

รหัสโครงการ SUT3-305-58-24-14



รายงานการวิจัย

การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันจากเลือดไก่
(Production of antioxidant peptides from chicken blood)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชันจากเลือดไก่ (Production of antioxidant peptides from chicken blood)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558-2559

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2564

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2558-2559 ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำอาคารเครื่องมือ 1 2 3 9 และ 10 ที่อำนวยความสะดวกในด้าน อุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ระดับสูง ขอขอบคุณ คุณศุภกาจน์ บุญอยู่ เจ้าหน้าที่บริหารงานทั่วไปของสถานวิจัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการควบคุม การเบิกจ่าย การรักษาเสถียรภาพของงบประมาณตลอดระยะเวลาของโครงการวิจัยจนเป็นที่เรียบร้อย อนึ่ง ขอขอบคุณผู้ช่วยนักวิจัยโครงการที่อุทิศตนปฏิบัติงานวิจัย และคุณกฤษณพงศ์ แก้วบังเกิด ผู้จัดทำ รูปเล่มรายงานอย่างวิริยะอุตสาหะ และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณผู้ที่ให้ความช่วยเหลือทุก ๆ ท่าน ที่มีส่วน เกี่ยวข้องให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ซึ่งคณะผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามท่านได้ทั้งหมด คณะผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2564

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของเลือดไก่โดยผลิตเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) โดยศึกษาชนิดของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ อัลคาเลส (Alcalase) พาเพน (papain) เพปซิน (pepsin) และเทอร์โมไลซิน (thermolysin) ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดและเม็ดเลือดย่อยด้วยอัลคาเลสมีค่าสูงสุดที่ร้อยละ 13.3-14.5 พลาสมา มีค่าระดับการย่อยเพียงร้อยละ 1.6-3.3 โปรตีนไฮโดรไลเซตจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซินแสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงที่สุดที่ 0.954 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (ferric reducing power) ของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเม็ดเลือดย่อยด้วยอัลคาเลสมีค่าสูงสุดที่ 55.9 ไมโครโมลลาร์โทรลอกซ์ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซตจากพลาสมา มีความสามารถในการจับกับโลหะสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือดและเม็ดเลือดโดยไม่ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ และความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซินมีค่าสูงสุดในระดับร้อยละ 28.4-29.4

เมื่อศึกษาระยะเวลาในการย่อยพลาสมาและเม็ดเลือดด้วยเพปซินหรือเทอร์โมไลซิน พบว่าที่ 4 ชั่วโมง ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของไฮโดรไลเซตเม็ดเลือดและพลาสมาย่อยด้วยเพปซินมีกิจกรรมสูงในช่วง 1.02-1.14 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ ปริมาณแอลฟาอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซตเตรียมจากเพปซินหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (*in vitro* gastrointestinal digestion) เพิ่มขึ้น 2.4 เท่า และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ มีค่าสูงสุด และเมื่อวิเคราะห์ห่อหุ้มประกอบของกรดอะมิโนพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซิน เม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซิน และเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซินหลังระบบย่อยอาหารจำลองปริมาณกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิกในระดับร้อยละ 61.7, 70.5 และ 58.9 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนระบบย่อยอาหารจำลอง

พลาสมาไฮโดรไลเซตย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินที่ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองมีคะแนนความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงในช่วง 8.5-9.0 ได้แก่ YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW และISRDRGV พลาสมาไฮโดรไลเซตจากเพปซินและเทอร์โมไลซินที่ผ่านการย่อยโดยระบบย่อยอาหารจำลองแสดงฤทธิ์ปกป้อง HepG2 ตามระดับความเข้มข้น โดยไฮโดรไลเซตจากเพปซินที่ย่อยโดยระบบย่อยอาหารจำลองแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์จาก tert-butyl hydroperoxide สูงสุดที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังลดการเกิดอนุมูลอิสระในระดับร้อยละ 71 เมื่อวิเคราะห์ด้วย dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)

การแยกเปปไทด์ด้วย Superdex Peptide 10/300 GL จากไฮโดรไลเซตพลาสมาย่อยด้วยเพปซิน พบว่าได้เปปไทด์ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 15.26

มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร โดยเพปไทด์มีขนาดโมเลกุลประมาณ 1100.48 ดาลตัน และมีปริมาณผลผลิตร้อยละ 82.3 และเมื่อทำบริสุทธิ์ต่อด้วย Reverse-phase chromatography พบว่าได้เพปไทด์ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} โดยมีค่า EC₅₀ เท่ากับ 2.31 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทประมาณ 3 เท่า และมีปริมาณผลผลิตร้อยละ 40 ดังนั้นพลาสมาไฮโดรไลเสทสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยคาดว่าจะยังคงแสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ



Abstract

Objective of this study was to increase utilization of chicken blood by producing antioxidant peptides from various fractions of chicken blood, namely whole blood (B), plasma (P), and blood corpuscle (BC), using different enzymes, including Alcalase, papain, pepsin, and thermolysin. Degree of hydrolysis values of B and BC, hydrolyzed by Alcalase were highest of 13.3-14.5%. Degree of hydrolysis of P was relatively low of 1.6-3.3%. Pepsin-hydrolyzed plasma (PHP) exhibited the highest ABTS^{°+} radical scavenging activity at 0.954 mM Trolox, while ferric reducing power of BC-hydrolyzed by Alcalase was highest at 55.9 μ M Trolox. Plasma hydrolysates exhibited higher metal chelating ability than did other samples, regardless of proteases used. Hydroxyl radical scavenging activity of B, P, and BC, hydrolyzed by pepsin was highest in the range of 28.4-29.4%.

When hydrolysis time of P and BC by pepsin and thermolysin was studied, it was found that 4-h of hydrolysis of these substrates by pepsin resulted in the highest ABTS radical scavenging activity at 1.02-1.14 mM Trolox. The α -amino content of digesta of hydrolysates prepared from pepsin increased 2.4 times with the highest ABTS^{°+} radical scavenging activity. Amino acid analysis revealed that digesta of PHP, pepsin-hydrolyzed BC (PHBC) and thermolysin-hydrolyzed BC (THBC) showed hydrophobic amino acids of 61.7, 70.5, and 58.9%, respectively, which were higher than their respective parent hydrolysates.

Digesta of PHP exhibited high antioxidant scores of 8.5-9.0 and their peptides were identified to be YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW and ISRDRWGV. Digesta of PHP and thermolysin-hydrolyzed plasma (THP) showed cytoprotective properties in a dose-dependent manner, and 100 μ g/ml of PHP digesta exhibited the highest protection of HepG2 cells against tert-butyl hydroperoxide (TBHP) and the greatest inhibition of intracellular reactive oxygen species of approximately 71% based on dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay.

Peptide separation of PHP by Superdex Peptide 10/300 GL resulted in peptides with ABTS scavenging activity with EC₅₀ value of 15.26 mg Leu/ml with estimated molecular weight of 1,100.48 Da with 82.3% yield. Further purification by reverse-phase chromatography increased ABTS radical scavenging activity to EC₅₀ of 2.31 mg Leu/ml,

which was about 3 times higher than the original hydrolysate with peptide yield of 40%. Thus, blood plasma hydrolysate could be developed to functional food products with high antioxidant activity. In addition, peptides obtained from gastrointestinal digestion of blood hydrolysate would likely to exhibit free radical scavenging activity.



สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข-ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง-จ
สารบัญ.....	ฉ-ช
สารบัญตาราง.....	ซ
สารบัญภาพ.....	ฌ-ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์.....	ฎ-ฏ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1-2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการ.....	3
1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 สารอนุมูลอิสระและการเกิดออกซิเดชัน.....	4-5
2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	6-7
2.3 เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ.....	7-11
2.4 เพปไทด์จากเลือด.....	12-13
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 วัสดุและสารเคมี.....	14
3.2 การเตรียมตัวอย่าง.....	14
3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี.....	14
3.4 วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE.....	15
3.5 ศึกษาชนิดของเอนไซม์และองค์ประกอบของเลือดไก่สำหรับการผลิต โปรตีนไฮโดรไลเสท.....	15-16
3.6 คุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant properties).....	16-17
3.7 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง (<i>In vitro</i> gastrointestinal (GI) digestion).....	17-18

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.8 การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของมวลโมเลกุลของไฮโดรไลเซตด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF).....	18
3.9 วิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโน (Amino acid profile).....	18
3.10 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS.....	19
3.11 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์.....	19-20
3.12 การแยกเพปไทด์.....	20-21
3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	21
3.14 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล.....	21
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลงานวิจัย	
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดไก่.....	22-24
4.2 ศึกษาชนิดของเอนไซม์และส่วนย่อยของเลือดที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	24-30
4.3 ศึกษาระยะเวลาสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	31-33
4.4 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง (<i>In vitro</i> gastrointestinal (GI) digestion).....	33-34
4.5 การวิเคราะห์รูปแบบมวลโมเลกุลของไฮโดรไลเซตด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF).....	34-36
4.6 วิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโน (Amino acid profile).....	37-38
4.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์.....	39-40
4.8 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS.....	41-42
4.9 การแยกเพปไทด์.....	41-44
บทที่ 5 สรุปผลการดำเนินวิจัย	
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	45
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	46
บรรณานุกรม.....	47-56
ประวัติผู้วิจัย.....	57-59

สารบัญตาราง

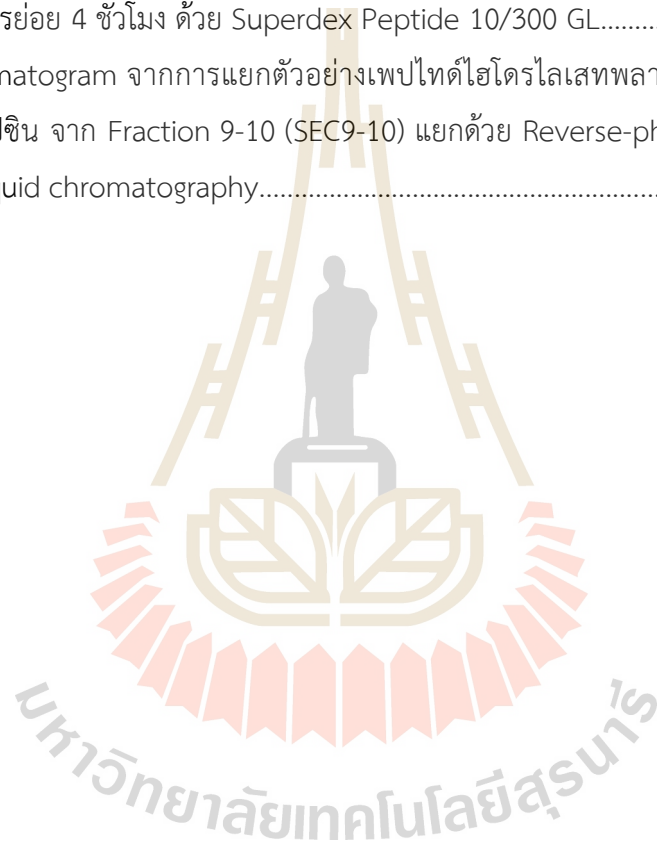
ตารางที่	หน้า
2.1 เพปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ.....	8-11
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดจากไก่.....	23
4.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของเลือด พลาสมาและเม็ดเลือด.....	24
4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{o+} ของโปรตีนไฮโดรไลเซต.....	33
4.4 ปริมาณซูทริกรดอะมิโนในเพปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเซตก่อนและหลังย่อยในระบบ ย่อยอาหารจำลอง.....	38
4.5 ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ผลิตจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินที่ต้านอนุมูล อิสระจากการวิเคราะห์แบบ <i>denovo</i> peptide sequencing.....	42
4.6 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{o+} ของเพปไทด์จากการแยกตามขนาด.....	43
4.7 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{o+} ของเพปไทด์ SEC9-10 จากการแยกความ มีขั้ว.....	44

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1.1 ผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต่อสุขภาพ.....	2
4.1 รูปแบบ SDS-PAGE ของเลือดไก่ประกอบด้วยเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดที่ 15% separating gel ปริมาณโปรตีนที่โหลดเจลที่ 15 ไมโครกรัม.....	23
4.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง.....	25
4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{•+} ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง..	27
4.4 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Ferric ion ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง..	28
4.5 ความสามารถในการจับกับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง.....	29
4.6 ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง และ 0 ชั่วโมง.....	30
4.7 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากตัวอย่างเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน พลาสมาย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน เม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซิน และพลาสมาย่อยด้วยเพปซินที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	31
4.8 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{•+} ของโปรตีนไฮโดรไลสเลือดที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซินและเพปซินที่ระยะเวลาต่าง ๆ.....	32
4.9 ปริมาณแอลฟาอะมิโน (α -amino acid) ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสชนิดต่าง ๆ.	33
4.10 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS ^{•+} ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสชนิดต่าง ๆ.....	34
4.11 การกระจายตัวของมวลโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลสชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี MALDI-TOF พลาสมาย่อยด้วยเพปซินก่อน และหลังย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง และเม็ดเลือดด้วยเพปซินก่อน และหลังย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง.....	35
4.12 การกระจายตัวของมวลโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลสชนิดต่างๆด้วยวิธี MALDI-TOF พลาสมาย่อยด้วยเทอร์โมไลซินก่อน และหลังย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง และเม็ดเลือดด้วยเทอร์โมไลซินก่อน และหลังย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง.....	36

สารบัญญภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.13 ความสามารถในการป้องกันความเป็นพิษจาก <i>Tert</i> -butylhydroperoxide (tBuOOH) (A) และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 (B) ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ย่อยผ่านระบบย่อยอาหารจำลอง.....	40
4.14 Chromatogram จากการแยกตัวอย่างไฮโดรไลเซสพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซิน ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ด้วย Superdex Peptide 10/300 GL.....	43
4.15 แสดง Chromatogram จากการแยกตัวอย่างเพปไทด์ไฮโดรไลเซสพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซิน จาก Fraction 9-10 (SEC9-10) แยกด้วย Reverse-phase fast protein liquid chromatography.....	44



คำอธิบายสัญลักษณ์

ANOVA	Analysis of variance
Ala (A)	Alanine
Arg (R)	Arginine
Asn (N)	Asparagine
Asp (D)	Aspartic acid
AOAC	Association of official chemists
Cys (C)	Cysteine
DH	Degree of hydrolysis
Glu (E)	Glutamic acid
Gln (Q)	Glutamine
Gly (G)	Glycine
His (H)	Histidine
Ile (I)	Isoleucine
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry
Leu (L)	Leucine
Met (M)	Methionine
mg	Milligram
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass
Mw	Molecular weight
MWCO	Molecular weight cut off
m/z	Mass per charge ratio
N	Normality
Pro (P)	Proline
SEC	Size exclusion chromatography
Ser (S)	Serine
Thr (T)	Threonine

คำอธิบายสัญลักษณ์ (ต่อ)

RP-HPLC	Reversed-phase high performance liquid chromatography
TNBS	2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonic acid
Trp (W)	Tryptophan
Tyr (Y)	Tyrosine
UF	Ultrafiltration
Val (V)	Valine
w/v	Weight by volume
v/v	Volume by volume
×g	Gravitational acceleration
μg	Microgram
μL	Microliter
μM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma

บทที่ 1

บทนำ

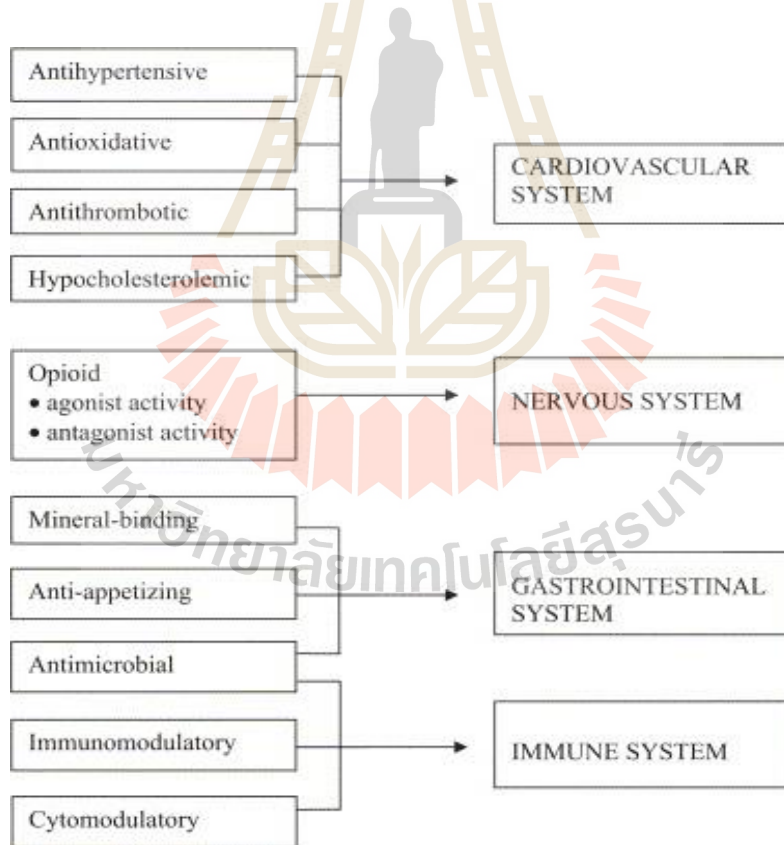
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันอุตสาหกรรมไก่เนื้อของประเทศไทยมีผลผลิตเป็นอันดับ 10 ของโลก เฉลี่ย 1.9-2.0 ล้านตัน โดยปริมาณการบริโภคภายในประเทศเฉลี่ยปีละ 1.2 ล้านตัน ในปี พ.ศ. 2559 ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกไก่แปรรูปอันดับ 1 ของโลกประมาณ 0.56 ล้านตัน และส่งออกไก่สดแช่แข็งเป็นอันดับ 5 ของโลกประมาณ 0.45 ล้านตัน เนื่องจากเลือดเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by-product) จากกระบวนการชำแหละไก่ ซึ่งเลือดไก่จากการชำแหละในแต่ละปีมีประมาณ 64,000 ตัน แม้จะมีการบริโภคเลือดไก่ภายในประเทศ แต่ปริมาณเลือดที่เกิดขึ้นยังมีมากกว่าความต้องการของตลาด การใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมมีจำกัดอยู่เพียงเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ดังนั้น การแปรรูปให้เกิดผลิตภัณฑ์มูลค่าเพิ่มจากเลือด จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าจากผลิตภัณฑ์พลอยได้จำนวนมหาศาลเหล่านี้

เลือดมีโปรตีนประมาณ 17-19% ประกอบด้วยเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) ประมาณ 40-45% และส่วนที่เป็นพลาสมา (blood plasma) ประมาณ 60% โดยเซลล์เม็ดเลือด (blood cells) มีส่วนประกอบหลักคือ เซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cells; RBC or erythrocytes) รองลงมาคือ เซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells; leucocytes) และเกล็ดเลือด (platelets) โดยโปรตีนที่สำคัญของเซลล์เม็ดเลือดคือฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญของธาตุเหล็ก ส่วนพลาสมาประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 3000 ชนิด (Garbett et al., 2007) แบ่งเป็นซีรัมอัลบูมิน (serum albumin, 60%) โกลบูลิน (globulins, 36%) และไฟบริโนเจน (fibrinogen, 4%) (Pearson and Dutson, 1988) นอกจากนี้ในส่วนของพลาสมายังประกอบไปด้วยเกลือแร่ต่าง ๆ ที่สำคัญ ได้แก่ โซเดียมคาร์บอเนต โซเดียมคลอไรด์ และเกลือแคลเซียม รวมถึงสารอาหารต่าง ๆ เช่น กลูโคส กรดไขมัน และกรดอะมิโน

เซลล์เม็ดเลือดสามารถแยกออกจากพลาสมาโดยการปั่นเหวี่ยง โปรตีนพลาสมาเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) และมีจำหน่ายในทางการค้าในรูปแบบ องค์กรประกอบโปรตีนที่สำคัญของพลาสมาได้แก่ 1) ซีรัมอัลบูมินซึ่งมีโครงร่าง (conformation) เป็นก้อนกลม (globular protein) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 66 กิโลดาลตัน และมีค่า Isoelectric point (pI) 4.8 เมื่อขจัดไขมันออกแล้ว ค่า pI เปลี่ยนเป็น 5.3 (Peters, 1996) 2) โกลบูลินเป็นโปรตีนหลักที่มีขนาดหลากหลายจาก 15 กิโลดาลตันจนถึงหลายร้อยกิโลดาลตัน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทต่อการเกิดเจลของพลาสมา โดยโปรตีนหลักในกลุ่ม globulins คือ immunoglobulins ซึ่งมีส่วนประกอบหลักคือ α , β และ γ globulins มีค่า pI 5-7 (Parés et al., 2011) ประกอบด้วย heavy chains 2 สาย ซึ่งมีขนาดประมาณ 50 กิโลดาลตัน และ light chains 2 สายที่มีขนาดประมาณ 25 กิโลดาลตัน เชื่อมต่อ

กันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และปฏิสัมพันธ์อันอ่อนโยนโควาเลนต์ชนิดต่าง ๆ (non-covalent interactions) 3) ไฟบริโนเจนเป็นไกลโคโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (fibrous protein) มีขนาด 340 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 2 subunits โดยแต่ละ subunit ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 3 สายที่ไม่เหมือนกันคือ $A\alpha$, $B\beta$ และ γ ต่อเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ทั้งหมด 29 พันธะ เพปไทด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรตีเนสหรือการย่อยด้วยกรด การใช้เทคโนโลยีเอนไซม์ที่เหมาะสมสามารถผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive) ได้หลากหลายชนิด ดังแสดงในรูปที่ 1.1 เช่น เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติลดความดัน (antihypertensive) ลดการเกิดออกซิเดชัน (antioxidative) ในระดับเซลล์ ออกฤทธิ์ต่อ opioid receptor (opioid agonistic) เพิ่มภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial) เป็นพรีไบโอติก (prebiotic) มีความสามารถในการจับแร่ธาตุ (mineral binding) ลดการเกาะตัวของลิ่มเลือด (antithrombotic) รวมถึงลดคอเลสเตอรอล (hypocholesterolemic effects) (Arihara, 2006) โดยคุณสมบัติของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้ขึ้นกับลำดับของกรดอะมิโนเป็นสำคัญ ซึ่งลำดับของกรดอะมิโนขึ้นกับโปรตีนที่เป็นสารตั้งต้นและโปรตีเนสที่ใช้ในกระบวนการผลิต



รูปที่ 1.1 ผลของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต่อสุขภาพ

ที่มา: Korhonen and Pihlanto (2006)

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 ผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีสมบัติด้านออกซิเดชันในระดับเซลล์จากเลือดไก่
- 1.2.2 ศึกษาสมบัติของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชัน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

แยกองค์ประกอบโปรตีนในเลือดไก่ ระบุองค์ประกอบโปรตีนในเลือดและชนิดของเอนไซม์ รวมถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติด้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์และในระดับเซลล์ ทำการแยกส่วน (fractionate) เพปไทด์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี (chromatography) ต่าง ๆ เพื่อให้ได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ด้านออกซิเดชันและวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนในตัวอย่างไฮโดรไลสเสท

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

คุณสมบัติของเพปไทด์ในการต้านอนุมูลอิสระขึ้นอยู่กับขนาดของเพปไทด์และลำดับกรด อะมิโน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์และสารตั้งต้นโปรตีน ดังนั้นการศึกษาชนิดของเอนไซม์และชนิดของโปรตีนในเลือดที่เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสม จึงเป็นแนวทางสำคัญที่จะนำไปสู่เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระตามที่ต้องการ นอกจากนี้สภาวะการย่อยในระบบทางเดินอาหาร อาจมีผลทั้งต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ของเพปไทด์

การทดสอบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สารสังเคราะห์เป็นแนวทางหนึ่งที่น่าจะบ่งชี้ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเบื้องต้นได้ แต่การทดสอบการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์จะช่วยให้ได้ข้อมูลที่ใกล้เคียงกับระบบสิ่งมีชีวิตมากขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเลือดไก่ เป็นการเพิ่มมูลค่าของเลือด ซึ่งการใช้ประโยชน์ยังมีอยู่อย่างจำกัดในปัจจุบัน เป็นการสร้างสรรค์ผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ซึ่งเป็นแนวโน้มของอุตสาหกรรมอาหารและผู้บริโภคในปัจจุบัน ก่อให้เกิดการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบ (ไก่) ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเป็นการสร้างความเข้มแข็งให้กับอุตสาหกรรมการแปรรูปไก่ ซึ่งเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญต่อประเทศ นอกจากนี้ การผลิตเพปไทด์เป็นกระบวนการผลิตที่ต้องใช้เทคโนโลยี กระบวนการแยกส่วน และการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารไปสู่ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยี แทนการพึ่งพาซื้อได้เปรียบทางวัตถุดิบอย่างในอดีตที่ผ่านมา ผลที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ยังเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพในกลุ่มโปรตีน สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารอนุมูลอิสระและการเกิดออกซิเดชัน

อนุมูลอิสระ คือ อะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) อย่างน้อย 1 ตัว โคจรอยู่รอบนอก (Halliwell and Gutteridge, 1999; Mine and Katayama, 2008) อนุมูลอิสระเหล่านี้จะดึงหรือให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้เกิดความเสถียร โมเลกุลที่สูญเสียหรือได้รับอิเล็กตรอนจะเปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระแทนและเกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reactions) ต่อไป อนุมูลอิสระมีหลากหลายชนิดขึ้นอยู่กับอะตอมศูนย์กลางของโมเลกุล เช่น อนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นศูนย์กลาง (reactive oxygen species; ROS) อนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นศูนย์กลาง (reactive nitrogen species; RNS) อนุมูลอิสระที่มีคาร์บอนเป็นศูนย์กลาง และอนุมูลอิสระที่มีซิลเฟอร์เป็นศูนย์กลาง (Halliwell, 2007) ROS เป็นอนุมูลอิสระที่เกิดได้มาก โดยเกิดจากกระบวนการทำงานภายในเซลล์สิ่งมีชีวิต (Miller et al., 1990)

2.1.1 Reactive oxygen species (ROS)

ROS แบ่งออกเป็นกลุ่มอนุมูลอิสระ (free oxygen radicals) และ ROS กลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (non-radical ROS) สารในกลุ่มอนุมูลอิสระ ROS ได้แก่ อนุมูลของซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide radical, $O_2^{\cdot-}$; conjugated acid-hydroperoxyl radical, HO_2^{\cdot}) อนุมูลของไฮดรอกซิล (hydroxyl radical, HO^{\cdot}) และอนุมูลของ alkoxy-(RO^{\cdot}) หรือ peroxy-(ROO^{\cdot}) ส่วน ROS กลุ่มที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระเป็นสารออกซิไดซ์หรือถูกเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนเป็นอนุมูลอิสระได้ง่าย ตัวอย่างเช่น ออกซิเจนอะตอมเดี่ยว (singlet oxygen, 1O_2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) และลิพิดเปอร์ออกไซด์ (lipid peroxide, LOOH) หรือ ไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (hydroperoxide, ROOH) (Cornelli, 2009; Leonarduzzi et al. 2010)

ROS สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากปัจจัยภายในและปัจจัยภายนอก โดยปัจจัยภายในที่ทำให้เกิด ROS เกิดจากกระบวนการทำงานของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ ได้แก่ ไมโทคอนเดรีย (mitochondria), ไซโตโครม P540 (cytochrome P450 metabolism), นิวโทฟิล (neutrophils), อีโอซิโนฟิล (eosinophils), แมคโครฟาจ (macrophages), เพอรอกซิโซม (peroxisome), ไมโครโซม (microsomes), การกระตุ้นกระบวนการอักเสบของเซลล์ (inflammatory cell activation), ระบบโมโนออกซิเจเนส (monooxygenase system) และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบของเซลล์ และกลไกอื่นๆ (Authen and Davis, 2009; Cadenas, 1989; Conner and Grisham, 1996; Inoue et al., 2003; Valko et al., 2004; Valko et al., 2006) ส่วน ROS ที่ถูกกระตุ้นจากปัจจัยภายนอก เช่น ตัวเร่งจากสิ่งแวดล้อม และสารซีโนไบโอติก (xenobiotic) เช่น ไอออนโลหะ การแผ่รังสี สารบาร์บิทูเรต (barbiturates) (Klaunig et al., 1997)

$O_2^{\cdot-}$ เป็นอนุมูลอิสระขั้นต้นของ ROS ซึ่งเกิดขึ้นจากกระบวนการรีดักชันของโมเลกุลออกซิเจน โดยผ่านตัวกลางคือ NAD(P)H oxidases และ xanthine oxidase หรือสารที่ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดอกซ์ เช่น สารประกอบ semi-ubiquinone ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย (Valko et al., 2007) $O_2^{\cdot-}$ สามารถเหนี่ยวนำโมเลกุลอื่นๆ ทำให้เกิดเป็น ROS เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) อนุมูลของไฮดรอกซิล และออกซิเจนอะตอมเดี่ยว ไม่ว่าจะเกิดปฏิกิริยาโดยตรงหรือผ่านกระบวนการเร่งจากเอนไซม์หรือโลหะ (Bielski and Cabelli, 1991; Buonocore et al., 2010; Picardo and Passi, 1997; Valko et al., 2004; Valko et al., 2005) การเกิด ROS ในรูปแบบต่างๆขึ้นอยู่กับปฏิกิริยารีดอกซ์ของโลหะ (เช่น Fe^{2+} , Cu^+ และอื่นๆ) (Valko et al., 2005) ภายใต้สภาวะเร่งซูเปอร์ออกไซด์จะปลดปล่อยอนุมูลอิสระของเหล็กส่วนเกินจากเอนไซม์ที่จับกับเหล็ก (Liochev and Fridorich, 1994) Fe^{2+} ที่ปล่อยอิเล็กตรอนออกมาสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยา Fenton ทำให้เกิด HO^{\cdot} ที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยา (Valko et al., 2007) นอกจากนี้อนุมูลเปอร์ออกไซด์ยังสามารถเกิดในปฏิกิริยา Haber-Weiss ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + HO^{\cdot} + HO^{\cdot}$) ซึ่งรวมถึงปฏิกิริยา Fenton ($Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + HO^{\cdot} + HO^{\cdot}$) และปฏิกิริยารีดักชันของ Fe^{3+} โดยซูเปอร์ออกไซด์ ทำให้เกิด Fe^{2+} และออกซิเจน ($Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2$) (Liochev and Fridorich, 2002)

ROS มีบทบาททั้งทางด้านที่มีประโยชน์และเป็นอันตรายแก่เซลล์ (Valko et al., 2006) ROS ที่ความเข้มข้นต่ำถึงปานกลางร่างกายจำเป็นต้องใช้ ROS ในการควบคุมสื่อประสาทในการผลิตพลังงาน และกลไกป้องกันการติดเชื้อ รวมถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาที่มีบทบาทในการเป็นตัวส่งสารสำรองของร่างกาย (Buonocore et al., 2010) ในทางตรงกันข้ามหากมี ROS ที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์โดยทำให้เซลล์เกิดสถานะเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน

ความเครียดจากการเกิดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสถานะที่เซลล์เกิดการออกซิไดซ์สูงจากการที่มีระดับ ROS เพิ่มขึ้นมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Mine and Katayama, 2008) ปริมาณ ROS ที่มากเกินไปจะทำลายส่วนประกอบของเซลล์เช่น ไขมัน โปรตีน รวมถึงดีเอ็นเอ ทำให้นำไปสู่โรคร้ายแรงหลายชนิดเช่น โรคมะเร็ง อากาศอักเสบ โรคตับและโรคอัลไซเมอร์ ตลอดจนความแก่ก่อนวัย (Balaban et al., 2005; Finkel, 2005; Hardy and Higgins, 1992; Kawanishi et al., 2002; Loguercio and Federico, 2003; Simmond and Rampton, 1993; Vitaglione et al., 2004) ความอันตรายของ ROS สามารถลดได้โดยการปรับสมดุลด้วยสารต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ (Halliwell, 1996; Valko et al., 2007)

นอกจากนี้โลหะทรานซิชัน เช่น Cu, Fe และ Co ส่งผลกระทบต่อกระบวนการ autoxidation และการสลายของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การเกิดกลิ่นเหม็นหืน อายุการเก็บและการก่อสารพิษในผลิตภัณฑ์ (Nawar, 1996; Pihlanto, 2006) องค์กรประกอบ $-CH=CH-CH_2-CH=CH-$ เป็นโครงสร้างของไขมันไม่อิ่มตัว (PUFAs) มีความไวที่จะเกิดการออกซิเดชันจากอนุมูลอิสระ (Rajapakse et al., 2005a)

2.2 สารต้านอนุมูลอิสระ

ร่างกายมนุษย์สามารถได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระอาจเรียกได้ว่าเป็น “สารอาหารที่สามารถลดผลกระทบจากอนุมูลอิสระทั้งอนุมูลออกซิเจนและไนโตรเจน รวมถึงการเกิดออกซิไดซ์จากโลหะ” (Huang et al., 2005) ในแง่ของอาหารสารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดออกซิไดซ์และชะลอการเกิด autoxidation ได้ในความเข้มข้นต่ำ (Halliwell and Gutteridge, 1990; Mielnik et al., 2003)

ในร่างกายมนุษย์ เซลล์จะป้องกันการเกิดกระบวนการ autoxidation ด้วยการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระทั้งระบบที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ ในระบบที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์นั้น ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) (Matés et al., 1999) สำหรับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ superoxide dismutase (EC 1.15.1.1) กระตุ้นการแตกตัวของ $O_2^{\cdot-}$ เป็น O_2 และ H_2O_2 ที่มีความไวต่อปฏิกิริยาลดน้อยลง (Fridovich, 1995; Matés et al., 1999) เอนไซม์ catalase (EC 1.11.1.6) เป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพสูงสามารถเปลี่ยน H_2O_2 เป็น H_2O และ O_2 (Matés et al., 1999) เอนไซม์ glutathione peroxidase (EC 1.11.1.19) ช่วยเร่งปฏิกิริยารีดักชันของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ROOH และ H_2O_2) โดยการใช้ GSH เป็นตัวให้อิเล็กตรอนทำให้ป้องกันเซลล์สิ่งมีชีวิตถูกทำลายจากกระบวนการออกซิเดชัน (Jornot et al., 1998) การออกซิไดซ์ glutathione (GSSG) จะถูกรีดิทซ์กลับไปเป็น GSH โดยเอนไซม์ glutathione reductase (Gred) โดยใช้ NADPH เป็นตัวให้อิเล็กตรอน

สำหรับสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์จะเป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น วิตามินซี (ascorbic acid), วิตามินอี (α -tocopherol), thiol antioxidants (glutathione thioredoxin และ lipoic acid), carotenoids, flavonoids และ ubiquinol ทำหน้าที่เป็นตัวจับกับ 1O_2 และเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (Chow, 1988; Picardo and Passi, 1997) วิตามินอีหรือ α -tocopherol เป็นวิตามินที่ละลายในไขมัน มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระที่ผนังเซลล์และทำหน้าที่หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ อนุมูลในรูป α -tocopherol สามารถถูกรีดิทซ์กลับไปเป็น tocopherol ที่มีความเสถียรได้โดยวิตามินซีหรือ reduced glutathione (Kojo, 2004; Packer et al., 1979) วิตามินซีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญและมีประสิทธิภาพสูงสามารถละลายในน้ำซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของร่างกาย วิตามินซีทำหน้าที่เป็นตัวจับกับอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนเช่น transferrin, ferritin, lactoferrin และ lactalbumin ที่สามารถจับกับโลหะได้ หรือ carulplasmin และ albumin ที่สามารถสร้างพันธะกับสารทองแดงได้ (Chow, 1988) กิจกรรมและระดับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระทั้งที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์และไม่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์จึงมีความสำคัญต่อการดำรงอยู่ของเซลล์สิ่งมีชีวิตและช่วยทำให้เกิดสุขภาพที่ดียิ่งขึ้น

ในแง่ของอาหาร สารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์ที่ใช้ ได้แก่ 3-ter-butyl-4-hydroxyanisole (BHA), 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT), tertiary-butylhydroxyquinone (TBHQ)

และ propyl gallate มักใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมัน อย่างไรก็ตาม BHA และ BHT มีแนวโน้มที่จะทำลายตับและก่อมะเร็งในตับได้ (Grice, 1986; Wichi, 1988) ดังนั้น จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจมากที่จะศึกษาทดลองเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระทางเลือกอื่น ๆ ที่ได้จากแหล่งธรรมชาติ ที่ช่วยป้องกันสารอนุมูลอิสระในร่างกายและชะลอการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหาร

2.3 เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ในปัจจุบันมีการศึกษาที่เน้นไปทางด้านการแยกและระบุลักษณะของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากแหล่งธรรมชาติเช่นจากพืชและสัตว์ (Sarmadi and Ismail, 2010) เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพคือ เพปไทด์ที่มีลักษณะเฉพาะในการส่งเสริมการทำงานของร่างกาย (Kitts and Wellwe, 2003) เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพไม่ได้เป็นเพปไทด์ที่พบอยู่ในแหล่งโปรตีนทั่วไป แต่เกิดในระหว่างการย่อยในระบบทางเดินอาหาร ในระหว่างการแปรรูปอาหาร หรือการย่อยด้วยเอนไซม์ (Lahl and Braun, 1994; Verduyck et al., 2005) เพปไทด์เหล่านี้มักมีกรดอะมิโน 2-20 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 6,000 ดาลตัน (Meisel and FitzGerald, 2003; Sun et al., 2004) ขึ้นอยู่กับโครงสร้าง องค์ประกอบ คุณสมบัติ และลำดับกรดอะมิโน โดยอาจมีการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ควบคุมความดันโลหิต ระวังอาการปวด ปรับภูมิคุ้มกัน ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็ง และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ โดยอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการเติมลงในอาหาร (Elias et al., 2008; Liu et al., 2008) หนึ่งในหน้าที่สำคัญของเพปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ คือ การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคร้ายหลายชนิด (Gu et al., 2012)

โปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) ประกอบไปด้วยเพปไทด์และกรดอะมิโนที่ได้มาจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ (ทั้งการย่อยโดยเอนไซม์จากภายนอก และการย่อยจากเอนไซม์ที่มีอยู่แล้วในอาหาร) การย่อยด้วยกรดหรือด่าง รวมถึงการย่อยโดยจุลินทรีย์ (Samaranayaka et al., 2010; Sarmadi and Ismail, 2010) วิธีการที่ได้กล่าวมาข้างต้นเป็นการย่อยโดยเติมเอนไซม์ (exogenous enzyme) เป็นกระบวนการที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระเนื่องจากใช้เวลาสั้นกว่ากระบวนการอื่น ๆ ที่ระดับการย่อย และองค์ประกอบเพปไทด์ที่ใกล้เคียงกัน (Samaranayaka and Li-chan, 2011)

เอนไซม์โปรตีเอสสามารถหาได้จากแหล่งต่างๆทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ โดยโปรตีเอสที่ในเชิงพาณิชย์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ เอนไซม์อัลคาเลส ฟลาโวไซม์ นิวเทรส พาเพน ทริปซิน ไคโมทริปซิน แพนครีเอติน เพปซิน และ โบมีเลน (Je et al., 2007) โดยตัวอย่างเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากการใช้เอนไซม์แสดงใน ตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 เพปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ

แหล่งของเพปไทด์	เอนไซม์ที่ใช้ย่อย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	แหล่งอ้างอิง
1. แหล่งจากสัตว์			
Conger eel muscle	Trypsin	Inhibition of lipid peroxidation, hydroxyl and peroxy radical scavenging activity	Ranathunga et al. (2006)
Tuna backbone	Pepsin	Inhibition of linoleic acid autoxidation, DPPH, hydroxyl and superoxide radical scavenging activity	Je et al. (2007)
Hoki (<i>Johnius belengerii</i>) (frame)	Pepsin	Inhibition of linoleic acid autoxidation, hydroxyl, superoxide and peroxy radical scavenging activity, protect MRC-5 cells from oxidant injury by TBHP and protective effects on DNA damage	Kim et al. (2007)
Bigeye tuna dark muscle (by-products)	Pepsin	Inhibition of lipid peroxidation, DPPH, hydroxyl and superoxide radical scavenger activity	Je et al. (2008)
Grass carp muscle	Alcalase	Inhibition of rat liver lipid oxidation and hydroxyl radical scavenger activity	Ren et al. (2008)
Tuna dark muscle (by-products)	Orientase (OR) and protease XXIII (PR)	Inhibition of linoleic acid autoxidation, DPPH, hydroxyl and superoxide radical scavenger activity	Hsu (2010)

ตารางที่ 2.1 เพปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

แหล่งของเพปไทด์	เอนไซม์ที่ใช้อยู่	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	แหล่งอ้างอิง
Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>) scale gelatin	Alcalase	DPPH, superoxide and hydroxyl radical scavenging activity, prevention of cellular and protective effects on DNA damage	Ngo et al. (2010)
Jumbo squid (<i>Dosidicus gigas</i>) muscle	Trypsin	Inhibition of linoleic acid autoxidation, hydroxyl, superoxide and peroxy radical scavenging activity and protect MRC-5 cells from oxidant injury by TBHP	Rajapakse et al. (2005a)
Bullfrog (<i>Rana catesbeiana</i> Shaw.) skin	Alcalase	Inhibition of lipid peroxidation, DPPH, hydroxyl, superoxide, peroxy radical scavenger	Qian et al. (1008b)
Marine rotifer (<i>Brachionus</i> <i>rotundiformis</i>)	Pepsin	DPPH radical scavenging activity	Byun et al. (2009)
Bovine liver sarcoplasmic	Thermolysin	DPPH radical scavenging activity, reducing power (FRAP assay) and Fe ²⁺ chelating activity	Di Bernardini et al. (2011)
Hen egg white lysozyme	The mixture of trypsin and papain	DPPH, ABTS radical scavenging activity and Fe ²⁺ chelating activity, inhibition of linoleic acid peroxidation	Memarpoor-Yazdi et al. (2012)

ตารางที่ 2.1 เพปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

แหล่งของเพปไทด์	เอนไซม์ที่ใช้ย่อย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	แหล่งอ้างอิง
2. แหล่งจากพืช			
β -conglycinin (7s protein)	Protease S	Inhibition of linoleic acid peroxidation	Chen et al. (1995)
Corn gluten	Alcalase	Inhibition of pyrogallol autoxidation	Zheng et al. (2006)
Algae protein waste	Pepsin	Hydroxyl, superoxide, peroxy, DPPH and ABTS radicals scavenging activity, protective effects on DNA and prevention of cellular damage	Sheih et al. (2009)
Potato protein	The mixture of Pancreatin and Amino-P	Inhibition of linoleic acid peroxidation, Inhibition of lipid oxidation in the erythrocyte membrane ghost and reduced ethanol-induced gastric mucosal damage	Kudo et al. (2009)
Rice endosperm protein	Neutrase	Inhibition of lipid peroxidation, hydroxyl, DPPH, superoxide and radical scavenging activity, protect MRC-5 and RAW264.7 cells from oxidant injury by TBHP and prevention of cellular damage	Zhang et al. (2010)
Chickpea (<i>Cicer arietium</i> L.)	Alcalase 2.4 L FG	DPPH, hydroxyl and superoxide free radicals, Fe ²⁺ and Cu ²⁺ chelation ability, inhibition of linoleic acid peroxidation	Zhang et al. (2011)

ตารางที่ 2.1 เพปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

แหล่งของเพปไทด์	เอนไซม์ที่ใช้ย่อย	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	แหล่งอ้างอิง
Walnut (<i>Juglans regia</i> L.)	Pepsin	Quench the hydroxyl radical, chelate ferrous ion, exhibit reducing power and inhibit the lipid peroxidation.	Chen et al. (2012)
Whey	Alcalase	Reducing power, inhibiting H ₂ O ₂ induced oxidative damage in MRC-5 cells by neutralize radicals and other ROS, elevating the activity of SOD, CAT, GSH-Px and decreased the level of malonaldehyde (MDA)	Kong et al. (2012)
Chickpea (<i>Cicer arietinum</i> L.) albumin	Sequentially using Alcalase and Flavorzyme	Reducing power, DPPH, TEAC, and hydroxyl radical scavenging activity	Kou et al. (2013)
<i>Zizyphus jujube</i> fruits	Trypsin	DPPH and ABTS radical scavenging activity, Fe ²⁺ chelation ability, reducing power and inhibition of linoleic acid peroxidation	Memarpour-Yazdi et al. (2013)

2.4 เพปไทด์จากเลือด

เลือดเป็นแหล่งโปรตีนที่มีศักยภาพในการผลิตเพปไทด์ โดยพบว่าโปรตีนจากพลาสมา (plasma) และเม็ดเลือดแดงของหมูเมื่อนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ผสมระหว่างทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ทำให้ได้เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินเปลี่ยนรูป (angiotensin-converting enzyme; ACE) ดีที่สุด ในขณะที่พลาสมาที่ผ่านการกำจัด fibrinogen (defibrinated plasma) ทำให้ได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งต่ำกว่า นอกจากนี้ การใช้เอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) และฟลาโวไซม์ (Flavourzyme) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เพปไทด์ที่ยับยั้ง ACE ต่ำกว่า เอนไซม์ผสมทริปซินและไคโมทริปซิน (Wei and Chiang, 2009) นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังพบว่าเพปไทด์ที่ได้ยังแสดงคุณสมบัติในการลดอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) อีกด้วย ไฮโดรไลเสทของฮีโมโกลบินหมูด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและฟลาโวไซม์ แสดงความสามารถในการจับเหล็ก และอนุมูลอิสระได้ดี โดยไฮโดรไลเสทที่มีขนาดใหญ่มีคุณสมบัติดีกว่าขนาดเล็ก (Chang et al., 2007)

นอกจากนี้ Sun et al. (2011) พบว่า ไฮโดรไลเสทของฮีโมโกลบินหมูที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin) แสดงคุณสมบัติในการจับอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด และ Sun et al. (2012) พบว่า เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คือ ARRLGHDFNPDVQAA ซึ่งแสดงคุณสมบัติในการลดออกซิเดชันของไขมันได้ดีกว่า α -tocopherol ไฮโดรไลเสทจากพลาสมาวัวด้วยเอนไซม์เพปซินยังแสดงคุณสมบัติในการปกป้องการกลายพันธุ์ของ DNA (DNA gene mutation) (Park and Hyun, 2002) นอกจากนี้ Xu et al. (2009) พบว่า ไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อยพลาสมาหมูด้วยเอนไซม์เพปซินและปาเพน (papain) แสดงคุณสมบัติในการลดออกซิเดชันของไขมันได้ดีกว่า α -tocopherol นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติในการลดอนุมูลอิสระสังเคราะห์ (DPPH) และมีความสามารถในการจับไอออน (chelating agent) สูงกว่า ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) Wang et al. (2008) พบว่าไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อย plasma albumin จากหมูด้วยเอนไซม์อัลคาเลสซึ่งมีมวลโมเลกุล <3 กิโลดาลตัน แสดงคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูล DPPH \cdot , hydroxyl (\cdot OH) และ superoxide ($O_2\cdot^-$) ได้ดีกว่าไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อย plasma globulin นอกจากนี้ Zhang et al. (2008) พบว่า ไฮโดรไลเสทที่ได้จากการย่อย plasma albumin จากหมูด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีผลลดการเกิดออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย 4-Nitroquinoline 1-oxide (4-NQO) ซึ่งจัดเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) นอกจากนี้ ยังพบ opioid peptide ที่ได้จากการย่อยฮีโมโกลบินของวัวด้วยเอนไซม์เพปซิน (Piot et al., 1992) โปรตีนจากเลือดเป็นสารตั้งต้นของเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีศักยภาพ โดยสามารถใช้ผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติหลากหลายทั้งเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ลดความดัน ป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ DNA ซึ่งมีนัยว่าสามารถลดความเสี่ยงของมะเร็ง โดยเพปไทด์ที่ได้ขึ้นอยู่กับกระบวนการผลิต หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ และระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis)

ไฮโดรไลเซสที่ได้จากย่อยพลาสติกมาหุ้มด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง lipid oxidation และลดอนุมูลอิสระต่างๆ รวมถึง DPPH., hydroxyl ($\cdot\text{OH}$) และ superoxide ($\text{O}_2\cdot^-$) (Liu et al. 2009) ซึ่งต่อมาพบว่าเพปไทด์ที่มีบทบาทดังกล่าวคือ His-Asn-Gly-Asn (Liu et al., 2010) ทีมคณะวิจัยเดียวกันยังพบว่าไฮโดรไลเซสของพลาสติกมาหุ้มเมื่อนำมาผ่านกระบวนการแยกด้วย ultrafiltration แล้วมีผลลด oxidative stress ของเซลล์ตับหนู จากการทดสอบโดยการให้ไฮโดรไลเซสในหนูทดลอง (Liu et al., 2011)

Mito et al. (1996) ศึกษาความสามารถในการลดความดันของไฮโดรไลเซสของฮีโมโกลบินจากหมูในหนูทดลองที่มีความดันเลือดสูง (spontaneously hypertensive rats) และพบว่าไฮโดรไลเซสดังกล่าวมีผลลดความดันได้ โดยสามารถระบุเพปไทด์ ที่แสดงคุณสมบัติได้ 4 ชนิด คือ Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala, Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Gly, Phe-Gln-Lys-Val-Val-Ala-Lys และ Gly-Lys-Lys-Val-Leu-Gln

นอกจากนี้ การย่อยฮีโมโกลบินจากเลือดวัวด้วยเอนไซม์เพปซิน ทำให้ได้เพปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Micrococcus luteus* A270, *Listeria innocua*, *Escherichia coli* และ *Salmonella enteritidis* โดยค่าต่ำสุดในการยับยั้ง (Minimum inhibitory concentrations, MIC) เชื้อ *L. innocua* คือ $38\ \mu\text{M}$ ในขณะที่แบคทีเรียชนิดอื่นมีค่า MIC เท่ากับ $76\ \mu\text{M}$ (Daoud et al., 2005) ต่อมา Nedjar-Arroume et al. (2008) พบเพปไทด์ 30 ท่อนที่ได้จากการย่อยฮีโมโกลบินจากเลือดวัวด้วยเอนไซม์เพปซินที่แสดงฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua* และ *Micrococcus luteus* ซึ่งแสดงถึงศักยภาพของการเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ทางธรรมชาติ (natural antimicrobial agent)

จะเห็นได้ว่าเลือดเป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูกสำหรับการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ที่มีคุณสมบัติหลากหลายซึ่งเพปไทด์ที่ได้จะมีมูลค่ามากกว่าผลิตภัณฑ์เลือดต้มที่จำหน่ายในปัจจุบัน ดังนั้นแนวคิดของการใช้เลือดเป็นวัตถุดิบในการผลิตเพปไทด์ จึงไม่เพียงแต่เป็นการใช้ประโยชน์จากผลิตผลพลอยได้ แต่เป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตผลพลอยได้อีกทางหนึ่ง และสอดคล้องกับแนวคิดของกระบวนการผลิตแบบไร้ของเสีย (zero discharge) เพื่อให้เกิดองค์ความรู้ทางวิชาการและการนำไปประยุกต์ใช้ได้จริงจำเป็นต้องทราบชนิดของโปรตีนในเลือดไก่ที่เป็นสารตั้งต้นที่ดีที่สุดและเอนไซม์ที่เหมาะสมที่สุดทั้งในด้านต้นทุนรวมถึงคุณสมบัติของเพปไทด์ที่ได้ ซึ่งสารตั้งต้นและเอนไซม์ที่เหมาะสมอาจแตกต่างกันขึ้นกับคุณสมบัติของเพปไทด์ที่มุ่งผลิต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) ได้แก่ angiotensin converting enzyme (ACE), hippuric acid (HA) hippuryl histidyl leucine (HHL), 2,4,6- trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS), L- leucine, tert- butyl hydroperoxide (tBuOOH) และ 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) เอนไซม์พาเพน (papain, EC 3.4.22.2, 10 หน่วยต่อมิลลิกรัม), เอนไซม์เทอร์โมไลซิน (thermolysin, EC 3.4.24.27, 40 หน่วยต่อมิลลิกรัม) จาก *Bacillus thermoproteolyticus rokko* และเอนไซม์ (pepsin, EC 3.4.23.1, 596 หน่วยต่อมิลลิกรัม) จากกระเพาะหมู ส่วนเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase, EC 3.4.21.62, 2.4 Anson หน่วยต่อกรัม) จาก *Bacillus licheniformis*, Subtilisin A จากบริษัท Novozymes (Bagsvaerd, Denmark) Dimethylsulfoxide (DMSO) จากบริษัท AMRESCO (Fountain Parkway Solon, OH, USA) Hank's balance salts solution (HBSS) และ 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) จากบริษัท Invitrogen Molecular Probes (Eugene, OR, USA) สารเคมีจากบริษัท Gibco Invitrogen (Grand Island, NY, USA) ได้แก่ Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), HEPES buffer solution, Phosphate buffer saline (PBS), Penicillin Streptomycin และ Trypsin-EDTA 0.25% และสารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ (Analytical grade)

3.2 การเตรียมตัวอย่าง

เลือดจากไก่เนื้อทางการค้า (*Gallus gallus*) จากโรงเชือดไก่ อ.ปทุมธานี จ.นครราชสีมา ซึ่งได้รับมาตรฐานจากกรมปศุสัตว์ ป้องกันการแข็งตัวของเลือดโดยเติมสารละลายโซเดียมซิเตรททันทีที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 1% แยกส่วนเม็ดเลือดจากพลาสมาด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ 2,530 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 15 นาที (Hitachi CR22GIII, Hitachi Koki Co. Ltd., Tokyo, Japan) จากนั้นนำแต่ละส่วนทำแห้งแบบระเหิดแห้ง (freeze drying) ตัวอย่างคือ เลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) เก็บตัวอย่างผงแห้งที่ -20 °C ตลอดระยะเวลาที่ศึกษา

3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ปริมาณโปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น วิเคราะห์ตามวิธีของ AOAC (2000)

3.4 วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE

วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนของเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดแดงที่เตรียมได้วิธี SDS-PAGE โดยละลายตัวอย่างลงในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecyl sulfate; SDS) เข้มข้น 5% ในอัตราส่วน 1:100 เตรียม Stacking gels เข้มข้น 4% และ Running gel เข้มข้น 15 % วิเคราะห์ตัวอย่างที่ปริมาณโปรตีน 15 ไมโครกรัม ย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R250 เข้มข้น 0.25% เป็นเวลา 45 นาที และล้างสีด้วยสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 7.5% และเมทานอลเข้มข้น 5%

3.5 ศึกษาชนิดของเอนไซม์และองค์ประกอบของเลือดไก่สำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

3.5.1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

ตัวอย่างที่ศึกษาคือ เลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) และคัดเลือกชนิดของเอนไซม์สำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท โดยศึกษาชนิดของเอนไซม์ได้แก่อัลคาเลส (pH 8.0, 60 °ซ), พาเพน (pH 7.0, 60 °ซ), เฮอร์มิไลซิน (pH 8.0, 70 °ซ), และเพปซิน (pH 2.0, 37 °ซ) ในอัตราส่วน E:S (1:100) เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์ที่ 95 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น ปรับ pH เป็นกลาง และปั่นเหวี่ยง 10000 ×g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ระดับการย่อย (degree of hydrolysis; DH) ด้วยวิธี 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) และเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ

3.5.2 วิเคราะห์ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH)

ส่วนใส (supernatant) วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มแอลฟาอะมิโน (α -amino group) ของไฮโดรไลเสท โดยทำปฏิกิริยากับ 2, 4, 6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) ตามวิธีของ Adler-Nissen (1979) โดยใช้ลิวซีน (leucine) เป็นสารมาตรฐาน นำตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) เติมสารละลายฟอสเฟตเข้มข้น 0.2125 โมลาร์ ที่ pH 8.2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมสารละลาย TNBS เข้มข้น 0.05% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 50 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิตร ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เขย่าให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (SmartSpec™ Plus, Bio-Rad Laboratories, California, USA) แสดงค่าการย่อยสลายในหน่วยมิลลิโมลาร์ของกลุ่มแอลฟาอะมิโนเทียบกับลิวซีน (Leucine) คำนวณค่าระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ตามสมการดังนี้

$$DH (\%) = [(h_s - h_o) / h_{tot}] \times 100$$

โดย h_s คือปริมาณ α -amino ของไฮโดรไลเสทที่เวลาต่างๆ h_o คือปริมาณ α -amino ในตัวอย่างที่ไม่ถูกย่อยที่เวลา 0 ชั่วโมง และ h_{tot} คือปริมาณ α -amino ทั้งหมด ที่ได้จากนำตัวอย่างผง

ของแต่ละองค์ประกอบที่แยกได้ย่อย ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล ที่ 120 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3 ศึกษาเวลาสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

ตัวอย่างที่ศึกษาคือ พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) และเลือกศึกษาชนิดของเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (pH 8.0, 70 °ซ) และเพปซิน (pH 2.0, 37 °ซ) ในอัตราส่วน E:S (1:100) เป็นเวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่ 95 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็น ปรับ pH ให้เป็นกลาง และปั่นเหวี่ยง 10000 xg ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ระดับการย่อย (DH) ผ่านวิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลฟาอะมิโน (α -amino) ตามรายละเอียดในข้อ 3.5.2 และเก็บส่วนใสที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ตามรายละเอียดในข้อ 3.6.1

3.6 คุณสมบัติด้านการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant properties)

3.6.1 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ (ABTS⁺ assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีของ Arnao and Acosta (2001) โดยปิเปตตัวอย่าง 20 ไมโครลิตรและสารละลาย 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS) เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1,980 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ (trolox) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยมิลลิกรัมโทรลอกซ์ต่อมิลลิกรัมสมมูลของลิวิซิน

3.6.2 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Fe³⁺ (FRAP assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ตามวิธีของ Benzie and Strain (1996) โดยวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกเป็นเฟอร์รัส ปิเปตตัวอย่าง 100 ไมโครลิตรซึ่งมีปริมาณเพปไทด์ เข้มข้น 0.13 มิลลิกรัมสมมูลของลิวิซินต่อมิลลิลิตร และสารละลายผสม 1000 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร FeCl₃. 6 H₂O เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ อะซิเตทบัฟเฟอร์เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร pH 3.6 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นาน 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานโทรลอกซ์ ความสามารถในการรีดิวซ์แสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐานโทรลอกซ์

3.6.3 ความสามารถในการจับกับโลหะ (Metal chelating assay)

วิเคราะห์ความสามารถในการจับโลหะเฟอร์รัสไอออน ตามวิธีของ Decker and Welch (1990) โดยปิเปตตัวอย่างเพปไทด์ (ความเข้มข้น 0.1-0.5 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร FeCl_2 เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน EDTA ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน EDTA

3.6.4 ฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical scavenging assay)

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทมาวิเคราะห์ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิล ตามวิธีของ Sakanaka and Tachibana (2006) โดยปิเปตตัวอย่างเพปไทด์ (ความเข้มข้น 0.3-0.5 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นปราศจากไอออนปริมาตร 525 ไมโครลิตร โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.2 โมลาร์ pH 7.4 ปริมาตร 450 ไมโครลิตร สารละลาย 2-deoxyribose เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร สารละลายผสม FeSO_4 -EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมกรดไทรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 2.8% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และ thiobarbituric acid เข้มข้น 1.0% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นในน้ำแข็ง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (A_{520}) คำนวณความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่างดังสมการ

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{1 - A_{520} \text{ of sample}}{A_{520} \text{ of control}} \times 100$$

Control คือ ตัวอย่างที่เติมน้ำปราศจากไอออนแทนตัวอย่างเพปไทด์

3.7 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง (*In vitro* gastrointestinal (GI) digestion)

ศึกษากิจกรรมต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างหลังจากผ่านระบบย่อยอาหารจำลองโดยใช้ เอนไซม์เพปซิน (pepsin) และแพนครีเอติน (pancreatin) ตามวิธีของ Cinq-Mars et al. (2008) ดังนี้ ละลายตัวอย่างแห้ง 250 มิลลิกรัมด้วยน้ำปราศจากไอออน 15 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อตัวอย่าง 1: 35 (w/w) ที่ pH 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 37°C เมื่อครบเวลาปรับ pH เป็น 5.3 ด้วยสารละลายอิมิตัว NaHCO_3 และปรับเป็น pH 7.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 10 นอร์มอล ย่อยต่อด้วยเอนไซม์แพนครีเอตินในอัตราส่วนเอนไซม์ต่อตัวอย่าง 1: 25 (w/w) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่ 37°C องศาเซลเซียส หยุดการทำงานของเอนไซม์โดยการต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที นำไป

ปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณแอลฟา-อะมิโน (α -amino) ด้วยวิธี TNBS ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺

3.8 การวิเคราะห์รูปแบบการกระจายตัวของมวลโมเลกุลของไฮโดรไลสเสทด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)

เตรียมสารละลาย α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (Bruker Daltonik GmbH) ในตัวทำละลายที่เตรียมได้จากการผสมระหว่าง acetonitrile และ trifluoroacetic acid เข้มข้น 0.1% ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 ตามลำดับ ปริมาณรวม 10 มิลลิกรัม จากนั้นผสมกับตัวอย่างเพปไทด์หยาบผสม ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงบนแผ่นรองรับที่อยู่บน อุปกรณ์ Reflector ของเครื่อง Mass spectrometer ปลดปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง วิเคราะห์การกระจายมวลด้วยเครื่อง MALDI-TOF mass spectrometer โดยใช้แสงเลเซอร์ที่ 337 นาโนเมตร โดยกำหนดค่าควบคุมที่สำคัญ ได้แก่ Positive polarity, Acceleration voltage ที่ 20 กิโลโวลต์, IS/2 ที่ 17 กิโลโวลต์, Focusing lens voltage ที่ 8.90 กิโลโวลต์, และ Extraction delay ที่ 400 นาโนวินาที ในหนึ่งตัวอย่างจะเก็บข้อมูลสะสมประมาณ 100 ครั้ง จากตำแหน่งของตัวอย่างที่ต่างกันประมาณ 3-4 ตำแหน่ง

3.9 วิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโน (Amino acid profile)

วิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนตามวิธี AOAC 994.12 และ 988.15 (2000) เตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมด (total amino acid) โดยย่อยตัวอย่างด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล ในหม้อนึ่ง (autoclave) ที่อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระเหยสารละลายส่วนใสด้วย Vacuum rotary evaporator นำตะกอนที่ได้จากการระเหยแห้งมาละลายด้วยน้ำปราศจากไอออน 10 มิลลิตร จากนั้นกรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร วิเคราะห์กรดอะมิโนทั้งหมดทั้งหมด (total amino acids) ด้วย Amino acid analyzer (AAA) สำหรับการวิเคราะห์กรดอะมิโนที่มีองค์ประกอบของซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ นำตัวอย่างทำปฏิกิริยากับกรดเปอร์ฟอร์มิกที่มีส่วนประกอบของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เข้มข้น 30% และกรดฟอร์มิก (formic acid) เข้มข้น 98% ในอัตราส่วน 1:9 โดยทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 0 ถึง -5 °ซ ข้ามคืน กำจัดกรดเปอร์ฟอร์มิกด้วยการเติมโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ จากนั้นนำตัวอย่างไปย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกตามรายละเอียดข้างต้น ส่วนการวิเคราะห์กรดอะมิโนทริปโตแฟน ย่อยตัวอย่างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 4.25 โมลาร์ อุณหภูมิ 110 °ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ปรับ pH ของตัวอย่างเป็น 4.25 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก กรองตัวอย่างผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วย Amino acid analyzer (AAA) โดยใช้คอลัมน์ Ion exchange โดยอาศัยหลักการ Post-column derivatization กับ ninhydrin และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร สำหรับกรดอะมิโน Proline ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

3.10 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

คัดเลือกส่วนของไฮโดรไลสเสทที่มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระสูงนำมาวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง Ultimate 3000 LC System (Dionex Ltd., Surrey, UK) ที่ต่อกับระบบ ESI-Ion Trap MS (HCT Ultra PTM Discovery System, Bruker, Daltonics, Germany) และ electrospray ionization แสดงรูปแบบ peptide mass ในโหมด positive ion โดยใช้ ESI-MS/MS และ nanocolumn (Acclaim PepMap 100 C18, 3 mm, 100A, 75 mm i.d. × 150 mm) ชะตัวอย่างแบบ gradient ด้วยสารละลาย mobile phase A คือ กรดฟอร์มิก (formic acid) เข้มข้น 0.1% ในน้ำ และจาก 0 – 70% ของ mobile phase B หรืออะซิโตไนไตรล์เข้มข้น 80% และกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.1% แบบ gradient ด้วยอัตราการไหล 300 นาโนลิตรต่อนาที เป็นเวลา 13 นาที วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี (de novo amino acid sequencing) ด้วยโปรแกรม Pepnovo (URL <http://proteomics.ucsd.edu/LiveSearch/>) และระบุโปรตีนที่เกี่ยวข้องจากฐานข้อมูล NCBI Protein Blast (chicken taxid:9031) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

3.11 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

3.11.1 การเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการทดลอง คือ เซลล์มะเร็งตับ (HepG2: Human liver cancer HepG-2 cells, ATCC, Manassas, VA, USA) เลี้ยงเซลล์ในขวดขนาด 75 ตารางเซนติเมตร ในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) ผสมด้วย Fetal bovine serum เข้มข้น 10%, HEPES เข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 เพนนิซิลินเข้มข้น 0.134 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสเตรปโตมัยซินเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มเซลล์ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% จนกระทั่งเซลล์แผ่กระจายตามพื้นผิวของขวดเลี้ยงเซลล์ประมาณ 80 ถึง 90% จากนั้นทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดโดยการเติมสารละลาย Trypsin-EDTA เข้มข้น 0.25% ล้างเซลล์ที่ได้ด้วยสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer saline, PBS) pH 7.4 เก็บเซลล์นี้ใช้ในการทดลอง

3.11.2 การป้องกันความเป็นพิษที่เหนียวน้ำโดย *Tert*-butylhydroperoxide (tBuOOH) ในเซลล์มะเร็งตับ HepG2

ปิเปตเซลล์ที่เตรียมตามข้อ 3.11.1 ใส่ในจานอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ 3×10^4 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์เต็ม (DMEM) จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมนิวโปรตีนไฮโดรไลสเสทที่เตรียมตามข้อ 3.3.1 ที่ผ่านการย่อยที่ 4 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิเต็มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมสารละลาย tBuOOH ความเข้มข้นสุดท้าย 500 ไมโครโมลาร์ บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิเต็มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปิเปตสารละลาย tBuOOH ที่เติมสารละลาย 3-(4, 5-

dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม บ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 °ซ ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง และเติมสารละลาย DMSO เข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร ความสามารถของโปรตีนไฮโดรไลเซสในการป้องกันความเป็นพิษจาก tBuOOH แสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (% Cell viability)

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{average OD of test group}}{\text{average OD of control group}} \times 100$$

3.11.3 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

นำตัวอย่างไฮโดรไลเซสที่เตรียมตามข้อ 3.5 ที่ผ่านการย่อยที่ 4 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) เก็บเกี่ยวเซลล์ HepG-2 ที่เลี้ยงใน Tissue culture flask ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร โดยการใช้วิธี Trypsinize เติมเซลล์ HepG-2 (3×10^4 เซลล์ต่อหลุม) ที่อยู่ใน complete media ลงไปในหลุมของ 96 well plate costar black/clear bottom จากนั้นบ่มเซลล์เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่ 37 °ซ และ 5% CO₂ ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วย HBSS 3 ครั้ง วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ด้วยไฮโดรไลเซสที่ความเข้มข้น 100, 50, 25 และ 12.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตัวอย่างควบคุม ได้แก่ วิตามินซี เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ และบ่มจนกระทั่งครบ 24 ชั่วโมง ล้างสารสกัดออกจากเซลล์ด้วย HBSS 3 ครั้ง และเติม DCFH-DA เข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ ที่อยู่ใน HBSS และบ่มในที่มีมืดอีกเป็นเวลาอีก 30 นาที ล้าง DCFH-DA ออก ด้วย HBSS 3 ครั้ง และ สุดท้ายเติมตัวกระตุ้น tBuOOH เข้มข้น 500 ไมโครโมลาร์ แล้วบ่มต่อไปเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ DCFH จะถูกออกซิไดซ์เป็น DCF ซึ่งสามารถเรืองแสงได้ ถ้าเพปไทด์ที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะทำให้การเรืองแสงของ DCF ลดลง ซึ่งติดตามด้วยเครื่อง Spectramax Gemini EM fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (Emission wavelength) 530 นาโนเมตร รายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของตัวอย่างในค่า Reactive oxygen species inhibition (%)

3.12 การแยกเพปไทด์

3.12.1 แยกด้วย Size exclusion chromatography (SEC)

เตรียมตัวอย่างสารละลายไฮโดรไลเซสเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แยกขนาดเพปไทด์ด้วยคอลัมน์ Superdex Peptide 10/300 GL (10 mm x 300 mm, Amersham Biosciences) ที่ต่อกับเครื่อง Fast protein liquid chromatography (Amersham Biosciences, United Kingdom) และ

ใช้ 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) ที่มี 30% acetonitrile เป็นสารละลายที่ชะเพปไทด์ โดยใช้ อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215, 254 และ 280 นาโนเมตร เก็บแฟร็กชัน (fraction) ที่เกิดขึ้นแล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Speed vacuum centrifuge ที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS⁺ และคัดแยกตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงไปทำการแยกเพปไทด์ด้วยเทคนิค Reverse-phase ต่อไป

3.12.2 การแยกด้วย Reverse-phase chromatography (RP-FPLC)

ละลายตัวอย่างจากข้อ 3.9.1 ด้วยน้ำปราศจากไอออน แล้วนำไปแยกด้วยคอลัมน์ Reversed-phase (150 x 4.6 mm, GE Healthcare Bio-Sciences AB) โดยใช้อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้ mobile phase A (0.1% TFA ในน้ำปราศจากไอออน) และ mobile phase B (0.1% TFA ใน acetonitrile) โดยไล่ระดับความเข้มข้น 20 ถึง 100 % ของ mobile phase B วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 215, 254 และ 280 นาโนเมตร เก็บ fraction ที่แยกได้แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่อง Speed vacuum centrifuge ที่ 2,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ -20°C เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต่อไป

3.13 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; ANOVA) และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics for Windows เวอร์ชัน 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)

3.14 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.14.1 ห้องปฏิบัติการวิจัยอาหาร 2 ห้อง F03214A ชั้น 2 อาคารเครื่องมือ 3 (F3) ของสาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามเลขทะเบียนห้องปฏิบัติการหมายเลข 2-0080-0046-0 ตามกองมาตรฐานงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

3.14.2 ห้องปฏิบัติการทางด้านเพาะเลี้ยง/ทดสอบในระดับเซลล์ (Cell Culture Laboratory) ห้อง F9424 อาคารเครื่องมือ 9 (F9) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.14.3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ศควท.) อาคารเครื่องมือ 10 และ 11 (F10-11) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

3.11.4 โรงประลองกำลัง (Pilot plant) อาคารเครื่องมือ 1 สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ.นครราชสีมา

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลงานวิจัย

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดไก่

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือดไก่โดยประมาณ (Proximate composition)

เม็ดเลือด (blood corpuscle, BC) มีปริมาณโปรตีนสูงสุด คือ 90.8% ส่วนเลือด (whole blood, B) มีปริมาณโปรตีนคิดเป็น 75.6% และพลาสมา (plasma, P) มีปริมาณโปรตีน 47.6% (ตารางที่ 4.1) ไขมันจากเลือดและเม็ดเลือดไม่ต่างกัน คือ ประมาณ 0.6% ส่วนไขมันจากพลาสมามีค่าน้อยสุด 0.45% ในขณะที่ถ้าจากพลาสมามีปริมาณสูงสุด คือ 28.4% ทั้งนี้เนื่องจากโซเดียมซิเตรท (sodium citrate) ที่เติมลงไปเพื่อป้องกันการจับตัวของเลือด ปริมาณเถ้าที่สูงในเลือด คือ 12.14% ก็เป็นเหตุผลเดียวกัน ในขณะที่เม็ดเลือดมีปริมาณเถ้าคิดเป็น 3.83% ซึ่งเหลืกน่าจะเป็นแร่ธาตุหลักของเม็ดเลือด จะเห็นได้ว่าเลือด พลาสมา หรือเม็ดเลือด เป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญและมีไขมันต่ำ ซึ่งแสดงถึงศักยภาพในการเป็นวัตถุดิบของการผลิตไฮโดรไลเสท

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดจากไก่

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี (%)			
	ความชื้น	*โปรตีน	*ไขมัน	*เถ้า
เลือดทั้งหมด (whole blood)	2.42 ± 0.21	75.55 ± 0.12	0.67 ± 0.08	12.14 ± 0.09
พลาสมา (plasma)	4.33 ± 0.31	47.55 ± 0.33	0.45 ± 0.02	28.43 ± 0.06
เม็ดเลือด (blood corpuscle)	0.99 ± 0.21	90.79 ± 0.45	0.62 ± 0.09	3.83 ± 0.01

หมายเหตุ: * หมายถึง ร้อยละฐานแห้ง (Dry basis: DB)

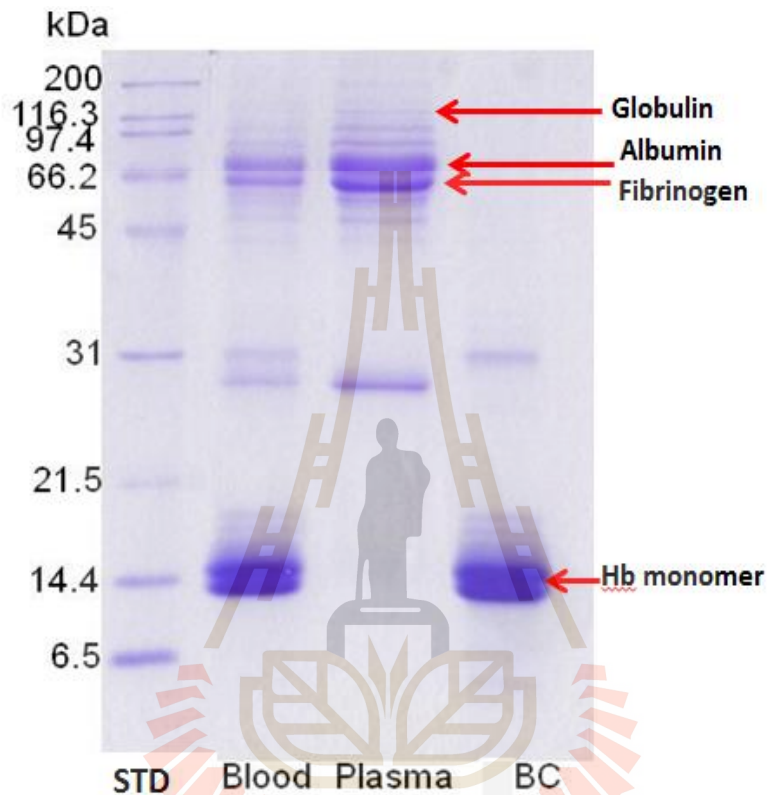
4.1.2 รูปแบบโปรตีน (Protein pattern)

โปรตีนหลักในเม็ดเลือดคือฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (รูปที่ 4.1) ซึ่งเป็น tetramer ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 14 กิโลดาลตัน โดยฮีโมโกลบินปรากฏทั้งในเลือด และ เม็ดเลือด ในขณะที่โปรตีนหลักในพลาสมาคือโกลบูลิน (globulin) และอัลบูมิน (albumin) ซึ่งมีขนาดประมาณ 100 และ 66 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ไฟบริโนเจน (fibrinogen) ก็เป็นโปรตีนที่สำคัญที่พบในพลาสมา และเป็นโปรตีนสำคัญในการเกิด fibrin clot หรือลิ่มเลือด

4.1.3 รูปแบบกรดอะมิโน (Amino acid profile)

เม็ดเลือดมีปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดสูงสุดคือประมาณ 99% (ตารางที่ 4.2) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Total nitrogen (ตารางที่ 4.1) โดยกรดอะมิโนหลักคือ Pro, Lys, Lue, His, Phe, Glu/Gln Asp/Asn และ Val (ตารางที่ 4.2) พลาสมา มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนทั้งหมดเพียง 55% ซึ่งอาจเป็นเพราะโซเดียมซิเตรทที่เติมลงไป โดยกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ

Glu/Gln และ Val ในขณะที่กรดอะมิโนที่สำคัญในเลือดคือ Glu/Gln, Val, Lue, Asp/Asn และ Cys มีในปริมาณสูงของทั้งสามส่วน กรดอะมิโนหลายชนิด เช่น Tyr, Met, His, Lys, Leu, Ile และ Trp มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Liu et al., 2010) ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าโปรตีนเลือดประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีคุณค่าทางโภชนาการและอาจเป็นสารตั้งต้นที่มีศักยภาพในผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ



รูปที่ 4.1 รูปแบบ SDS-PAGE ของเลือดไก่ประกอบด้วยเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดที่ 15% separating gel ปริมาณโปรตีนที่โหลดเจลที่ 15 ไมโครกรัม (Lane 1; STD = standard marker, Lane 2; Whole blood, Lane 3; Plasma, Lane 4; BC = Blood corpuscle)

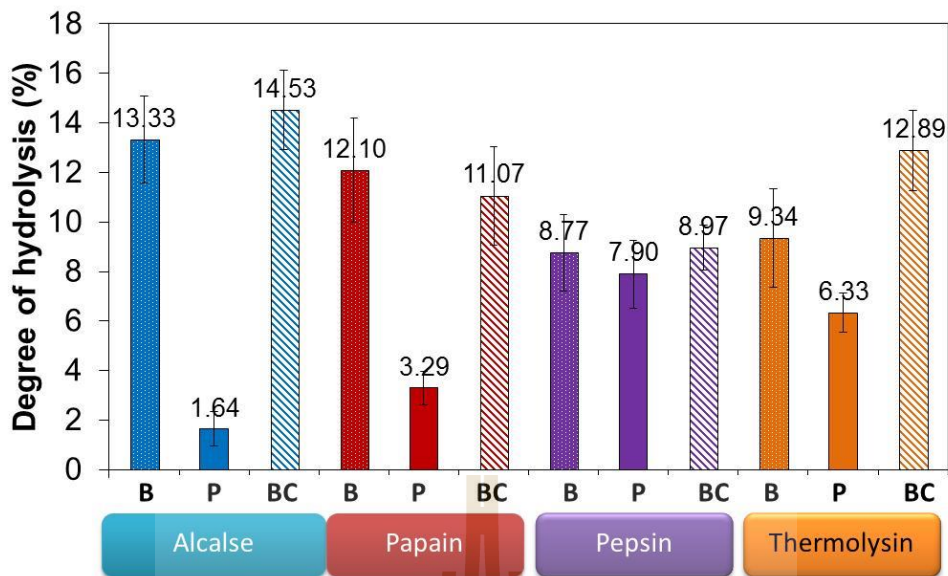
ตารางที่ 4.2 ปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดของเลือด พลาสมาและเม็ดเลือด (กรัมต่อ100 กรัม)

Amino acid	Whole blood	Plasma	Blood corpuscle
Asp/Asn	5.69	4.45	7.00
Thr	2.84	2.8	3.63
Ser	2.27	3.01	2.61
Glu/Gln	7.27	6.78	8.24
Gly	3.45	2.79	3.91
Ala	4.45	2.49	5.67
Cys	5.32	3.5	3.68
Val	7.26	5.21	8.03
Met	0.90	0.84	1.01
Ile	3.17	2.07	3.75
Leu	6.83	4.09	8.57
Tyr	2.43	2.53	1.56
Phe	4.08	2.37	5.78
His	4.59	1.72	5.73
Trp	1.13	1.32	1.38
Lys	6.9	4.01	9.03
Arg	3.65	3.23	4.19
Pro	2.68	2.71	15.2
Total	74.9	55.91	98.96

4.2 ศึกษาชนิดของเอนไซม์และส่วนย่อยของเลือดที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

4.2.1 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH)

ระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสทหรือเพปไทด์จากเลือดและเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีค่าสูงสุด (รูปที่ 4.2, $p < 0.05$) โปรตีนพลาสมาถูกย่อยได้ดีต่ำโดยอัลคาเลสและพาเพน ทั้งนี้ อาจเนื่องจากสารยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitor) ในเลือด เพปซินแสดงความสามารถในการย่อยโปรตีนเลือดทั้ง 3 ส่วนได้ค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อีก 3 ชนิด จะเห็นได้ว่าสารตั้งต้นและเอนไซม์มีผลต่อระดับการย่อยอย่างมาก



รูปที่ 4.2 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscles; BC) ด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง

4.2.2 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ (ABTS⁺ assay)

เมื่อวิเคราะห์คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองโดยวัดความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงที่สุด รองลงมาพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน ส่วนเลือดย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีกิจกรรมต่ำสุด ($p < 0.05$, รูปที่ 4.3) คุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสขึ้นอยู่กับระดับการย่อย ชนิดและลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ นอกจากนี้ในตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือด มีกรดอะมิโน Trp, Tyr และ His ซึ่งมีหมู่ indolic, phenolic และ imidazole ตามลำดับ สามารถให้โปรตอนกับอนุมูลอิสระได้ โดยโปรตีนไฮโดรไลสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินอาจมีส่วนของกรดอะมิโนดังกล่าวในปริมาณสูงกว่าตัวอย่างอื่น ๆ ดังนั้นความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จึงสูง

ระยะเวลาการย่อยที่ 12 ชั่วโมงทำให้ได้ไฮโดรไลสที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการย่อย (0 ชั่วโมง) บ่งชี้ถึงเพปไทด์ซึ่งมีมวลโมเลกุลเล็กกว่ามีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ มากกว่าโปรตีนซึ่งมีมวลโมเลกุลใหญ่ นอกจากนี้ตัวอย่างไฮโดรไลสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน เทอร์โมไลซิน พาเพน และอัลคาเลส ที่ระดับการย่อย 7.9, 6.3, 3.3 และ 1.6% ตามลำดับ และมีคุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จากมากไปน้อย 0.954-0.515 มิลลิโมลลาร์โทรลอคซ์ ตามลำดับ ส่วนเม็ดเลือดแดงที่ย่อยด้วยอัลคาเลสที่ระดับการย่อย

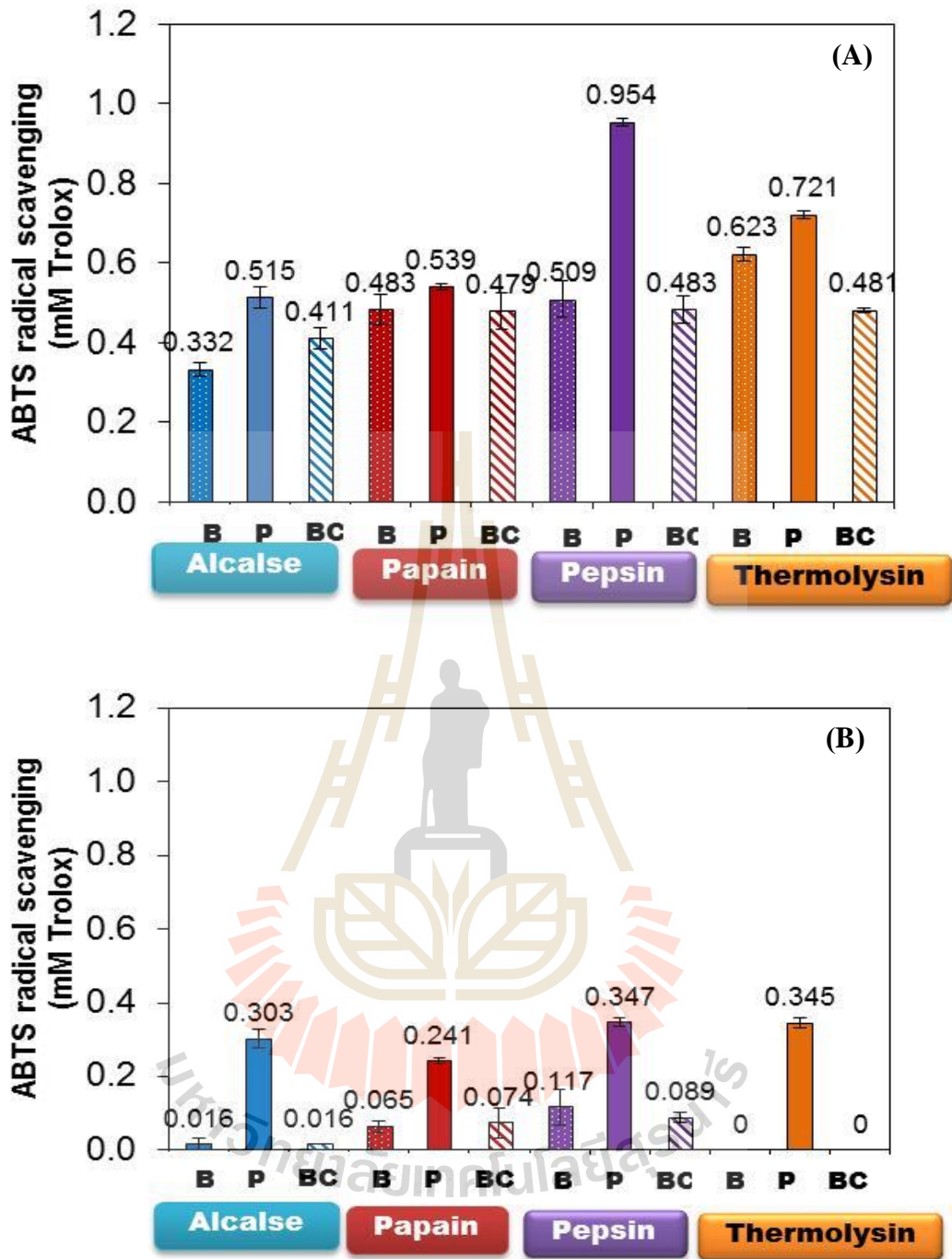
14.5% และเทอร์โมไลซิน 12.9% มีคุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่น้อยกว่าไฮโดรไลเซสที่ย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน ($p < 0.05$) จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า คุณสมบัติในการจับกับอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซสไม่ได้เพิ่มขึ้นตามระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้นเท่านั้น แต่อาจขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเปปไทด์อีกด้วย

4.2.3 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Ferric ion (FRAP assay)

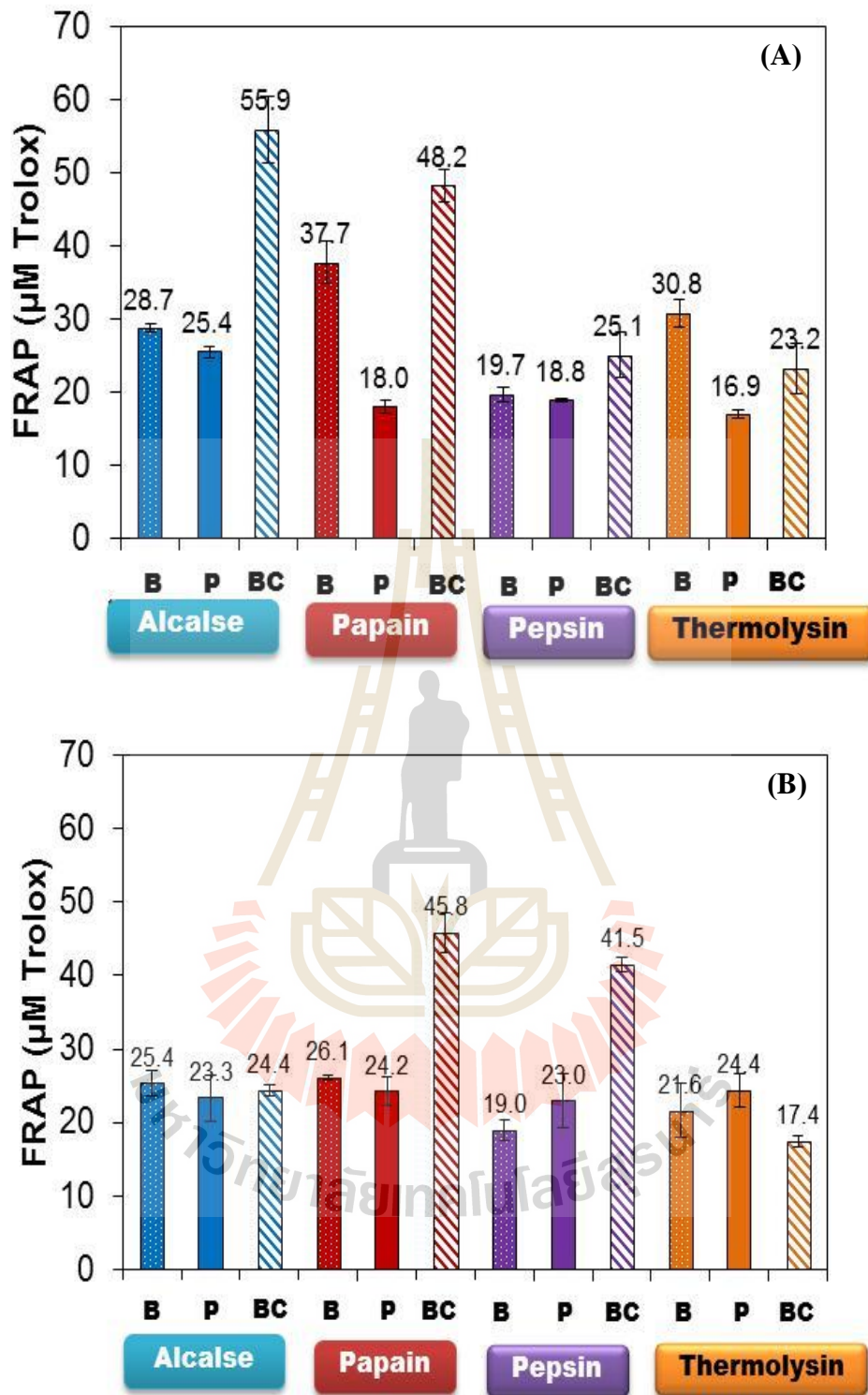
คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เมื่อวัดด้วยวิธี FRAP พบว่าความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Fe^{3+} ของโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเม็ดเลือดแดงย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสสูงที่สุดคือ 55.9 ไมโครโมลลาร์โทรลอกซ์ รองลงมาเม็ดเลือดแดงย่อยด้วยเอนไซม์พาเพน ($p < 0.05$, รูปที่ 4.4A) ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซสจากทั้ง 3 ตัวอย่างย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน เทอร์โมซินมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Fe^{3+} ต่ำกว่าโปรตีนชนิดอื่น นอกจากนี้ระยะเวลาการย่อยที่ 12 ชั่วโมงมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Fe^{3+} ของโปรตีนไฮโดรไลเซสทุกตัวอย่างสูงกว่าไม่มีการย่อย (0 ชั่วโมง) ยกเว้นในตัวอย่างเม็ดเลือดแดงอาจเนื่องจากมีเกลือรบกวนต่อระบบการวิเคราะห์ของ FRAP ซึ่งมี Fe^{3+} เป็นองค์ประกอบในปฏิกิริยา

4.2.4 ความสามารถในการจับโลหะ (Metal chelating assay)

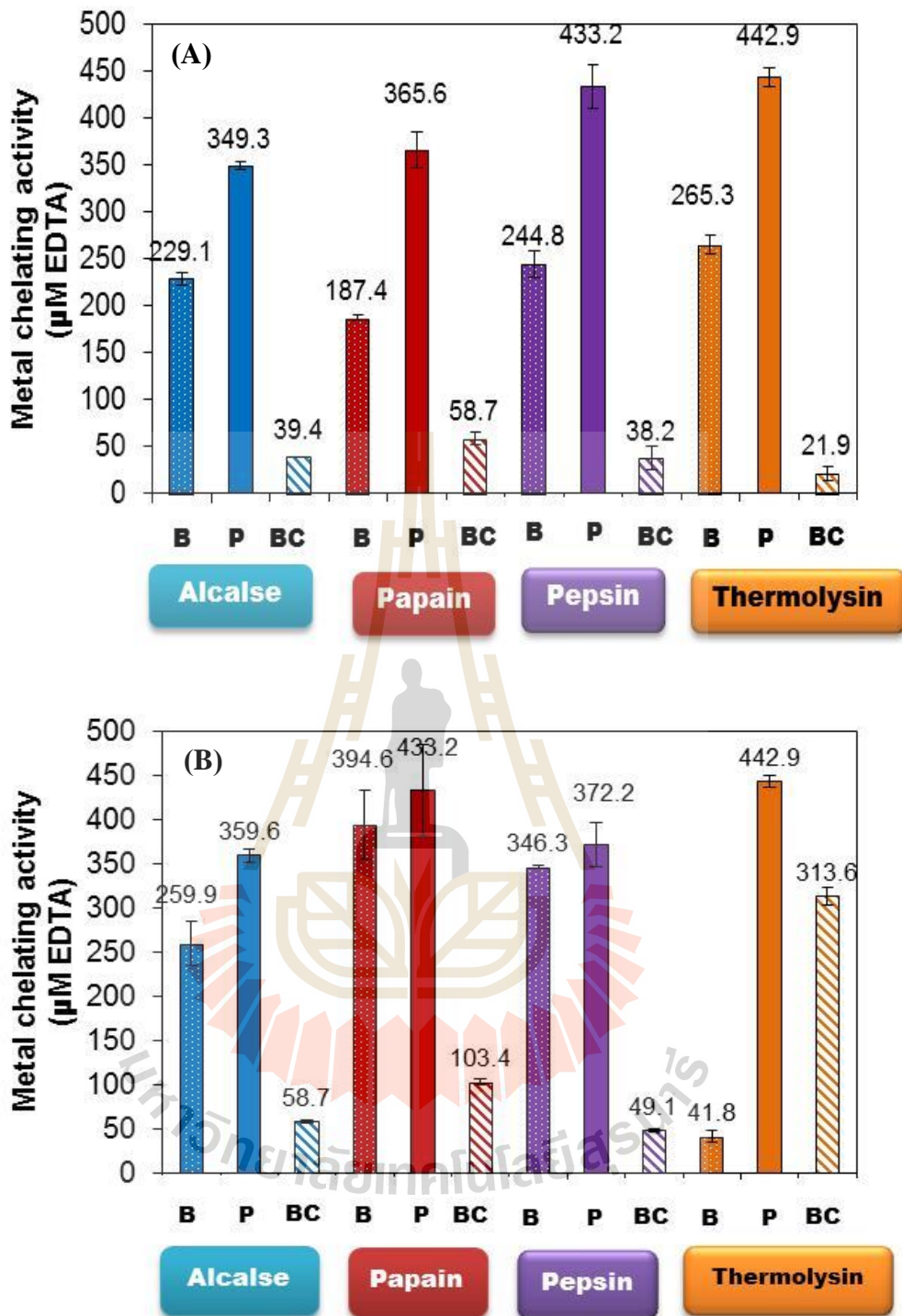
โปรตีนไฮโดรไลเซสจากพลาสมาที่ย่อยในทุกเอนไซม์มีความสามารถในการจับกับโลหะสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสจากโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเลือดและเม็ดเลือดแดง ($p < 0.05$, รูปที่ 4.5A) แนวโน้มความสามารถในการจับกับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลเซสระยะเวลาการย่อยที่ 12 ชั่วโมงไม่ต่างจากเวลาที่ 0 ชั่วโมง ($p > 0.05$) จึงอาจกล่าวได้ว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ไม่มีผลต่อการเพิ่มความสามารถในการจับยึดโลหะของเปปไทด์ คุณสมบัติในการจับยึดโลหะจึงอาจไม่ใช่สมบัติเด่นของเปปไทด์ของเลือด ประเด็นที่อาจต้องพิจารณาในกรณีนี้คือหลักการของวิธีการตรวจวัดนี้คือการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ Fe^{2+} -Ferrozine ของเปปไทด์มีความสามารถในการจับกับ Fe^{2+} จะทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อน Fe^{2+} -Ferrozine ลดลงสีแดงที่เกิดขึ้นจะลดลง อย่างไรก็ตาม Fe^{2+} ที่อยู่ในตัวอย่างไฮโดรไลเซสอาจเข้าจับกับ Ferrozine ก่อให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนสีแดงด้วยเช่นกัน ซึ่งอาจเป็นหนึ่งในเหตุผลที่ไม่พบการลดลงของสีแดงอย่างเด่นชัดในตัวอย่างก่อนย่อยและหลังย่อยด้วยเอนไซม์



รูปที่ 4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือดแดง (blood corpuscles; BC) ด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (A) และ 0 ชั่วโมง (B)



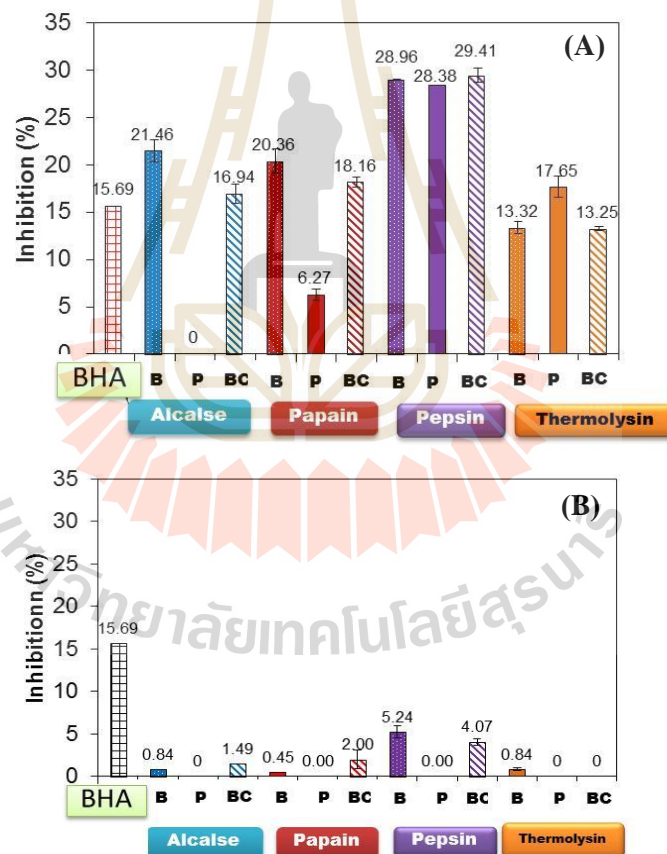
รูปที่ 4.4 ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ Ferric ion ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือดแดง (blood corpuscles; BC) ด้วยเอนไซม์ ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (A) และ 0 ชั่วโมง (B)



รูปที่ 4.5 ความสามารถในการจับกับโลหะของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือดแดง (blood corpuscles; BC) ด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (A) และ 0 ชั่วโมง (B)

4.2.5 ฤทธิ์ในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical scavenging assay)

โปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดแดงย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินมีความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลสูงที่สุดที่ 28.4-29.4% ($p < 0.05$, รูปที่ 4.6) ระยะเวลาการย่อยที่ 12 ชั่วโมง ส่งผลให้ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล ของโปรตีนไฮโดรไลสทุกตัวอย่างสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อย (0 ชั่วโมง) ในภาพรวมจะเห็นว่าพลาสมาและเม็ดเลือดแดงเป็นสารตั้งต้นที่สำคัญสำหรับการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระที่โดดเด่นคือ ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $ABTS^+$ และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระไฮดรอกซิลซึ่งมีแนวโน้มจะไปในทิศทางเดียวกัน ส่วนสมบัติอื่น (FRAP และ Metal chelating ability) ยังไม่โดดเด่นเนื่องจากมีค่าไม่ต่างจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านกระบวนการย่อย ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงเลือกตัวอย่างพลาสมาและเม็ดเลือดแดงกับเอนไซม์เพปซินและเทอร์โมไลซินในการผลิตไฮโดรไลส โดยมุ่งเน้นการวิเคราะห์เฉพาะความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^+$

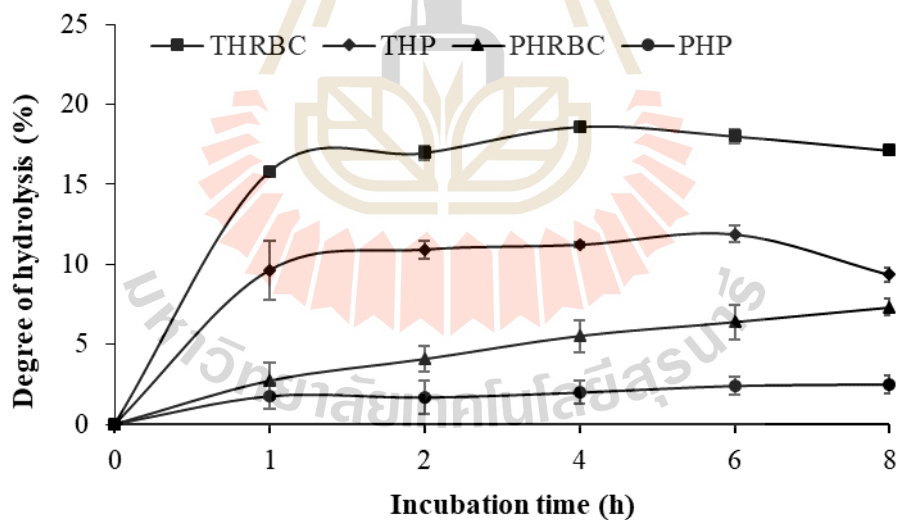


รูปที่ 4.6 ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลสจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือดแดง (blood corpuscles; BC) ด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (A) และ 0 ชั่วโมง (B)

4.3 ศึกษาระยะเวลาสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท

4.3.1 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH)

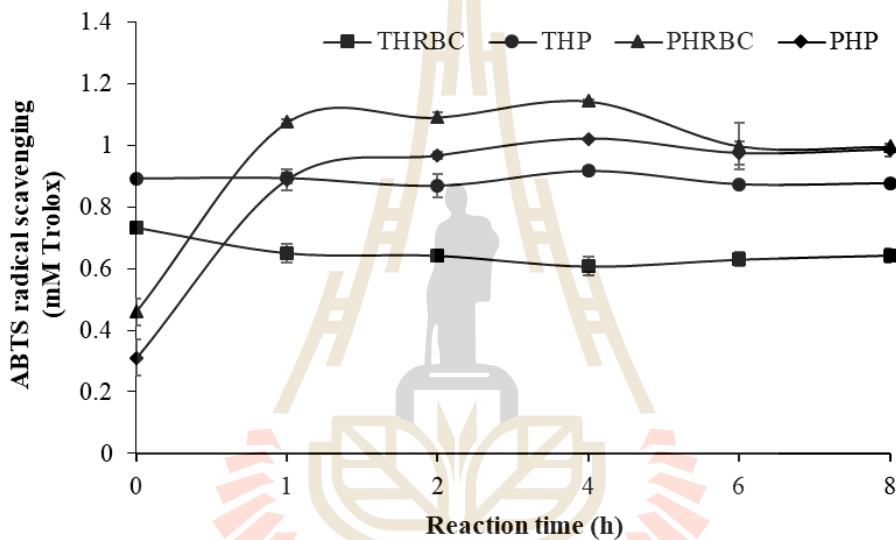
ระดับการย่อยของเอนไซม์เทอร์โมไลซินและเพปซินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 1 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่ในระยะเวลา 2- 8 ชั่วโมง (รูปที่ 4.7, $p < 0.05$) โดยทั่วไปจะมีการเพิ่มขึ้นของอัตราการย่อยอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงแรกของการย่อย หลังจากนั้นอัตราการย่อยจะลดลงเนื่องจากสารตั้งต้นที่และประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ที่ลดลง ซึ่งพบแนวโน้มที่เหมือนกันในการศึกษาระดับการย่อยเม็ดเลือดของกวาง แกะ หมู และวัว (Bah et al., 2016) และการย่อยพลาสติกชีว (Bah et al., 2015b) ยกเว้นโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินที่ระดับการย่อยเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่า เม็ดเลือดสามารถถูกย่อยได้ดีกว่าพลาสติกชีวในสภาวะการย่อยเดียวกัน ทั้งนี้อาจมีผลมาจากสารยับยั้งโปรตีเอส (protease inhibitor) หลายชนิดรวมถึง alpha-2-macroglobulin และ kininogens ในเลือด (Seymour et al., 1999) โดยเอนไซม์เทอร์โมไลซินมีประสิทธิภาพในการย่อยได้ดีกว่าเพปซินที่โปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม เอนไซม์เทอร์โมไลซินมีความจำเพาะต่อการย่อยในวงกว้างกว่าเพปซินซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงต่อกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) เช่น Phe และ Leu (Chiang et al., 2006) โดยระดับการย่อยของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซินสูงสุดที่ 17% ส่วนพลาสติกชีวย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินต่ำสุดที่ 2.5% ($p < 0.05$)



รูปที่ 4.7 ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากตัวอย่างเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THRBC) พลาสติกชีวย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THP) เม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซิน (PHRBC) และพลาสติกชีวย่อยด้วยเพปซิน (PHP) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

4.3.2 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺

ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ (รูปที่ 4.8, $p < 0.05$) ของเอนไซม์เพปซินสูงขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 1 ชั่วโมงแรกของการย่อย และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 8 ไฮโดรไลสจากเม็ดเลือดและพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินมีกิจกรรมสูงในช่วง 1.02-1.14 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ในชั่วโมงที่ 4 ของการย่อย ส่วนตัวอย่างที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซินไม่แสดงการเพิ่มขึ้นของการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ในช่วงระยะเวลา 8 ชั่วโมงของการย่อย ($p > 0.05$) จะเห็นว่าแม้สายเพปไทด์ที่ได้ผลการย่อยด้วยเพปซินมีแนวโน้มยาวกว่าที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (ค่า DH ต่ำกว่า) แต่ตัวอย่างที่ย่อยด้วยเพปซินกลับมีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระสูงกว่า ซึ่งบ่งชี้ว่าลำดับกรดอะมิโนและชนิดของกรดอะมิโนอาจมีบทบาทมากกว่าความสั้น-ยาวของสายเพปไทด์ในกรณีนี้



รูปที่ 4.8 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของโปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือดที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซินและเพปซินที่ระยะเวลาต่าง ๆ

เนื่องจากการย่อยตัวอย่างเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แสดงคุณสมบัติการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงสุด จึงวิเคราะห์ค่า EC₅₀ และพบว่าตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือดและพลาสมา ย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินมีค่า EC₅₀ สูงสุดในช่วง 5.5 -5.6 มิลลิกรัมลิวีนสมมูลต่อมิลลิลิตร ส่วนโปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือดและพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซินประสิทธิภาพด้อยกว่า (ตารางที่ 4.3, $p < 0.05$) แสดงว่าเม็ดเลือดและพลาสมาจากเลือดไก่เป็นสารตั้งต้นที่ดีสำหรับการผลิตไฮโดรไลสที่มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS⁺ เมื่อย่อยด้วยเพปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดย Cheng et al. (2016) รายงานว่าไฮโดรไลสพลาสมาย่อยด้วยอัลคาเลสมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าเม็ดเลือด เนื่องจากมีกรดอะมิโนที่มีประจุลบในระดับที่สูง กรดอะมิโนเหล่านี้สามารถส่งถ่ายอิเล็กตรอนทำให้มีฤทธิ์ในการรีดิวซ์สารอนุมูลอิสระ

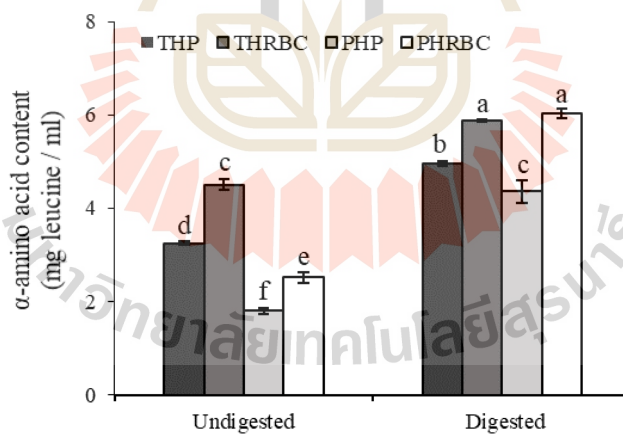
ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของโปรตีนไฮโดรไลเสท

ตัวอย่าง	EC ₅₀ (มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร)
ไฮโดรไลเสทเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THRBC)	10.17 ^c
ไฮโดรไลเสทพลาสมาย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THP)	7.19 ^b
ไฮโดรไลเสทเม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซิน (PHRBC)	5.61 ^a
ไฮโดรไลเสทพลาสมาย่อยด้วยเพปซิน (PHP)	5.52 ^a

หมายเหตุ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างตัวอย่าง

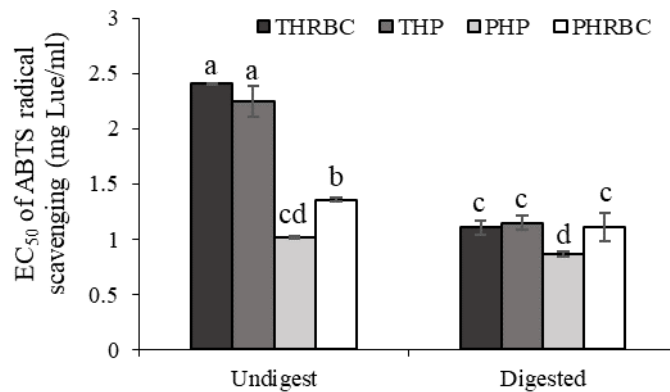
4.4 เสถียรภาพภายใต้ระบบย่อยอาหารจำลอง (*In vitro* gastrointestinal (GI) digestion)

การทดลองการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง พบว่าปริมาณแอลฟาอะมิโน (α -amino acid) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.9, $p < 0.05$) บ่งชี้ว่าระบบการย่อยจำลองที่ศึกษาทำให้เกิดการย่อยเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งปริมาณแอลฟาอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเสทย่อยด้วยเพปซิน หลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองเพิ่มสูงขึ้น 2.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะมิโนหลังจากการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองพบว่าตัวอย่างไฮโดรไลเสทจากเม็ดเลือดมีแอลฟาอะมิโนสูงกว่าไฮโดรไลเสทจากพลาสมา และจากการคำนวณปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่เพิ่มขึ้น 18.6-36.0% หลังจากการย่อยในระบบย่อยอาหาร



รูปที่ 4.9 ปริมาณแอลฟาอะมิโน (α -amino acid) ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดต่าง ๆ

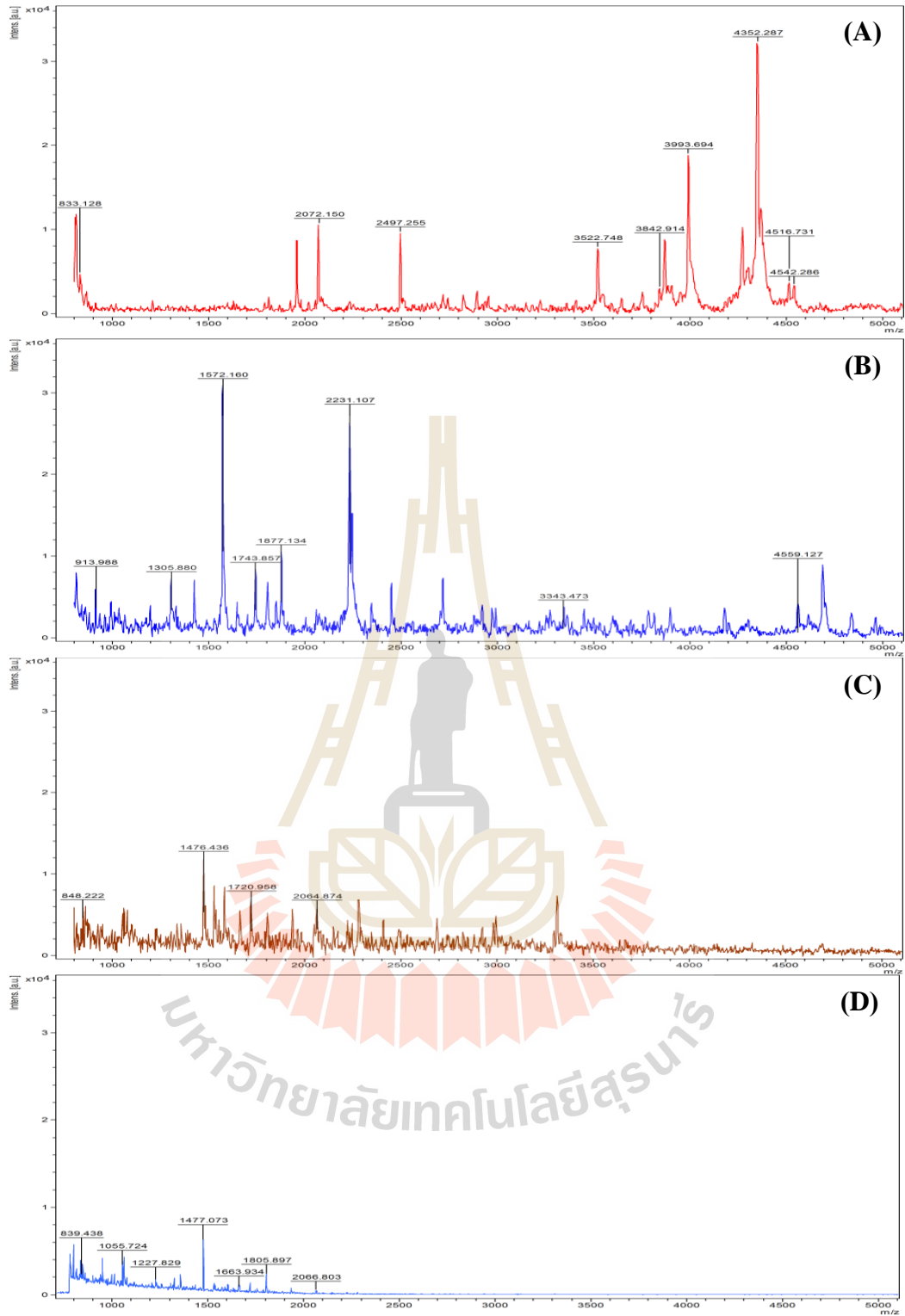
นอกจากนี้ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของโปรตีนไฮโดรไลเสทเพิ่มขึ้นหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (รูปที่ 4.10, $p < 0.05$) ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซินมี EC₅₀ สูงสุด 0.86 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ก่อนและหลังการย่อยในระบบอาหารจำลอง ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซินไม่ต่างกัน ($p > 0.05$)



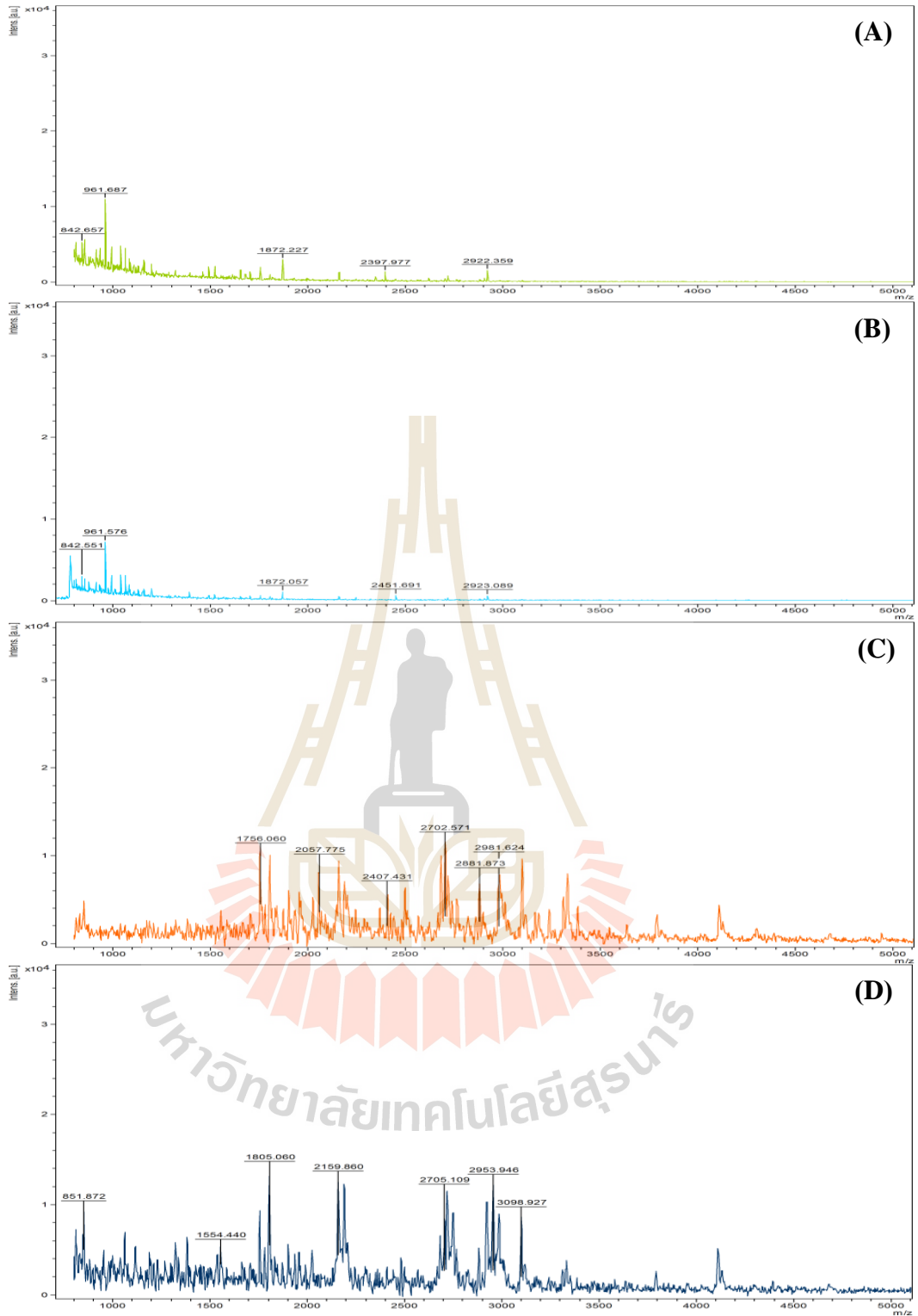
รูปที่ 4.10 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดต่าง ๆ

4.5 การวิเคราะห์รูปแบบมวลโมเลกุลของไฮโดรไลเสทด้วยเทคนิค Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)

ศึกษาารูปแบบของขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับระหว่างก่อนและหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (GI digestion) โดยวิเคราะห์การกระจายตัวของมวลโมเลกุลด้วยวิธี MALDI-TOF (รูปที่ 4.11-4.12) พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทก่อนและหลังในระบบย่อยอาหารจำลอง มีรูปแบบการกระจายตัวของขนาดที่ต่างกัน โดยโปรตีนไฮโดรไลเสทพลาสมาย่อยด้วยเพปซินก่อนการย่อยในระบบย่อยอาหาร มีการกระจายตัวในระหว่าง 3,500-4,500 m/z สูง (รูปที่ 4.11A-B) และเม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซินก่อนการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองมีการกระจายตัวในระหว่าง 2,500-3,500 m/z สูง (รูปที่ 4.11C-D) เมื่อเทียบกับหลังการย่อยในระบบอาหารจำลองซึ่งมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 2,000 m/z บ่งชี้ถึงน้ำหนักโมเลกุลหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองมีขนาดที่เล็กลงซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแอลฟาอะมิโนที่สูงประมาณ 2.4 เท่าหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (รูปที่ 4.9) และจะสังเกตได้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทของพลาสมามีขนาดที่ใหญ่กว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทของเม็ดเลือด อย่างไรก็ตามโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซินพบการกระจายตัวไม่ชัดเจนระหว่างก่อนและหลังการย่อยในระบบจำลอง (รูปที่ 4.12) อาจเนื่องมาจากหลังการย่อยมีขนาดที่เล็กมากในช่วงต่ำกว่า 850 m/z ซึ่งอยู่นอกขอบเขตการตรวจจับ ซึ่งเม็ดเลือดที่ย่อยด้วยเทอร์โมไลซินหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง พบมีการกระจายตัวที่ 851 m/z (รูปที่ 4.12 C-D) บ่งชี้ถึงมีขนาดที่เล็กหลังการย่อยในระบบย่อยอาหาร GI



รูปที่ 4.11 การกระจายตัวของมวลโมเลกุลของเพปไทด์ไนโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MALDI-TOF พลาสมาย่อยด้วยเพปซินก่อน (A) และหลัง (B) ย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง และเม็ดเลือดแดงย่อยด้วยเพปซินก่อน (C) และหลัง (D) ย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง



รูปที่ 4.12 การกระจายตัวของมวลโมเลกุลของเพปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเสทชนิดต่างๆด้วยวิธี MALDI-TOF พลาสมาย่อยด้วยเทอร์โมไลซินก่อน (A) และหลัง (B) ย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง และเนื้อเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซินก่อน (C) และหลัง (D) ย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง

4.6 วิเคราะห์รูปแบบกรดอะมิโน (Amino acid profile)

กรดอะมิโนของเพปไทด์ทั้งก่อนและหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (ตารางที่ 4.4) พบว่าเพปไทด์จากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) หลังระบบย่อยอาหารจำลอง มีกรดอะมิโนโดดเด่นคือ Asp, Glu, Asn, Val, Ile, Leu, Lys และ Arg โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรดอะมิโน Val, Tyr และ Lys มีปริมาณสุทธิสูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนการย่อย ($p < 0.05$) ส่วนเพปไทด์จากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHRBC) พลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (THP) และเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (THRBC) ทั้งก่อนและหลังระบบย่อยอาหารจำลองมีปริมาณกรดอะมิโนโดดเด่นไม่ต่างกัน คือ Pro, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe และ Lys ($p > 0.05$)

นอกจากนี้เมื่อพิจารณาปริมาณกรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ (hydrophobic, HAA) พบว่าเพปไทด์จากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) เม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHRBC) และเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THRBC) หลังระบบย่อยอาหารจำลองมีปริมาณสูงกว่าเพปไทด์ในไฮโดรไลเสท ส่วนกรดอะมิโนกลุ่มที่มีโครงสร้างเป็นวง (aromatic, AAA) พบเพปไทด์ในไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) หลังระบบย่อยอาหารจำลองมีปริมาณ 4.2% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนการย่อย กรดอะมิโน hydrophobic (HAA) และกรดอะมิโนกลุ่ม aromatic (AAA) ในเพปไทด์มีบทบาทสำคัญต่อความสามารถต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับกรดอะมิโนกลุ่มประจุลบ (NAA) พบว่าเพปไทด์จากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) และเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THRBC) หลังถูกย่อยอาหารด้วยระบบการย่อยอาหารจำลองมีค่าน้อยกว่าก่อนการย่อย ส่วนกรดอะมิโนประจุบวก (PAA) ในทุกตัวอย่างไม่ต่างกันระหว่างก่อนและหลังการย่อย โดยอยู่ในช่วงที่ 16-21%

มีการรายงานทางวิชาการว่ากรดอะมิโนในกลุ่ม hydrophobic เช่น Val, Ile, Leu และกรดอะมิโนในกลุ่ม aromatic เช่น Tyr เป็นกรดอะมิโนสำคัญที่บ่งชี้ถึงความสามารถต้านอนุมูลอิสระ (Chi et al., 2015) กรดอะมิโน Val และ Leu ที่ปลายด้านที่มีหมู่อะมิโนเป็นอิสระ (N-terminal) สามารถส่งเสริมการเข้าถึงเพปไทด์ไปยังกลุ่มเป้าหมายที่เป็น hydrophobic (Yours and Howell, 2015) ส่วนเพปไทด์ที่ประกอบด้วย Leu, Asp และ Lys มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูง (Luo et al., 2013) นอกจากนี้ O'Sullivan, Lafarga, Hayes and O'Brien (2017) รายงานว่ามีกรดอะมิโน Tyr และ Leu ในปริมาณสูงจากไฮโดรไลเสท γ -globulin จากเลือดวัว (bovine blood) มีความสามารถให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณสุทธิกรดอะมิโนในเปปไทด์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทก่อนและหลังย่อยในระบย่อยอาหารจำลอง (กรัมอะมิโนต่อ100 กรัมเปปไทด์)

AA in net peptide ¹	PHP ²		PHRBC ³		THP ⁴		THRBC ⁵	
	Und. ⁶	D. ⁷	Und.	D.	Und.	D.	Und.	D.
Asp	10.9 ^a	4.3 ^b	2.9 ^c	1.6 ^d	4.9 ^b	4.5 ^b	4.3 ^b	2.4 ^c
Asn	19.9 ^b	11.4 ^c	0.4 ^f	ND	5.5 ^e	5.5 ^e	23.8 ^a	8.7 ^d
Thr	0.9 ^e	0.8 ^e	5.7 ^a	2.3 ^d	4.07 ^b	2.9 ^{cd}	3.6 ^{bc}	2.4 ^d
Ser	0.4 ^d	0.4 ^d	2.8 ^b	1.1 ^c	4.6 ^a	2.6 ^b	2.7 ^b	2.4 ^b
Glu	8.7 ^a	3.8 ^b	0.1 ^d	1.7 ^c	ND	ND	ND	ND
Pro	ND	ND	5.9 ^b	5.5 ^b	10.5 ^a	8.6 ^a	3.5 ^c	4.9 ^c
Gly	ND	ND	3.7 ^a	2.3 ^b	3.5 ^a	2.4 ^b	3.5 ^a	2.6 ^b
Ala	ND	ND	8.3 ^a	4.9 ^{bc}	5.1 ^b	3.1 ^c	6.3 ^b	4.9 ^{bc}
Val	0.6 ^e	5.6 ^a	4.2 ^{bcd}	3.1 ^d	4.4 ^{bc}	3.3 ^{cd}	5.1 ^{ab}	3.8 ^{cd}
Cys	2.6 ^b	2.4 ^b	3.0 ^a	2.4 ^b	1.6 ^c	1.5 ^c	2.7 ^{ab}	2.7 ^{ab}
Met	0.3 ^{ab}	0.1 ^b	0.5 ^{ab}	0.1 ^b	0.4 ^{ab}	0.5 ^{ab}	0.6 ^a	0.3 ^{ab}
Ile	4.1 ^{ab}	5.8 ^a	2.7 ^b	3.6 ^{ab}	3.4 ^{ab}	2.3 ^b	2.7 ^b	2.1 ^b
Leu	8.0 ^{ab}	9.6 ^a	5.6 ^{bc}	3.7 ^c	5.9 ^{bc}	4.3 ^c	7.9 ^{ab}	5.3 ^{bc}
Tyr	0.4 ^b	2.4 ^a	3.0 ^a	2.0 ^a	2.9 ^a	2.3 ^a	2.4 ^a	1.9 ^a
Phe	ND	ND	2.8 ^c	2.8 ^c	3.8 ^b	2.3 ^c	4.5 ^a	2.7 ^c
Lys	7.6 ^b	9.6 ^a	5.3 ^{cd}	4.8 ^d	6.3 ^c	4.3 ^d	7.1 ^b	4.6 ^d
His	ND	ND	2.5 ^b	2.9 ^b	1.9 ^c	1.1 ^d	4.2 ^a	2.9 ^b
Arg	6.3 ^a	1.3 ^b	2.5 ^b	2.0 ^b	3.1 ^b	3.3 ^b	3.5 ^b	1.9 ^b
HAA ⁸ (%)	23.7 (33.5)	35.5 (61.7)	41.3 (66.7)	33 (70.5)	44.3 (61.6)	32.4 (59.1)	42.8 (48.4)	33.3 (58.9)
AAA ⁹ (%)	0.4 (0.5)	2.4 (4.2)	5.8 (9.4)	4.8 (10.2)	6.7 (9.3)	4.6 (8.4)	6.9 (7.80)	4.6 (8.1)
NAA ¹⁰ (%)	39.5 (55.9)	19.5 (33.9)	3.4 (5.5)	3.3 (7.0)	10.4 (14.5)	10.0 (13.9)	28.1 (31.8)	11.1 (19.6)
PAA ¹¹ (%)	13.9 (19.7)	10.9 (18.9)	10.3 (16.6)	9.7 (20.7)	11.3 (15.7)	8.7 (15.9)	14.8 (16.7)	9.4 (16.6)
Net peptides	70.7	57.5	61.9	46.8	71.9	54.8	88.4	56.5

Note: ¹Amino acid composition of peptides (total amino acids-free amino acids). ²Pepsin hydrolyzed plasma. ³Pepsin hydrolysed red blood cell. ⁴Thermolysin hydrolyzed plasma. ⁵Thermolysin hydrolyzed red blood cell. ⁶Undigested peptides. ⁷Digested peptides. ⁸Hydrophobic amino acids. ⁹Aromatic amino acids. ¹⁰Negatively charged amino acids. ¹¹Positively charged amino acids. Different letters in the same row indicate statistical difference ($p < 0.05$).

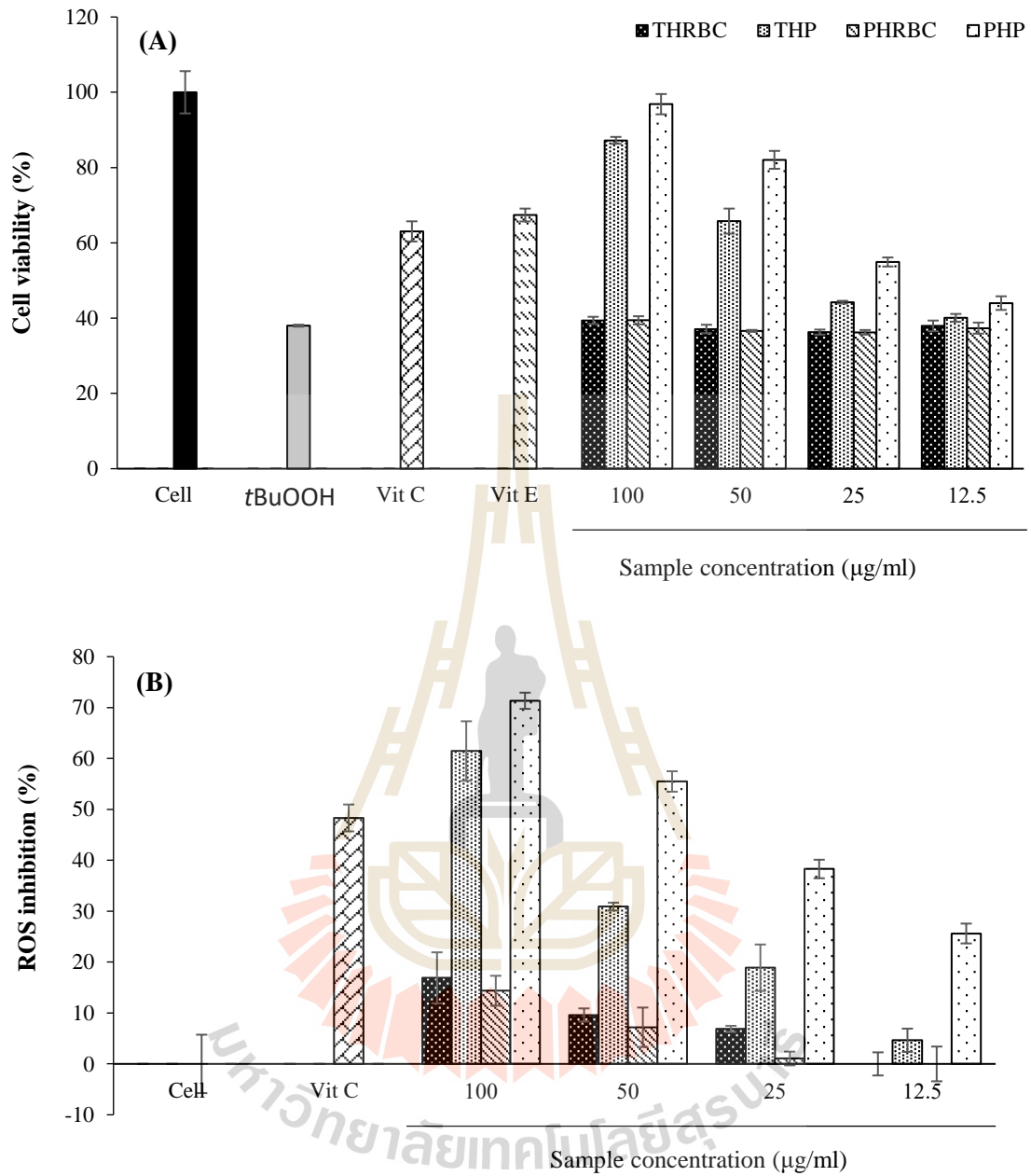
4.7 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

4.7.1 คุณสมบัติการป้องกันความเป็นพิษที่เหนี่ยวนำโดย *Tert-butylhydroperoxide* (tBuOOH) ในเซลล์มะเร็งระดับ HepG2

ตัวอย่างเพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง มีคุณสมบัติในการป้องกันความเป็นพิษที่เหนี่ยวนำโดย tBuOOH เท่ากับ 12-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 4.13A) ไฮโดรไลเซสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการปกป้องเซลล์ได้ดีที่สุดที่ 99.99% รองลงมา คือ โปรตีนไฮโดรไลเซสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (THP) ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถป้องกันได้กว่า 93% ในขณะที่เทียบกับเซลล์ในกลุ่มวิตามินซีความเข้มข้น 88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และวิตามินอีความเข้มข้น 21.54 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปกป้องเซลล์ได้ที่ 63.03 และ 67.4 % ตามลำดับ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHRBC) และโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซิน (THRBC) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการปกป้องเซลล์น้อยที่ 39.42 และ 39.39% ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเพปไทด์จากการย่อยพลาสมามีความสามารถปกป้องเซลล์จากออกซิเดชันดีกว่าเพปไทด์จากเม็ดเลือดแดง และเอนไซม์เพปซินทำให้ได้ไฮโดรไลเซสที่มีประสิทธิภาพสูงกว่า

4.7.2 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระบบเซลล์

เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกับคุณสมบัติการป้องกันความเป็นพิษที่เหนี่ยวนำโดย tBuOOH (รูปที่ 4.13B) ซึ่งเมื่อ 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) ผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอสเทอเรสที่อยู่ภายในเซลล์กลายเป็น DCFH ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง แต่ถ้าภายในเซลล์มีอนุมูลอิสระ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ DCFH จะถูกออกซิไดซ์เป็น DCF ซึ่งสามารถเรืองแสงได้ ถ้าเพปไทด์ที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะทำให้การเรืองแสงของ DCF ลดลง จากการทดลองพบว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) ที่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ (% inhibition) ได้ดีที่สุด รองลงมา คือ พลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (THP) ในขณะที่วิตามินซีความเข้มข้น 88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระได้น้อยกว่าส่วนโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHRBC) และโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน (THRBC) ที่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลอง มีความสามารถในการปกป้องเซลล์น้อยมาก นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซสจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (PHP) และเทอร์โมไลซิน (THP) มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระแม้ผ่านระบบย่อยอาหารจำลอง



รูปที่ 4.13 ความสามารถในการป้องกันความเป็นพิษจาก *Tert*-butylhydroperoxide (tBuOOH) (A) และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 (B) ของโปรตีนไฮโดรไลสที่ย่อยผ่านระบบย่อยอาหารจำลอง

4.8 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากพลาสมาด้วยเพปซินที่ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง และหาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อที่จะอธิบายความสามารถด้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ ซึ่งพบว่าเพปไทด์ที่มีคะแนนความสามารถด้านอนุมูลอิสระสูงในช่วง 8.5-9.0 ได้แก่ YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW และ ISRDRGV ส่วนเพปไทด์ที่มีคะแนนความสามารถด้านอนุมูลอิสระในช่วง 6.5-7.5 ได้แก่ YEGLSKLVK, YRDSIVA, FSYLSKD และ LIVKALMAK (ตารางที่ 4.5) ซึ่งกรดอะมิโน Trp (W) และ Tyr (Y) มีความสามารถให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ (Hernández-Ledesma, Davalos, Bartolome, and Amigo, 2005) กรดอะมิโน Arg (D), Glu (E) และ Lys (K) มีความสามารถในการจับกับโลหะได้ (Saiga et al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่ากรดอะมิโนหลายชนิด เช่น Tyr (Y), Met (M), His (H), Lys (K), Leu (L), Ile (I) และ Trp (W) มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Liu et al., 2010)

4.9 การแยกเพปไทด์

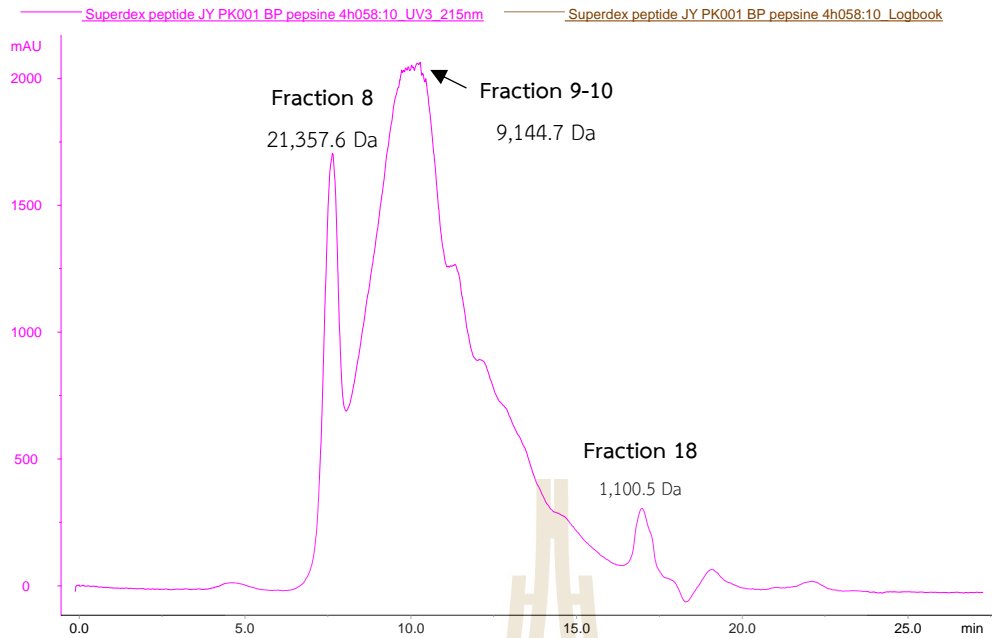
4.9.1 การแยกด้วย Size exclusion chromatography (SEC)

เนื่องจากตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากการย่อยพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซินที่ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง แสดงสมบัติด้านออกซิเดชันสูง จึงแยกเพปไทด์เพื่อทำบริสุทธิ์ด้วย Superdex Peptide 10/300 GL และได้เพปไทด์ที่มีขนาดแตกต่างกันหลัก ๆ อยู่ 3 ขนาด (รูปที่ 4.14) โดยประกอบไปด้วยแฟร็กชัน (fraction) ที่ 8, 9-10 และ 18 โดยมีขนาดโมเลกุลประมาณ 21,357.6 9,144.7 และ 1,100.5 ดาลตัน ตามลำดับและมีปริมาณการผลิอยู่ที่ 14.28, 82.30 และ 2.1 % ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างเพปไทด์ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ค่า IC₅₀ ดังตารางที่ 4.6 จะเห็นว่าเพปไทด์จากการย่อยพลาสมาด้วยเพปซินมีแนวโน้มว่าความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ จะสูงขึ้นเมื่อเพปไทด์มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง โดย Zheng et al. (2018) ได้ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือดไก่ พบว่าเพปไทด์ที่มีฤทธิ์สูงในการต้านอนุมูลอิสระมีขนาดโมเลกุล 943.5 ดาลตัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์สายสั้นจะมีแนวโน้มที่จะมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูง

ตารางที่ 4.5 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ผลิตจากพลาสมาของหนูด้วยเอนไซม์เปปซินที่ต้านอนุมูลอิสระจากการวิเคราะห์แบบ *denovo* peptide sequencing

Sequence	Hydrophobicity	AOX Score ¹	Origin
AMADCCS	4.24	2	Albumin
YPKAPFS	17.77	8.5	Albumin
LLINLIK	33.77	5.5	Albumin
DMVECMD	17.35	3	Albumin
YEGLSKLVK	21.97	7.5	Albumin
SPGSLCA	9.84	3	alpha-2-macroglobulin
PTATVLG	14.58	4	alpha-2-macroglobulin
CGLAGREE	9.44	2	alpha-2-macroglobulin
FTVTFENTD	22.9	5	alpha-2-macroglobulin
YRDSIVA	14.52	6.5	alpha-2-macroglobulin
HLAVGAS	11.39	4	complement C3
IEGTSYA	8.81	5	complement C3
MIGMTPTV	25.42	5	complement C3
FSYLISKD	26.06	7	complement C3
DVKDTCM	8.8	4.5	complement C3
MIGMTPTV	25.42	5	complement C3
VWGLASDL	31.69	8.5	complement C3
YGTAITG	11.58	5.5	complement C4
MQPAMAAI	22.06	4	complement C4
LSVPLVL	32.47	5.5	complement C4
AGSSSPI	7.74	4	complement C5
KIPLNLV	28	6	complement C5
ISVCNSLL	26.12	4	complement C5
EELPLPL	30.85	4	Immunoglobulin
ALPTGG	7.73	3	Immunoglobulin
DTKSDFH	8.36	5	Transferrin
TKSDFHL	17.09	5	Transferrin
MGTAPMW	24.98	8.5	C-reactive protein
ISRDWRGV	20.59	9	Vitronectin
GKLGAVL	20.87	4	Interleukin
LRCQCIS	11.43	3.5	Interleukin
LIVKALMAK	27.4	6.5	Interleukin

Note: ¹ Antioxidant score



รูปที่ 4.14 Chromatogram จากการแยกตัวอย่างไฮโดรไลเซทพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซินระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ด้วย Superdex Peptide 10/300 GL

ตารางที่ 4.6 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ของเปปไทด์จากการแยกตามขนาด

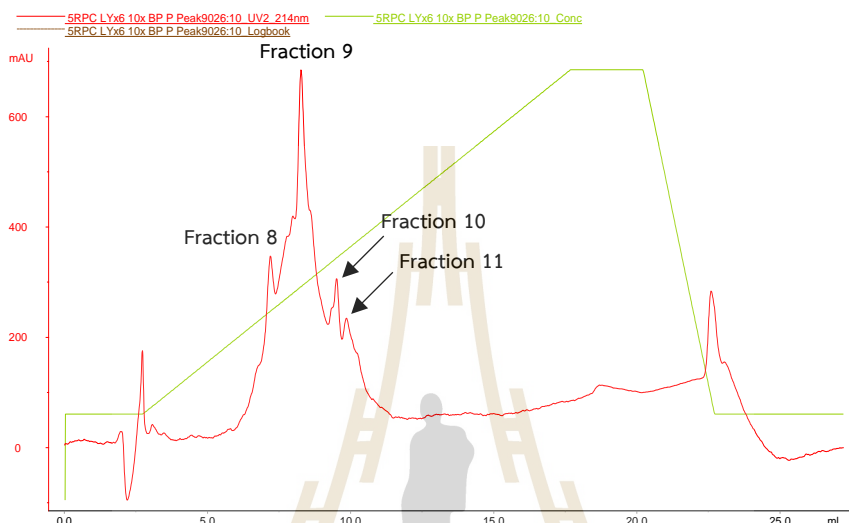
ตัวอย่าง	EC ₅₀ (มิลลิกรัมลิวซีสินสมมูลต่อมิลลิลิตร)
Blood plasma hydrolysate	6.46 ^a
Fraction 8 (SCE8)	17.01 ^c
Fraction 9-10 (SEC9-10)	15.26 ^b
Fraction 18 (SEC18)	5.46 ^a

หมายเหตุ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

4.9.2 การแยกด้วย Reverse-phase fast protein liquid chromatography (RP-FPLC)

ตัวอย่างเปปไทด์จากการแยกด้วย Size exclusion chromatography โดยได้เลือกตัวอย่าง Fraction 9-10 (SEC9-10) นำมาแยกต่อโดยใช้ Reverse-phase fast protein liquid chromatography เนื่องจากมีปริมาณผลผลิตสูงกว่า Fraction อื่นพบว่าสามารถแยกได้เป็น 4 Fraction คือ Fraction ที่ 8, 9, 10 และ 11 โดยมีปริมาณผลผลิตอยู่ที่ 9.39, 39.12, 8.13 และ 8.45% ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างเปปไทด์ไปทดสอบการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยการทดสอบความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ได้ค่า EC₅₀ ดังตารางที่ 4.7 พบว่า Fraction ที่ 8, 9 และ 10 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ที่ใกล้เคียงกันโดยเปปไทด์ที่ทำการแยกด้วย RP-FPLC

นั้นมีค่า EC_{50} ต่ำกว่าการแยกด้วย SEC แสดงถึงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ ที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าการทำบริสุทธิ์เพปไทด์มีผลทำให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงขึ้น Fraction ที่แม่ประสิทธิภาพสูงกว่าไฮโดรไลเซทประมาณ 6.9 เท่าแต่มีปริมาณผลผลิตเพียง 8% ในขณะที่ Fraction อื่นๆ มีประสิทธิภาพสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทประมาณ 3 เท่า โดย Fraction 9 มีปริมาณผลผลิตเกือบ 40% ในการทำบริสุทธิ์เพื่อค้นหาเพปไทด์ที่มีฤทธิ์จึงอาจนำ Fraction 11 ไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนต่อไป



รูปที่ 4.15 แสดง Chromatogram จากการแยกตัวอย่างเพปไทด์ไฮโดรไลเซทพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซิน จาก Fraction 9-10 (SEC9-10) แยกด้วย Reverse-phase fast protein liquid chromatography

ตารางที่ 4.7 ฤทธิ์ในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\cdot+}$ ของเพปไทด์ SEC9-10 จากการแยกความมีขี้

ตัวอย่าง	EC_{50} (มิลลิกรัมลิวซินสมมูลต่อมิลลิลิตร)
Fraction 8 (RP9-10)	2.35 ^b
Fraction 9 (RP9-10)	2.31 ^b
Fraction 10 (RP9-10)	2.21 ^b
Fraction 11 (RP9-10)	0.94 ^a

หมายเหตุ a, b, c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 5

สรุปผลการดำเนินงานวิจัย

5.1 สรุปผลการวิจัย

วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมไก่แปรรูปโดยเฉพาะอย่างยิ่งเลือดไก่เป็นแหล่งโปรตีนที่มีประโยชน์มีคุณค่าทางโภชนาการโดยเฉพาะกรดอะมิโน และสามารถเพิ่มมูลค่าโดยการผลิตไฮโดรไลเสทระดับการย่อยโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือด พลาสมาและเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ แปรผันตามชนิดของสารตั้งต้นและเอนไซม์ พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซินแสดงค่าการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ สูงที่สุด และความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินมีค่าสูงที่สุด

ระยะเวลาในการย่อยพลาสมาด้วยเพปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้ได้ไฮโดรไลเสทที่มีสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ ประมาณ 1.02 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ และโปรตีนไฮโดรไลเสทหลังจากการย่อยระบบย่อยอาหารจำลอง มีปริมาณแอลฟาอะมิโนเพิ่มสูงขึ้น 2.4 เท่า และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS⁺ มีค่า EC₅₀ สูงสุด 0.86 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลอง

โปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซิน เม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เพปซิน และเม็ดเลือดย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซินหลังระบบย่อยอาหารจำลอง ปริมาณกรดอะมิโนกลุ่ม hydrophobic สูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนย่อย ส่วนกรดอะมิโนกลุ่ม aromatic (AAA) พบโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซินหลังระบบย่อยอาหารจำลอง มีปริมาณสูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนการย่อย ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ไม่ต่างกันระหว่างก่อนและหลังการย่อย โปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาด้วยเอนไซม์เพปซินที่ระยะเวลาการย่อย 4 ชั่วโมง ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหาร และหาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) พบว่าเพปไทด์ที่มีคะแนนความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงในช่วง 8.5-9.0 ได้แก่ YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW และ ISRDWRGV ส่วนเพปไทด์ที่มีคะแนนความสามารถต้านอนุมูลอิสระในช่วง 6.5-7.5 ได้แก่ YEGLSKLVK, YRDSIVA, FSYLISKD และ LIVKALMAK

ศึกษาคุณสมบัติการป้องกันความเป็นพิษที่เหนี่ยวนำโดย tBuOOH และการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์มะเร็ง HepG2 พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความสามารถในการปกป้องเซลล์และยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการศึกษานี้บ่งชี้ว่าไฮโดรไลเสทจากเลือดไก่สามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาขั้นต่อไปคือการทดสอบประสิทธิภาพเพปไทด์ในระบบเซลล์อื่น ๆ รวมถึงศึกษาในสัตว์ทดลองและมนุษย์ซึ่งจะช่วยให้สามารถยืนยันผลการต่อต้านอนุมูลอิสระได้จริง และเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ควรศึกษาเชิงลึกถึงสารออกฤทธิ์ที่แท้จริง อีกทั้งยังสามารถขยายผลการวิจัยการผลิตเพปไทด์จากเลือดในสัตว์ชนิดอื่นในอุตสาหกรรมเช่น หมู วัว และแพะ เป็นต้น



บรรณานุกรม

- วาริรัตน์ เพชรสีช่วง. (2560). อุตสาหกรรมไก่แช่แข็งและแปรรูป. แนวโน้มธุรกิจ/อุตสาหกรรม ปี 2560-62, 5 หน้า.
- Arihara, K. (2006). Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In: L. Nollet and F. Toldrá (Eds). Advanced technologies for meat processing. pp. 245-273. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Association of official agricultural chemists (AOAC). (2000). Official methods of analysis of AOAC international (17th ed.). AOAC international: Rockville, MD.
- Authen, R.L. and Davis, J.M. (2009). Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. Pediatric Research. Vol 66. 121-127.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidant, and aging. Cell. Vol 120. 483-495.
- Bah, C.S.F., Bekhit, A.E.A., Carne, A., and Mcconnell, M.A. (2015b). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep and pig plasma using plant and fungal protease preparations. Food Chemistry. Vol 176. 54-63.
- Bah, C.S.F., Carne, A., Mcconnell, M.A., Mros, S., and Bekhit, A.E.A. (2016). Production of bioactive peptide hydrolysates from deer, sheep, pig and cattle red blood cell fractions using plant and fungal protease preparations. Food Chemistry. Vol 202. 458-466.
- Bielski, B.H.J. and Cabelli, D.E. (1991). Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions. The International Journal of Radiation Biology. Vol 59. 292-319.
- Buonocore, G., Perrone, S., and Tataranno, M.L. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. Seminars in Fetal and Neonatal Medicine. Vol 15. 186-190.
- Byun, H.G., Lee, J.K., Park, H.G., Jeon, J.K., and Kim, S.K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. Process Biochemistry. Vol 44. 842-846
- Cadenes, E. (1989). Biochemistry of oxygen toxicity. Annual Review of Biochemistry. Vol 58. 79-110.

- Chang, C., Wu, K., and Chiang, S. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. Food Chemistry. Vol 100. 1537-1543
- Chen, H.M., Muramoto, K., and Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -Conglycinin. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 43. 574-578.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J., and Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptide from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. Peptides. Vol 38. 344-349.
- Cheng, F.Y., Lai, I.C., Lin, L.C., and Sakata, R. (2016). The in vitro antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein. Animal Science Journal. Vol 87. 921-928.
- Chiang, W.D., Lee, M.J., Guo, W.S., and Tsai, T.C. (2006). Protein hydrolysate batch production with angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity from egg whites. Journal of Food and Drug Analysis. Vol 14. 385-390.
- Chow, C.K. (1988). Interrelationships of cellular antioxidant defense systems. In C.K. Chow (Ed.). Cellular Antioxidant Defense Mechanisms. pp. 217-237. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Cinq-Mars, C.D., Hu, C., Kitts, D.D., and Li-Chan, E.C.Y. (2008). Investigations into inhibitor type and mode, simulated gastrointestinal digestion, and cell transport of the angiotensin l-converting enzyme-inhibitory peptides in pacific hake (*Merluccius productus*) fillet hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 56. 410-419.
- Conner, E.M. and Grisham, M.B. (1996). Inflammation, free radicals, and antioxidants. Nutrition. Vol 12. 274-277.
- Cornelli, U. (2009). Antioxidant uses in nutraceuticals. Clinics in Dermatology. Vol 27. 175-194.
- Daoud, R., Dubois, V., Bors-Dodita, L., Nedjar-Arrouma, N., Krier, F., Chihib, N., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., and Guilothon, D. (2005). New antibacterial peptide derived from bovine hemoglobin. Peptides. Vol 26. 713-719.
- di-Bernardini, R., Rai, D.K., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., Harnedy, P., and Hayes, M. (2011). Isolation, purification and characterization of antioxidant

- peptide fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolysate. Peptides. Vol 32. 388-400.
- Elias, R.J., Kellerby, S.S., and Decker, E.A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 48. 430-441.
- Fridovich, I. (1995). Superoxide radical and superoxide dismutases. Annual Review of Biochemistry. Vol 64. 97-112.
- Garbett, N., Miller, J.J., Jenson, A.B., Miller, D.M., and Chaires, J.B. (2007). Interrogation of the plasma proteome with differential scanning calorimetry. Clinical Chemistry. Vol 53. 2012-2014.
- Grice, H.C. (1986). Safety evaluation of butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung and gastrointestinal tract. Food and Chemical Toxicology. Vol 24. 1127-1130.
- Gu, L., Zhao, M., Li, W., You, L., Wang, L., Wang, H., and Ren, J. (2012). Chemical and cellular antioxidant activity of two novel peptides designed on glutathione structure. Food and Chemical Toxicology. Vol 50. 4085-4091.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. Annual Review of Nutrition. Vol 16. 33-50.
- Halliwell, B. (2007). Biochemistry of oxidative stress. Biochemical Society Transaction. Vol 35. 1147-1150.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology. Vol 186. 1-85.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1999). Free Radicals in Biology and Medicine (3rd ed.). Oxford University: Oxford, UK.
- Hardy, J.A. and Higgins, G.A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. Science. Vol 256. 184-185.
- Hsu, K.C. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chemistry. Vol 122. 42-48.
- Huang, D., Boxin, O.U., and Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 53. 1841-1856.
- Inous, M., Sato, E.F., and Nishikawa M. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. Current Medicinal Chemistry. Vol 10. 2495-2505.

- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., and Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry. Vol 42. 840-846.
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Lee, S.H., Byun, H.G., and Kim, S.K. (2008). Purification and antioxidant properties of bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. Journal of Medicinal Food. Vol 11. 629-637.
- Jornot, L., Petersen, H., and Junod, A.F. (1998). Hydrogen per-oxide-induced DNA damage is independent of nuclear calcium but dependent on redox-active ions. Biochemical Journal. Vol 335. 85-94.
- Kawanishi, S., Hiraku, Y., Murata., M, and Oikawa, S. (2002). The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. Free Radical Biology and Medicine. Vol 32. 822-832.
- Kim, S.Y., Je, J.Y., and Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. Journal of Nutrition Biochemistry. Vol 18. 31-38.
- Kitts, D.D. and Wellwe, K. (2003). Bioactive proteins and peptides from food sources: Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design. Vol 9. 1309-1323.
- Klaunig, J.E., Xu, Y., Bachowaki, S., and Jiang, J. (1997). Free-radical oxygen induced changes in chemical carcinogenesis. In K.B. Wallace (ed.). Free radical toxicology. pp. 375-400. Taylor & Francis: London: UK.
- Kojo, S. (2004). Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress. Current Medicinal Chemistry. Vol 11. 1041-1064.
- Kong, B., Peng, X., Xiong, Y.L., and Zhao, X. (2012). Protection of lung fibroblast MRC-5 cells against hydrogen peroxide-induced oxidative damage by 0.1-2.8 Da antioxidative peptide isolated from whey protein hydrolysate. Food Chemistry. Vol 135. 540-547.
- Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang., Wang, H., and Wang, X. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*Cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. LWT-Food Science and Technology. Vol 49. 747-756.

- Kudo, K., Onodera, S., Takeda, Y., Benkeblia, N., and Shiomi, N. (2009). Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract. Journal of Functional Foods. Vol 1. 170-176.
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. Vol 16. 945-960.
- Lahl, W.J. and Braun, S.D. (1994). Enzymatic production of protein by hydrolysates for food use. Food Technology. Vol 48. 68-71.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. (1994). The role of O₂ in the production of HO: In *vitro* and in *vivo*. Free Radical Biology and Medicine. Vol 16. 29-33.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. (2002). The Haber-Weiss cycle-70 years later: An alternative view. Redox Report. Vol 7. 55-57.
- Liu, A., Tweed, J. and Wujcik, C.E. (2009). Investigation of an on-line two-dimensional chromatographic approach for peptide analysis in plasma by LC-MS-MS. Journal of Chromatography B. Vol 877. 1873-1881.
- Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., and Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chemistry. Vol 118. 403-410.
- Liu, M., Xiao-jin, Y., Wen-hui., Ying, Y., Bei-bing, Di., Lin, L., and Yong, H. (2011). Plasma catecholamine release-inhibitory peptide catestatin in patients with essential hypertension. Journal of Cardiovascular Medicine. Vol 12. 643-647.
- Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H., and Zhao, Y. (2008). Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea giga*) with alcalase and bromelain. Food Control. Vol 19. 231-235.
- Leonarduzzi, G., Sottero, B., and Poli, G. (2010). Targeting tissue oxidative damage by mean of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited. Pharmacology and Therapeutics. Vol 128. 336-374.
- Loguercio, C. and Federico, A. (2003). Oxidative stress in viral and alcoholic Hepatitis. Free Radical Biology and Medicine. Vol 34. 1-10.
- Matés, J. M., Perez-Gomez, C., and Núñez de Castro, I. (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. Clinical Biochemistry. Vol 32. 595-603.

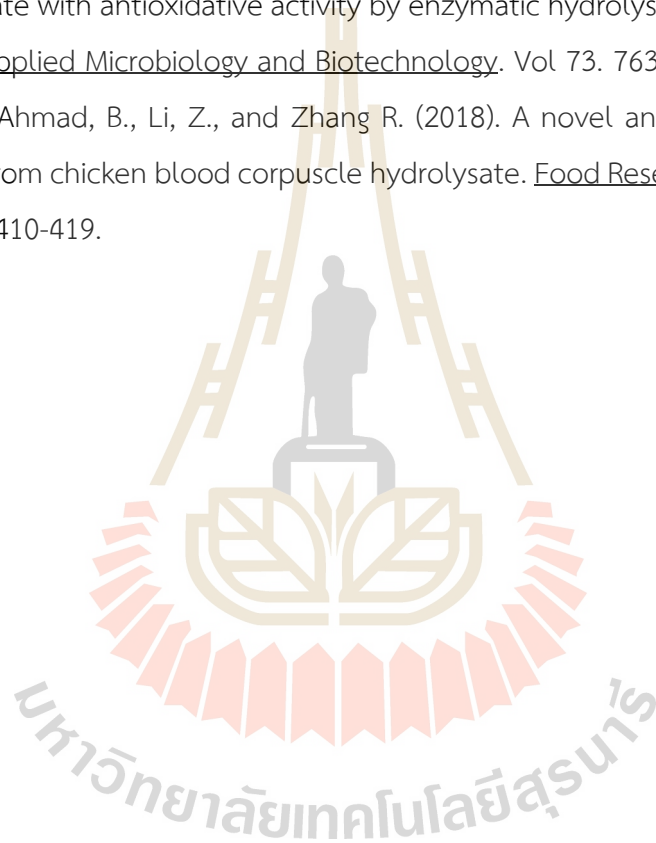
- Meisel, H. and FitzGerald, R.J. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current Pharmaceutical Design. Vol 9. 1289-1295.
- Memarpour-Yazdi, M., Asoodeh A., and Chamani J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. The Journal of Functional Foods. Vol 4. 278-286.
- Memarpour-Yazdi, M., Mahaki, H., and Zare-Zardini, H. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from Zizyphus jujube fruits. Journal of Functional Foods. Vol 5. 62-70.
- 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. 2166-2178.
- Mielnik, M. B., Aaby, K., and Skrede, G. (2003). Commercial antioxidant control lipid oxidation in mechanically deboned turkey meat. Meat Science. Vol 65. 1147-1155.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., and Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autooxidation" reactions. Free Radical Biology and Medicine. Vol 8. 96-108.
- Mine, Y. and Katayama, S. (2008). Antioxidative Stress Peptides. Functional Food and Health. Vol 993. 213-228.
- Mito, K., Fujii, M., Kuwahara, M., Matsumura, N., Shimizu, T., Sugano, S., and Karaki, H. (1996). Antihypertensive effect of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from hemoglobin. European Journal of Pharmacology. Vol 304. 93-98.
- Nawar, W.W. (1996). Lipids. In O.R. Fennema (Ed.). Food chemistry. pp. 225-319. Marcel Dekker: New York, NY.
- Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Park, J.W., and Kim, S.K. (2010). *In vitro* antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. Journal of Functional Foods. Vol 2. 107-117.
- Nedjar-Arroume, N., Dubois-Delval, V., Adje, E.Y., Traisnel, J., Krier, F., Mary, P., Kouach, M., Briand, G., and Guillochon, D. (2008). Bovine hemoglobin: An attractive source of antibacterial peptides. Peptides. Vol 29. 969-977.

- Packer, J.E., Slater, T.F., and Wilson, R.L. (1979). Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. Nature. Vol 278. 737-739.
- Parés, D., Saguer, E. and Carretero, C. (2011). Blood by-products as ingredients in processed meat. In: J.P. Kerry and J.F. Kerry (Eds.). Processed meats: improving safety, nutrition and quality. pp. 218-42. Woodhead: Cambridge, UK.
- Park, K. and Hyun, C. (2002). Antigenotoxic effects of the peptide derived from bovine blood plasma proteins. Enzyme and Microbial Technology. Vol 30. 633-638.
- Pearson, A.M. and Dutson, T.R. (1988). Edible meat by-products. Elsevier Applied Science. Vol 110. 21-159.
- Peter, T. (1996). All about Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. Academic Press: San Diego, CA.
- Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. International Dairy Journal. Vol 16. 1306-1314.
- Picardo, M. and Passi, S. (1997). Free radicals. In J.D. Bos (Ed.). Skin immune system (SIS). pp. 207-226. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Piot, j.M., Zhao, Q., Guillochon, D., and Thomas D. (1992). Isolation and characterization of two opioid peptides from a bovine hemoglobin peptic hydrolysate. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol 189. 101-110.
- Qian, Z.L., Jung, W.K., and Kim, S K. (2008b). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresource Technology. Vol 99. 1690-1698.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., and Kim, S.K. (2005a). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptide on free radical mediated oxidative systems. The Journal of Nutritional Biochemistry. Vol 16. 562-569.
- Ranathuga, S., Rajapakse, N., and Kim, S. K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). European Food Research and Technology. Vol 222. 310-315.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., and Cui, C. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Food Chemistry. Vol 108. 727-736.

- Sakanaka, S. and Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry. Vol 95. 243-249.
- Samaranayaka, A.G.P., Kitts, D.D., and Li-Chan, E.C.Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 cell permeation. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 58. 1535-1542.
- 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. 229-254.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptide from food proteins: A review. Peptide. Vol 31. 1949-1956.
- Seymour, T.A., Peters, M.Y., Morrissey, M.T., and An, H. (1997). Surimi gel enhancement by bovine plasma proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 45. 2919-2923
- Sheih, I.C., Wu, T.K., and Fang, T.J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology. Vol 100. 3419-3425.
- Simmonds, N.J., and Rampoton, D.S. (1993). Inflammatory bowel disease-a radical view. Gut. Vol 34. 865-868.
- Sun, J., He, H., and Xie, B. J. (2004). Novel antioxidant peptide from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 52. 6646-6652.
- Sun, Q., Shen, H., and Luo, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin Journal of Food Science and Technology. Vol 48. 53-60.
- Sun, Y., Pan, D., Guo, Y., and Li, J. (2012). Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. Food and Chemical Toxicology. Vol 50. 3397-3404.

- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C. J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and Cellular Biochemistry. Vol 266. 37-56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions. Vol 160. 1-40.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Vol 39. 44-84.
- Valko, M., Morris, H., and Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. Current Medicinal Chemistry. Vol 12. 1161-1208.
- Vercruyse, L., Van Camp, J., and Smagghe, G. (2005). ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol 53. 8106-8115.
- Viitaglione, P., Morisco, F., Caporaso, N., and Fogliano, V. (2004). Dietary antioxidant compounds and liver health. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Vol 44. 575-586.
- Wang, J., Zhang, H., Zhang, M., Yao, W., Mao, W. and Ren, F. (2008). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions of porcine plasma albumin and globulin. Journal of Food Biochemistry. Vol 32. 693-707.
- Wei, J.T. and Chiang, B.H. (2009). Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 89. 372-378.
- Wichi, H.P. (1988). Enhanced tumor development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the oesophageal squamous epithelium. Food and Chemical Toxicology. Vol 26. 717-723.
- Xu, X., Cao, R., He, L. and Yang, N. (2009). Antioxidant activity of hydrolysates derived from porcine plasma. Journal of the Science of Food and Agriculture. Vol 89. 1897-1903.
- Zhang, T., Li, Y., Miao, M., and Jiang, B. (2011). Purification and characterization of a new antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietium* L.) protein hydrolysates. Food Chemistry. Vol 128. 28-33.

- Zhang, H., Wang, J., Li, R., Bai, J., Ye, Y., and Ren, F. (2008). Attenuated effects of peptides derived from porcine plasma albumin on *in vitro* peroxidation in the liver homogenate of mice. Food Chemistry. Vol 111. 364-369.
- Zhang, J. H., Zhang, H., Wang, L., Guo, X.N., Wang, X.G., and Yao, H.Y. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. Food Chemistry. Vol 119. 226-234.
- Zheng, X.Q., Li, L.T., Liu, X.L., Wang, X.J., Lin, J., and Li, D. (2006). Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 73. 763-770.
- Zheng, Z., Si, D., Ahmad, B., Li, Z., and Zhang R. (2018). A novel antioxidative peptide derived from chicken blood corpuscle hydrolysate. Food Research International. Vol 106. 410-419.



ประวัติผู้วิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. หัวหน้าโครงการวิจัย

1.1 ชื่อ รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล (Assoc. Prof. Dr. Jirawat Yongsawatdigul)

1.2 หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-22-4387
E-mail: jirawat@sut.ac.th

1.3 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา (สาขาวิชา)	วิชาเอก	สถาบันศึกษา	ประเทศ
2539	Ph.D. (Food Science and Technology)	Seafood chemistry	Oregon State University	อเมริกา
2535	M.S. (Food Science)	Food processing	University of Wisconsin-Madison	อเมริกา
2532	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต) เกียรตินิยมอันดับ 2	เทคโนโลยีอาหาร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

1.4 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- โปรตีน เพปไทด์ และเอนไซม์สำหรับเทคโนโลยีการอาหาร
- การใช้ประโยชน์จากวัสดุชีวภาพเหลือทิ้งจากฟาร์ม-อุตสาหกรรม เพื่อผลิตเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพมูลค่าสูง
- การใช้ประโยชน์จากกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักโปรตีน
- วิทยาศาสตร์ทางด้านโปรตีนหลังการเก็บเกี่ยวในระดับโมเลกุล
- กระบวนการแปรรูปและคุณภาพของผลิตภัณฑ์จากโปรตีนปลา

1.5 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

1.5.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: จำนวน 50 โครงการ

1.5.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียนในประเทศไทย: จำนวน 1 สิทธิบัตร

1.5.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
วารสารระดับชาติ 2 เรื่อง และวารสารระดับนานาชาติ 108 เรื่อง

2. ผู้ร่วมวิจัย

1.1 ชื่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์ (Asst. Prof. Dr. Benjamart Chitsomboon)

2.2 หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก:

สาขาปรีคลินิก (ชีวเวชศาสตร์) สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เลขที่ 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทร 044-22-4187 โทรสาร 044-22-4185
E-mail: benja@sut.ac.th

2.3 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา (สาขาวิชา)	วิชาเอก	สถาบันศึกษา	ประเทศ
2529	Ph.D. (Toxicology)	Pharmacology and Toxicology	Utah State University	อเมริกา
2523	M.S. (Environmental health)	Toxicology	University of Michigan	อเมริกา
2520	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

2.4 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญการพิเศษ

- ระบบวิทยาการต้านการอักเสบและและการก่อกลายพันธุ์ (Anti-inflammatory)
- ระบบการก่อกลายพันธุ์ (Gene mutagenic and mutation)
- ระบบภูมิคุ้มกันและพิษวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunology and immunotoxicology)
- การปนเปื้อนสารพิษ (Toxic contaminants)
- พฤษศาสตร์บำบัด (Phytoremediation)
- สารพิษจากเชื้อราในอาหาร (Food poisoning from Fungi)
- คุณสมบัติทางชีวเคมีของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากสมุนไพร

2.5 ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยและงานวิจัย

2.5.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: มากกว่า 20 โครงการ

2.5.2 สิทธิบัตรที่ยื่นจดทะเบียนในประเทศไทย: -

2.5.3 ผลงานวิจัยที่ได้พิมพ์เผยแพร่

- ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ
วารสารระดับนานาชาติมากกว่า 60 เรื่อง