สารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 : 6 (w/v) ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อทำให้ตัวอย่างเท้าไก่เกิดการพองตัวแล้วล้างด้วยน้ำอีกครั้งก่อนนำมาสกัดเป็นเจลาตินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Mokhtar และคณะ [11] ด้วยกรนำตัวอย่างเท้าไก่มาแช่น้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 : 2 (w/v) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนนำมาแยกด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ในระบบสุญญากาศเก็บสารละลายส่วนใสหรือเจลาตินในถุงพลาสติกชนิดพอลิเอทิลีน

แล้วนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส

2.3 การศึกษาปริมาณเปปซินและระยะเวลาในการย่อยคอลลาเจนไฮโดรไลสจากเท้าไก่ด้วยการออกแบบการทดลองแบบ CCD

นำสารสกัดเจลาตินความเข้มข้น 14 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาย่อยด้วยเปปซินที่ความเข้มข้น 0.02–5% (w/w) ที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 2 และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2–8 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1 ก่อนนำมาปฏิบัติการที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที ทั้งนี้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องก่อนนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 กรัม เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำสารละลายมาวิเคราะห์คุณภาพต่างๆ (ค่าตอบสนอง) ได้แก่ ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry [12] ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันในระบบ Lecithin Liposome [13] ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ [14] ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS [15] ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH [15] และความสามารถการในต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี FRAP [15]

ตารางที่ 1 ตัวแปรและระดับของตัวแปรจากการออกแบบการทดลองแบบ CCD

ตัวแปร	ระดับ				
	- α	-1	0	1	+ α
เปปซิน (X_1 , %w/w)	0.02	0.75	1.76	4.27	5.00
ระยะเวลา (X_2 , h)	2.00	3.30	5.00	7.00	8.00

วิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุ (Multiple Regression) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตามทีวิเคราะห์ (Y) และตัวแปรที่ศึกษา (X) เมื่อ β_0 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยโดยมีความสัมพันธ์ดังสมการที่ (1)

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + \beta_4 X_1^2 + \beta_5 X_2^2 \quad (1)$$

วิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab[®] 18 พิจารณาความน่าเชื่อถือของสมการจาก R^2 (Coefficient of Determination) และค่า Model Significance และการทวนสอบความแม่นยำของสมการจาก Error (%) สมการที่ (2)

$$Error (\%) = ((A-B)/A) \times 100 \quad (2)$$

กำหนดให้ A คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลอง

B คือ ค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย

เลือกสถานะที่เหมาะสมในการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลสจากเท้าไก่ที่มีผลต่อความสามารถในการยับยั้งการออกซิเดชันมากที่สุด โดยการใช้เทคนิคการซ้อนทับกราฟ (Super Imposed Technique)

3. ผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณเปปซิน (X_1) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย (X_2) คอลลาเจนไฮโดรไลสจากเท้าไก่ที่มีผลต่อปริมาณโปรตีน (Y_1) ความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBA (Y_2) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (Y_3) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (Y_4) DPPH (Y_5) และ FRAP (Y_6) ซึ่งเป็นการจัดสิ่งทดลองแบบ CCD แบบหุ่นกำลังสองมาตรฐาน ทำให้สามารถจัดสิ่งทดลองได้ 11 สิ่งทดลอง ดังตารางที่ 2

การวิเคราะห์สมการถดถอยแบบพหุดังตารางที่ 3 แบ่งเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linear Effect) ความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (Quadratic Effect) และอิทธิพลระหว่างปัจจัย (Interaction Effect) ซึ่งมีรูปแบบความสัมพันธ์เชิงเส้นหรือเทอมกำลังหนึ่ง (X_1, X_2) ความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งหรือเทอมกำลังสอง (X_1^2, X_2^2) และอิทธิพลระหว่างปัจจัยหรือเทอมที่มีอิทธิพลร่วมกัน ($X_1 X_2$) ได้รับการประเมินทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ซึ่งในการพิจารณาความเชื่อถือของความสัมพันธ์ของสมการพบว่า ค่าตอบสนองต่างๆ ($Y_1 - Y_6$) มีค่า R^2 ของปริมาณโปรตีน (99.55%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (98.33%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (91.31%)

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของค่าตอบสนอง (Y_1, Y_3, Y_4) กับตัวแปร (X_{1-2}) ของคอลลาเจนไฮโดรไลสได้จากเท้าไก่

สิ่งทดลอง	ตัวแปร		ค่าตอบสนอง					
	X_1	X_2	Y_1 (mg/ml)		Y_3 (μ g)		Y_4 (μ mole TE/mg protein)	
	(%w/w)	(h)	ทดลอง*	ทำนาย	ทดลอง*	ทำนาย	ทดลอง*	ทำนาย
1	0.75	3.30	24.06 \pm 1.65 ^{bc}	23.74	44.30 \pm 9.49 ^{cd}	39.67	0.0419 \pm 0.00 ^{abc}	0.0418
2	0.75	7.00	38.38 \pm 1.61 ^a	37.79	87.73 \pm 10.45 ^a	83.75	0.0383 \pm 0.00 ^c	0.0385
3	4.27	3.30	26.01 \pm 3.41 ^{bc}	25.78	27.38 \pm 7.16 ^{de}	28.89	0.0391 \pm 0.00 ^{abc}	0.0398
4	4.27	7.00	37.86 \pm 0.79 ^a	37.35	89.10 \pm 9.25 ^a	91.25	0.0388 \pm 0.00 ^{bc}	0.0398
5	0.02	5.00	23.00 \pm 1.46 ^c	23.22	19.00 \pm 4.53 ^e	20.69	0.0398 \pm 0.00 ^{abc}	0.0396
6	5.00	5.00	40.73 \pm 1.83 ^a	41.33	95.17 \pm 0.84 ^a	95.95	0.0380 \pm 0.00 ^c	0.0373
7	1.76	2.00	29.01 \pm 3.08 ^{bc}	29.49	59.03 \pm 2.14 ^{bc}	64.62	0.0416 \pm 0.00 ^{abc}	0.0417
8	1.76	8.00	30.27 \pm 1.91 ^b	30.62	65.39 \pm 5.08 ^b	62.30	0.0423 \pm 0.00 ^{abc}	0.0413
9	1.76	5.00	29.98 \pm 2.41 ^b	29.87	63.86 \pm 6.08 ^{bc}	64.22	0.0431 \pm 0.00 ^a	0.0429
10	1.76	5.00	29.82 \pm 2.81 ^b	29.87	62.18 \pm 8.34 ^{bc}	64.22	0.0428 \pm 0.00 ^{ab}	0.0429
11	1.76	5.00	29.81 \pm 1.79 ^b	29.87	66.60 \pm 1.31 ^b	64.22	0.0427 \pm 0.00 ^{ab}	0.0429

*ค่าจากการทดลองได้จากค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ

a, b, c, ... หมายถึง ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรต่างกันในแนวตั้งเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

มากกว่า 90% หรือเข้าใกล้ 1 และมีค่า Model Significant ของปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ต่ำกว่า 0.05 แสดงให้เห็นว่าปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีสมการที่มีความเหมาะสมน่าเชื่อถือเพื่อใช้ทำนายสภาวะที่เหมาะสมที่สุดต่อไป

การทวนสอบความแม่นยำของสมการที่ทำนายได้โดยพิจารณาค่า Error (ตารางที่ 3) พบว่า ค่า Error ของปริมาณโปรตีน (-0.01%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (-0.69%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (-0.02%) มีค่า Error น้อยมากจากการเปรียบเทียบค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าตอบสนองที่ได้จากการทำนาย (ตารางที่ 2) ซึ่งบ่งบอกได้ว่าค่าตอบสนองที่ได้จากการทดลองและค่าการทำนายมีค่าใกล้เคียงกัน [16]

เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBA ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ FRAP มีค่า R^2 ต่ำกว่าปริมาณ

โปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS อาจมีผลมาจากสภาวะที่ศึกษารวมถึงข้อผิดพลาดที่อาจส่งผลกระทบต่อระดับการย่อยและลักษณะโครงสร้างของคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ถูกผลิตขึ้น โดยจะเห็นว่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Y_3, Y_5 และ Y_6) มีผลที่ไม่สอดคล้องกัน อาจเป็นผลมาจากความสามารถในการวิเคราะห์ของแต่ละวิธี โดยวิธี ABTS มีความสามารถละลายที่ดีในน้ำและตัวทำละลายอินทรีย์ทำให้สามารถใช้ในการวิเคราะห์หาความสามารถในการออกซิเดชันของสารได้หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นสารที่ละลายได้ในน้ำหรือไขมัน ในขณะที่วิธี DPPH มีข้อจำกัดในการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เป็นโปรตีนสูงได้ เนื่องจากต้องเตรียมสารละลายในตัวทำละลายที่เป็นแอลกอฮอล์ ซึ่งจะทำให้โปรตีนตกตะกอน [17] จึงไม่สามารถวิเคราะห์การต้านอนุมูลอิสระในแต่ละสิ่งทดลองตามค่าการต้านที่แท้จริงได้ อีกทั้งการทดสอบด้วยวิธี FRAP มีรายงานจาก Pvlน และคณะ [18] เปรียบเทียบการวิเคราะห์ FRAP กับ TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity or ABTS) เพื่อประเมินความสามารถในการต้าน

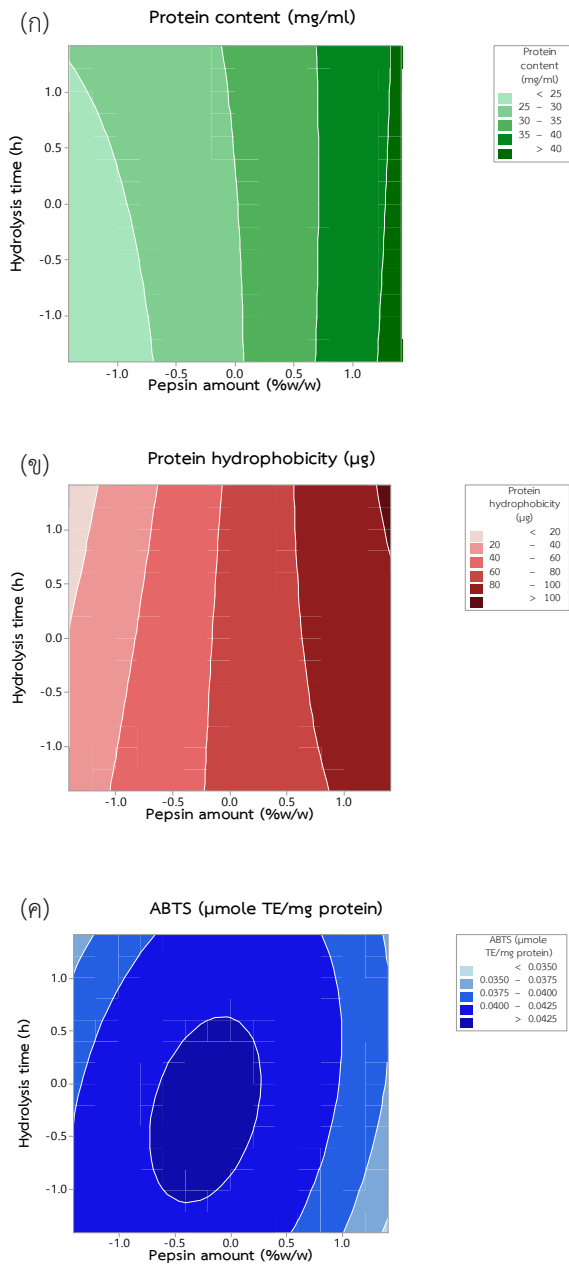
ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของค่าตอบสนอง (Y_{1-6}) กับตัวแปร (X_{1-2}) ในรูปสมการถดถอยของ R^2 , Model Significant และ Error

ค่าผลตอบสนอง	สมการถดถอย	R^2 (%)	Model Significant	Error (%)
Y_1 (mg/mL)	$= 29.871+6.404X_1+0.399X_2+1.202X_1^2+0.092X_2^2- 0.618X_1X_2$	99.55	0.00	-0.01
Y_2 (mg of MDA/l of liposome)	$= 0.4409+0.00415X_1+0.01124X_2+0.0164X_1^2+0.0181X_2^2$	47.90	0.34	-
Y_3 (μ g)	$= 64.22+26.61X_1- 0.82X_2- 2.95X_1^2- 0.38X_2^2+4.57X_1X_2$	98.33	0.00	-0.69
Y_4 (μ mole TE/mg protein)	$= 0.042886- 0.000815X_1- 0.000157X_2- 0.002210X_1^2- 0.000701X_2^2+0.000807X_1X_2$	91.31	0.01	-0.02
Y_5 (μ mole TE/mg protein)	$= 0.034814+0.000468X_1+0.000049X_2- 0.001619X_1^2- 0.000874X_2^2$	60.69	0.17	-
Y_6 (μ mole TE/mg protein)	$= 0.002474- 0.000157X_1- 0.000047X_2+0.000094X_1^2- 0.000364X_2^2+0.000430X_1X_2$	50.73	0.49	-

อนุมูลอิสระในเลือด รายงานว่าค่าเฉลี่ยของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งหมดของวิธี TEAC สูงกว่าวิธี FRAP อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากวิธี TEAC พิจารณาโปรตีนเป็นหนึ่งในองค์ประกอบที่มีผลในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในขณะที่ FRAP ไม่พิจารณาปริมาณโปรตีนในองค์ประกอบ ซึ่งโปรตีนเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระผ่านกลุ่มซัลไฟด์ (-SH) ดังนั้นความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จึงมีความเหมาะสมมากกว่า DPPH และ FRAP ที่ทำให้มีค่า R^2 ต่ำเช่นเดียวกับความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันด้วยวิธี TBA อาจเป็นผลมาจาก TBA ที่ไม่เพียงทำปฏิกิริยากับ Malondialdehyde (MDA) แต่ยังทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นๆ (เช่น คาร์โบไฮเดรต กรดอะมิโน ไพริดีน เม็ดสี และอื่นๆ) [19] ที่เป็นผลิตภัณฑ์จากการย่อย จึงอาจทำให้ค่า TBA ไม่สามารถนำมาทำนายได้

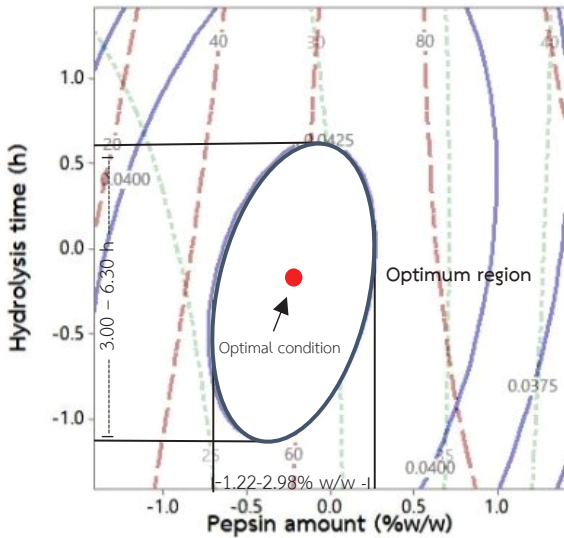
เมื่อนำสมการถดถอยแบบพหุ (ตารางที่ 3) มาสร้างกราฟพื้นผิวตอบสนองเพื่ออธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการศึกษารวมกับระยะเวลาในการย่อยของคอลลาเจนไฮโดรไลเสตกับปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ดังรูปที่ 1 โดยจากรูปที่ 1 (ก) พบว่า ปริมาณโปรตีนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซิน โดยปริมาณโปรตีนมีอิทธิพลต่อปริมาณเปปซินมากกว่าระยะเวลาในการย่อยจึงมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่เพิ่มมากขึ้นมากกว่า จากผลดังกล่าว

ความเข้มข้นของเปปซินส่งผลต่อการย่อยซีสเตรตได้มากขึ้น [20] ซึ่งเปปซินมีความจำเพาะเจาะจงในการตัดเปปไทด์ที่ตำแหน่งปลายด้านกลุ่มคาร์บอกซิลของวงอะโรมาติกและ/หรือกรดอะมิโนลิซีนและฟีนิลอะลานีน [21], [22] เป็นผลให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กและมีสมบัติการละลายได้มากขึ้น อัตราการย่อยด้วยเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นในช่วงแรกและเริ่มคงที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป จึงเป็นผลให้ระยะเวลาในการย่อยไม่มีอิทธิพลเมื่อใช้ระยะเวลาที่นานขึ้น และจากรูปที่ 1 (ข) พบว่า ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินที่ใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการย่อยโปรตีนของเอนไซม์โดยทั่วไปอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทรงกลมของโปรตีน เนื่องจากส่วนที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในธรรมชาติของโปรตีนจะถูกปลดปล่อยออกมาซึ่งสภาพแวดล้อมที่มีซิว (น้ำ) มากขึ้น [23] เนื่องจากความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ซึ่งจะตัดพันธะเปปไทด์เกิดเป็นอะมิโนอิสระที่เฉพาะเจาะจง [24] ที่อาจทำให้มีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น จึงทำให้มีปริมาณของโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำมากขึ้น เช่นเดียวกับรายงานของ Cui และคณะ [25] ศึกษาการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยเปปซิน พบว่า โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำถูกปลดปล่อยออกมามากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนถั่วเหลืองที่ไม่ถูกย่อย และจากรูปที่ 1 (ค) พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินร่วมกับ



รูปที่ 1 พื้นที่ตอบสนองในลักษณะภาพ 2 มิติ ของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (ก) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (ข) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (ค) กับปริมาณเอนไซม์ (X_1) และระยะเวลาในการย่อย (X_2) เมื่อกำหนดค่า X_1 และ X_2 เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)

ระยะเวลาในการย่อย เนื่องจากซัสเตรตถูกย่อยจนเป็นเปปไทด์สายสั้นจึงทำให้มีกรดอะมิโนที่ปลายสายเพิ่มมากขึ้นที่จะสามารถให้อิเล็กตรอนและไฮโดรเจนในปฏิกิริยาการต้านอนุมูลอิสระต่างๆ และเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซินร่วมกับระยะเวลาในการย่อยจนถึงจุดหนึ่งๆ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มีแนวโน้มลดลงเมื่อยังคงเพิ่มปริมาณเปปซินร่วมกับระยะเวลาในการย่อยต่อไป ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Sonklin และคณะ [26] กล่าวคือความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เพิ่มขึ้นจนกระทั่งถึงจุดหนึ่งแล้วลดลง อาจมีสาเหตุมาจากความอึดตัวของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งความอึดตัวของเอนไซม์โปรติเอสเกิดขึ้นเมื่อใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่สูงและใช้ระยะเวลาในการย่อยนานจึงไม่สามารถที่จะย่อยได้อีกทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ลดลง [26] นอกจากนี้ขนาดเปปไทด์ที่สั้นเกินไปและการมีลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยเช่นกัน ซึ่งจากงานวิจัยของ Karami และคณะ [27] รายงานว่าการย่อยที่เหมาะสมสามารถปลดปล่อยเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถเพิ่มกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ อีกทั้งการย่อยอาจผลิตเปปไทด์ที่มีและไม่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระหรือกรดอะมิโนของเปปไทด์เกิดการเปลี่ยนแปลง นำไปสู่ความสามารถที่ลดลงในการต้านอนุมูลอิสระ [28], [29] อย่างที่ทราบกันดีว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนและลำดับของเปปไทด์นั้นมีความสำคัญต่อคุณสมบัติของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งการย่อยโปรตีนจะทำให้มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่หลากหลายขึ้นอยู่กับโครงสร้างของเปปไทด์และลำดับของกรดอะมิโนที่มีผลมาจากแหล่งของโปรตีนและเงื่อนไขในการย่อย [30] ซึ่งชี้ให้เห็นว่าคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของการย่อยไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยเพียงอย่างเดียว แต่เกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น การมีเปปไทด์ที่ไม่ชอบน้ำในสายเปปไทด์หรือปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมอื่นๆ [31] ซึ่งรวมถึงขนาดของเปปไทด์ที่เหมาะสม (ประมาณ 1300–1400 Da) จึงทำให้อธิบายได้ว่าการเพิ่มปริมาณเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยส่งผลต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่มากขึ้นใน



รูปที่ 2 พื้นที่ผิวตอบสนองของสภาวะที่เหมาะสมของความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน (---) ปริมาณ โปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (- - -) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (—) กับปริมาณ เอนไซม์ และระยะเวลาในการย่อยเมื่อกำหนดค่า X_1 และ X_2 เป็นค่ารหัส (-1.414, -1, 0, 1, 1.414)

ระดับหนึ่ง [31]

เมื่อนำพื้นที่ผิวตอบสนองทั้ง 3 ค่าตอบสนองมาหาสภาวะที่เหมาะสมโดยเทคนิคการซ้อนทับกราฟโดยกำหนดให้มีสภาวะของพื้นที่ผิวตอบสนองของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุด (รูปที่ 2) พบว่ามีการใช้ปริมาณเปปซินอยู่ในช่วง 1.22–2.98% w/w ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย 3.00–6.30 ชั่วโมง ทำให้มีปริมาณโปรตีนอยู่ในช่วง 26.80–31.67 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ในช่วง 45.10–71.13 ไมโครกรัม และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS 0.0425–0.0431 $\mu\text{mole TE/mg protein}$ และเมื่อพิจารณาเลือกสภาวะที่เหมาะสมจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ที่ให้ค่าจากการทำนายมากที่สุด (0.0430 $\mu\text{mole TE/mg protein}$) พบว่า มีการใช้ปริมาณของเปปซิน 2.08% (w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย 4.48 ชั่วโมง ซึ่ง

มีปริมาณโปรตีน 28.26 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ 58.03 ไมโครกรัม และเมื่อนำมาทวนสอบความแม่นยำของสมการมีค่า Error ของปริมาณโปรตีน (4.00%) ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำ (1.68%) และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS (1.77%) ต่ำ เนื่องจากค่าตอบสนองที่ได้มีค่าใกล้เคียงกัน โดยรายงานของ Mazloomi-Kiyapey, Sadeghi-Mahoonak, Ranjbar-Nedamani and Nour-mohammadi [32] มีการใช้ปริมาณของเปปซิน 1% ร่วมกับระยะเวลาในการย่อยโปรตีนจากเมล็ดพืชทอง 2 ชั่วโมง ทำให้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด (82.07%) ซึ่งจะเห็นได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมมีความแตกต่างกัน เนื่องจากความแตกต่างของข้อบ่งชี้และสภาวะต่าง ๆ [33] ทำให้มีผลต่อกระบวนการย่อย

4. สรุป

ปริมาณเปปซินและระยะเวลาในการย่อยเพื่อผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีน ปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS ($R^2 > 90$, $p < 0.05$) การใช้สมการมาสร้างพื้นที่ผิวตอบสนองทำให้ทราบว่าปริมาณโปรตีนและปริมาณโปรตีนที่ไม่ชอบน้ำจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณเปปซิน ในขณะที่ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS จะเพิ่มมากขึ้นในระดับหนึ่งและลดลงเมื่อปริมาณเปปซินและระยะเวลาในการย่อยเพิ่มขึ้น ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเสตจากเท้าไก่ด้วยวิธีพื้นที่ผิวตอบสนองโดยให้ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS มากที่สุดคือ การผลิตโดยใช้ปริมาณเปปซิน 2.08% (w/w) ร่วมกับระยะเวลาในการย่อย 4.48 ชั่วโมง

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ 2562 และได้รับการสนับสนุนจากหน่วยบริการนวัตกรรมการทางวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (SIF-IN-60910022)

เอกสารอ้างอิง

- [1] A. K. Chakka, A. Muhammed, P. Z. Sakhare, and N. Bhaskar, "Poultry processing waste as an alternative source for mammalian gelatin: Extraction and characterization of gelatin from chicken feet using food grade acids," *Waste and Biomass Valorization*, vol. 8, no. 8, pp. 2583–2593, 2017.
- [2] A. Lasekan, F. Abu Bakar, and D. Hashim, "Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources," *Waste Management*, vol. 33, no. 3, pp. 552–565, 2013.
- [3] L. Du and M. Betti, "Chicken collagen hydrolysate cryoprotection of natural actomyosin: Mechanism studies during freezethaw cycles and simulated digestion," *Food Chemistry*, vol. 211, pp. 791–802, 2016.
- [4] M. M. Schmidt, R. C. P. Dornelles, R. O. Mello, E. H. Kubota, M. A. Mazutti, A. P. Kempka, and I. M. Demiate, "Collagen extraction process," *International Food Research Journal*, vol. 23, no. 3, pp. 913–922, 2016.
- [5] H. Song and B. Li, "Beneficial effects of collagen hydrolysate: a review on recent developments," *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, vol. 1, no. 2, pp. 1–4, 2017.
- [6] S. Siriamornpun, *Antioxidants in Food*, Bangkok: Odeon store, 2014 (in Thai).
- [7] S. Jantad, "Dried protein hydrolysate powder from chicken breast meat with enzymatic hydrolysis using as ingredient in prototype beverage product," M.S. thesis, Department of Product Development, Faculty of Agro Industry, Kasetsart University, 2014 (in Thai).
- [8] R. R. da Silva, "Enzymatic synthesis of protein hydrolysates from animal proteins: exploring microbial peptidases," *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, no. 735, 2018.
- [9] S.J. Lee, K. H. Kim, Y.-S. Kim, E.-K. Kim, J.-W. Hwang, B. O. Lim, S.-H. Moon, B.-T. Jeon, Y.-J. Jeon, C.-B. Ahn, and P.-J. Park, "Biological activity from the gelatin hydrolysates of duck skin by-products," *Process Biochemistry*, vol. 47, no. 7, pp. 1150–1154, 2012.
- [10] P. Mokrejs, R. Gál, D. Janacova, M. Plskova, and M. Zacharová, "Chicken paws by-products as an alternative source of proteins," *Oriental Journal of Chemistry*, vol. 33, no. 5, pp. 2209–2216, 2017.
- [11] N. D. Mokhtar, W. A. Wahab, N. A. Hamdan, H. A. Hadi, M. S. A. Hassan, and N. M. Bunnori, "Extraction optimization and characterization of collagen from chicken (*Gallus gallus domesticus*) feet," presented at the 5th International Conference on Chemical, Agricultural, Biological and Environmental Sciences (CAFES-17), Kyoto, Japan, April 18-21, 2017.
- [12] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall, "Protein measurement with the folin phenol reagent," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265–275, 1951.
- [13] S. Yarnpakdee, S. Benjakul, H. G. Kristinsson, and H. Kishimura, "Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one- and two-step hydrolysis," *Journal of Food Science and Technology*, vol. 52, no. 6, pp. 3336–3349, 2015.
- [14] I. Chelh, P. Gatellier, and V. Santé-Lhoutellier, "Technical note: A simplified procedure for



- myofibril hydrophobicity determination,” *Meat Science*, vol. 74, no. 4, pp. 681–683, 2006.
- [15] N. K. Vate and S. Benjakul, “Antioxidative activity of melanin-free ink from splendid squid (*Loligo formosana*),” *International Aquatic Research*, vol. 5, no. 9, pp. 1–12, 2013.
- [16] N. Bumrungsart and K. Duangmal, “Optimization of enzymatic hydrolysis condition for producing black gram bean (*Vigna mungo*) hydrolysate with high antioxidant activity,” *Food and Applied Bioscience Journal*, vol. 7, no. 3, pp. 105–117, 2019 (in Thai).
- [17] L. M. Magalhães, M. A. Segundo, S. Reis, and J. L. F. C. Lima, “Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 613, no. 1, pp. 1–19, 2008.
- [18] S. Pvlñ, V. S. Kiranmayi, P. Swathi, L. Jeyseelan, S. Mm, and A. Bitla, “Comparison of two analytical methods used for the measurement of total antioxidant status,” *Journal of Antioxidant Activity*, vol. 1, no. 1, pp. 22–28, 2015.
- [19] R. Mendes, C. Cardoso, and C. Pestana, “Measurement of malondialdehyde in fish: A comparison study between HPLC methods and the traditional spectro-photometric test,” *Food Chemistry*, vol. 112, no. 4, pp. 1038–1045, 2009.
- [20] V. Silva, K. Park, and M. Hubinger, “Optimization of the enzymatic hydrolysis of mussel meat,” *Journal of Food Science*, vol. 75, no. 1, pp. C36–42, 2010.
- [21] A. Justina, “Bioactive properties of salmon skin protein hydrolysate,” M.S. thesis, Department of Bioresource Engineering, McGill university, 2012.
- [22] J. Ahn, M. J. Cao, Y. Q. Yu, and J. R. Engen, “Assessing the reproducibility and specificity of pepsin and other aspartic proteases,” *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1834, no. 6, pp. 1222–1229, 2013.
- [23] K. A. Al-Shamsi, P. Mudgil, H. M. Hassan, and S. Maqsood, “Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in *in vitro* and in food model systems,” *Journal of Dairy Science*, vol. 101, no. 1, pp. 47–60, 2018.
- [24] A. P. F. Corrêa, D. J. Daroit, R. Fontoura, S. M. M. Meira, J. Segalin, and A. Brandelli, “Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities,” *Peptides*, vol. 61, pp. 48–55, 2014.
- [25] C. Cui, M. Zhao, B. Yuan, Y. Zhang, and J. Ren, “Effect of pH and pepsin limited hydrolysis on the structure and functional properties of soybean protein hydrolysates,” *Journal of food science*, vol. 78, no. 12, pp. C1871–C1877, 2013.
- [26] C. Sonklin, N. Laohakunjit, and O. Kerdchoe-chuen, “Assessment of antioxidant properties of membrane ultrafiltration peptides from mungbean meal protein hydrolysates,” *PeerJ*, vol. 6, e5337, 2018.
- [27] Z. Karami, S. H. Peighambardoust, J. Hesari, and B. Akbari-Adergani, “Response surface methodology to optimize hydrolysis parameters in production of antioxidant peptides from wheat germ protein by alcalase digestion and identification of antioxidant peptides by LC-



- MS/MS,” *Journal of Agricultural Science and Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 829–844, 2019.
- [28] Y. Zhuang and L. Sun, “Preparation of reactive oxygen scavenging peptides from tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin: optimization using response surface methodology,” *Journal of Food Science*, vol. 76, no. 3, pp. C483–C489, 2011.
- [29] Z. Zheng, Y. Huang, R. Wu, L. Zhao, C. Wang, and R. Zhang, “Response surface optimization of enzymatic hydrolysis of duck blood corpuscle using commercial proteases,” *Poultry Science*, vol. 93, no. 10, pp. 2641–2650, 2014.
- [30] M. Rudzinska, E. Flaczyk, R. Amarowicz, E. Wasowicz, and J. Korczak, “Antioxidative effect of crackling hydrolysates during frozen storage of cooked pork meatballs,” *European Food Research and Technology*, vol. 224, pp. 293–299, 2007.
- [31] P. Chuesiang, “Protein hydrolysate from tilapia and perch frame : Antioxidant and ace - inhibitor properties,” M.S. thesis, Department of Mathematics, Faculty of Science, Chulalongkorn University, 2011 (in Thai).
- [32] S. N. Mazloomi-Kiyapey, A. Sadeghi-Mahoonak, E. Ranjbar-Nedamani, and E. Nourmo-hammadi, “Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties,” *ARYA Atheroscler*, vol. 15, no. 5, pp. 218–227, 2019.
- [33] M. Ovissipour, K. A. Abedian, A. Motamedza-degan, and R. Nazari, “Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*),” *Food and Bioprocess Technology*, vol. 5, pp. 696–705, 2010.