

รหัสโครงการ 2559A10802098

สัญญาเลขที่ 105/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดได้จากกากน้ำปลา

Bioactive activities of peptides extracted from fish sauce byproduct

อ.ดร. แวววลี โชคแสงการ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ.ดร. ผาณิตา เอี้ยวชีโป

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. สิริรักษ์ รอยตระกูล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศ. ดร. สุทธวัฒน์ เบญจกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กรกฎาคม 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 105/2559

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์สุทนต์ บัญกุล ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย สำหรับการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดการดำเนินโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด สำหรับตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 และการให้ข้อมูลเกี่ยวกับกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา

บทคัดย่อ

กากน้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา ซึ่งมีมูลค่าต่ำแต่ยังคงมีสารอาหารที่มีคุณค่าสูง ในกระบวนการผลิตน้ำปลาในโรงงานอุตสาหกรรม โปรตีนจากปลาจะถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงด้วยเอนไซม์จากระบบย่อยอาหารของปลา และเอนไซม์จากแบคทีเรียที่หมักในบ่อหมัก จึงสามารถจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตที่เกิดตามธรรมชาติได้ กากน้ำปลาแบ่งออกเป็น 3 ระดับชั้นคุณภาพ ตามระดับของน้ำปลาที่ผลิตและระยะเวลาในการหมัก ซึ่งทำให้โมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซตมีขนาดแตกต่างกันด้วยงานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลาเพื่อนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์พลอยได้ โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกศึกษา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กากน้ำปลาถูกนำมาศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสมและวิธีแยกเปปไทด์ออกจากเกลือโดยใช้ gel-filtration chromatography ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีนในกากน้ำปลา มีค่าลดลงตามระดับชั้นคุณภาพที่ลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนไม่มีความสอดคล้องโดยตรงกับฤทธิ์ทางชีวภาพ กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme ได้ดีกว่าอีกสองระดับชั้นคุณภาพ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.32 ± 0.02 mg/mL และ 0.99 ± 0.40 mg/mL ตามลำดับ กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl และจับกับไอออนของโลหะได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.36 ± 0.01 mg/mL และ EC_{50} เท่ากับ 1.00 ± 0.12 mg/mL ตามลำดับ กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus*, *E. coli* and *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้บางส่วน อย่างไรก็ตาม กากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพไม่มีแสดงคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ทั้งนี้ โครงการวิจัยต่อเนื่องในปีที่สองจะมุ่งเน้นไปที่การแยกส่วนเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพตามคุณสมบัติของเปปไทด์ และมุ่งเน้นการทำบริสุทธิ์เปปไทด์เพื่อนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของกากน้ำปลาต่อไป

ABSTRACT

Fish sauce byproduct (FSB) is a waste from fish sauce industry. It is known to be low value but rich in nutrients. In the fish sauce manufacturing process, fish proteins are cleaved by proteases from the fish gastrointestinal system and from halophilic bacteria in the fermentation tank. Therefore, FSB is considered as natural protein hydrolysate. FSB can be classified into 3 grades, depending on the grade of fish sauce and fermentation period. Thus, the molecular weight of peptides from each grade of the protein hydrolysate could be varied. This work focuses on investigation of biological activities of peptides from FSB, including antioxidant, ion chelation, antihypertensive, antibacterial and anticancer activities, in order to develop value-added products from the FSB. In our experiment, extraction protocols were optimized, and desalting methods were performed using gel-filtration chromatography. Our results indicated that protein concentration of the FSB extracts were decreased with lowering grades of the FSB. Protein content was not correlated with the FSB bioactivities. The 1st grade FSB showed the strongest abilities to inhibit DPPH radicals and angiotensin-converting enzyme activity with the IC₅₀ values of 0.32 ± 0.02 mg/mL and 0.99 ± 0.40 mg/mL, respectively. The 2nd grade FSB revealed the strongest abilities to scavenge hydroxyl radicals and to chelate metal ion with the IC₅₀ of 0.36 ± 0.01 mg/mL and EC₅₀ of 1.00 ± 0.12 mg/mL, respectively. The 2nd and 3rd grade FSB exhibited partial antibacterial activity against *S. aureus*, *E. coli* and *X. oryzae pv. oryzae*. However, none of the FSB exhibited anticancer activity against hepatocarcinoma cell line HepG2. In our continuing research project, we aim to fractionate the bioactive peptides based on their properties and to purify the bioactive peptides for the future development for adding value to the industrial waste.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
บทนำ	8
วิธีการทดลอง	18
ผลการทดลอง	24
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	34
ข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	38
ประวัติย่อคณะผู้วิจัย	44

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 เปปไทด์ที่ได้จากสัตว์ทะเลและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง	13
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน	29
ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน	29
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถจับกับไอออนโลหะได้ร้อยละ 50 (EC ₅₀) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน	30
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 (IC ₅₀) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน	31

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ภาพรวมของการทดลองในปีที่ 1	19
รูปที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง (a) สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (b) เวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน	24
รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography	25
รูปที่ 4 ค่าการนำไฟฟ้า ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography	25
รูปที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography	25
รูปที่ 6 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1 st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2 nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3 rd)	26
รูปที่ 7 SDS-PAGE แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่พบในน้ำปลา และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ตามที่ระบุด้านบนแผ่นเจล	26
รูปที่ 8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4	27
รูปที่ 9 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4	28
รูปที่ 10 ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4	28
รูปที่ 11 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4	30
รูปที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4	31
รูปที่ 13ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (a) <i>S. aureus</i> , (b) <i>E. coli</i> และ (c) <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1 st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2 nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3 rd) ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (Khositanon <i>et al.</i> , 2018)	32
รูปที่ 14 ผลของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1 st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2 nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3 rd) ที่ความเข้มข้น 200 μ g/mL และ 400 μ g/mL ต่อการเจริญของ (a) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell line และ (b) เซลล์ปกติ Vero cell line (Khositanon <i>et al.</i> , 2018)	33

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ACE	Angiotensin-converting enzyme
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FSB	Fish sauce byproduct
HHL	Hippuryl-histidyl-leucine
MHB	Mueller Hinton Broth
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สถิติจาก Food and Agriculture Organization (FAO) ในปี 2012 แสดงให้เห็นว่า มีการใช้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำในตลาดโลกในปริมาณสูงถึง 158 ล้านตัน ในจำนวนนี้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ประชากรใช้บริโภคประมาณ 136 ล้านตัน และมีส่วนที่ไม่สามารถบริโภคได้ถึง 32 ล้านตัน ซึ่งส่วนมากจะเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ (byproduct) ที่ถูกนำไปแปรรูปเป็นอาหารสัตว์เลี้ยง เนื่องจากผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทะเลมีคุณค่าทางอาหารสูงและมีปริมาณมาก การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนากระบวนการแปรรูปและใช้ประโยชน์จากสารอาหารจากผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านี้จึงได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น โดยมีการนำไปใช้ในรูปแบบของอาหารเสริมเพื่อสุขภาพ ยา เครื่องสำอาง และเชื้อเพลิงชีวภาพ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2014)

อุตสาหกรรมอาหารทะเลที่สำคัญอย่างหนึ่งของประเทศไทยคืออุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลาซึ่งแสดงถึงเอกลักษณ์ของอาหารไทยและได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในตลาดโลก รายงานจากข้อมูลการค้าระหว่างประเทศของไทย กระทรวงพาณิชย์ (www2.ops3.moc.go.th) ระบุว่ามูลค่าการส่งออกน้ำปลาของประเทศไทย ในปี 2556 สูงถึง 1,423 ล้านบาท และข้อมูลจากกลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง กรมประมง แสดงให้เห็นว่าปริมาณสัตว์น้ำที่ใช้ในการผลิตน้ำปลาในประเทศไทยสูงถึง 106,630 ตัน ในปี 2554 (สถิติหน่วยธุรกิจการประมง, 2554) วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตคือปลาสดและเกล็ด โดยทำการหมักปลาสดและเกล็ดในอัตราส่วน 2:1 ถึง 5:1 โดยน้ำหนัก เป็นระยะเวลาประมาณ 6-18 เดือน (อรรธรณ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนใสและผลิตภัณฑ์พลอยได้ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า กากน้ำปลา (fish sauce byproduct) ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะมีการนำกากน้ำปลาไปหมักต่อเพื่อใช้เป็นน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นกากน้ำปลาจะถูกแปรรูปเป็นอาหารสัตว์เลี้ยงและปุยชีวภาพที่มีมูลค่าต่ำ สถิติจาก บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด ระบุว่าปริมาณกากน้ำปลาที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตในแต่ละปีมีปริมาณสูงถึง 2,040 ตัน

กากน้ำปลาประกอบไปด้วยสารอาหารที่สำคัญคือ โปรตีน (ร้อยละ 15.37) คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 21.32) และไขมัน (ร้อยละ 3.15) และส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ เกล็ด ความชื้น เถ้า และเยื่อใยหยาบ (คันธารัตน ประทุมวัลย์ และคณะ, 2549) ในปัจจุบันยังมีการนำกากน้ำปลาเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างไม่เต็มที่ คณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของการศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารอาหารจากกากน้ำปลา ทั้งนี้ มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารทะเลชนิดอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตซูริมิและอุตสาหกรรมอาหารทะเลแปรรูป ในรูปแบบของการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) โดยอาศัยเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจากผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านั้นให้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) ซึ่งอุดมไปด้วยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Benjakul *et al*, 1997) เปปไทด์บางชนิดที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Piyadhamviboon *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013; Wiriayaphan *et al*, 2015), การจับกับ

ไอออนของโลหะ (metal ion chelating activity) เพื่อลดการสร้างอนุมูลอิสระและเพิ่มการนำส่งไอออนที่จำเป็นต่อร่างกาย (Megias *et al*, 2007; Charoenphun *et al*, 2013; Jung *et al*, 2007), การลดความดันโลหิต (antihypertensive activity) โดยยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme (ACE) (Piyadhamviboon *et al*, 2012; Je *et al*, 2004), การต้านการเจริญของจุลชีพ (antimicrobial activity) (Rajanbabu and Chen, 2011; Su 2011), การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) (Lee *et al*, 2004; Kim *et al*, 2012) โดยฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างปฐมภูมิและมวลโมเลกุลของเปปไทด์ (Shahidi and Zhong, 2008) เปปไทด์บางชนิดอาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งอย่าง (Meisel and FitzGerald, 2003; Piyadhamviboon *et al*, 2012) ในปัจจุบันมีการจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์จากเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและใช้ในทางการค้าในรูปแบบของอาหารเสริมและยา เช่น PeptACETM Vasotensin[®] LevenormTM จากปลาทูน่าใช้เพื่อควบคุมความดันโลหิต เป็นต้น (Thorkelsson and Kristinsson, 2008) ทั้งนี้ การใช้ประโยชน์จากเปปไทด์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการป้องกันและรักษาโรค เนื่องจากเป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่ไม่เป็นพิษต่อร่างกาย จากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับกากน้ำปลาในประเทศไทย พบว่ายังมีการศึกษาวิจัยในวงจำกัด โดยยังไม่พบรายงานการใช้ประโยชน์จากกากน้ำปลาในรูปแบบของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่ากากน้ำปลาจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตตามธรรมชาติรูปแบบหนึ่งที่เกิดจากการย่อยโปรตีนในปลาสดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจากภายในตัวปลาและเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดทนเค็มภายในบ่อหมักน้ำปลา จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะมีเปปไทด์ที่มีโครงสร้างปฐมภูมิและขนาดที่หลากหลาย และมีแนวโน้มเป็นอย่างสูงที่จะพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว โดยจากผลการทดลองเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่าในกากน้ำปลามีกลุ่มเปปไทด์หลายชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 45 kDa และพบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระในหลอดทดลอง ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่มีอยู่ในกากน้ำปลา ซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ ลดความดันโลหิต ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้มีการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของกากน้ำปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา รวมถึงเป็นการพัฒนานวัตกรรมอาหารฟังก์ชัน (functional food) เพื่อสุขภาพที่ดี ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในหมู่ผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ โดยในระยะยาวอาจมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเปปไทด์ที่เป็นอาหารเสริมหรืออาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการปกติ โครงการวิจัยฉบับนี้เป็นอีกก้าวหนึ่งของการใช้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการผลิตน้ำปลาไทยซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านแขนงหนึ่งและเพื่อพัฒนาศักยภาพของอุตสาหกรรมขนาดย่อมในเขตชุมชนในการใช้วัตถุดิบให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำปลามาใช้ประโยชน์ในเชิงอาหารฟังก์ชันเพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1) เพื่อศึกษาวิเคราะห์มวลโมเลกุลและปริมาณของเปปไทด์ที่มีอยู่ในกากน้ำปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตน้ำปลาระดับคุณภาพขั้นที่ 1 2 และ 3

2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาในการต้านอนุมูลอิสระ การจับกับไอออนของโลหะ การยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme การต้านการเจริญของจุลชีพ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

3) เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ วิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน และศึกษาเสถียรภาพ (stability) ของเปปไทด์บริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 คณะผู้วิจัยจะทำการสกัดและวิเคราะห์เปปไทด์จากกากน้ำปลา ซึ่งได้จากการผลิตน้ำปลาระดับคุณภาพขั้นที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตน้ำปลาในเขตชุมชน จ.ชลบุรี (บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจะเริ่มศึกษาเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซสที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในระหว่างการหมักน้ำปลาโดยอาศัยเอนไซม์โปรติเอสในระบบทางเดินอาหารของปลาและเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดทนเค็ม เปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพจะถูกนำมาวิเคราะห์หามวลโมเลกุลและปริมาณ จากนั้นคณะผู้วิจัยจะทำการแยกส่วนสกัดอย่างหยาบเพื่อแยกเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่นๆออกจากเปปไทด์ ก่อนที่จะนำไปศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ (1) การต้านอนุมูลอิสระโดยตรวจสอบการทำงานในหลอดทดลอง เพื่อทดสอบความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) และความสามารถในการต้านการเกิด lipid peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ซึ่งใช้เป็นแบบจำลองสำหรับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในเซลล์ (2) ความสามารถของเปปไทด์ในการจับกับโลหะไอออน เช่น Fe^{2+} เพื่อป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ (3) ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของโรคความดันโลหิตสูง เพื่อการพัฒนาเป็นอาหารทางเลือกสำหรับลดความดันโลหิตต่อไป (4) ความสามารถในการต้านการเจริญของจุลชีพ โดยจะทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และ (5) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ หลังจากนั้น ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ส่วนสกัดที่แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและมีปริมาณเปปไทด์มากจะถูกเลือกสำหรับทำบริสุทธิ์เปปไทด์ต่อไป คณะผู้วิจัยจะศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟี และ ultrafiltration เปปไทด์บริสุทธิ์จะถูกวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย tandem mass spectrometry โดยใช้เทคนิคในการเกิด fragmentation คือ Collisionally-induced dissociation (CID) เพื่อบอกลำดับกรดอะมิโนและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันในกรดอะมิโน นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยจะศึกษาเสถียรภาพของเปปไทด์บริสุทธิ์ในเบื้องต้น และศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนเปปไทด์จากกากน้ำปลา เพื่อเป็นแนวทางในการต่อยอดงานวิจัยต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

ในปี 2554 ประเทศไทยมีการใช้สัตว์น้ำในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำปลาเป็นปริมาณสูงถึง 106,630 ตัน (สถิติหน่วยธุรกิจการประมง, 2554) และในกระบวนการผลิตน้ำปลา มีกากน้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จำนวนมาก ซึ่งมักจะถูกแปรรูปเป็นปุ๋ยหรืออาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาเพื่อใช้ประโยชน์ในเชิงอาหารเพื่อสุขภาพและเป็นการเพิ่มมูลค่าของกากน้ำปลารูปแบบหนึ่ง ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลา ในขณะที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับอาหารและอาหารทะเล มีรายงานทางวิชาการระบุว่าการใช้เอนไซม์โปรตีเอส เช่น alcalase, neutrase, trypsin, chymotrypsin, pepsin, *Virgibacillus* sp. SK33 เพื่อย่อยโปรตีนจากผลิตภัณฑ์ พลอยได้เหล่านั้นนำไปสู่การผลิตเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น การย่อยผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตซูริมิจากปลา threadfin bream ด้วยเอนไซม์ *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase และ alcalase ให้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดความดันโลหิต (Piyadhamviboon *et al*, 2012; Wiriayaphan *et al*, 2015), การย่อยเกล็ดปลา croceine croaker ด้วยเอนไซม์ trypsin และ pepsin ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์ GFRGTIGLVG, GPAGPAG, GFPSG ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Wang *et al*, 2013), การย่อยโปรตีนจากปลา tilapia ด้วยเอนไซม์ alcalase ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์ที่มี calcium-binding motif WEWLHYW ซึ่งมีความสามารถในการจับกับแคลเซียมไอออนสูง (Charoenphun *et al*, 2013), การย่อยโปรตีนจากหอย *Mytilus coruscus* ด้วยเอนไซม์ pepsin ให้ผลิตภัณฑ์เป็นเปปไทด์ AFNIHNRNLL ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งปอด (Kim *et al*, 2012) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการอุตสาหกรรมอาหารทะเลโดยไม่ผ่านการย่อย เช่น เยื่อหุ้มหนังปลา yellow catfish มีเปปไทด์ GKLNFLSLRLEILKLFVGAL ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา (Su, 2011) และพบ hydrophobic fraction ของเปปไทด์ที่สกัดจากน้ำปลา anchovy ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งชนิด human lymphoma (U937) (Lee *et al*, 2004) เป็นต้น นอกจากตัวอย่างดังกล่าว ยังมีเปปไทด์อีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 1 คุณสมบัติทางชีวภาพเหล่านี้มีความหลากหลาย เนื่องจากกรดอะมิโน 20 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์มีคุณสมบัติเฉพาะตัวขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันแต่ละประเภท ปัจจัยหลักที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้คือโครงสร้างปฐมภูมิและความยาวของสายเปปไทด์ (Shahidi and Zhong, 2008)

กากน้ำปลาจัดเป็นกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเซตตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารในรูปของเปปไทด์อยู่ปริมาณมาก ในการกระบวนการผลิตน้ำปลามีเอนไซม์โปรตีเอสที่เกี่ยวข้องหลายชนิดทั้งจากภายในตัวปลาและเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่พบในบ่อหมักน้ำปลา เช่น *Halobacterium salinarum*, *Halobacillus thailandensis*, *Virgibacillus* spp. SK33 เป็นต้น (ศิริลักษณ์ นามวงศ์, 2553) เปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนในปลาสดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิดดังกล่าวมีความหลากหลายสูง ทั้งในด้านของลำดับกรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเป็นระยะเวลานาน 6-18 เดือน และความยาวของสายเปปไทด์ ซึ่งอาจทำให้เปปไทด์ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่ามีโพลีเปปไทด์จำนวนมากที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า

45 kDa ในตัวอย่างกากน้ำปลา โดยที่แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ในตัวอย่างกากน้ำปลาในระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 มีความแตกต่างจากตัวอย่างน้ำปลาในระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และจากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น พบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูง มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3kDa จากไฮโดรไลเซตของ porcine hemoglobin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น (Sun *et al*, 2011) ผลการทดลองเบื้องต้นนี้จะพื้นฐานไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงสมมติฐานว่ามีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่เปปไทด์บริสุทธิ์ที่สกัดจากกากน้ำปลาอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ/ลดความดันโลหิต/มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ/ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย/ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่เปปไทด์อาจแสดงคุณสมบัติอย่างใดอย่างหนึ่งหรือแสดงคุณสมบัติหลายอย่างร่วมกัน

ตารางที่ 1 เปปไทด์ที่ได้จากสัตว์ทะเลและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง

เปปไทด์	แหล่งกำเนิด	เอนไซม์	ฤทธิ์ทางชีวภาพ	เอกสารอ้างอิง
GFRGTIGLVG, GPAGPAG, GFPSG	<i>Pseudosciaena crocea</i>	trypsin/ pepsin	ต้านอนุมูลอิสระ	Wang <i>et al</i> , 2013
RPDFDLEPPY	<i>Limanda aspera</i>	alcalase/ chymotrypsin/ papain/ pepsin/PronaseE/ Neutrase/ trypsin	ต้านอนุมูลอิสระ	Jun <i>et al</i> , 2004
PSYV	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Papain	ต้านอนุมูลอิสระ	You <i>et al</i> , 2010
AMTGLEA	<i>Parastromateus niger</i>	pepsin/trypsin/ chymotrypsin	ต้านอนุมูลอิสระ	Jai Ganesh <i>et al</i> , 2011
VLSGGTTMAMYTLV	<i>Theragra chalcogramma</i>	pepsin	จับกับไอออนโลหะ	Jung <i>et al</i> , 2006
VLSGGTTMYASLYAE	<i>Johnius belengerii</i>	pepsin	จับกับไอออนโลหะ	Jung and Kim, 2007
motif-WEWLHYW	<i>Oreochromis niloticus</i>	alcalase	จับกับไอออนโลหะ	Charoenphun <i>et al</i> , 2013
GDLGKTTTVSNWSP PKYKDTP	Tuna	pepsin	ยับยั้ง ACE	Lee and Kim, 2010
AWLHPGAPKVF	<i>Phascolosoma esculenta</i>	pepsin	ยับยั้ง ACE	Du <i>et al</i> , 2013
GY, VY, GF, VIY	sea bream	enzyme L	ยับยั้ง ACE	Fahmi <i>et al</i> , 2004
FGASTRGA	Alaska pollack	pepsin	ยับยั้ง ACE	Je <i>et al</i> , 2004
GKLNLFSLRLEILKLF VGAL	<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	-	ยับยั้งการเจริญของ จุลชีพ	Su, 2011
Piscidin 2	hybrid striped bass	-	ยับยั้งการเจริญของ จุลชีพ	Sung <i>et al</i> , 2008
AFNIHNRNLL	<i>Mytilus coruscus</i>	pepsin	ยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็ง	Kim <i>et al</i> , 2012
LPHVLTPEAGAT, PTAEGVYMVT	Tuna	papain/ Protease XXIII	ยับยั้งการเจริญของ เซลล์มะเร็ง	Hsu <i>et al</i> , 2011

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

กากน้ำปลาร้าจัดเป็นไฮโดรไลเซตตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการจากโปรตีนสูงที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา การผลิตน้ำปลาร้าเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่สืบทอดกันมาช้านานและเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางเศรษฐกิจเนื่องจากมีความต้องการในตลาดโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ควบคู่กับการขยายตัวของตลาดอาหารไทย กระบวนการผลิตน้ำปลาร้าเริ่มจากการผสมปลาทะเลขนาดเล็กกับเกลือในอัตราส่วน 2:1 ถึง 5:1 โดยน้ำหนัก และหมักเป็นเวลานาน 6-18 เดือน การย่อยสลายของปลาเกิดจากเอนไซม์โปรตีเอสทั้งจากอวัยวะภายในและจากภายนอกตัวปลาซึ่งถูกผลิตมาจากแบคทีเรียภายในถึงหมัก โดยเฉพาะในกลุ่ม halophilic bacteria (อรรณพ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) กระบวนการผลิตน้ำปลาร้าภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย มีการแบ่งน้ำปลาร้าแหว่งออกเป็นสามระดับคุณภาพโดยวัดจากปริมาณ total nitrogen น้ำปลาร้าระดับคุณภาพชั้นที่ 1 เกิดจากการหมักปลาสดโดยตรง ส่วนน้ำปลาร้าระดับคุณภาพชั้นที่ 2 และ 3 ได้จากการหมักกากน้ำปลาร้าที่เหลือจากน้ำปลาร้าระดับคุณภาพชั้นที่ 1 และ 2 ตามลำดับ กากน้ำปลาร้าที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาร้าระดับคุณภาพชั้นที่ 3 จะถูกใช้เป็นปุ๋ยหรืออาหารสัตว์ (ข้อมูลจากโรงงานผลิตน้ำปลาร้าแห่งหนึ่งใน จ.ชลบุรี) ซึ่งกากน้ำปลาร้าเหล่านี้มีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 15.37 คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 21.32 และไขมัน ร้อยละ 3.15 (คันธารัตน ประทุมวัลย์ และคณะ, 2549) แม้ว่าในปัจจุบันจะมีกลุ่มวิจัยที่ให้ความสำคัญกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาร้าไทยในหลายรูปแบบ มีการศึกษาถึงการเพิ่มเอนไซม์โปรตีเนสจากแบคทีเรียเพื่อเร่งกระบวนการผลิต (Yongsawatdigul *et al*, 2007; ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) และการศึกษาการผลิตน้ำปลาร้าโซเดียมต่ำเพื่อเป็นอาหารทางเลือกให้ผู้ใส่ใจสุขภาพและผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงและโรคไต (Chindapan *et al*, 2009) แต่ยังไม่มียานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลาร้า

ในปัจจุบัน มีรายงานทางวิชาการเกี่ยวกับการสกัดและการทำบริสุทธิ์ของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) ซึ่งได้จากกระบวนการหมักหรือกระบวนการย่อยโปรตีนที่พบในอาหาร เช่น นม เนื้อสัตว์ อาหารทะเล โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรไลเซตซึ่งอุดมไปด้วยเปปไทด์ที่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาร้า เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพส่วนใหญ่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 2-20 หน่วย (Ryan *et al*, 2011; Shahidi and Zhong, 2008) โดยมีการออกฤทธิ์ได้หลากหลายรูปแบบ เช่น การต้านอนุมูลอิสระ, การต้านการเจริญเติบโตของจุลชีพ, การลดความดันโลหิต, การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน, การลดการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง, การลดการอักเสบ, การต้านเชื้อไวรัส HIV, การป้องกันการแข็งตัวของเลือด, การลดปริมาณคลอเลสเตอรอล, การระงับอาการปวดโดยจับกับ opioid receptor, และความสามารถในการจับกับแคลเซียม (Najafian and Babji, 2012; Nalinanon *et al*, 2011; Ryan *et al*, 2011; Shahidi and Zhong, 2008) โดยที่คุณสมบัติเหล่านี้ขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ และมีงานวิจัยระบุว่าเปปไทด์บางชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากกว่าหนึ่งอย่าง (Meisel and FitzGerald, 2003; Piyadhamviboon *et al*, 2012)

การนำไฮโดรไลเซตจากปลามาใช้ประโยชน์จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของเนื้อปลาและเศษเหลือปลาซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล การเตรียมไฮโดรไลเซตทำได้โดยใช้เอนไซม์ เช่น

alcalase, neutrase, trypsin, chymotrypsin, pepsin, *Virgibacillus* sp. SK33 ในการย่อยโปรตีนในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น (Benjakul and Morrissey, 1997; Najafian and Babji, 2012; Wiriyan et al, 2015) ผลิตภัณฑ์เปปไทด์ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ มีเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่ได้รับการจดสิทธิบัตรและใช้ในทางการค้าเพื่อเป็นอาหารเสริมและยา เช่น (1) PeptACE™ เป็นเปปไทด์ที่สกัดได้จากปลาทูน่าชนิด Bonito ใช้เพื่อควบคุมความดันโลหิต โดยช่วยยับยั้งการทำงานของ angiotensin converting enzyme, (2) SEACURE® ซึ่งสกัดได้จากเนื้อปลาทะเลเล็ก มีส่วนช่วยในการทำงานและรักษาอาการอักเสบที่เกิดในระบบทางเดินอาหาร, (3) Nutripeptin® สกัดจากเนื้อปลา codfish มีส่วนช่วยในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (Thorkelsson and Kristinsson, 2009; Marchbank et al, 2008) เป็นต้น

การออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ขึ้นอยู่กับโครงสร้างปฐมภูมิและขนาดของเปปไทด์ ซึ่งเป็นผลมาจากโครงสร้างปฐมภูมิของโปรตีนและสภาวะของการเกิดไฮโดรไลซิส (Shahidi and Zhong, 2008) ในส่วนของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีการตั้งสมมติฐานกลไกการทำงานหลายรูปแบบ โดยภาพรวมกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อการขจัดอนุมูลอิสระมีหมู่ฟังก์ชันที่สามารถให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ เช่น หมู่ phenolic ใน tyrosine หมู่ indole ใน tryptophan หมู่ thiol ใน cysteine, และ หมู่ imidazole ใน histidine และมีการตั้งข้อสังเกตว่ากรดอะมิโน leucine, valine และ proline ก็มีส่วนสำคัญต่อการทำลายอนุมูลอิสระเช่นเดียวกัน รายงานวิจัยจาก Chen et al ระบุว่าเปปไทด์ 6 ชนิด จากไฮโดรไลเซตของถั่วเหลืองที่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ มีความคล้ายคลึงกันคือ valine และ leucine อยู่ที่ N-terminus และมี proline, histidine, tyrosine เป็นองค์ประกอบ (Chen et al, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับของ tripeptide PHH เป็นส่วนสำคัญของฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Chen et al, 1996) ต่อมา Saito et al ทำการทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ 114 tripeptides ที่มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับ PHH และ 108 tripeptides ที่ประกอบด้วย histidine หรือ tyrosine อย่างน้อยสอง residue คณะผู้วิจัยพบว่า tripeptide ที่มี tyrosine สอง residue มีฤทธิ์สูงกว่า histidine สอง residue และส่วนที่มีความสำคัญต่อ radical scavenging activity คือ tryptophan และ tyrosine ที่ปลาย C-terminus นอกจากนี้ยังพบว่า cysteine ใน tripeptide มีความสำคัญต่อการขจัดอนุมูล peroxynitrite (Saito et al, 2003) ตัวอย่างงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีความหลากหลายของโครงสร้างปฐมภูมิสูง

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับโลหะไอออนเนื่องจากไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง เป็นสาเหตุให้เกิด reactive oxygen species ขึ้นในระบบ หากเปปไทด์มีความสามารถในการเข้าจับกับไอออนของโลหะได้ดีก็จะช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระด้วย Megias et al รายงานว่าความสามารถในการจับกับไอออนทองแดง ของเปปไทด์จากถั่ว chickpea ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ histidine ซึ่งมีหมู่ imidazole ที่เข้าจับกับโลหะไอออนได้ดี และยังขึ้นอยู่กับความยาวของสายเปปไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วย (Megias et al, 2007) นอกจากนี้ความสามารถในการเข้าจับกับโลหะของเปปไทด์ยังเป็นประโยชน์ในด้านการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น แคลเซียม โดยเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมีกรดอะมิโนที่มีประจุลบหรือมีหมู่ imidazole เช่น WEWLHYW จากไฮโดรไลเซตของปลา tilapia (Charoenphun et al, 2013), TCH จากไฮโดรไลเซตกุ้ง

(Huang *et al*, 2011), และ VLSGGTTMYASLYAE (Jung and Kim, 2007) จากไฮโดรไลเซทของปลา hoki เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการค้นพบเปปไทด์หลายชนิดจากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีฤทธิ์ในการลดความดันโลหิต โดยทดสอบจากความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme (ACE) เอนไซม์ชนิดนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนโมเลกุล angiotensin I ให้เป็น angiotensin II ซึ่งมีผลให้หลอดเลือดหดตัว ด้วยเหตุนี้การยับยั้งการทำงานของ ACE จึงส่งผลต่อการลดความดันโลหิต เปปไทด์ที่เป็น ACE inhibitor มีลำดับกรดอะมิโนที่หลากหลาย แต่มีความคล้ายคลึงกันคือ การที่กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก อยู่ปลาย C-terminus และอีกกรณีหนึ่งคือ arginine, lysine หรือ proline อยู่ปลาย c-terminus โดยสมมติฐานของกลไกการยับยั้งการทำงานของ ACE คือเอนไซม์นี้มี catalytic site สองแห่ง เปปไทด์ที่ไฮโดรโฟบิกทำหน้าที่แย่งจับกับสารตั้งต้นที่ N-terminal catalytic site ส่วนเปปไทด์ที่ไฮโดรฟิลิกทำหน้าที่แย่งจับกับสารตั้งต้นที่ C-terminal catalytic site (Hong *et al*, 2008; Turner and Hooper, 2002; Vermeirssen *et al*, 2004)

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับเปปไทด์หลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพหลายชนิด ทั้งแบคทีเรีย และไวรัส เปปไทด์เหล่านี้มีคุณสมบัติร่วมคือมีกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าร้อยละ 50 ของกรดอะมิโนทั้งหมด, มีส่วนที่มีประจุบวกจาก lysine และ arginine, และมีคุณสมบัติ amphipathic โดยส่วนมากมีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ (Shahidi and Zhong, 2008) ตัวอย่างเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ เช่น GKLNFLSRLEILKLFVGAL ที่สกัดจากเยื่อหุ้มหนังปลา yellow catfish มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Candida albicans* (Su, 2011)

นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยกล่าวถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากเปปไทด์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด Kim *et al* ทำการวิเคราะห์เปปไทด์จากไฮโดรไลเซทของ *Mytilus coruscus* แล้วพบว่าเปปไทด์ AFNIHNRNLL มีความเป็นพิษสูงต่อเซลล์มะเร็งเต้านม มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งปอด แต่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติในตับ (Kim *et al*, 2012) เปปไทด์ที่จากไฮโดรไลเซทของปลา anchovy มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (U937) (Lee *et al*, 2004) กลไกการยับยั้งเซลล์มะเร็งของเปปไทด์ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด มีการตั้งสมมติฐานถึงกลไกการทำงานของเปปไทด์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง โดยจำแนกได้เป็นสองประเภทหลักคือ (1) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์มะเร็งผ่านการเกิด micelle หรือการเกิดรูพรุน และ (2) การเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ผ่านวิธีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Papo and shai, 2005) ตัวแปรที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของเปปไทด์คือ ความเป็นไฮโดรโฟบิก, ประจุรวม, ความเป็นแอมฟิพาติก, ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิในเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการเกิดโอลิโกเมอร์เซชัน (Hoskin and Ramamoorthy, 2008; Huang *et al*, 2011; Shai, 1999)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยจะเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับอาหารฟังก์ชันเชิงโภชนาการในรูปของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, ลดความดันโลหิต, นำส่งไอออนที่มีจำเป็นต่อร่างกาย, ต้านจุลชีพ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้จะช่วยทำให้ประชาชนทั่วไปใส่ใจในโภชนาการเพื่อสุขภาพของตนเองมากขึ้น โดยจะมีการเผยแพร่งานวิจัยผ่านสื่อต่างๆ เช่น รายการวิทยุเพื่อประชาชน วารสารทางวิชาการ วารสารเพื่อชุมชน และการเผยแพร่ในงานสัปดาห์วิทยาศาสตร์แห่งชาติ ภาคตะวันออก

- บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลามีส่วนช่วยให้ภาคธุรกิจการผลิตน้ำปลาในเขตชุมชนภาคตะวันออก ซึ่งรวมถึงหน่วยงานที่สนับสนุนโครงการวิจัยนี้ (บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด) และหน่วยงานอื่นๆ ได้ใช้ประโยชน์จากสารอาหารในวัตถุดิบให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยอาจนำไปสู่การแปรรูปเปปไทด์บริสุทธิ์จากกากน้ำปลาให้เป็นอาหารเสริม หรือการปรับปรุงสูตรน้ำปลาแต่ละระดับคุณภาพให้มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบเพิ่มเติม

- เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลาเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มอุตสาหกรรมขนาดย่อมในเขตภาคตะวันออก โดยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ช่วยสนับสนุนด้านข้อมูลคุณค่าทางอาหารของกากน้ำปลา และอาจเป็นแนวทางให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกากน้ำปลาต่อไปในอนาคต

เมื่อโครงการวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ คาดว่าจะต่อยอดเป็นโครงการวิจัยย่อยของนิสิตระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษา นอกจากนี้หน่วยงานวิจัยและสถาบันการศึกษา ทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ชีวเคมี เภสัชเคมี และทางการแพทย์สามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไปได้

- เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ที่ได้รับจากการสกัด การทำบริสุทธิ์ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาอาหารฟังก์ชันจากกากน้ำปลา การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การลดอาการอักเสบ และการลดคอเลสเตอรอล และเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลา นอกจากนี้ ยังอาจนำองค์ความรู้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกด้วย

วิธีการทดลอง

คณะผู้วิจัยมีวิธีการดำเนินงานวิจัยโดยรวมดังแผนภาพในรูปที่ 1 โดยจะทำการเก็บตัวอย่างจากน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1, 2, และ 3 จากบริษัทน้ำปลาพิไชย อ.เมือง จ.ชลบุรี และทำการศึกษาวิจัยที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เริ่มต้นจากการศึกษาวิธีการสกัดเปปไทด์และโปรตีนในตัวอย่าง โดยใช้ น้ำและสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมทั้งศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด เช่น เวลา อุณหภูมิ และการลดพื้นที่ผิว จากนั้นเกลือที่มีในตัวอย่างจะถูกแยกด้วย gel-filtration chromatography เปปไทด์และโปรตีนจะถูกแยกตามขนาดด้วยเทคนิค gel-filtration chromatography แล้วเก็บ fraction อย่างหยาบ ตามขนาดของเปปไทด์/โปรตีน หลังจากนั้นแต่ละ fraction ย่อยจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

- การต้านอนุมูลอิสระโดยทดสอบด้วย free radical scavenging activity assay โดยใช้สารตั้งต้นเป็น 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) และ hydroxyl radical และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง (Osawa and Namiki, 1985, Piyadhamviboon *et al*, 2012; Wang *et al*, 2008)

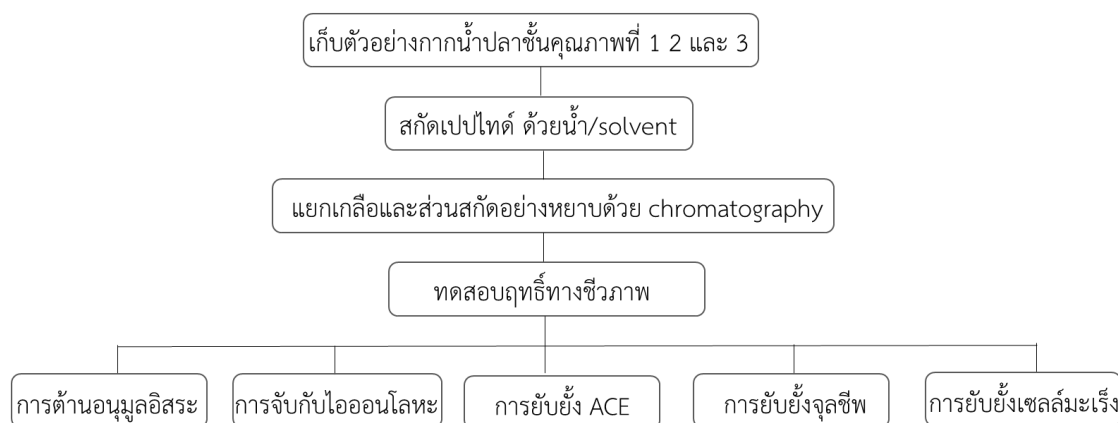
- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ในหลอดทดลอง ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (Cushman and Cheung, 1971)

- ความสามารถในการจับตัวกับโลหะไอออน เช่น Fe^{2+} เพื่อประโยชน์ในการกำจัดไอออนที่เป็นสาเหตุให้เกิดอนุมูลอิสระ (Jung *et al*, 2006; Carter, 1971)

- ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยใช้ *S. Aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก และ *E. coli* และ *X. oryzae pv. oryzae* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ

- ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยวัดจากอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่ออยู่ในอาหารที่มีเปปไทด์จากกาน้ำปลา

ทั้งนี้ หากพบ fraction หยาบของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูงและมีปริมาณเปปไทด์ในตัวอย่างมาก เปปไทด์จะถูกนำมาทำบริสุทธิ์ในโครงการวิจัยต่อเนื่อง ด้วยเทคนิค chromatography ที่เหมาะสม โดยหากพบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกันจากตัวอย่างกาน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ ผู้ทดลองจะเลือกใช้ตัวอย่างกาน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 เพื่อทำบริสุทธิ์เปปไทด์ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่ไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์ หลังจากการทำบริสุทธิ์ เปปไทด์จะถูกวิเคราะห์ด้วย tandem mass spectrometry ประกอบกับเครื่องมือทาง bioinformatics หลังจากนั้น เปปไทด์บริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์จะถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งหนึ่ง รวมถึงถูกนำไปศึกษาเสถียรภาพที่สภาวะต่างๆโดยมีตัวแปรคือ อุณหภูมิ, ค่า pH, และความเข้มข้นของ NaCl เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต (ในปีที่ 2 ของทุนวิจัย)



รูปที่ 1 ภาพรวมของการทดลองในปีที่ 1 (แผนภาพแสดงเฉพาะการทดลองในปีที่ 1 ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559)

(1) การเตรียมตัวอย่างกากน้ำปลา

ตัวอย่างกากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 2 และ 3 ได้รับจาก บริษัท น้ำปลาพิชัย จำกัด จ.ชลบุรี กากน้ำปลาจะส่งจากบ่อหมักมาที่มหาวิทยาลัยบูรพา โดยใช้เวลาเดินทางประมาณ 10 นาที ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บที่ 4 °C กากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 เป็นส่วนของแข็งที่เหลือจากการหมักปลากะตักสดเป็นระยะเวลา 18 เดือน กากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 2 เป็นส่วนของแข็งที่เหลือจากการหมักกากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 เป็นระยะเวลา 6 เดือน และกากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 3 เป็นส่วนของแข็งที่เหลือจากการหมักกากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 2 เป็นระยะเวลา 6 เดือน

(1.1) การศึกษาวิธีสกัดโปรตีนจากกากน้ำปลา

กากน้ำปลาซึ่งมีลักษณะเป็นผงแต่ละระดับชั้นคุณภาพจะถูกนำมาทดสอบหาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดเปปไทด์โดยใช้ตัวอย่างเป็นกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 โดยการละลายเปปไทด์ 10 g ใน 10 mL H₂O, 10% EtOH, 20% EtOH, 30% EtOH, 40% EtOH และ 50% EtOH ตามลำดับ รวมทั้งทำการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการละลายตัวอย่าง และการบดตัวอย่างด้วย glinder เพื่อช่วยในการละลายของเปปไทด์ด้วย ส่วนสกัดจะถูกนำไปแยกเปปไทด์ออกจากเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่นด้วย gel-filtration chromatography (GE-Healthcare) ตาม protocol จากผู้ผลิต จากนั้นทำการเก็บ fraction อย่างหยาบ เพื่อหาความเข้มข้นของเปปไทด์/โปรตีนในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีต่างกัดังกล่าวด้วย Lowry's protein assay (Lowry *et al*, 1951) วิธีสกัดที่ได้ผลดีที่สุดจะถูกเลือกเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

(1.2) การศึกษาวิธีแยกเกลือจากส่วนสกัดกากน้ำปลา

ตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 จะถูกสกัดด้วยวิธีที่เหมาะสม แยกเกลือออกจากตัวอย่างด้วยเทคนิค gel-filtration chromatography จากนั้นแต่ละ fraction จะถูกหาปริมาณด้วย Lowry's protein assay ก่อนที่จะรวม fraction ที่พบเปปไทด์/โปรตีนเข้าด้วยกัน แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี centrifugal evaporation เปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

(1.3) การศึกษา protein profile ในกากน้ำปลา

เปปไทด์/โปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ จะถูกวิเคราะห์ด้วย protein gel electrophoresis และ peptide gel electrophoresis (Schägger, 2006) และย้อมสีด้วย Coomassie blue เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของมวลโมเลกุลและปริมาณโปรตีนในกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ

(2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตัวอย่างที่สกัดได้จะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ (ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลในทุกการทดลอง)

(2.1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(2.1.1) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ Piyadhamviboon *et al*, 2012 โดยเติมเปปไทด์ช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 mg/mL ในสารละลายที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 ปริมาตร 50 μ L ลงในสารละลาย 0.2 mM DPPH ใน methanol ปริมาตร 100 μ L จากนั้นทำการบ่มที่อุณหภูมิห้อง ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ตัวอย่างจะถูกนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm เพื่อตรวจสอบปริมาณสารตั้งต้น (DPPH radical) ที่เหลืออยู่ในปฏิกิริยา โดยมี control เป็นตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์

(2.1.2) ความสามารถในการยับยั้ง hydroxyl radical จะถูกทดสอบด้วยวิธีของ Wang *et al*, 2008 โดยปฏิกิริยาประกอบด้วย 1.5 mM FeSO₄ ปริมาตร 67 μ L, 6 mM H₂O₂ ปริมาตร 47 μ L, 20 mM sodium salicylate ปริมาตร 20 μ L, และเปปไทด์ตัวอย่าง ปริมาตร 66 μ L สารผสมนี้จะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที และค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ hydroxylated salicylate complex จะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 562 nm ค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากทั้งสองวิธี สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1)

$$\% \text{ scavenging activity} = [A(\text{control}) - A(\text{peptide}) / A(\text{control})] \times 100 \dots \dots \dots (\text{สมการที่ 1})$$

$$\% \text{ scavenging activity} = \text{ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ}$$

A(control) = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์

A(peptide) = ค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างที่มีเปปไทด์

(2.1.3) ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ทดสอบโดยใช้ linoleic acid เป็นโมเดล ตามหลักการของ Osawa and Namiki, 1985 โดยตัวอย่างเปปไทด์จะถูกละลายใน 50 mM phosphate buffer, pH 7.0 ปริมาตร 10 mL และเติมใน linoleic acid ปริมาตร 0.13 mL และ 99.5% ethanol ปริมาตร 10 mL และปรับปริมาตรรวมให้เป็น 25 mL ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นสารผสมจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 40°C ในที่มืด จากนั้นตรวจสอบการเกิด hydroperoxide ซึ่งเกิดจาก lipid peroxidation ที่แต่ละช่วงเวลา โดยให้สารผสมดังกล่าวทำปฏิกิริยากับ FeCl_2 และ ammonium thiocyanate และวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 500 nm

* หมายเหตุ ทุกการทดลองในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีการใช้ positive control คือ ascorbic acid และมีการคำนวณค่า IC_{50} จาก linear regression analysis ของกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของเปปไทด์กับ % inhibitory activity

(2.2) ความสามารถในการจับตัวกับไอออนของโลหะ

ความสามารถในการจับกับไอออน Fe^{2+} จะถูกทดสอบด้วยวิธี Fe^{2+} chelating activity assay (Carter, 1971) โดยละลายตัวอย่างเปปไทด์ 100 μg ใน 250 μL ของ 100 mM sodium acetate buffer, pH 4.9 และ 30 μL ของ 0.01%, w/v FeCl_2 จากนั้น 40 mM Ferrozine ปริมาตร 12.5 μL จะถูกเติมลงไป ในสารผสม แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที การเกิดสารเชิงซ้อนของ Fe^{2+} และ Ferrozine สามารถติดตามได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วยเครื่อง VersaMax™ absorbance microplate reader โดยมี positive control คือ EDTA ความสามารถในการจับของ Fe^{2+} และเปปไทด์ คำนวณได้จากสมการที่ 2

$$\% \text{chelating activity} = [\text{A}(\text{control}) - \text{A}(\text{peptide}) / \text{A}(\text{control})] \times 100 \dots \dots \dots (\text{สมการที่ } 2)$$

% chelating activity = ความสามารถในการจับกับไอออน Fe^{2+} ของเปปไทด์

A(control) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ของตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์

A(peptide) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ของตัวอย่างที่มีเปปไทด์

(2.3) การยับยั้งการทำงานของ Angiotensin-converting enzyme (ACE)

ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE จะถูกตรวจสอบด้วยวิธีของ Cushman and Cheung, 1971 โดยใช้ Hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) เป็นสารตั้งต้น โดยเติมตัวอย่างเปปไทด์ ปริมาตร 15 μL ใน 33.33 mU/mL ACE ปริมาตร 30 μL และน้ำ DI ปริมาตร 55 μL และทำการบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นสารตั้งต้น 8.3 mM HLL ใน 500 mM NaCl, 0.1 M Tris-HCl, pH 8.3 ปริมาตร 150 μL จะถูกเติมลงในปฏิกิริยา และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 250 μL ของ 1 M HCl เพื่อหยุดปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ Hippuric acid จะถูกสกัดด้วย ethyl acetate และระเหยแห้งใน heat block จากนั้นละลาย Hippuric acid ในน้ำกลั่น ก่อนที่จะวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm โดยความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE สามารถคำนวณได้จากสมการที่ 3

$$\% \text{ ACE Inhibition} = [1 - (A_S - A_{B2}) / (A_C - A_{B1})] \times 100 \dots\dots\dots (\text{สมการที่ 3})$$

A_S = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm ของตัวอย่างที่มีเปปไทด์ + ACE

A_C = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm ของตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์ + ACE

A_{B1} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm ของตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์ + inactivated ACE

A_{B2} = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm ของตัวอย่างที่มีเปปไทด์ + inactivated ACE

(2.4) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียถูกทดสอบโดยใช้ *S.aureus* เป็นตัวแทนของ แบคทีเรียแกรมบวก *E.coli* และ *X. oryzae pv. oryzae* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบ แบคทีเรีย *S.aureus* และ *E. coli* จะถูกเลี้ยงใน LB agar plate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ส่วน *X. oryzae pv. oryzae* ถูกเลี้ยงบน LB agar plate ที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้น โคโลนี เดียวของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ใน 96-well plate เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity assay) ในกลุ่มควบคุม แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB จะถูกเจือจางให้มีค่า OD₆₀₀ เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้เป็น starter จากนั้น นำ starter ปริมาตร 1 μL มาเจือจางต่อด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 99 μL แล้วบันทึกการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นที่ OD₆₀₀ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มทดลอง แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผสมกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

(2.5) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ส่วนสกัดจากกากน้ำปลาจะถูกนำมาทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2, ATCC No. HB-8065 และเซลล์ปกติ (Vero, ATCC No. CCL-81) โดยใช้อาหารสูตร Eagle's Minimum Essential medium (MEM) ที่มีการเพิ่ม 10% (v/v) FBS, 1% Sodium pyruvate, 1% L-glutamin และ 1% NEAA ในอาหาร เซลล์ทุกชนิดจะถูกเลี้ยงในภาวะ 5% (v/v) CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นจะตรวจวัดโดยวิธี MTT โดยกำหนดปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ทดสอบต่อตัวอย่างคือ 4×10^3 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 200 ไมโครลิตรใน 96-well plate และทำการบ่มในภาวะ 37 องศาเซลเซียส 5% (v/v) CO₂ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะผสมกับส่วนสกัดจากกากน้ำปลา และบ่มที่สภาวะ 5% (v/v) CO₂ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การยับยั้งเซลล์มะเร็งจะถูกตรวจสอบโดยเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลาย MTT ให้กลายเป็น formazan crystals (ผลึกสีม่วง) ซึ่งจะถูกละลายด้วย 100% DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) จากสมการที่ 4

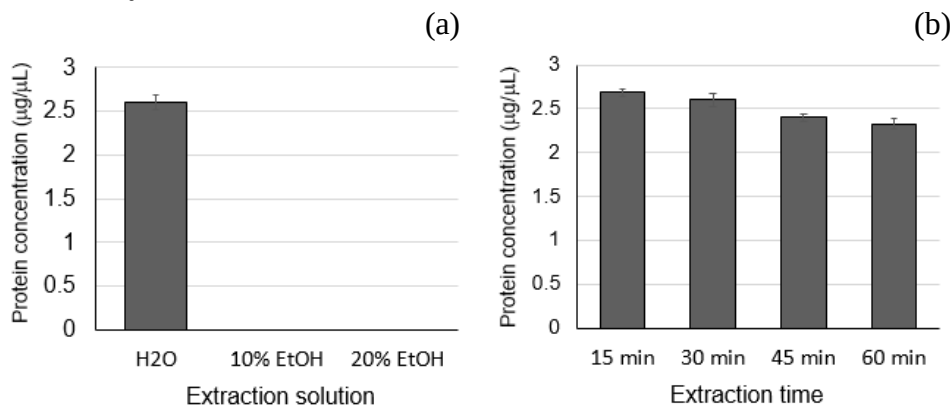
$$\% \text{ การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับสารตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ควบคุม}} \times 100 \dots\dots\dots (\text{สมการที่ 4})$$

ผลการทดลอง

(1) การเตรียมตัวอย่างกากน้ำปลา

(1.1) ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับการสกัดโปรตีนจากกากน้ำปลา

จากการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการสกัด เปปไทด์/โปรตีน ให้มี % yield สูงสุด คณะผู้วิจัยศึกษาเปรียบเทียบผลของ (1) การใช้น้ำและเอทานอลที่อัตราส่วนต่างๆ ได้แก่ 0% 10% 20% 30% 40% และ 50% เอทานอลในน้ำ (2) ระยะเวลาที่ใช้ในการละลายตัวอย่าง และ (3) การปั่นเพื่อลดพื้นที่ผิว ต่อปริมาณเปปไทด์/โปรตีนที่สกัดได้ โดยวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's protein assay พบว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณเปปไทด์/โปรตีนที่สูงกว่าการใช้สารละลายผสมเอทานอลในน้ำที่อัตราส่วนต่างๆ **รูปที่ 2 (a)** ในส่วนของระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด เวลา 15 และ 30 นาที ให้ปริมาณเปปไทด์/โปรตีนที่สูงกว่า 45 และ 60 นาที ตามลำดับ **รูปที่ 2 (b)** ในส่วนของการปั่นเพื่อลดพื้นที่ผิว พบว่าการปั่นโดยใช้ blender ทำให้กากน้ำปลามีความหนืดสูงและส่งผลให้ปริมาณโปรตีน/เปปไทด์ ที่สกัดได้ลดลง

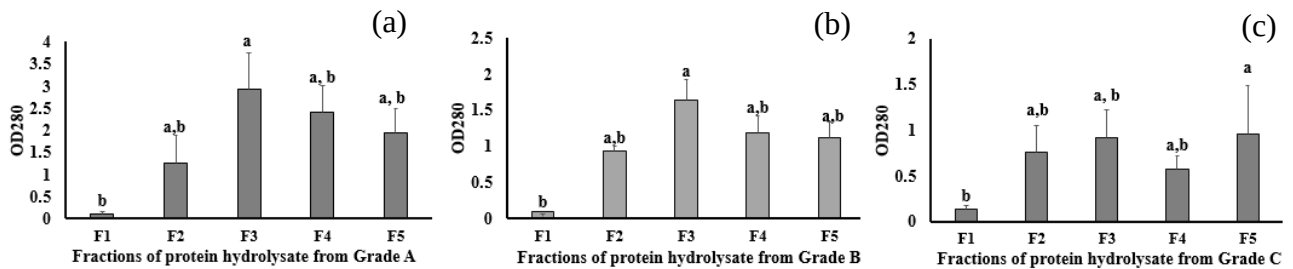


รูปที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง (a) สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน (b) เวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

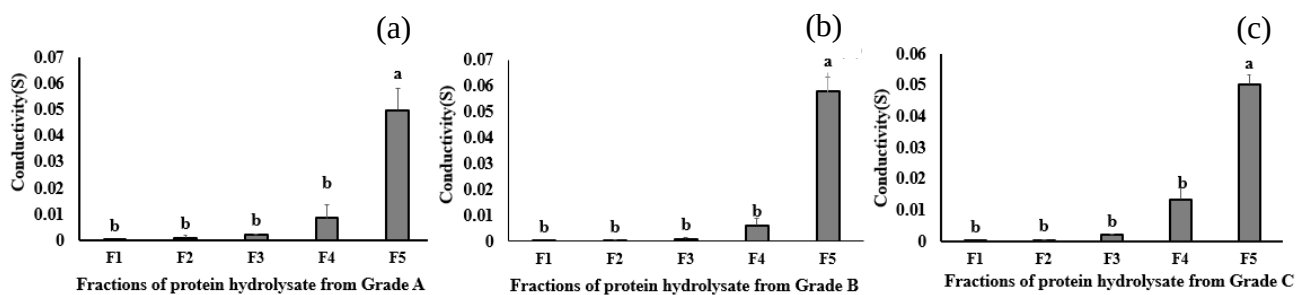
(1.2) ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกเกลือจากส่วนสกัดกากน้ำปลา

คณะผู้วิจัยศึกษาวิธีที่ใช้ในการแยกส่วนสกัดหยาบของโปรตีน/เปปไทด์ จากเกลือที่มีในตัวอย่างกากน้ำปลาโดยใช้เทคนิค gel-filtration chromatography (คอลัมน์ Sephadex G-15 และ Sephadex G-25) ที่มีความยาวคอลัมน์ต่างกัน พบว่าการใช้คอลัมน์ Sephadex G-15 ที่มีความยาวคอลัมน์ 50 เซนติเมตร มีประสิทธิภาพในการแยกเกลือที่ดี โดยตรวจสอบปริมาณโปรตีน/เปปไทด์ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจสอบปริมาณไอออนโดยใช้เครื่อง conductivity meter ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโปรตีน/เปปไทด์จากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่ fraction 2 ถึง fraction 5 (**รูปที่ 3 (a-c)**) ส่วนค่าการนำไฟฟ้าของไอออนมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ fraction 5 (**รูปที่ 4 (a-c)**) ดังนั้นผู้ทดลองจึงเลือกใช้ fraction 2 3 และ 4 ในการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงและมีปริมาณไอออนต่ำ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดปริมาณโปรตีน/เปปไทด์ในตัวอย่างกากน้ำปลาด้วย Lowry's protein assay เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโน

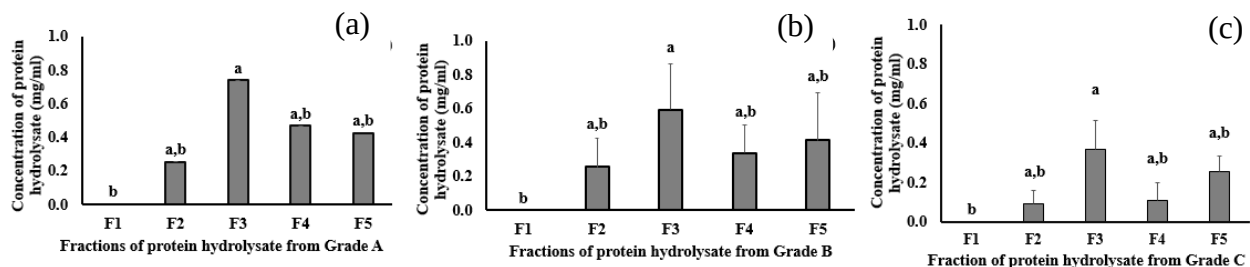
เมตร พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุดที่ fraction 3 (รูปที่ 5 (a-c)) เมื่อทำการรวม fraction ที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ (F2-F4) ของกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพพบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (รูปที่ 6)



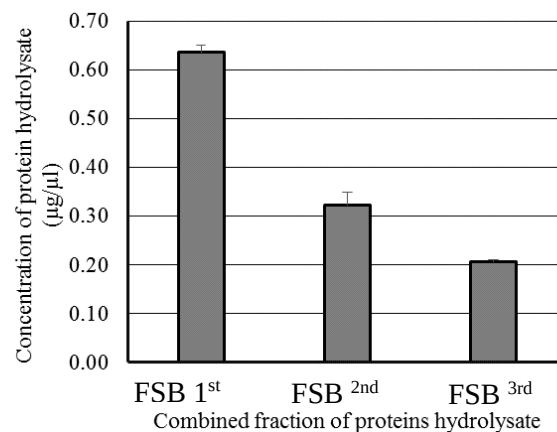
รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



รูปที่ 4 ค่าการนำไฟฟ้า ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



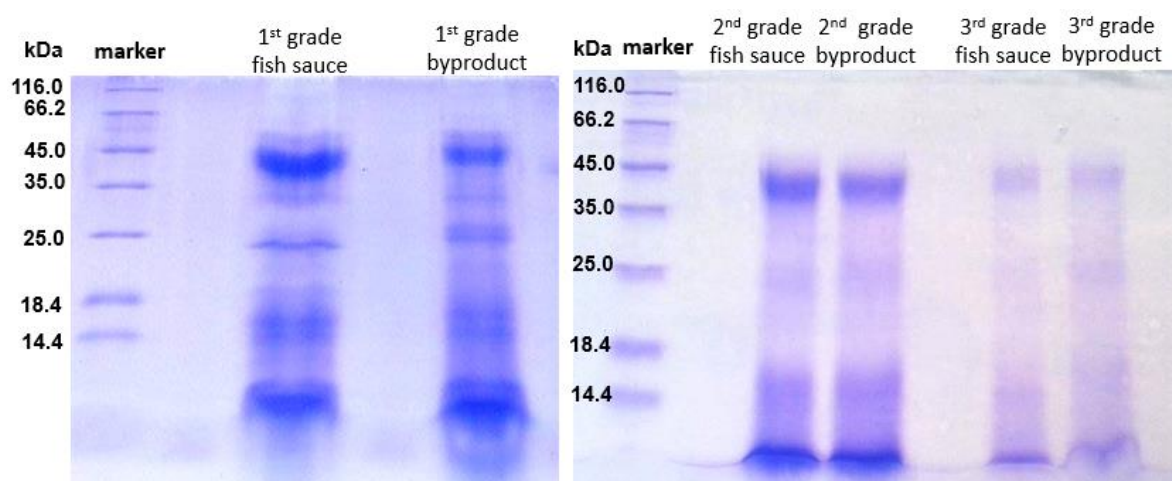
รูปที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา (a) ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (b) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ (c) ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



รูปที่ 6 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd)

(1.3) ผลการศึกษา protein profile ในกากน้ำปลา

คณะผู้วิจัยตรวจสอบมวลโมเลกุลของโปรตีน/เปปไทด์ในกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ โดยเปรียบเทียบกับโปรตีน/เปปไทด์ในน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนจากตัวอย่างกากน้ำปลาและตัวอย่างน้ำปลา มีมวลโมเลกุลใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดเล็กกว่า 45 kDa (รูปที่ 7) ทั้งนี้ ปริมาณโปรตีนจะลดลงในน้ำปลา/กากน้ำปลาที่มีระดับชั้นคุณภาพต่ำลง



รูปที่ 7 SDS-PAGE แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่พบในน้ำปลา และกากน้ำปลา ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ตามที่ระบุด้านบนแผ่นเจล

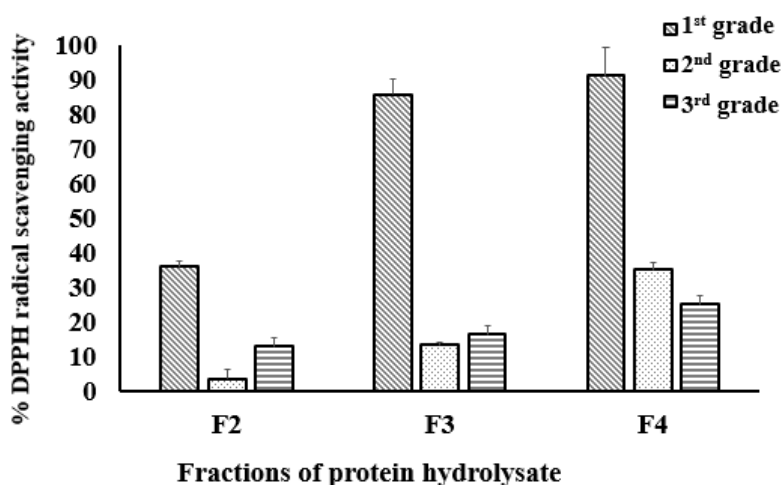
(2) ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

(2.1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

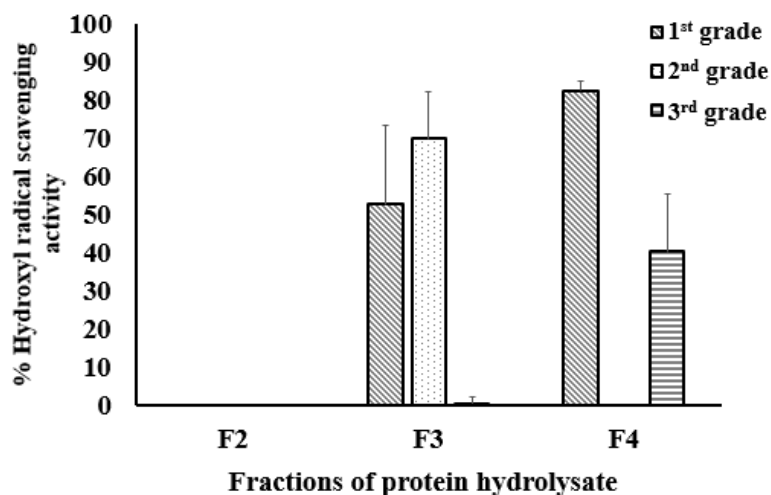
คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ โดยตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH อนุมูล hydroxyl และการเกิด lipid peroxidation เพื่อทดสอบคุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH (รูปที่ 8) โดยกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุดใน fraction ที่ 4 (91.03 ± 7.90 %) ซึ่งมีความสามารถเทียบเท่ากับ ascorbic acid ที่ความเข้มข้น $27.27 \mu\text{g/mL}$ ซึ่งใช้เป็น positive control ส่วนกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้น้อยกว่า 50%

สำหรับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl พบว่ากากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ได้ดีกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl สูงสุด $82.42 \pm 2.58\%$ ใน fraction ที่ F4 ส่วนกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ใน fraction ที่ F3 สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ $69.83 \pm 12.17\%$ และกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ในทุก fraction มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ได้น้อยกว่า 50% (รูปที่ 9)

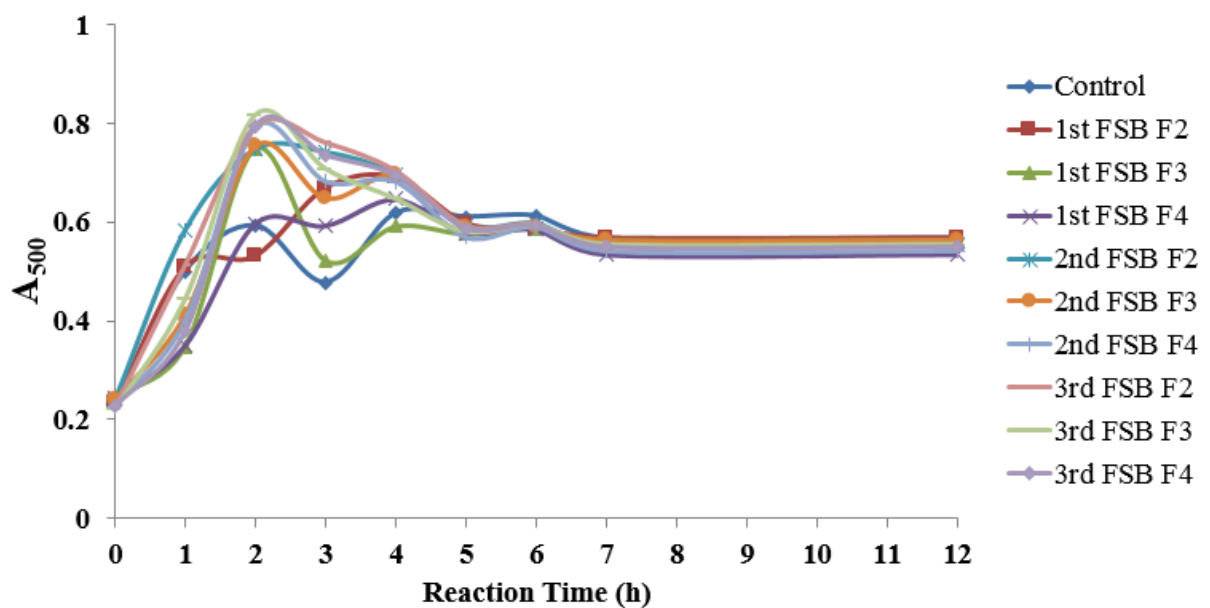
สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation นั้น ไม่พบ fraction ของกากน้ำปลาที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ โดยทำการติดตามปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณการเกิด peroxide ของตัวอย่างกรดไขมันที่มีกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพผสมอยู่ด้วยไม่แตกต่างจากในชุดควบคุม (รูปที่ 10)



รูปที่ 8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4



รูปที่ 9 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4



รูปที่ 10 ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ แสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูล DPPH และยับยั้งการเกิดอนุมูล hydroxyl แต่ไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด กลุ่มผู้วิจัยจึงทำการทดลองต่อโดยการหาค่า IC_{50} ของกากน้ำปลาแต่ละ

ระดับชั้นคุณภาพ โดยนำ fraction ที่ F2 F3 และ F4 ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพมารวมกัน เนื่องจากเป็น fraction ที่มีปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้ และมีปริมาณเกลือต่ำ (รูปที่ 3, รูปที่ 4 และ รูปที่ 5) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH ที่สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 และ 2 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ที่สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 และ 1 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

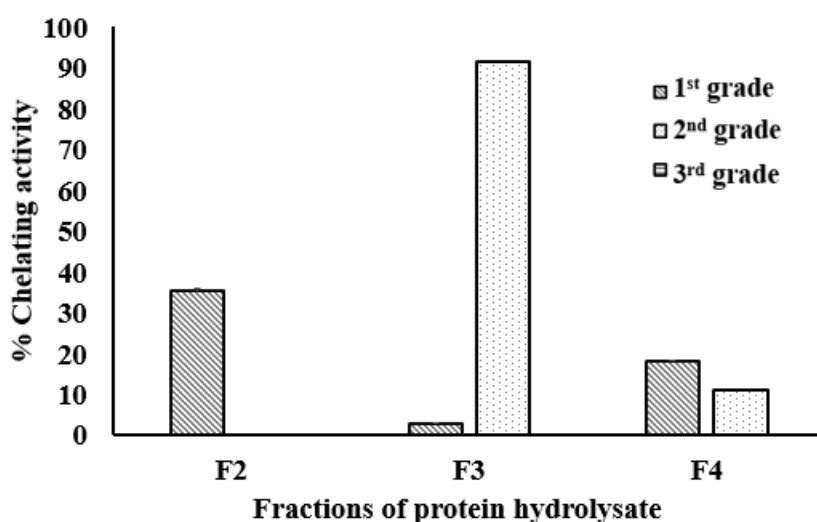
ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	IC_{50} (mg/mL)
1	0.32 ± 0.02
2	1.05 ± 0.08
3	0.96 ± 0.11
ascorbic acid	0.016 ± 0.007

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	IC_{50} (mg/mL)
1	0.78 ± 0.07
2	0.36 ± 0.01
3	0.75 ± 0.06

(2.2) ความสามารถในการจับตัวกับไอออนของโลหะ

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการแย่งจับกับไอออน Fe^{2+} ของกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพพบว่า fraction F3 ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ Fe^{2+} ได้ดีที่สุด (91.35%) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ 0.5 mM EDTA (99%) ที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวก กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการแย่งจับกับไอออนโลหะรองลงมา คือ 35.3% ใน fraction ที่ F2 อย่างไรก็ตาม ไม่พบฤทธิ์ในการแย่งจับกับไอออนโลหะใน fraction ย่อยจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (รูปที่ 11) เมื่อทำการรวม fraction ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพเพื่อวัดค่าความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ที่สามารถจับกับไอออนของโลหะได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีค่า EC_{50} ที่ดีที่สุด เท่ากับ 1.00 ± 0.12 mg/mL (ตารางที่ 4)



รูปที่ 11 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4

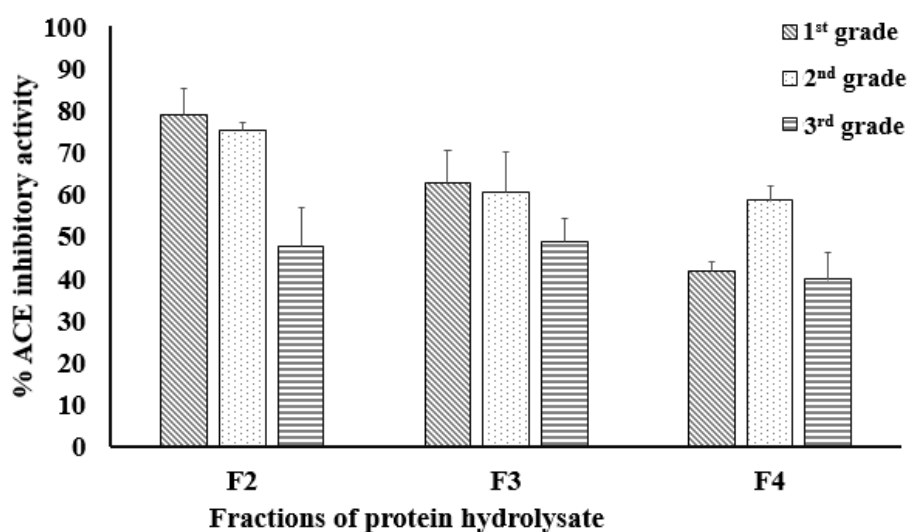
ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถจับกับไอออนโลหะได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	EC_{50} (mg/mL)
1	> 2.00
2	1.00 ± 0.12
3	> 2.00
EDTA	$< 1.86 \times 10^{-4}$

(2.3) การยับยั้งการทำงานของ Angiotensin-converting enzyme (ACE)

ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ถูกตรวจสอบโดยการติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์นี้ เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น Hippuryl-L-histidyl-L-leucine โดยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ hippuric acid ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 228 nm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และ 2 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ดีที่สุดที่ fraction F2 โดยมีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเป็น $79.03 \pm 6.14\%$ และ $75.42 \pm 1.55\%$ ตามลำดับ (รูปที่ 12) และเมื่อนำ fraction ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพมารวมกันเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้น

คุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 5)



รูปที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fraction ที่ F2 F3 และ F4

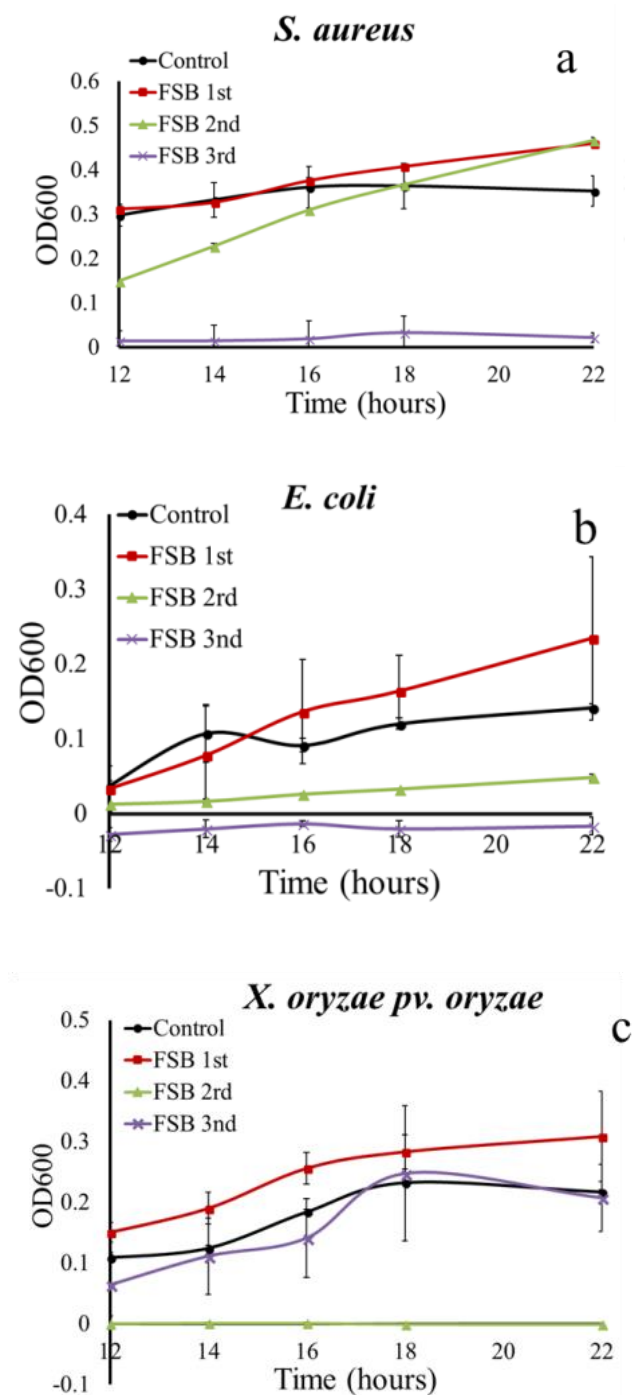
ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	IC_{50} (mg/mL)
1	0.99 ± 0.40
2	1.31 ± 0.10
3	> 2

(2.4) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ฤทธิ์ทางชีวภาพของกากน้ำปลาในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ถูกตรวจสอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคมิวหนังในคน, *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหารในคน, และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยผู้วิจัยทำการติดตามการเจริญของแบคทีเรียทั้งสามชนิดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพที่ความเข้มข้น 2 mg/mL เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีกากน้ำปลาซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลา ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีกว่ากากน้ำปลา ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 1 ตามลำดับ (รูปที่ 13 (a) และรูปที่ 13 (b)) ในขณะที่กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae* pv. *oryzae* ได้สูงที่สุด (รูปที่ 13 (c)) รวมทั้งสามารถ

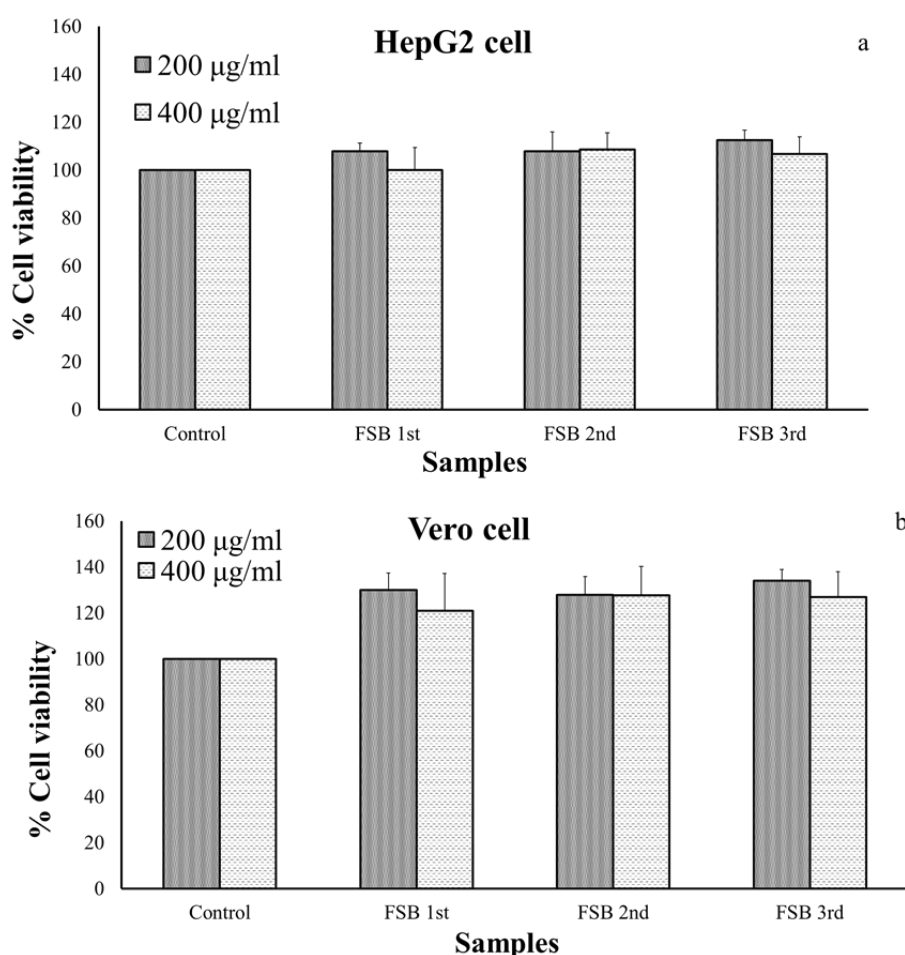
ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี ในทางตรงกันข้าม กากน้ำปลาในระดับชั้นคุณภาพที่ 1 ไม่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแต่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ ทั้งนี้ ผู้วิจัยไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL และ 1 mg/mL



รูปที่ 13 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (a) *S. aureus*, (b) *E. coli* และ (c) *X. oryzae pv. oryzae* ของกากน้ำปลาในระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL

(2.5) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของกากน้ำปลาถูกตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay เพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญ (cell proliferation) ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell line) ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ และ 400 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 แต่สามารถเร่งการเจริญของเซลล์ได้เล็กน้อย โดยมีค่า %viability อยู่ระหว่าง $106.81 \pm 7.07\%$ และ $112.51 \pm 4.27\%$ (รูปที่ 14 (a)) เมื่อพิจารณาการเจริญของเซลล์ปกติ (Vero cell line) ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม พบว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพสามารถเร่งการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งได้ดี (รูปที่ 14 (b)) โดยมีค่า %viability อยู่ระหว่าง $120.97 \pm 16.28\%$ และ $134.06 \pm 4.92\%$



รูปที่ 14 ผลของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 200 $\mu\text{g/mL}$ และ 400 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการเจริญของ (a) เซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell line และ (b) เซลล์ปกติ Vero cell line (Khositanon *et al.*, 2018)

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

กากน้ำปลาเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำปลาซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนและเปปไทด์ขนาดต่างๆ โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 เป็นของแข็งที่เหลือจากการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 18 เดือน และใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นอีก 6 เดือน จากนั้นกากที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 โดยการหมักน้ำปลานานขึ้นอีก 6 เดือน และมีผลิตภัณฑ์พลอยได้ (byproduct) ที่เกิดขึ้นเป็นกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่พบในน้ำปลาและกากน้ำปลามีความใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากตัวปลายังไม่สามารถละลายในน้ำปลาได้ทั้งหมด และไม่พบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 48 kDa คณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีสกัดโปรตีนจากกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ โดยเปรียบเทียบการใช้น้ำและสารละลายเอทานอลในน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อเป็นการลดความเข้มข้นของสารละลาย และเพิ่มโอกาสในการละลายน้ำของโปรตีนหรือเปปไทด์ในกลุ่มที่มีขั้วน้อย หรือกลุ่มไฮโดรโฟบิก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าสารละลายเอทานอล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่โปรตีนหรือเปปไทด์ที่เหลือในกากน้ำปลา มีขนาดโมเลกุลเล็ก และมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนที่มี polarity สูง จึงสามารถละลายในน้ำได้ดี ทั้งนี้ ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ กากน้ำปลาจะถูกกวนด้วย magnetic stirrer ตลอดเวลาซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการละลายในน้ำได้ดีกว่าในบ่อหมักในโรงงานอุตสาหกรรม ซึ่งกากน้ำปลาเหล่านี้จะเป็นตะกอนอยู่ที่ส่วนล่างของบ่อหมัก และจากการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ได้จากการสกัดที่ระยะเวลา 15 – 60 นาที พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนมีค่าสูงใกล้เคียงกันเมื่อใช้เวลาในการสกัด 15 นาที และ 30 นาที ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้น้ำเป็นตัวทำละลายและใช้ระยะเวลาในการสกัดเป็น 30 นาที สำหรับใช้ในการทดลองขั้นตอนถัดไป

สารสกัดกากน้ำปลาที่มีเกลือที่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูงทำให้รบกวนการตรวจวัดฤทธิ์ทางชีวภาพได้ ผู้วิจัยจึงศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกเกลือออกจากตัวอย่างเปปไทด์ โดยใช้เทคนิค gel-filtration chromatography พบว่าการใช้คอลัมน์ชนิด Sephadex G-15 ที่มีความยาว 50 เซนติเมตร สามารถแยกเกลือออกจากเปปไทด์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยตัวอย่างถูกแยกเป็น 5 fraction ย่อย (F1 – F5) และถูกตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของกรดอะมิโนที่มีวงอะโรมาติกที่ 280 nm ร่วมกับการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วย Lowry's protein assay พบว่าโปรตีน/เปปไทด์ถูกชะออกจากคอลัมน์ตั้งแต่ fraction ที่ F2 – F5 โดยมีปริมาณโปรตีนสูงสุดที่ fraction F3 ซึ่งผลการทดลองจากทั้ง 2 วิธีมีความสอดคล้องกัน และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไอออนที่มีในตัวอย่่างด้วยการวัดความสามารถในการนำไฟฟ้า พบปริมาณเกลือเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ จาก fraction F1 จนถึง fraction F5 ซึ่ง fraction สุดท้ายนี้มีค่าการนำไฟฟ้าแตกต่างจาก fraction อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ fraction F2 F3 และ F4 ที่มีความเข้มข้นเปปไทด์สูง และมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นสูงกว่า

ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ลดลงในน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ต่ำลง

มีรายงานวิจัยจำนวนมากได้กล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ โดยนำโปรตีนมาย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆเช่น trypsin bromelain flavyzyme เป็นต้น เพื่อสร้างเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์จับกับไอออนของโลหะ ลดความดันโลหิต ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Shahidi and Zhong, 2008) และเนื่องจากกากน้ำปลามีองค์ประกอบเป็นโปรตีนจากปลา และมีเอนไซม์ที่ได้จากระบบย่อยอาหารของปลา รวมถึงเอนไซม์จาก halophilic bacteria ที่เจริญในบ่อหมัก (อรรวรรณ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนได้ที่ degree of hydrolysis ที่แตกต่างกัน กากน้ำปลาจึงสามารถจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท และในแต่ละระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลาอาจมี degree of hydrolysis ที่แตกต่างกัน ประกอบกับมีลำดับกรดอะมิโน และความยาวของเปปไทด์ที่ต่างกันจึงน่าจะส่งผลให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกันด้วย ในระยะแรกของโครงการวิจัยนี้ (ปีงบประมาณ 2559) ผู้วิจัยสนใจศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพในส่วนสกัดหยาบของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ก่อนที่จะนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไปในโครงการระยะที่สอง (ปีงบประมาณ 2560)

เนื่องจากอนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตได้หลายกลไก (mechanism) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาจึงถูกตรวจสอบด้วย 3 วิธี ที่แตกต่างกัน ดังนี้ (1) DPPH radical scavenging assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ (2) hydroxyl radical scavenging assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการยับยั้ง reactive oxygen specie ที่มีความไวสูง และ (3) lipid peroxidation assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิพิด ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในกากน้ำปลาทุกระดับชั้นคุณภาพ (fraction F2-F4) ความเข้มข้นของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน โดยจะเห็นได้ว่า F3 มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดในกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ในขณะที่ F4 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด และเมื่อทำการรวม fraction ย่อยของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ดีกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.32 ± 0.02 mg/mL และมีค่าใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ของโปรตีนไฮโดรไลเซทที่สร้างจากการย่อยหนังปลา bluefin leather jacket ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Chi *et al.*, 2015) สำหรับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นโปรตีนกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน โดยในกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และ 3 พบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl สูงที่สุดที่ fraction F4 ในขณะที่กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ดีที่สุดที่ fraction F3 ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอาจมีปริมาณน้อย หรือมีโมเลกุลขนาดเล็กและประกอบด้วยพันธะเปปไทด์น้อยกว่า 4 พันธะ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบด้วย Lowry's protein assay ได้ เมื่อทำการรวม fraction ย่อยของกากน้ำปลาพบว่า กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการต้านอนุมูล hydroxyl ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.36 ± 0.01 mg/mL นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ ไม่มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด และควรมีการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษากลไกอื่นๆในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น การทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์ หรือ

การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง reactive species ชนิดอื่นๆ และควรมีการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษาผลของขนาดโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วย โดยมีงานวิจัยที่ระบุว่าชนิดของกรดอะมิโนมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ กลุ่มที่มีหมู่ฟังก์ชันเป็น phenolic/ indole/ thiol/ imidazole จัดเป็นพวกมีส่วนสำคัญต่อการกำจัดอนุมูลอิสระ (Chen *et al*, 1995)

สำหรับการทดสอบความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ เพื่อลดโอกาสในการสร้างอนุมูลอิสระของปฏิกิริยาที่มีไอออนเหล่านี้เป็นตัวเร่ง พบว่า กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} จากการเกิดสารเชิงซ้อนกับ ferrozine ได้ดีกว่าอีกสองระดับชั้นคุณภาพ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ที่มีค่าสูงที่สุด ในกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 อย่างไรก็ตาม ค่า EC_{50} มีค่าสูงถึง 1.00 ± 0.12 mg/mL แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการแย่งจับกับไอออนของโลหะของกากน้ำปลายังมีค่าน้อย และความเข้มข้นของกากน้ำปลาไม่มีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการแย่งจับกับไอออนของโลหะ

คุณสมบัติในการลดความดันโลหิตของกากน้ำปลาถูกตรวจสอบโดยติดตามความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin converting enzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ควบคุมการหดตัวของหลอดเลือด และเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} อยู่ที่ 0.99 ± 0.40 mg/mL ซึ่งจำเป็นต้องมีการแยก fraction ย่อยตามขนาดโมเลกุลและคุณสมบัติความเป็นไฮโดรโฟบิกเพื่อวิเคราะห์ชนิดของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป โดยส่วนมากเปปไทด์ที่มีรายงานว่ามียูเรียยับยั้งเอนไซม์ชนิดนี้เป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก (< 3 kDa) และประกอบด้วยกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิกหรือกลุ่มที่มีประจุบวกที่ปลาย C-terminus (Hong *et al*, 2008; Turner and Hooper, 2002)

สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ผู้วิจัยติดตามการเจริญของแบคทีเรียสามชนิดที่ก่อโรคในคนและในพืช โดยครอบคลุมทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *E.coli*, *S. aureus* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มี activity ที่สูงที่สุดในการยับยั้งการเจริญของ *E.coli* และ *S. aureus* ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกตามลำดับ ส่วนกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบทั้ง 2 ชนิดได้ดี ทั้ง *E.coli* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ในขณะที่กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 แสดงให้เห็นฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Khositanon *et al.*, 2018) ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่แตกต่างกันของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ อาจเป็นผลมาจากขนาดโมเลกุล degree of hydrolysis และลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน เนื่องจากผ่านการหมักด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ได้รับเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียต่างประเภทภายในบ่อหมักน้ำปลา (ศิริลักษณ์ นามวงศ์, 2553) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 อาจมีกลไกในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เนื่องจากระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ อาจเป็นกลุ่มที่มีประจุบวกที่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลที่มีประจุลบบนผิวเซลล์ (outer membrane) ได้ สำหรับกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีฤทธิ์ต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ น่าจะมีกลไกอื่นๆ ในการเข้าทำลายเซลล์ ซึ่งมีรายงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาถึงกลไกการทำลายเซลล์แบคทีเรียของเปปไทด์ เช่น

การทำให้เกิดช่องว่างบนเยื่อหุ้มเซลล์ (pore-forming) การทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane disruption) และการแทรกผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane penetration) เพื่อจับจำเพาะกับสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เป็นต้น (Ageitos *et al.*, 2017) ทั้งนี้ หากต้องการทราบกลไกในการออกฤทธิ์จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้ พบการแสดงคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E.coli*, *S. aureus* และ *X. oryzae* pv. *oryzae* ที่ความเข้มข้นสูงถึง 2 mg/mL ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าความเข้มข้นของเปปไทด์จากไฮโดรไลเซตรูปแบบอื่นๆที่มีรายงานในวารสารวิชาการ

ฤทธิ์ทางชีวภาพอีกประเภทหนึ่งที่ผู้วิจัยให้ความสนใจคือความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยติดตามการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งระดับชนิด HepG2 ในสถานะที่มีกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เทียบกับสถานะการเจริญแบบปกติ และศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ไม่ใช่ มะเร็งชนิด Vero ควบคู่ไปด้วย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพที่ความเข้มข้น 400 μ g/mL ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ปกติ ชนิด Vero โดยความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิด อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เปปไทด์ขนาดเล็กในกากน้ำปลาเป็น สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Zhang *et al.*, 2012)

สรุปผลการทดลอง

1. กากน้ำปลาที่มีโปรตีน/เปปไทด์เป็นองค์ประกอบ โดยกากน้ำปลากระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ
2. กากน้ำปลาที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จับกับเอนไซม์ของโลหะ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin converting enzyme และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย
3. ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลาที่แตกต่างกันส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่ต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

ควรทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อแยกกลุ่มเปปไทด์ตามขนาดโมเลกุลและความเป็นไฮโดรโฟบิก เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างคุณสมบัติและฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ ซึ่งอยู่ในแผนงานของโครงการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 รวมถึงศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เปปไทด์จากกากน้ำปลาในอุตสาหกรรมน้ำปลาหรืออุตสาหกรรมอาหารในรูปแบบอื่นๆ

บรรณานุกรม

- คันธารรัตน์ ประทุมวัลย์, อนุวัตร แจ่มชัด, ไพศาล วุฒิจำนงค์, ชุตินา ไชยราชฤทธิ์ (2549) การพัฒนาอาหารสัตว์โดยใช้กากเหลือจากการผลิตน้ำปลา. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเศรษฐศาสตร์ สาขาบริหารธุรกิจ*, 386-393
- ศิริลักษณ์ นามวงษ์ (2553) ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 15, 122-132
- หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง (2554) กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง เอกสารฉบับที่ 13/2556
- อรรวรรณ คงพันธุ์ (2553) การผลิตน้ำปลาด้วยวิธีการหมักแบบธรรมชาติ, กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- Ageitos, JM, Sánchez-Pérez, A, Calo-Mata, P, Villa, TG (2017) Antimicrobial peptides (AMPs): Ancient compounds that represent novel weapons in the fight against bacteria. *Biochem Pharmacol* 133, 117-138.
- Benjakul S, Morrissey MT (1997) Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *J Agric Food Chem* 45, 3423-3430.
- Carter P (1971) Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Anal Biochem* 40, 450-458.
- Charoenphun N, Cheirsilp B, Sirinupong N, Youravong W (2013) Calcium-binding peptides derived from tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Eur Food Res Technol* 236, 57-63.
- Chen H, Muramoto K, Yamauchi F (1995) Structural Analysis of Antioxidative Peptides from Soybean .beta.-Conglycinin. *J Agric Food Chem* 43, 574-578.
- Chen H, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K (1996) Antioxidant Activity of Designed Peptides Based on the Antioxidative Peptide Isolated from Digests of a Soybean Protein. *J Agric Food Chem* 44, 2619-2623.
- Chi CF, Wang B, Hu FY, Wang YM, Zhang B, Deng SG, Wu CW (2015) Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Res Int* 73, 124-129.

- Chindapan N, Devahastin S, Chiewchan N (2009) Electrodialysis desalination of fish sauce: electrodialysis performance and product quality. *J Food Sci* 74, E363-71.
- Choi H, Nesvizhskii, A (2008) False discovery rates and related statistical concepts in mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res* 7, 47-50.
- Cushman DW, Cheung HS (1971) Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem Pharmacol* 20, 1637- 1648.
- Du L, Fang M, Wu H, Xiea J, Wu Y, Li P, Zhang D, Huang Z, Xia Y, Zhou L, Wei D (2013) A novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from *Phascolosoma esculenta* water-soluble protein hydrolysate. *J Functional Foods* 5, 475-483.
- Edwards N, Wu X, Tseng TW (2009) An unsupervised, model-free, machine-learning combiner for peptide identifications from tandem mass spectra. *Clinical Proteomics* 5, 23-36.
- Fahmi A, Morimura S, Guo HC, Shigematsu T, Kida K, Uemura Y (2004) Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochem* 39, 1195–1200.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2014) The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges
- Hong F, Ming L, Yi S, Zhanxia L, Yongquan W, Chi L (2008) The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? *Peptides* 29, 1062-1071.
- Hoskin DW, Ramamoorthy A (2008) Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1778, 357–75.
- Hsu KC, Li-Chan ECY, Jao CL (2011) Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chem* 126, 617-622.
- Huang G, Ren L, Jiang J (2011) Purification of a histidine-containing peptide with calcium binding activity from shrimp processing byproducts hydrolysate. *Eur Food Res Technol* 232, 281-287.
- Huang Y, Wang X, Wang H, Liu Y, and Chen Y (2011) Studies on mechanism of action of anticancer peptides by modulation of hydrophobicity within a defined structural framework. *Mol Cancer Ther* 10, 416-426.

- Jai Ganesh R, Nazeer RA, Sampath kumar NS (2011) Purification and identification of antioxidant peptide from Black Pomfret, *Parastromateus niger* (Bloch, 1975) viscera protein hydrolysate. *Food Sci Biotechnol*, 20, 1087–1094.
- Je JY, Park PJ, Kwon JY, Kim SK (2004) A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *J Agric Food Chem* 52, 7842-7845.
- Jun S, Park P, Jung W, Kim S. (2004) Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Res Technol* 219, 20–26.
- Jung WK, Karawita R, Heo SJ, Lee BJ, Kim SK, Jeon YJ (2006) Recovery of a novel Ca-binding peptide from Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) backbone by pepsinolytic hydrolysis. *Process Biochem* 41, 2097-2100
- Jung SK, Kim SK (2007) Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *Eur Food Res Technol* 224, 763-767
- Kim EK, Joung HJ, Kim YS, Hwang JW, Ahn CB, Jeon YJ, Moon SH, Park PJ (2012) Purification of a novel anticancer peptide from enzymatic hydrolysate of *Mytilus coruscus*. *J Microbiol Biotechnol*. 22, 1381-1387
- Khositanon P, Inpratom D, Somwang T, Iamsipo P, Roytrakul S, Choksawangkarn W (2018) Antibacterial and anticancer activities of protein hydrolysate from fish sauce byproduct. *Proceeding of The 6th International Conference on Biochemistry and Molecular Biology*, Rayong, Thailand, 1-8.
- Lee SH, Qian ZJ, Kim SK (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry* 118, 96–102.
- Lee YG., Lee KW, Kim JY, Kim KH, Lee HJ (2004) Induction of apoptosis in a human lymphoma cell line by hydrophobic peptide fraction separated from anchovy sauce. *BioFactors* 21, 63-67.
- Lopetcharat K, Choi YJ, Park JW, Daeschel MA (2001) Fish sauce products and manufacturing: A review. *Food Rev Int* 17, 65-88.
- Lowry O, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275.

- Marchbank T, Limdi JK, Mahmood A, Elia G, Playford RJ (2008) Clinical trial: protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 28, 799-804
- Megías C, Pedroche J, Yust MM, Girón-Calle J, Alaiz M, Millan F, Vioque J (2007) Affinity purification of copper chelating peptides from chickpea protein hydrolysates. *J Agric Food Chem* 55, 3949-54
- Meisel H, FitzGerald RJ (2003) Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des* 9, 1289-129
- Najafian L, Babji, AS (2012) A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides* 33, 178-185.
- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F (2011) Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem* 124, 1354–1362.
- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y (1996) Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med.* 21, 895-902.
- Osawa T, Namiki M (1985) Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. *J Agric Food Chem* 33, 777–780.
- Papo N, Shai Y (2005) Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 62, 784–90.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS (1999) Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3367.
- Piyadhamviboon P, Wongngam W, Benjakul S, Yongsawatdigul J (2012) Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates Prepared from Threadfin Bream (*Nemipterus* spp.) Surimi By-products. *J Aquat Food Prod T* 21, 265-278.
- Rajanbabu V, Chen JY (2011) Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides* 32, 415-420.
- Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF, Stanton C (2011) Bioactive peptides from muscle sources: meat and fish. *Nutrients* 3, 765-791.

- Saito K, Jin D, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K (2003) Antioxidative Properties of Tripeptide Libraries Prepared by the Combinatorial Chemistry. *J Agric Food Chem* 51, 3668-3674.
- Schägger H (2006) Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols* 1, 16-22.
- Shahidi F, Zhong Y (2008) Bioactive peptides. *Journal of AOAC International* 91, 914-931.
- Shai Y (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* 1462, 55–70.
- Sheih IC, Wu TK, Fang TJ (2009) Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour Technol* 100, 3419–3425.
- Su Y (2011) Isolation and identification of pelteobagrin, a novel antimicrobial peptide from the skin mucus of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Comp Biochem Phys B* 158, 149-154.
- Sun, QA, Shen, H, and Luo, YK (2011) Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *J Food Sci Tech Mys* 48, 53-60.
- Sung WS, Lee J, Lee DG (2008) Fungicidal effect and the mode of action of piscidin 2 derived from hybrid striped bass. *Biochem Biophys Res Commun* 371, 551-555.
- Syka, JE, Coon JJ, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF (2004) Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci* 101, 9528-9533.
- Tanner S, Shu H, Frank A, Wang LC, Zandi E, Mumby M, Pevzner PA, Bafna V (2005) InsPecT: identification of posttranslationally modified peptides from tandem mass spectra. *Anal Chem* 77, 4626-39.
- Thorkelsson G, Kristinsson H (2009) Bioactive Peptides from Marine Sources. State of Art. Report to the NORA fund. ISSN 1670-7192.
- Turner AJ, Hooper NM (2002) The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 23, 177-183.
- Vermeirssen V, Van Camp J, Verstraete W (2004) Bioavailability of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides. *Br J Nutr.* 92, 357-366.

- Wang B, Wang YM, Chi CF, Luo HY, Deng SG, and Ma JY (2013) Isolation and Characterization of Collagen and Antioxidant Collagen Peptides from Scales of Croceine Croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Mar Drugs* 11, 4641-4661.
- Wang H, Gao XD, Zhou GC, Cai L, Wen Yao WB (2008) *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit. *Food Chemistry* 106, 888-895.
- Wells JM, McLuckey SA (2005) Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins. *Methods Enzymol*, 402, 148-185.
- Wiriaphan C, Xiao H, Decker EA, and Yongsawatdigul J (2015) Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. *Food chemistry* 167, 7-15.
- Yongsawatdigul J, Rodtong S, Raksakulthai N (2007) Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter cultures. *J Food Sci* 72, M382-90.
- You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J (2010) Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Res Int* 43, 1167–1173.
- Zhang QX, Ling YF, Sun Z, Zhang L, Yu HX, Kamau SM, Lu RR (2012) Protective effect of whey protein hydrolysates against hydrogen peroxide-induced oxidative stress on PC12 cells. *Biotechnol Lett* 34, 2001-2006.