การศึกษาเบื้องต้นการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีทางเอนไซม์

สุพรรณี เบเชกู่[1]
วนิดา ปานอุทัย[2*]

[1]สาขาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
[2]ฝ่ายจุลชีววิทยาประยุกต์
สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
[*]ผู้นิพนธ์หลัก อีเมล : ifrwdp@ku.ac.th
รับเมื่อ 22 กุมภาพันธ์ 2567 **แก้ไขเมื่อ** 20 พฤษภาคม 2567 **ตอบรับเมื่อ** 24 พฤษภาคม 2567

จุดเด่น

- กระบวนการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีทางเอนไซม์
- ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่าขึ้นอยู่กับสภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์
- ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสามารถพบได้ในโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่า

บทคัดย่อ

สาหร่ายสไปรูลิน่าจัดเป็นสาหร่ายขนาดเล็กที่อุดมไปด้วยโปรตีนที่มีคุณภาพสูง ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นและเปปไทด์ รวมถึงสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารประกอบฟีนอลิก จึงมีส่วนช่วยในการส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค โดยโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากการเลี้ยงชีวมวลสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีทางเอนไซม์ โดยแปรผันชนิดและอัตราส่วนของเอนไซม์ที่ใช้ จากผลการศึกษาพบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) มีค่าสูงถึง 6.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การใช้เอนไซม์อัลคาเลส (Acalase®) ให้ค่าความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตสูงสุดเท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากผลการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดในโปรตีนไฮโดรไลเสตพบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยการแปรผันชนิดของเอนไซม์แตกต่างกันส่งผลให้ได้ผลผลิตที่แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดแตกต่างกัน ยังคงได้ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตใกล้เคียงกัน

คำสำคัญ : สาหร่ายสไปรูลิน่า โปรตีนไฮโดรไลเสต การย่อยด้วยวิธีทางเอนไซม์ สารประกอบฟีนอลิก

Preliminary study on protein hydrolysates from *Spirulina* using enzymatic hydrolysis

Supannee Bachaku[1], and
Wanida Pan-utai[2*]

[1]Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University
[2]Department of Applied Microbiology,
Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University
*Corresponding author, e-mail : ifrwdp@ku.ac.th
Received 22 February 2024; **Revised** 20 May 2024; **Accepted** 24 May 2024

Highlights

- Protein hydrolysates-process from *Spirulina* using enzymatic hydrolysis methodology
- The yield of protein hydrolysates from *Spirulina* depends on the enzymatic conditions
- The total phenolic content was found in the protein hydrolysates

Abstract

Spirulina is classified as microalgae and is composed of high quality protein. It contains trace amounts of essential amino acids and bioactive peptides, including important biological active substances such as phenolic compounds. Therefore, it helps to promote the consumer's health. Protein hydrolysates are a source of a variety of bioactive peptides. Protein hydrolysates were obtained from *Spirulina* biomass using various conditions of enzymatic hydrolysis. The results found that the concentration of protein hydrolyses with alkaline protease was 6.33 mg/ml. However, hydrolysis with alcalase enzyme (Alcalase®) resulted in the highest protein concentration of 0.58 mg/ml. Total phenolic contents obtained from alcalase hydrolysis were greater than that of alkaline protease enzyme. Although different types of enzymes showed an effect on hydrolysis yield, protein yields were similar when the enzyme concentration and the hydrolysis time were varied.

Keywords : *Spirulina*, protein hydrolysates, enzymatic hydrolysis, phenolic compounds

บทนำ

องค์กร Functional Food Center (FFC) ได้ให้คำจำกัดความของอาหารเพื่อสุขภาพว่าเป็น “อาหารธรรมชาติหรืออาหารแปรรูป ประกอบไปด้วยสารที่สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพในปริมาณที่เพียงพอและมีประโยชน์แก่สุขภาพ สามารถป้องกันและรักษาโรคที่สำคัญ ไม่เกิดพิษต่อร่างกาย” ในปัจจุบันผู้บริโภคมีการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมการรับประทานโดยคำนึงถึงการดูแลสุขภาพมากขึ้น เพื่อลดอาการของโรคเรื้อรังที่เกิดจากพฤติกรรมการรับประทานอาหาร[1-2] ดังนั้นในด้านของอุตสาหกรรมอาหาร จึงได้มีการเสริมสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพลงในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เช่น ชีวมวลที่ผ่านการย่อย (ไฮโดรไลเสต) และเปปไทด์[3]

สาหร่ายสไปรูลิน่า *(Spirulina)* เป็นสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินหรือไซยาโนแบคทีเรียขนาดเล็ก มีคุณประโยชน์ทางโภชนาการที่อุดมไปด้วยโปรตีนที่มีคุณภาพสูงร้อยละ 60-70 ของน้ำหนักแห้ง มีกรดอะมิโนจำเป็น วิตามิน แร่ธาตุ กรดไขมันจำเป็น โพรวิตามินเอ (เบต้าแคโรทีน) เป็นต้น[4] แม้ว่าไซยาโนแบคทีเรียหลายชนิดมีสารพิษที่เรียกว่าไมโครซิสติน ทำให้ไซยาโนแบคทีเรียสร้างปัญหาทางด้านสาธารณสุขในหลายพื้นที่ จึงต้องมีการควบคุมสารพิษเหล่านี้อย่างเข้มงวด[4] อย่างไรก็ตามสาหร่ายสไปรูลิน่าไม่สร้างสารพิษชนิดนี้ และยังไม่มีการรายงานถึงสารพิษอื่น ๆ อีกทั้งยังได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่า มีความปลอดภัย (GRAS : Generally Recognized as Safe) จากองค์การอาหารและยา (FDA : Food and Drug Administration) และยังเป็นอาหารที่ได้รับการยอมรับตามกฎระเบียบข้อกำหนดสำหรับอาหารใหม่ของสหภาพยุโรป (EU-2015/2283)[5-6]

โปรตีนไฮโดรไลเสต สามารถทำได้โดยวิธีทางเคมี วิธีทางเอนไซม์ หรือการหมักด้วยจุลชีพ องค์ประกอบที่ถูกย่อยจะมีศักยภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่ามีการศึกษากิจกรรมทางชีวภาพอย่างแพร่หลายทั้งในระดับหลอดทดลองหรือในสัตว์ทดลอง[4] ฤทธิ์ทางชีวภาพจากการศึกษาที่ผ่านมา เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ[4] ลดความดันโลหิตโดยยับยั้งเอนไซม์ ACE (Angiotensin-Converting Enzyme)[7] ฤทธิ์ต้านการอักเสบและสร้างเยื่อบุลำไส้ในหนูได้อย่างสมบูรณ์ในระยะเวลาที่ทดลอง[8] ต้านเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด (HepG-2, MCF-7, SGC-7901, A549 และ HT-29) โดยเฉพาะเซลล์ A549 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งปอด[9] ต้านเชื้อก่อโรคทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus*[10] และยังช่วยในการต้านโรคอ้วน โดยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมไขมันในหนู[11] นอกจากนี้การทดลองรักษาโรคกล้ามเนื้อฝ่อในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์ C2C12 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่ามีผลกับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคกล้ามเนื้อฝ่อที่เกิดจากการกระตุ้นของเดกซาเมทาโซน (Dexamethasone : DEX)[12]

กระบวนการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยวิธีทางเอนไซม์ เป็นวิธีทั่วไปที่ใช้ผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพได้ เนื่องจากสามารถควบคุมได้ง่าย ใช้ระยะเวลาไม่นานในการได้มาซึ่งโปรตีนที่มีระดับ

การย่อยที่สูง ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และอุณหภูมิมีความเหมาะสม นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมกระบวนการย่อยเพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลหรือกรดอะมิโนเฉพาะและองค์ประกอบอะมิโนมีปริมาณใกล้เคียงโปรตีนเริ่มต้น ที่สำคัญคือ การย่อยโดยใช้เอนไซม์ไม่รุนแรงและไม่มีการตกค้างของสารพิษ จึงเหมาะสำหรับการใช้งานในอุตสาหกรรมอาหารและยา[13-14] การใช้เอนไซม์อัลคาเลสและอัลคาไลน์โปรตีเอส (มีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมภายใต้ค่าความเป็นกรดด่างเป็นกลางและเป็นด่างตามลำดับ) ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส สามารถตัดพันธะเปปไทด์ภายในโครงสร้างอย่างอิสระ ทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ ที่มีหลายขนาด แตกต่างจากเอกซ์โซเปปติเดสที่ย่อยจากปลาย N หรือปลาย C ของสายโซ่เปปไทด์ จะได้กรดอะมิโนอิสระมากกว่าเอนโดเปปติเดส[15] เอนโดเปปติเดสแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ได้แก่ ซีรีนโปรตีเอส แอสปาร์ติก-โปรตีเอส ซีสเทอีนโปรตีเอส และเมทัลโลโปรตีเอส[16] ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตเบื้องต้นจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีทางเอนไซม์ โดยแปรผันชนิดของเอนไซม์และระยะเวลาในการย่อย เพื่อให้ได้ผลได้ของโปรตีนไฮโดรไลเสตสูง รวมถึงการติดตามปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่พบในโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมชีวมวลสาหร่าย

สาหร่ายขนาดเล็ก *Spirulina platensis* IFRPD 1182 ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ทำการเพาะเลี้ยงและเตรียมชีวมวลเซลล์ตามวิธีการของ Pan-utai และ Iamtham[17] โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อสาหร่ายสไปรูลิน่าในอาหารเหลว Zarrouk ภายในห้องปฏิบัติการที่มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-14 วัน ก่อนการเพาะเลี้ยงระบบเปิดในอ่างขนาด 500 ลิตร โดยใช้กล้าเชื้อสไปรูลิน่าปริมาตรร้อยละ 10 ในอาหารเหลว Zarrouk ที่มีปริมาตรทำงานที่ 200 ลิตร เป็นเวลา 15-20 วัน สาหร่ายจะเจริญเข้าสู่ระยะ exponential ทำการเก็บเกี่ยวด้วยผ้ากรองไนลอนขนาด 60 ไมโครเมตร ล้างเซลล์ด้วยน้ำสะอาด จากนั้นอบแห้งสไปรูลิน่าในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำชีวมวลสไปรูลิน่าที่ถูกอบแห้งแล้วบดด้วยเครื่องบดให้มีขนาดอนุภาค 0.5 มิลลิเมตร (ZM-1, Retsch, Haan, Germany) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การศึกษาเบื้องต้นของโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยวิธีทางเอนไซม์

ทำการศึกษาการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยแปรผันชนิดของเอนไซม์ทางการค้า ได้แก่ 1) เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase®, Novozyme, Switzerland) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7 ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และ 2) เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease, iKnowZyme, Reach Biotechnology, Thailand) ในสารละลาย Tris-HCl บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

เท่ากับ 9 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ (มวล/ปริมาตร) เท่ากับร้อยละ 2.4 และ 4.8 ทำการเก็บตัวอย่างในระยะเวลา 0, 30 และ 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำให้เย็นลง เก็บส่วนสารละลายเพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่อัตราเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดใหม่ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ต่อไป

3. การวิเคราะห์โปรตีน

ทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างโดยใช้วิธีการแบรดฟอร์ด (Bradford method)[18] โดยผสมตัวอย่างหรือสารมาตรฐานปริมาตร 40 ไมโครลิตรกับสารละลาย Bradford (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories Ltd., Thailand) ปริมาตร 160 ไมโครลิตร ทำการบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (M965+, Microplate reader, Metertech, Taiwan) โดยใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

4. การวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด

ทำการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu โดยการผสมตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานปริมาตร 20 ไมโครลิตรกับสารละลาย Folin-Ciocalteu (ความเข้มข้น 0.2 นอร์มัล) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (ความเข้มข้น 0.7 โมลาร์) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ทำการบ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader (M965+, Microplate reader, Metertech, Taiwan) ใช้กรดแกลลิก (gallic acid) เป็นสารมาตรฐาน แสดงผลในหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อกรัมของตัวอย่างแห้ง (mg GAE/g DW)

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลการทดลองโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละการทดลองโดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics (Version 25.0) แสดงผลด้วยค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลการทดลอง

จากการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยการใช้เอนไซม์ในกลุ่มเอนโดเปปติเดส คือ อัลคาเลสและอัลคาไลน์-โปรตีเอสที่อัตราส่วนน้ำหนักเอนไซม์ต่อปริมาตรบัฟเฟอร์เท่ากับร้อยละ 2.4 และร้อยละ 4.8 โดยอัลคาเลสย่อยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วนอัลคาไลน์โปรตีเอสย่อยที่อุณหภูมิ 45 องศา-

เซลเซียส เก็บตัวอย่างในนาทีที่ 0, 30 และ 60 ตามลำดับ เพื่อติดตามพารามิเตอร์ของโปรตีนไฮโดรไลเสตระยะการย่อย ได้แก่ ความเข้มข้นโปรตีน ผลผลิตโปรตีนที่ได้ รวมถึงสารประกอบฟินอลิกรวมในโปรตีนไฮโดรไลเสต ผลของโปรตีนที่ได้พบว่า การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสที่ใช้อัตราส่วนร้อยละ 2.4 มีปริมาณใกล้เคียงกันในทุกระยะเวลาของการเก็บตัวอย่าง โดยมีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 0.49, 0.47 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ และการเพิ่มอัตราส่วนเอนไซม์เป็นร้อยละ 4.8 มีโปรตีน 0.58, 0.49 และ 0.49 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ (Figure 1) ในขณะที่ปริมาณโปรตีนจากการย่อยโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส มีปริมาณโปรตีนสูงกว่าการย่อยโดยใช้เอนไซม์อัลคาเลส ในการย่อยโดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 2.4 พบความเข้มข้นของโปรตีนในนาทีที่ 0 เท่ากับ 5.59 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และลดลงเป็น 4.92 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรในนาทีที่ 30 และมีปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อย่อยนาน 60 นาที (6.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4.8 ความเข้มข้นโปรตีนที่ได้ในนาทีที่ 0 และ 30 มีค่าเท่ากันคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 ย่อยนาน 60 นาที อย่างไรก็ตามปริมาณโปรตีนลดลงเหลือเพียง 5.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อย่อยนาน 60 นาที (Figure 1) ถึงแม้ว่าการแปรผันชนิดของเอนไซม์แตกต่างกันจะส่งผลต่อผลผลิตที่ได้แตกต่างกัน แต่ความเข้มข้นเอนไซม์และระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่ได้ใกล้เคียงกัน

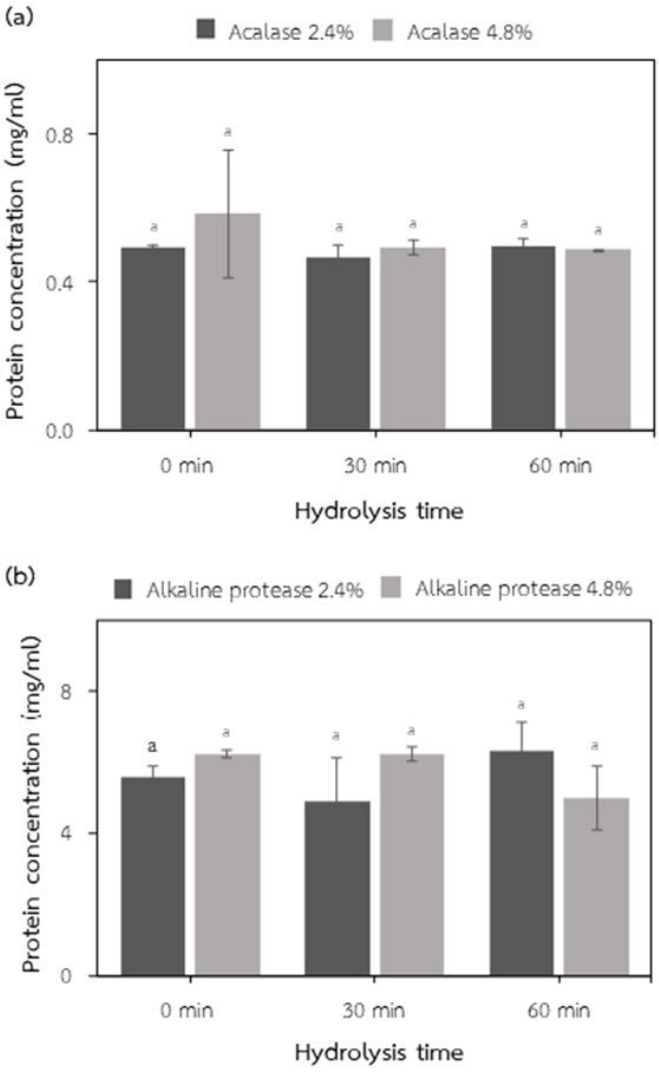

Figure 1 Protein hydrolysates from *S. platensis* IFRPD 1182 under various conditions, including Acalase® (a) and alkaline protease (b)

เมื่อคำนวณผลผลิตโปรตีนจากแต่ละตัวอย่างการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 2.4 ได้ผลผลิตโปรตีน 9.97, 9.30 และ 9.96 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ใกล้เคียงกับการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ร้อยละ 4.8 ซึ่งผลผลิตของโปรตีนสูงสุดพบในนาทีที่ 0 โดยมีความเข้มข้นโปรตีนเท่ากับ 11.68 มิลลิกรัมต่อกรัม และลดลงเป็น 9.85 และ 9.72 มิลลิกรัมต่อกรัม ของการ

เก็บตัวอย่างในนาทีที่ 30 และ 60 ตามลำดับ (Figure 2) แต่ปริมาณผลผลิตโปรตีนที่ได้จากการย่อยโดยใช้เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีผลผลิตโปรตีนที่สูงกว่า โดยการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 จะเห็นได้ว่าจากการย่อยในนาทีที่ 0 และ 30 ได้ผลผลิตทางโปรตีนเท่ากับ 111.86 และลดลงเป็น 98.37 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ส่วนผลผลิตที่ได้จากนาทีที่ 60 (126.58 มิลลิกรัมต่อกรัม) มีค่าไม่แตกต่างจากการย่อยโดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 4.8 ในนาทีที่ 0 และ 30 (124.90 มิลลิกรัมต่อกรัม) อย่างไรก็ตามผลผลิตโปรตีนลดลงเป็น 99.96 มิลลิกรัมต่อกรัม เมื่อย่อยนาน 60 นาที (Figure 2)

ผลของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของการย่อยด้วยเอนไซม์ทั้งสองชนิดเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือ การใช้เอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อย ส่วนในการใช้ความเข้มข้นเอนไซม์ร้อยละ 4.8 มีการเพิ่มขึ้นตามลำดับในนาทีที่ 0 และ 30 แต่ลดลงในนาทีที่ 60 อย่างไรก็ตามหากเปรียบเทียบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของเอนไซม์สองชนิดมีความแตกต่างกัน โดยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดสูงกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของเอนไซม์อัลคาเลสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 มีการเพิ่มขึ้นในนาทีที่ 0, 30 และ 60 เป็น 20.13, 32.29 และ 38.91 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ และการใช้ความเข้มข้นร้อยละ 4.8 พบปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเป็น 26.80 และ 33.06 จากนั้นลดลงเป็น 30.90 มิลลิกรัมต่อกรัม (Figure 3) จะเห็นได้ว่า การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสความเข้มข้นร้อยละ 2.4 นาน 60 นาที มีปริมาณฟีนอลิกสูงสุด (38.91 มิลลิกรัมต่อกรัม) ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสความเข้มข้นร้อยละ 2.4 มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดเพิ่มขึ้นตามลำดับเมื่อย่อยนานขึ้น (10.62, 13.82 และ 15.12 มิลลิกรัมต่อกรัม) แต่การใช้เอนไซม์ด้วยความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (ร้อยละ 2.4 และ ร้อยละ 4.8) ให้ปริมาณฟีนอลิกไม่แตกต่างกัน (Figure 3)

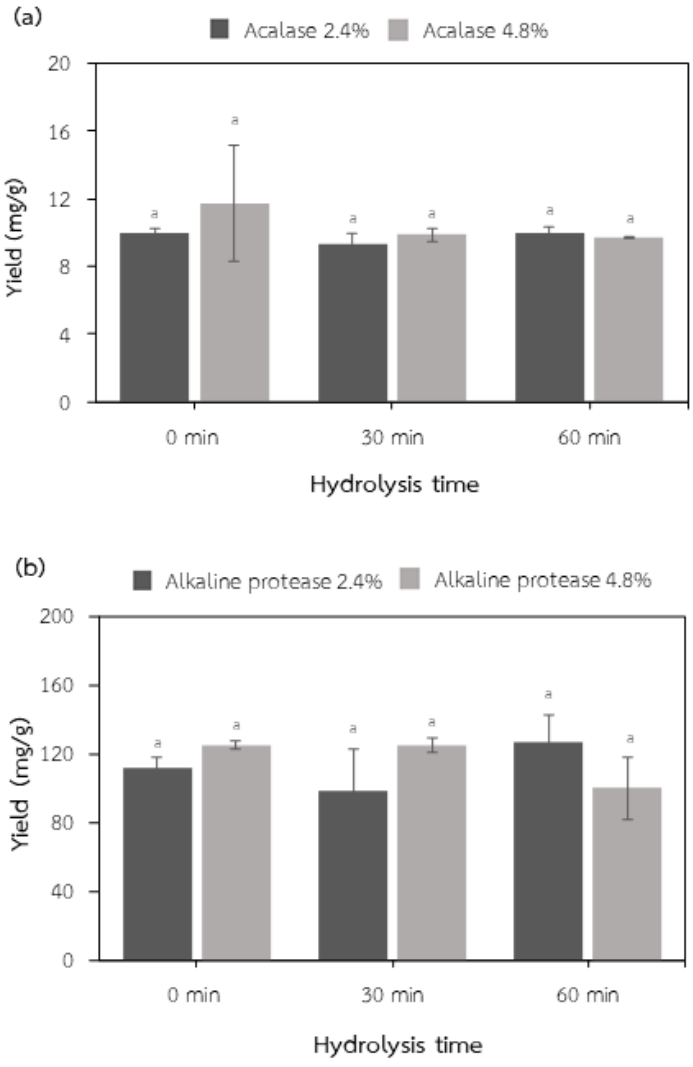

Figure 2 Yield of protein hydrolysates from *S. platensis* IFRPD 1182 under various conditions, including Acalase® (a) and alkaline protease (b)

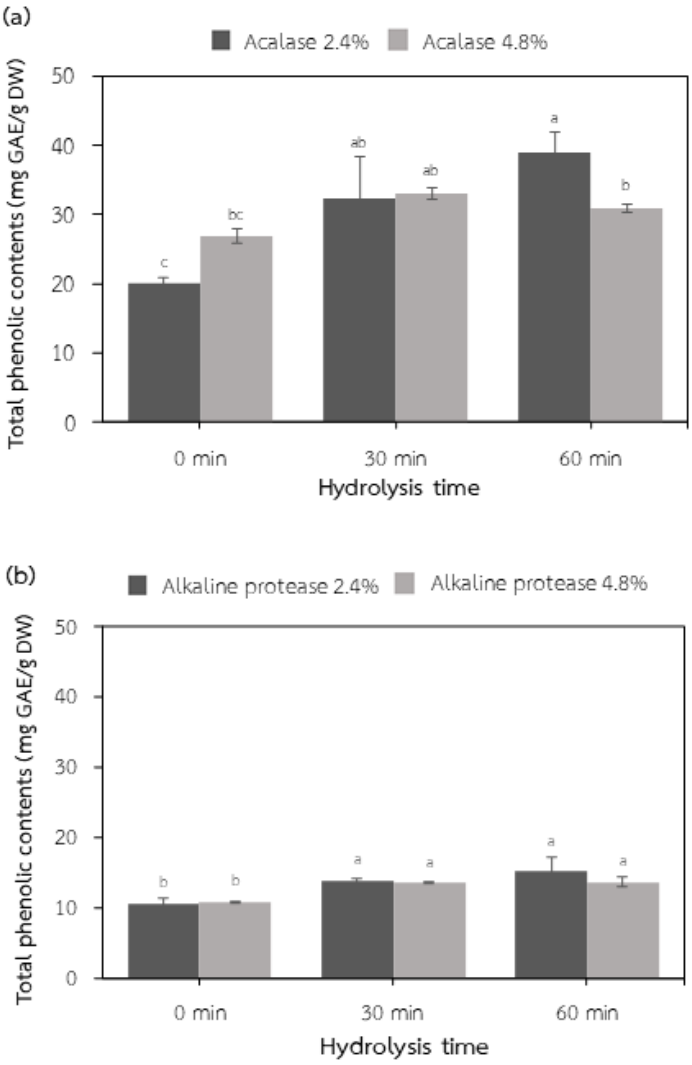

Figure 3 Total phenolic contents of protein hydrolysates from *S. platensis* IFRPD 1182 under various conditions, including Acalase® (a) and alkaline protease (b)

อภิปรายผลการทดลอง

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า การควบคุมสภาวะระหว่างกระบวนการย่อย สามารถปรับเปลี่ยนคุณสมบัติเชิงฟังก์ชันของโปรตีนได้[19] ในการศึกษาครั้งนี้โปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยวิธีทางเอนไซม์ โดยมีการผันแปรชนิดเอนไซม์ 2 ชนิด และความเข้มข้นเอนไซม์ 2 ระดับ คือ อัลคาเลสและอัลคาไลน์โปรตีเอสที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 และ 4.8 ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบพบว่า ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสมีปริมาณสูงสุดถึง 6.33 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณโปรตีนสูงสุดเท่ากับ 0.58 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยที่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง มีการใช้งานอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมผงซักฟอกหรือเครื่องหนัง แต่ยังไม่เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมอาหาร[20] อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าอัลคาไลน์โปรตีเอสสามารถย่อยให้ผลผลิตโปรตีนที่สูง มีการศึกษาที่เปรียบเทียบเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยสาหร่ายสไปรูลิน่าด้วยเอนไซม์โปรตีเอสกับเอนไซม์ชนิดอื่น พบว่า มีความเข้มข้นของเปปไทด์ 1.10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สูงกว่าเปปไทด์จากปาเปนและเปปซินที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 0.92 และ 0.94 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ[21] นอกจากนี้อัลคาไลน์โปรตีเอสมีความสามารถในการย่อยได้ดีกว่าเอนไซม์ทริปซินและเปปซิน โดยเฉพาะเมื่อใช้ร่วมกับเอนไซม์ปาเปน โดยย่อยด้วยอัลคาไลน์โปรตีเอสก่อนและตามด้วยปาเปน จะช่วยส่งเสริมให้การย่อยประสิทธิภาพยิ่งขึ้น[10] เอนไซม์อัลคาเลสถือเป็นเอนไซม์ที่มีการยอมรับถึงประสิทธิภาพสำหรับการย่อยเพื่อสกัดโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยมีระดับการย่อยที่เหมาะสมและได้เปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ[3,22] จากผลผลิตปริมาณโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสต่ำกว่าเอนไซม์

อัลคาไลน์โปรตีเอสสอดคล้องกับการศึกษาของ Fan และ Cui[23] โดยการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณโปรตีนที่ต่ำกว่าเอนไซม์ปาเปน เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาดัง Table 1 จะเห็นได้ว่าปริมาณโปรตีนจากโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ส่วนใหญ่มีปริมาณน้อยกว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอสชนิดต่าง ๆ

Table 1 Yield of protein hydrolysates in various conditions

Microalgae	Enzyme	pH / Temperature	Protein hydrolysates	References
S. platensis IFRPD 1182	Alcalase Alkaline protease	7 / 70 9 / 45	0.58 mg/g 6.33 mg/g	This study
S. platensis	Alkaline protease	8 / 55	65%	(24)
S. platensis	Alcalase	6.5 / 30	50.96%	(25)
S. platensis	Alcalase	6.5 / 30	36.5%	(26)
Spirulina sp. LEB 18	Protemax 580L	9.5 / 60	55.46%	(27)
S. platensis	Promod 184 MDP	7 / 55	64.71%	(28)
S. platensis	Alcalase	8 / 45	108 mg/g	(29)
S. platensis	Protease from bactertia	7 / 37	(soluble peptide) 1.10 mg/g	(21)
S. platensis	Alcalase Protamex	8.5 / 50 8 / 40	30.62% 34.45%	(23)

อย่างไรก็ตามการวิเคราะห์สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดพบว่า โปรตีนที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีปริมาณสูงกว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส โดยมีปริมาณสูงสุดคือ 38.91 มิลลิกรัมต่อกรัม และ 15.12 มิลลิกรัมต่อกรัมตามลำดับ ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดจากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีปริมาณสูงสุดเท่ากับ 35.57 มิลลิกรัมต่อกรัม[30] ซึ่งในการศึกษานี้การย่อยด้วยอัลคาเลสใช้เวลาในการย่อยเพียง 60 นาที และได้ปริมาณฟีนอลิกสูงกว่า จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่า เอนไซม์อัลคาเลสอาจมีศักยภาพในการย่อยดีกว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเอส เนื่องจากการย่อยที่มีระดับการย่อยสูงกว่าสามารถปลดปล่อยปริมาณฟีนอลิกได้สูงกว่า[31] ทั้งนี้ปริมาณของฟีนอลิกขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของสาหร่ายและสามารถเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาวะการสกัดและการแปรรูป[31]

บทสรุป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้เอนไซม์อาหารทางการค้าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่า โดยแปรผันชนิดและความเข้มข้นเอนไซม์พบว่า ส่งผลต่อโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสาหร่ายสไปรูลิน่าที่แตกต่างกัน ความเข้มข้น

และผลผลิตของโปรตีนแตกต่างกันอย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามผลของปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าผลผลิตทางโปรตีนที่สูงไม่สัมพันธ์กับปริมาณฟีนอลิก สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรเสตด้วยวิธีทางเอนไซม์ทั้งสองชนิดคือ เอนไซม์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.4 ใช้ระยะเวลาในการย่อยนาน 60 นาที ซึ่งมีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดและได้ปริมาณฟีนอลิกสูงสุดในแต่ละเอนไซม์ นอกจากนี้การนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารจำเป็นต้องทำการศึกษาถึงการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตต่อไป เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์ได้อย่างเหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

1. Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes IdAA, Pedro AC, Rubio FTV, Branco IG, et al. Functional properties of bioactive compounds from *Spirulina* spp.: Current status and future trends. Food Chem: Mol Sci. 2022;5:100134.
2. Gur J, Mawuntu M, Martirosyan D. FFC's advancement of functional food definition. Funct Foods Health Dis. 2018;8(7):385-97.
3. Akbarbaglu Z, Ayaseh A, Ghanbarzadeh B, Sarabandi K. Techno-functional, biological and structural properties of *Spirulina platensis* peptides from different proteases. Algal Res. 2022;66:102755.
4. Jie Y, Yuanliang H, Mingxiong X, Yaohao D, Shenao L, Nan P, et al. Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. J Microbiol Biotechn. 2016;26(7):1216-23.
5. Akbarbaglu Z, Ayaseh A, Ghanbarzadeh B, Sarabandi K. Biological stabilization of Arthrospira bioactive-peptides within biopolymers: Functional food formulation; bitterness-masking and nutritional aspects. LWT. 2024;191:115653.
6. Vo T-S, Ngo D-H, Kim S-K. Chapter 19 - Nutritional and pharmaceutical properties of microalgal *Spirulina*. In: Kim S-K, editor. Handbook of Marine Microalgae. Boston: Academic Press; 2015. p. 299-308.
7. Zhang N, Li F, Zhang T, Li C-Y, Zhu L, Yan S. Isolation, identification, and molecular docking analysis of novel ACE inhibitory peptides from *Spirulina platensis*. Eur Food Res Technol. 2022;248(4):1107-15.
8. Moghadamzadegan S, Emtyazjoo M, Sadeghi M, Rabbani M. Evaluation of Anti-inflammatory Effects of bioactive peptides of *Spirulina platensis* extracted by animal cysteine protease enzyme in Mice Balb/C. J Anim Biol. 2021;13(4):119-32.
9. Wang Z, Zhang X. Inhibitory effects of small molecular peptides from *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* on cancer cell growth. Food Funct. 2016;7(2):781-8.
10. Sun Y, Chang R, Li Q, Li B. Isolation and characterization of an antibacterial peptide from protein hydrolysates of *Spirulina platensis*. Eur Food Res Technol. 2016;242(5):685-92.
11. Bingli Z, Cui Y, Xiaodan F, Qi P, Liu C, Zhou X, et al. Anti-obesity effects of *Spirulina platensis* protein hydrolysate by modulating brain-liver axis in high-fat diet fed mice. PLOS ONE. 2019;14:e0218543.
12. Lee C-W, Chang YB, Park CW, Han SH, Suh HJ, Ahn Y. Protein hydrolysate from *Spirulina platensis* prevents dexamethasone-induced muscle atrophy via Akt/Foxo3 signaling in C2C12 myotubes. Marine Drugs [Internet]. 2022; 20(6).
13. Akbarian M, Khani A, Eghbalpour S, Uversky VN. Bioactive Peptides: Synthesis, Sources, Applications, and Proposed Mechanisms of Action. Int J Mol Sci. 2022;23(3).
14. Nasri M. Chapter Four - Protein hydrolysates and biopeptides: production, biological activities, and applications in foods and health benefits. a review. In: Toldrá F, editor. Advances in Food and Nutrition Research. 81: Academic Press; 2017. p. 109-59.
15. Noreen S, Siddiqa A, Fatima R, Anwar F, Adnan M, Raza D-A. Protease production and purification from agro industrial waste by utilizing *Penicillium digitatum*. Int J Appl Biol Forensic. 2017;1(4):119-29.

16. Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiol Mol Biol Rev. 1998;62(3):597-635.
17. Pan-utai W, Iamtham S, Boonbumrung S, Mookdasanit J. Improvement in the sequential extraction of phycobiliproteins from *Arthrospira platensis* using green technologies. Life [Internet]. 2022; 12(11).
18. Pan-utai W, Pantoa T, Roytrakul S, Praiboon J, Kosawatpat P, Tamtin M, et al. Ultrasonic-assisted extraction and antioxidant potential of valuable protein from *Ulva rigida* macroalgae. Life. 2023; 13(1).
19. Forutan M, Hasani M, Hasani S, Salehi N. Antioxidative activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysate of *Spirulina platensis*. J Food Biosci Technol. 2023;13(1):75-89.
20. Sharma M, Gat Y, Arya S, Kumar V, Panghal A, Kumar A. A review on microbial slkaline protease: an essential tool for various industrial approaches. Ind Biotechnol. 2019;15:69-78.
21. Niknam H, Fathi F, Mahboubi A, Tabarzad M. Antioxidant activity of peptides derived from enzymatic digestion of *Spirulina platensis* protein extract by different proteases : antioxidant activity of protein digests of *S. platensis*. Trends Pept Protein Sci. 2022;7:1-7 (e6).
22. Shishavan MM, Mirdamadi S, Ofoghi H. Antioxidant activity of alcalase hydrolysates of *Spirulina proteins*. Microbiol Metab Biotechnol. 2019;2(2):109-18.
23. Fan X, Cui Y, Zhang R, Zhang X. Purification and identification of anti-obesity peptides derived from *Spirulina platensis*. J Funct Foods. 2018;47:350-60.
24. Ouyang K, Chen Q, Xie H, Zhang Q, Tao L, Xiong H, et al. *Arthrospira* cell residue valorization: a study on protein hydrolysate production by limited enzymatic hydrolysis. Food Biosci. 2023;56:103264.
25. Verni M, Dingeo C, Rizzello CG, Pontonio E. Lactic acid bacteria fermentation and endopeptidase treatment improve the functional and nutritional features of *Arthrospira platensis*. Front Microbiol. 2021;12.
26. Verdasco-Martín CM, Echevarrieta L, Otero C. Advantageous preparation of digested proteic extracts from *Spirulina platensis* biomass. Catalysts. 2019; 9(2).
27. Silva PCd, Toledo T, Brião V, Bertolin TE, Costa JAV. Development of extruded snacks enriched by bioactive peptides from microalga *Spirulina* sp. LEB 18. Food Biosci. 2021;42:101031.
28. Maag P, Dirr S, Özmutlu Karslioglu Ö. Investigation of bioavailability and food-processing properties of *Arthrospira platensis* by enzymatic treatment and micro-encapsulation by spray drying. Foods. 2022; 11(13).
29. Forutan M, Hasani M, Hasani S, Salehi N, Sabbagh F. Liposome system for encapsulation of *Spirulina platensis* protein hydrolysates: controlled-release in simulated gastrointestinal conditions, structural and functional properties. Materials. 2022; 15(23).
30. Yücetepe A, Kasapoğlu K, Ozcelik B. Angiotensis-I-converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of tryptic *Spirulina platensis* protein hydrolysates: effect of hydrolysis and in vitro gastrointestinal digestion. Ecol Life Sci (NWSAELS). 2018;13(3):151-62.
31. Guldas M, Ziyanok S, Sahan Y, Yıldız E, Gurbuz O. Antioxidant and anti-diabetic properties of *Spirulina platensis* produced in Turkey. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2021;41:615-25.