รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดได้จากกากน้ำปลา

Bioactive activities of peptides extracted from fish sauce byproduct

อ.ดร. แวววลี โชคแสวงการ

อ.ดร. ผาณตา เอี้ยวซิโป

ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศ.ดร. สุทธวัฒน์ เบญจกุล

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐

มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802109

สัญญาเลขที่ 4/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดได้จากกากน้ำปลา

Bioactive activities of peptides extracted from fish sauce byproduct

อ.ดร. แวววลี โชคแสวงการ

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

อ.ดร. ผาณตา เอี้ยวซีโป

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

จันทิมา จเรสิทธิกุลชัย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ศ. ดร. สุทธวัฒน์ เบญจกุล

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 4/2560

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศาสตราจารย์สุทธวัฒน์ เบญจกุล ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย สำหรับการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ตลอดการดำเนินโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณบริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด สำหรับตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 และการให้ข้อมูลเกี่ยวกับกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา

บทคัดย่อ

กากน้ำปลาเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา ซึ่งมีมูลค่าต่ำแต่ยังคงมีสารอาหารที่มีคุณค่าสูง ในกระบวนการผลิตน้ำปลาในโรงงานอุตสาหกรรม โปรตีนจากปลาจะถูกย่อยให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงด้วยเอนไซม์จากระบบย่อยอาหารของปลาและจากแบคทีเรียทนเค็มในบ่อหมัก จึงสามารถจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เกิดตามธรรมชาติได้ กากน้ำปลาแบ่งออกเป็น 3 ระดับชั้นคุณภาพ ตามระดับของน้ำปลาที่ผลิตและระยะเวลาในการหมัก ซึ่งทำให้โมเลกุลของเปปไทด์ในโปรตีนไฮโดรไลเซทมีขนาดแตกต่างกันด้วย งานวิจัยนี้สนใจศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลาเพื่อนำไปสู่การเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์พลอยได้ โดยฤทธิ์ทางชีวภาพที่ถูกศึกษา ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ ฤทธิ์ลดความดันโลหิต ฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ และฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง กากน้ำปลาถูกนำมาศึกษาวิธีสกัดที่เหมาะสมและวิธีแยกเปปไทด์ออกจากเกลือโดยใช้ gel-filtration chromatography ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของโปรตีนในกากน้ำปลามีค่าลดลงตามระดับชั้นคุณภาพที่ลดลง อย่างไรก็ตาม ปริมาณโปรตีนไม่มีความสอดคล้องโดยตรงกับฤทธิ์ทางชีวภาพ กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE) ได้ดีกว่าอีกสองระดับชั้นคุณภาพ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.32 ± 0.02 mg/mL และ 0.99 ± 0.40 mg/mL ตามลำดับ และยังมีความสามารถในการรีดิวซ์ที่ดีกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 อีกด้วย 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 อย่างไรก็ตามกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 และเมื่อเปปไทด์ผ่านการแยกส่วนตามมวลโมเลกุลและแยกส่วนตามคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ตามลำดับ พบว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ที่ดี เป็นกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3 kDa และมีความไฮโดรโฟบิกสูง โดยเปปไทด์บริสุทธิ์จากแฟรกชันที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถระบุลำดับกรดอะมิโนได้ด้วย LC-MS/MS คือ PQLLLLLL และ LLLLLLL ซึ่งมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิกสูง งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ทางชีวภาพจากเปปไทด์ที่มีอยู่ในกากน้ำปลา ซึ่งสามารถใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มมูลค่าของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

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 stongest abilities to inhibit DPPH radicals and angiotensin-converting enzyme activity with the IC_{50} values of 0.32 $\pm$ 0.02 mg/mL and 0.99 $\pm$ 0.40 mg/mL, respectively. Also, the reducing power of the 1st grade FSB was higher that the other two grades. The 2nd grade FSB revealed the strongest abilities to scavenge hydroxyl radicals and to chelate metal ion with the IC_{50} of 0.36 $\pm$ 0.01 mg/mL and EC_{50} of 1.00 $\pm$ 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. After peptide fractionation based on molecular weight and hydrophobicity, it was shown that small peptides with the molecular weight lower than 3 kDa and with high hydrophobicity exhibited strong antioxidative and ACE inhibition activities. Two pure peptides, PQLLLLLL and LLLLLLL, could be identified by using LC-MS/MS from the fraction with the strongest antioxidant property. Both of them were shown to be highly hydrophobic. In summary, this work revealed an information about bioactivities of the peptides in the undervalued fish sauce byproduct, which could be useful for the future development of value-added products from manufacturing waste.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
บทนำ	10
วิธีดำเนินการวิจัย	20
ผลการทดลอง	29
อภิปรายผลการทดลอง	53
สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	58
บรรณานุกรม	59
ประวัติคณะผู้วิจัย	66

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 เปปไทด์ที่ได้จากสัตว์ทะเลและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง 15

ตารางที่ 2 องค์ประกอบ (proximate composition) ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 32

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน 36

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน 37

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล ABTS ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน 37

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถจับกับไอออนโลหะได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน 38

ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน 40

ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนด้วย Ninhydrin test และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนอิสระด้วย paper chromatography ในแฟรกชันที่ 1-6 49

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของแฟรกชันย่อยของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ที่ถูกแยกด้วย HPLC และลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ถูกระบุชนิดได้ด้วย MS/MS 51

ตารางที่ 10 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์บริสุทธิ์สังเคราะห์ที่ละลายในสารละลาย 4 ชนิด คือ H_2O, 50 mM NH_4HCO_3, 10 mM NaCl และ 100 mM NaCl 52

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ภาพรวมของการทดลอง 21
รูปที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง **(A)** สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน **(B)** เวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน 29
รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยางคลื่น 280 nm ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography 30
รูปที่ 4 ค่าการนำไฟฟ้า ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography 30
รูปที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography 30
รูปที่ 6 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) 31
รูปที่ 7 SDS-PAGE แสดงมวลโมเลกุลของโปรตีนที่พบในน้ำปลา และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ตามที่ระบุด้านบนแผ่นเจล 31
รูปที่ 8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 33
รูปที่ 9 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 34
รูปที่ 10 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 34
รูปที่ 11 ความสามารถในการรีดิวซ์ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 34
รูปที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 35
รูปที่ 13 ความสามารถของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพในการต้านอนุมูลอิสระจากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และ **(D)** ความสามรถในการรีดิวซ์ 36
รูปที่ 14 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 38

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 15 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 หลังจากรวม fraction ที่ F2 F3 และ F4 38

รูปที่ 16 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4 39

รูปที่ 17 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 หลังจากรวม fraction ที่ F2 F3 และ F4 40

รูปที่ 18 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย **(A)** *S. aureus*, **(B)** *E. coli* และ **(C)** *X. oryzae pv. oryzae* ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL 41

รูปที่ 19 ผลของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 200 μg/mL และ 400 μg/mL ต่อการเจริญของ **(A)** เซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell line และ **(B)** เซลล์ปกติ Vero cell line 42

รูปที่ 20 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) เมื่อผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter 43

รูปที่ 21 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter จากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และ **(D)** ความสามารถในการรีดิวซ์ 44

รูปที่ 22 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter 45

รูปที่ 23 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) เมื่อผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิกด้วย reverse-phase resin (C18 C8 และ C4) 46

รูปที่ 24 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิก จากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl และ **(C)** ความสามารถในการรีดิวซ์ 47

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 25 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิก 48

รูปที่ 26 (A) ความเข้มข้นของโปรตีน **(B)** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในรูปของความเข้มข้นสมมูลเมื่อเทียบกับ gallic acid **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของแต่ละแฟรกชันย่อยที่ได้จากสารสกัดกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ค่าที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยตัวอักษรกำกับบนแผนภูมิที่แตกต่างกัน (a-d) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูล ($p<0.05$) 49

รูปที่ 27 (A) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแฟรกชันที่ 2 **(B)** ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกลุ่มโปรตีนช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ตัวอักษรกำกับบนแผนภูมิที่แตกต่างกัน (a-b) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูล ($p<0.05$) 50

รูปที่ 28 (A) โครมาโทแกรมจาก HPLC ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 แฟรกชันที่ 2 แสดงให้เห็นถึงการแบ่งแฟรกชันย่อย 2A 2B และ 2C, (B) mass spectra ของเปปไทด์ PQLLLLLL ($m/z = 462.26$, $z = +2$) จากแฟรกชันย่อย 2A และ (C) mass spectra ของเปปไทด์ LLLLLLL ($m/z = 405.73$, $z = +2$) from จากแฟรกชันย่อย 2B 51

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

ABTS	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ACE	Angiotensin-converting enzyme
CID	Collisionally induced dissociation
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	Ethanol
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
FSB	Fish sauce byproduct
HHL	Hippuryl-histidyl-leucine
MHB	Mueller Hinton Broth
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MS	Mass spectrometry
MS/MS	Tandem mass spectrometry
RP-HPLC	Reverse phase-high performance liquid chromatography
TPTZ	2,4,6-tripyridyl-s-triazine

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สถิติจาก Food and Agriculture Organization (FAO) ในปี 2012 แสดงให้เห็นว่า มีการใช้ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำในตลาดโลกในปริมาณสูงถึง 158 ล้านตัน ในจำนวนนี้มีปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ประชากรใช้บริโภคประมาณ 136 ล้านตัน และมีส่วนที่ไม่สามารถใช้บริโภคสูงถึง 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 แสดงให้เห็นว่าปริมาณสัตว์น้ำที่ถูกใช้ในการผลิตน้ำปลาในประเทศสูงถึง 106,630 ตัน ในปี 2554 (สถิติหน่วยธุรกิจการประมง, 2554) วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตคือปลาสดและเกลือ โดยทำการหมักปลาสดและเกลือในอัตราส่วน 2:1 ถึง 5:1 โดยน้ำหนัก เป็นระยะเวลาประมาณ 6-18 เดือน (อรวรรณ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 ซึ่งเป็นส่วนใสและผลิตภัณฑ์พลอยได้ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำที่เรียกว่า กากน้ำปลา (fish sauce byproduct) ในกระบวนการผลิตระดับอุตสาหกรรมจะมีการนำกากน้ำปลาไปหมักต่อเพื่อใช้เป็นน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นกากน้ำปลาจะถูกแปรรูปเป็นอาหารสัตว์เลี้ยงและปุ๋ยชีวภาพที่มีมูลค่าต่ำ สถิติจาก บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด ระบุว่าปริมาณกากน้ำปลาที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตในแต่ละปีมีปริมาณสูงถึง 2,040 ตัน

กากน้ำปลาประกอบไปด้วยสารอาหารที่สำคัญคือ โปรตีน (ร้อยละ 15.37) คาร์โบไฮเดรต (ร้อยละ 21.32) และไขมัน (ร้อยละ 3.15) และส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ เกลือ ความชื้น เถ้า และเยื่อใยหยาบ (คันธารัตน ประทุมวัลย์ และคณะ, 2549) ในปัจจุบันยังมีการนำกากน้ำปลาเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์อย่างไม่เต็มที่ คณะผู้วิจัยจึงเห็นความสำคัญของการศึกษาการใช้ประโยชน์ของสารอาหารจากกากน้ำปลา ทั้งนี้มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นในอุตสาหกรรมอาหารทะเลชนิดอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตซูริมิและอุตสาหกรรมอาหารทะเลแปรรูป ในรูปแบบของการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) โดยอาศัยเอนไซม์ในการย่อยโปรตีนจากผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านั้นให้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท (protein hydrolysate) ซึ่งอุดมไปด้วยเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (Benjakul and Morrissey, 1997) เปปไทด์บางชนิดที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทมีคุณสมบัติในการต้าน

อนุมูลอิสระ (antioxidant activity) (Piyadhammaviboon *et al*, 2012; Wang *et al*, 2013; Wiriyaphan *et al*, 2015), การจับกับไอออนของโลหะ (metal ion chelating activity) เพื่อลดการสร้างอนุมูลอิสระและเพิ่มการนำส่งไอออนที่จำเป็นต่อร่างกาย (Charoenphun *et al*, 2013; Jung and Kim *et al*, 2007; Megias *et al*, 2007), การลดความดันโลหิต (antihypertensive activity) โดยยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme (ACE) (Je *et al*, 2004; Piyadhammaviboon *et al*, 2012), การต้านการเจริญของจุลชีพ (antimicrobial activity) (Rajanbabu and Chen, 2011; Su 2011), การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง (anticancer activity) (Kim *et al*, 2012; Lee *et al*, 2004) โดยฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์แต่ละชนิดขึ้นอยู่กับโครงสร้างปฐมภูมิและมวลโมเลกุลของเปปไทด์ (Shahidi and Zhong, 2008) เปปไทด์บางชนิดอาจแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากกว่าหนึ่งอย่าง (Meisel and FitzGerald, 2003; Piyadhammaviboon *et al*, 2012) ในปัจจุบันมีการจดสิทธิบัตรผลิตภัณฑ์จากเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพและใช้ในทางการค้าในรูปแบบของอาหารเสริมและยา เช่น PeptACE™ Vasotensin® Levenorm™ จากปลาใช้เพื่อควบคุมความดันโลหิต เป็นต้น (Thorkelsson and Kristinsson, 2009) ทั้งนี้ การใช้ประโยชน์จากเปปไทด์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งของการป้องกันและรักษาโรค เนื่องจากเป็นโมเลกุลทางชีวภาพที่ไม่เป็นโทษต่อร่างกาย จากการสืบค้นข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับกากน้ำปลาในประเทศไทย พบว่ายังมีการศึกษาวิจัยในวงจำกัด โดยยังไม่พบรายงานการใช้ประโยชน์จากกากน้ำปลาในรูปแบบของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

คณะผู้วิจัยเล็งเห็นว่ากากน้ำปลาจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซทตามธรรมชาติรูปแบบหนึ่งที่เกิดจากการย่อยโปรตีนในปลาสดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสจากภายในตัวปลาและเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดทนเค็มภายในบ่อหมักน้ำปลา จึงมีความเป็นไปได้อย่างมากที่จะมีเปปไทด์ที่มีโครงสร้างปฐมภูมิและขนาดที่หลากหลาย และมีแนวโน้มเป็นอย่างสูงที่จะพบเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่มีอยู่ในกากน้ำปลา ซึ่งได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ ลดความดันโลหิต ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งการศึกษานี้จะเป็นส่วนสำคัญที่ทำให้มีการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของกากน้ำปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา รวมถึงเป็นการพัฒนานวัตกรรมอาหารฟังก์ชัน (functional food) เพื่อสุขภาพที่ดี ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมในหมู่ผู้บริโภคที่ใส่ใจสุขภาพ โดยในระยะยาวอาจมีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้อยู่ในรูปของเปปไทด์ที่เป็นอาหารเสริมหรืออาจพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นนอกเหนือจากคุณค่าทางโภชนาการปกติ โครงการวิจัยฉบับนี้เป็นอีกก้าวหนึ่งของการใช้วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการผลิตน้ำปลาไทยซึ่งเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านแขนงหนึ่งและเพื่อพัฒนาศักยภาพของอุตสาหกรรมขนาดย่อมในเขตชุมชนในการใช้วัตถุดิบให้เกิดประโยชน์สูงสุด

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อศึกษาและพัฒนาการใช้ประโยชน์จากกากน้ำปลามาใช้ประโยชน์ในเชิงอาหารฟังก์ชันเพื่อเพิ่มมูลค่าของวัตถุดิบ โดยมีวัตถุประสงค์ย่อยดังนี้

1) เพื่อศึกษาวิเคราะห์มวลโมเลกุลและปริมาณของเปปไทด์ที่มีอยู่ในกากน้ำปลาซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 2 และ 3

2) เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาในการต้านอนุมูลอิสระ การจับกับไอออนของโลหะ การยับยั้งการทำงานของ angiotensin-converting enzyme การต้านการเจริญของจุลชีพ และการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

3) เพื่อศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนและฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์บริสุทธิ์

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาในปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 คณะผู้วิจัยทำการสกัดและวิเคราะห์เปปไทด์จากกากน้ำปลา ซึ่งได้จากการผลิตน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ โดยทำการเก็บตัวอย่างจากโรงงานผลิตน้ำปลาในเขตชุมชน จ.ชลบุรี (บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด) ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจะเริ่มศึกษาเปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทที่เกิดตามธรรมชาติในระหว่างการหมักน้ำปลาโดยอาศัยเอนไซม์โปรติเอสในระบบทางเดินอาหารของปลาและเอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดทนเค็ม 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 เพื่อการพัฒนาเป็นอาหารทางเลือกสำหรับลดความดันโลหิต (4) ความสามารถในการต้านการเจริญของจุลชีพ โดยจะทดสอบกับแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ และ (5) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและเซลล์ปกติ

ในปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ส่วนสกัดที่แสดงประสิทธิภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพสูงและมีปริมาณเปปไทด์มากจะถูกเลือกสำหรับทำบริสุทธิ์เปปไทด์ต่อไป คณะผู้วิจัยจะศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ โดยอาศัยเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและ ultrafiltration เปปไทด์บริสุทธิ์จะถูกวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย tandem mass spectrometry โดยใช้เทคนิคในการเกิด fragmentation คือ collisionally-induced dissociation (CID) เพื่อบอกลำดับกรดอะมิโนและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหมู่ฟังก์ชันในกรดอะมิโน นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยจะศึกษาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเหมือนเปปไทด์จากกากน้ำปลา 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 เพื่อย่อยโปรตีนจากผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านั้นนำไปสู่การผลิตเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้หลากหลาย เช่น การย่อยผลิตภัณฑ์พลอยได้จากการผลิตซูริมิจากปลา threadfin bream ด้วยเอนไซม์ Virgibacillus sp. SK33 proteinase และ alcalase ให้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและลดความดันโลหิต (Piyadhammaviboon *et al*, 2012; Wiriyaphan *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) นอกจากนี้ยังพบเปปไทด์ที่สกัดได้จากผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหารทะเลโดยไม่ผ่านการย่อย เช่น เยื่อหุ้มหนังปลา yellow catfish มีเปปไทด์ GKLNLFLSRLEILKLFVGAL ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ และเชื้อรา (Su, 2011) และพบ hydrophobic fraction ของเปปไทด์ที่สกัดจากน้ำปลา anchovy ซึ่งมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์มะเร็งชนิด human lymphoma (U937) (Lee *et al*, 2004) เป็นต้น นอกจากตัวอย่างดังกล่าว ยังมีเปปไทด์อีกหลายชนิดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังแสดงใน**ตารางที่ 1** คุณสมบัติทางชีวภาพของเปปไทด์เหล่านี้มีความหลากหลายเนื่องจากกรดอะมิโน 20 ชนิด ที่เป็นองค์ประกอบของเปปไทด์มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ขึ้นอยู่กับหมู่ฟังก์ชันแต่ละประเภท ปัจจัยหลักที่มีผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้คือโครงสร้างปฐมภูมิ และความยาวของสายเปปไทด์ (Shahidi and Zhong, 2008)

กากน้ำปลาจัดเป็นกลุ่มโปรตีนไฮโดรไลเซทตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางอาหารในรูปของเปปไทด์อยู่ปริมาณมาก ในการกระบวนการผลิตน้ำปลามีเอนไซม์โปรตีเอสที่เกี่ยวข้องหลายชนิดทั้งจากภายในตัวปลาและเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่พบในบ่อหมักน้ำปลา เช่น *Halobacterium salinarum*, *Halobacillus thailandensis*, *Virgibacillus* spp. SK33 เป็นต้น (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) เปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยโปรตีนในปลาสดด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิดดังกล่าวมีความหลากหลายสูง ทั้งในด้านของลำดับกรดอะมิโน การเปลี่ยนแปลงหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโนที่อาจเกิดขึ้นในระหว่าง

กระบวนการหมักเป็นระยะเวลานาน 6-18 เดือน และความยาวของสายเปปไทด์ ซึ่งอาจทำให้เปปไทด์ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันไป จากการศึกษาเบื้องต้น คณะผู้วิจัยพบว่ามีโพลีเปปไทด์จำนวนมากที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 45 kDa ในตัวอย่างกากน้ำปลา โดยที่แถบโปรตีนบน SDS-PAGE ในตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 มีความแตกต่างจากตัวอย่างน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น และจากการทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระเบื้องต้น พบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานทางวิชาการก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 3kDa จากไฮโดรไลเซทของ porcine hemoglobin ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีเอส มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้น (Sun *et al*, 2011) ผลการทดลองเบื้องต้นนี้จะเป็นพื้นฐานไปสู่การศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ด้วยเหตุนี้ คณะผู้วิจัยจึงสมมติฐานว่ามีแนวโน้มเป็นอย่างมากที่เปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาอาจมีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านอนุมูลอิสระ/ ลดความดันโลหิต/ มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ/ ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย/ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ที่เปปไทด์อาจแสดงคุณสมบัติอย่างใดอย่างหนึ่งหรือแสดงคุณสมบัติหลายอย่างร่วมกัน

ตารางที่ 1 เปปไทด์ที่ได้จากสัตว์ทะเลและฤทธิ์ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้อง

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

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

กากน้ำปลาจัดเป็นไฮโดรไลเซทตามธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการจากโปรตีนสูงที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำปลา การผลิตน้ำปลาเป็นภูมิปัญญาชาวบ้านที่สืบทอดกันมาช้านานและเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญอย่างยิ่งทางเศรษฐกิจเนื่องจากมีความต้องการในตลาดโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องควบคู่กับการขยายตัวของตลาดอาหารไทย กระบวนการผลิตน้ำปลาเริ่มจากการผสมปลาทะเลขนาดเล็กกับเกลือในอัตราส่วน 2:1 ถึง 5:1 โดยน้ำหนัก และหมักเป็นเวลานาน 6-18 เดือน การย่อยสลายของปลาเกิดจากเอนไซม์โปรตีเอสทั้งจากอวัยวะภายในและจากภายนอกตัวปลาซึ่งถูกผลิตมาจากแบคทีเรียภายในถังหมัก โดยเฉพาะในกลุ่ม halophilic bacteria (อรวรรณ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) กระบวนการผลิตน้ำปลาภาคอุตสาหกรรมในประเทศไทย มีการแบ่งน้ำปลาแท้ออกเป็นสามระดับคุณภาพโดยวัดจากปริมาณ total nitrogen น้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 เกิดจากการหมักปลาสดโดยตรง ส่วนน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 2 และ 3 ได้จากการหมักกากน้ำปลาที่เหลือจากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 และ 2 ตามลำดับ กากน้ำปลาที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 3 จะถูกใช้เป็นปุ๋ยหรืออาหารสัตว์ ซึ่งกากน้ำปลาเหล่านั้นมีคุณค่าทางอาหารสูง โดยมีโปรตีนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 15.37 คาร์โบไฮเดรต ร้อยละ 21.32 และไขมัน ร้อยละ 3.15 (คันธารัตน ประทุมวัลย์ และคณะ, 2549) แม้ว่าในปัจจุบันจะมีกลุ่มวิจัยที่ให้ความสำคัญกับการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำปลาไทยในหลายรูปแบบ มีการศึกษาถึงการเพิ่มเอนไซม์โปรตีเนสจากแบคทีเรียเพื่อเร่งกระบวนการผลิต (Yongsawatdigul *et al*, 2007; ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) และการศึกษาการผลิตน้ำปลาโซเดียมต่ำเพื่อเป็นอาหารทางเลือกให้ผู้ที่ใส่ใจสุขภาพและผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงและโรคไต (Chindapan *et al*, 2009) แต่ยังไม่มีงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลา

ในปัจจุบัน มีรายงานทางวิชาการเกี่ยวกับการสกัดและการทำบริสุทธิ์ของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) ซึ่งได้จากกระบวนการหมักหรือกระบวนการย่อยโปรตีนที่พบในอาหาร เช่น นม เนื้อสัตว์ อาหารทะเล โดยใช้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไฮโดรไลเซทซึ่งอุดมไปด้วยเปปไทด์ที่มีความหลากหลายของลำดับกรดอะมิโน อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลา 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; Piyadhammaviboon *et al*, 2012)

การนำไฮโดรไลเซทจากปลามาใช้ประโยชน์จัดเป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของเนื้อปลาและเศษเหลือปลาซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมอาหารทะเล การเตรียมไฮโดรไลเซททำได้โดยใช้

เอนไซม์ เช่น alcalase, neutrase, trypsin, chymotrypsin, pepsin, *Virgibacillus sp.* SK33 ในการย่อยโปรตีนในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น (Benjakul and Morrissey, 1997; Najafian and Babji, 2012; Wiriyapan *et al*, 2015) ผลิตภัณฑ์เปปไทด์ที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ มี เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่ได้รับการจดสิทธิบัตรและใช้ในทางการค้าเพื่อเป็นอาหารเสริมและยา เช่น (1) PeptACE™ เป็นเปปไทด์ที่สกัดได้จากปลาทูน่าชนิด Bonito ใช้เพื่อควบคุมความดันโลหิต โดยช่วยยับยั้งการทำงานของ angiotensin converting enzyme, (2) SEACURE® ซึ่งสกัดได้จากเนื้อปลาทะเลลึก 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 จากไฮโดรไลเซทของถั่วเหลืองที่มีความสามารถในการขจัดอนุมูลอิสระ 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* (2003) 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

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระบางชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการจับกับโลหะไอออน เนื่องจากไอออนของโลหะ เช่น เหล็กและทองแดง มีความไวต่อปฏิกิริยาสูง เป็นสาเหตุให้เกิด reactive oxygen species ขึ้นในระบบ หากเปปไทด์มีความสามารถในการเข้าจับกับไอออนของโลหะได้ดีก็จะช่วยลดการสร้างอนุมูลอิสระด้วย Megias *et al* (2007) รายงานว่าความสามารถในการจับกับไอออนทองแดง ของเปปไทด์จากถั่ว chickpea ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ histidine ซึ่งมีหมู่ imidazole ที่เข้าจับกับโลหะไอออนได้ดี และยังขึ้นอยู่กับความยาวของสายเปปไทด์และลำดับกรดอะมิโนด้วย นอกจากนี้ความสามารถในการเข้าจับกับโลหะของเปปไทด์ยังเป็นประโยชน์ในด้านของการเพิ่มการดูดซึมแร่ธาตุที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น แคลเซียม โดยเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมีกรดอะมิโนที่มีประจุลบหรือมีหมู่

imidazole เช่น WEWLHYW จากไฮโดรไลเซทของปลา tilapia (Charoenphun *et al*, 2013), TCH จากไฮโดรไลเซทกุ้ง (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 จึงส่งผลดีต่อการลดความดันโลหิต เปปไทด์ที่เป็น ACE inhibitor มีลำดับกรดอะมิโนที่หลากหลาย แต่มีความคล้ายคลึงกันคือ การที่กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก อยู่ที่ปลาย C-terminus และอีกกรณีหนึ่งคือ arginine, lysine หรือ proline อยู่ที่ปลาย 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 รา และไวรัส เปปไทด์เหล่านี้มีคุณสมบัติร่วมคือมีกรดอะมิโนที่เป็นไฮโดรโฟบิกมากกว่าร้อยละ 50 ของกรดอะมิโนทั้งหมด, มีส่วนที่มีประจุบวกจาก lysine และ arginine, และมีคุณสมบัติ amphipathic โดยส่วนมากมีกลไกการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการทำลายผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลชีพ (Shahidi and Zhong, 2008) ตัวอย่างเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ เช่น GKLNLFLSRLEILKLFVGAL ที่สกัดจากเยื่อหุ้มหนังปลา yellow catfish มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Candida albicans* (Su, 2011)

นอกจากนี้ มีรายงานวิจัยกล่าวถึงความเป็นไปได้ในการใช้ประโยชน์จากเปปไทด์เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งหลายชนิด Kim *et al* (2012) 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 ผ่านวิถีการส่งสัญญาณภายในเซลล์ (Papo and Shai, 2005) ตัวแปรที่มีผลต่อฤทธิ์ต้านมะเร็งของเปปไทด์คือ ความเป็นไฮโดรโฟบิก, ประจุรวม, ความเป็นแอมฟิพาธิค, ลักษณะโครงสร้างทุติยภูมิในเยื่อหุ้มเซลล์ และความสามารถในการเกิดโอลิโกเมอไรเซชัน (Hoskin and Ramamoorthy, 2008; Huang *et al*, 2011; Shai, 1999)

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- บริการความรู้แก่ประชาชน

องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยจะเพิ่มความเข้าใจเกี่ยวกับอาหารฟังก์ชันเชิงโภชนาการ ในรูปของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ, ลดความดันโลหิต, นำส่งไอออนที่มีจำเป็นต่อร่างกาย, ต้านจุลชีพ และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง ซึ่งองค์ความรู้เหล่านี้อาจช่วยให้ประชาชนทั่วไปใส่ใจในโภชนาการเพื่อสุขภาพของตนเองมากขึ้น โดยจะมีการเผยแพร่งานวิจัยผ่านสื่อต่างๆ เช่น วารสารทางวิชาการ

- บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ และนำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลามีส่วนช่วยให้ภาคธุรกิจการผลิตน้ำปลาในเขตชุมชนภาคตะวันออก ซึ่งรวมถึงหน่วยงานที่สนับสนุนโครงการวิจัยนี้ (บริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด) และหน่วยงานอื่นๆ ได้ใช้ประโยชน์จากสารอาหารในวัตถุดิบให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยอาจนำไปสู่การแปรรูปเปปไทด์จากกากน้ำปลาให้เป็นอาหารเสริม หรือการปรับปรุงสูตรน้ำปลาแต่ละระดับคุณภาพให้มีคุณค่าทางอาหารสูงขึ้นโดยไม่จำเป็นต้องใช้วัตถุดิบเพิ่มเติม

- เป็นประโยชน์ต่อประชากรกลุ่มเป้าหมาย

องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลาเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มอุตสาหกรรมขนาดย่อมในเขตภาคตะวันออก โดยข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ช่วยสนับสนุนด้านข้อมูลคุณค่าทางอาหารของกากน้ำปลา และอาจเป็นแนวทางให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากกากน้ำปลาต่อไปในอนาคต

โครงการวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อนิสิตระดับปริญญาตรีและบัณฑิตศึกษาที่ได้เข้าร่วมศึกษาวิจัย นอกจากนี้หน่วยงานวิจัยและสถาบันการศึกษา ทั้งในด้านอุตสาหกรรมอาหาร ชีวเคมี เภสัชเคมี และทางการแพทย์สามารถนำไปศึกษาและพัฒนาต่อไปได้

- เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

องค์ความรู้ที่ได้รับจากการสกัด การทำบริสุทธิ์ และการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ สามารถใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาอาหารฟังก์ชันจากกากน้ำปลา การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอื่นๆ เช่น การลดอาการอักเสบ และการลดคลอเลสเตอรอล และเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์จากกากน้ำปลา นอกจากนี้ ยังอาจนำองค์ความรู้เหล่านี้ไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์พลอยได้จากอุตสาหกรรมอื่นๆอีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัยมีวิธีการดำเนินงานวิจัยโดยรวมดังแผนภาพใน**รูปที่ 1** โดยจะทำการเก็บตัวอย่างกากน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1, 2, และ 3 จากบริษัทน้ำปลาพิไชย อ.เมือง จ.ชลบุรี และทำการศึกษาวิจัยที่ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ เริ่มต้นจากการศึกษาวิธีการสกัดเปปไทด์และโปรตีนในตัวอย่าง โดยใช้น้ำและสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ รวมทั้งศึกษาตัวแปรที่มีผลต่อการสกัด เช่น เวลา อุณหภูมิ และการลดพื้นที่ผิว จากนั้นเกลือที่มีในตัวอย่างจะถูกแยกด้วย gel-filtration chromatography เปปไทด์และโปรตีนจะถูกแยกตามขนาดด้วยเทคนิค gel-filtration chromatography แล้วเก็บ fraction อย่างหยาบ ตามขนาดของเปปไทด์/โปรตีน หลังจากนั้นแต่ละ fraction ย่อยจะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพดังนี้

- การยับยั้งอนุมูลอิสระโดยทดสอบด้วย free radical scavenging activity assay โดยใช้สารตั้งต้นเป็น 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) และ hydroxyl radical และทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในหลอดทดลอง รวมถึงความสามารถในการรีดิวซ์ของกากน้ำปลา (Osawa and Namiki, 1985, Piyadhammaviboon *et al*, 2012; Wang *et al*, 2008)

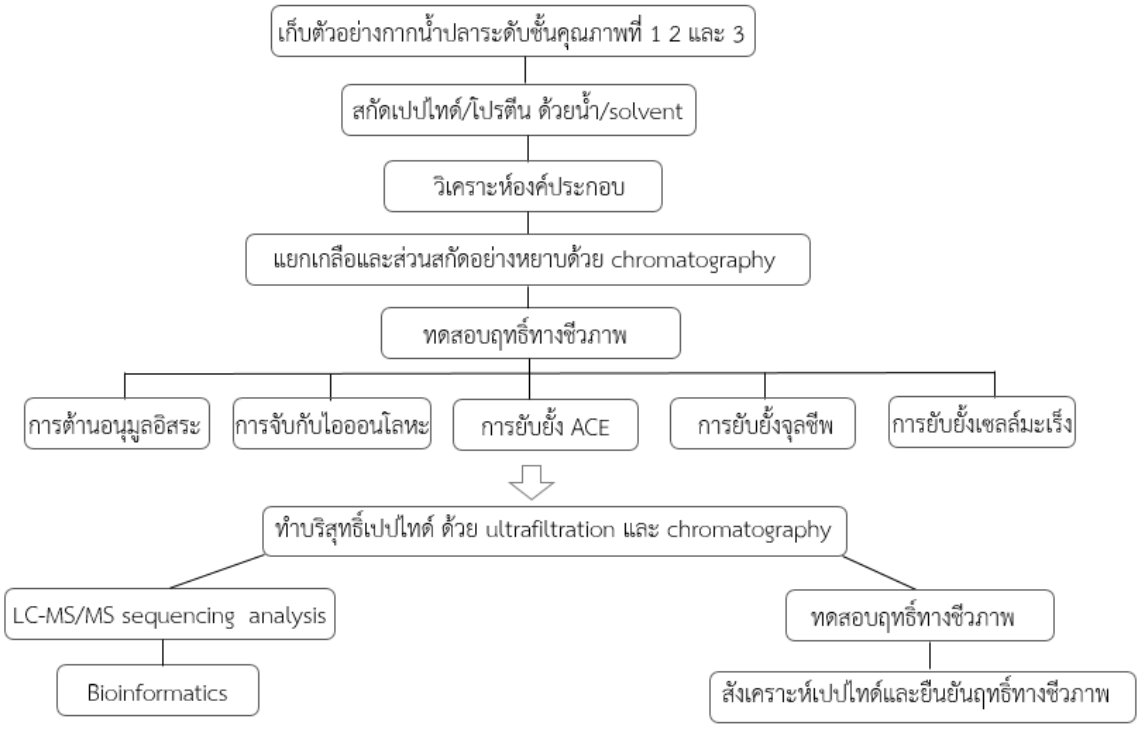
- การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ในหลอดทดลอง ซึ่งเอนไซม์นี้เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (Cushman and Cheung, 1971)

- 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

- ความสามารถในการยับยังการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยวัดจากอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เมื่ออยู่ในอาหารที่มีเปปไทด์จากกากน้ำปลา

ทั้งนี้ หากพบ fraction หยาบของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวที่มีประสิทธิภาพสูงและมีปริมาณเปปไทด์ในตัวอย่างมาก เปปไทด์จะถูกนำมาทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคที่เหมาะสม โดยหากพบฤทธิ์ทางชีวภาพที่ใกล้เคียงกันจากตัวอย่างกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ ผู้ทดลองจะเลือกใช้ตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 เพื่อทำบริสุทธิ์เปปไทด์ เนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่ไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์ หลังจากการทำบริสุทธิ์ เปปไทด์จะถูกวิเคราะห์ด้วย HPLC และ tandem mass spectrometry ประกอบกับเครื่องมือทาง bioinformatics หลังจากนั้น เปปไทด์บริสุทธิ์ หรือกึ่งบริสุทธิ์จะถูกนำไปทดสอบประสิทธิภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งหนึ่ง เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ต่อไปในอนาคต



รูปที่ 1 ภาพรวมของการทดลอง

(1) การเตรียมตัวอย่างกากน้ำปลา

ตัวอย่างกากน้ำปลาระดับคุณภาพชั้นที่ 1 2 และ 3 ได้รับจาก บริษัท น้ำปลาพิไชย 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 H_2O, 10% ethanol, 20% ethanol, 30% ethanol, 40% ethanol และ 50% ethanol ตามลำดับ รวมทั้งทำการทดสอบระยะเวลาที่ใช้ในการละลายตัวอย่าง และการบดตัวอย่างด้วย glinder เพื่อช่วยในการละลายของเปปไทด์ด้วย ส่วนสกัดจะถูกนำไปแยกเปปไทด์ออกจากเกลือและสารโมเลกุลเล็กอื่นด้วย gel-filtration chromatography (GE-Healthcare) ตาม protocol จากผู้ผลิต จากนั้นทำการเก็บ fraction อย่างหยาบ เพื่อหาความเข้มข้นของเปปไทด์/โปรตีนในตัวอย่างที่สกัดด้วยวิธีต่างกันดังกล่าวด้วย Lowry's protein assay (Lowry *et al*, 1951) วิธีสกัดที่ได้ผลดีที่สุดจะถูกเลือกเพื่อทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

(1.2) การศึกษาวิธีแยกเกลือจากส่วนสกัดกากน้ำปลา

ตัวอย่างกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ที่สกัดได้ด้วยวิธีที่เหมาะสม จะถูกนำมาแยกตามขนาดโมเลกุลและแยกเกลือออกจากตัวอย่างด้วย gel-filtration chromatography โดยใช้ stationary phase เป็น sephadex G-15 ที่มีความสูงของคอลัมน์ 50 cm และมีปริมาตรคอลัมน์ 88 mL คอลัมน์ถูก equlibrate ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 880 mL แล้วนำกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการสกัดแล้ว ปริมาตร 4 mL เติมลงบน stationary phase เพื่อให้เกิดการแยกตามขนาดโมเลกุล mobile phase ที่ใช้คือน้ำกลั่น ตัวอย่างจะถูกเก็บเป็นแฟรกชันละ 10 mL จำนวน 5 แฟรกชัน โดยจะถูกนำมาวัดค่าการนำไฟฟ้าด้วย conductivity meter และตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm และ Lowry's protein assay ตามลำดับ ก่อนที่จะรวม fraction ที่พบเปปไทด์/โปรตีนเข้าด้วยกัน แล้วทำให้แห้งด้วยวิธี centrifugal evaporation เปปไทด์ที่สกัดจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 จะถูกนำไปทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

วิธีการแยกเกลือออกจากตัวอย่างอีกระบบหนึ่งที่ใช้ทดสอบคือการใช้ gel-filtration chromatography แบบ PD-10 desalting column (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 10 column volumn เป็น equlibration buffer จากนั้น กากน้ำปลาปริมาตร 2.5 mL ถูกเติมลงในคอลัมน์ แล้วทำการชะด้วยน้ำกลั่น แฟรกชันของส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ถูกแบ่งเป็น 6 แฟรกชัน ปริมาตรแฟรกชันละ 3 mL ซึ่งแต่ละแฟรกชันจะถูกนำไปวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry's protein assay และวัดปริมาณสารประกอบฟีนอลิกด้วยวิธี Folin ciocaltau (Blainski et al., 2013) พร้อมทั้งวัดปริมาณเกลือในตัวอย่าง ด้วย conductivity meter แต่ละแฟรกชันจะถูกนำไปตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH จากนั้นแยกส่วนด้วย molecular weight cut-off filter และ HPLC ก่อนที่จะวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

(1.3) การศึกษา protein profile ในกากน้ำปลา

เปปไทด์/โปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ และน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ จะถูกวิเคราะห์ด้วย protein gel electrophoresis (Schägger, 2006) และย้อมสีแถบโปรตีนด้วย Coomassie blue เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของมวลโมเลกุลและปริมาณโปรตีนในกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ รวมถึงเปรียบเทียบมวลโมเลกุลของโปรตีนในน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพด้วย

(1.4) การวิเคราะห์องค์ประกอบของกากน้ำปลา (proximate analysis)

กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 ถูกนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี โดยรวมถึงโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน ไฟเบอร์ เถ้า และความชื้น โดยการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนใช้วิธีของ Kjeldahl (AOAC International, 2000) ไขมันถูกวิเคราะห์ด้วยวิธี soxhlet extraction (AOAC International, 1997) และ ไฟเบอร์ เถ้า และความชื้น ถูกตรวจวัดด้วยวิธีของ AOAC International (1997) เช่นเดียวกัน ส่วนปริมาณส่วนที่เหลือคิดเป็นร้อยละของคาร์โบไฮเดรตในตัวอย่าง การทดลองถูกทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

(2) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

ตัวอย่างกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพที่ผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุล และแยกเกลือออกจากตัวอย่างด้วย gel-filtration chromatography ถูกนำมาวิเคราะห์ฤทธิ์ทางชีวภาพดังต่อไปนี้ (ทำการทดลองซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง เพื่อยืนยันผลในทุกการทดลอง)

(2.1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

(2.1.1) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระจะถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ตามวิธีของ Piyadhammaviboon *et al*, 2012 โดยเติมเปปไทด์ช่วงความเข้มข้น 0.1 – 1.0 mg/mL ในสารละลายที่เหมาะสมจากข้อ 1.1 ปริมาตร 50 µL ลงในสารละลาย 0.2 mM DPPH ใน methanol ปริมาตร 100 µL 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 $FeSO_4$ ปริมาตร 67 uL, 6 mM H_2O_2 ปริมาตร 47 µL, 20 mM sodium salicylate ปริมาตร 20 uL, และเปปไทด์ตัวอย่าง ปริมาตร 66 µL สารผสมนี้จะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 60 นาที และค่าการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ hydroxylated salicylate complex จะถูกวัดที่ความยาวคลื่น 562 nm

ค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระจากทั้งสองวิธี สามารถคำนวณได้จากสมการที่ (1)

% scavenging activity = [A(control)-A(peptide)/A(control)]×100.....(สมการที่ 1)

% scavenging activity = ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระ

A(control) = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ไม่มีเปปไทด์

A(peptide) = ค่าการดูดกลืนแสง ของตัวอย่างที่มีเปปไทด์

(2.1.3) ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ถูกตรวจสอบโดยดัดแปลงจากวิธีของ Re et al (1999) สารละลายอนุมูล ABTS เตรียมได้โดยการออกซิไดซ์ 7 mM ABTS ด้วยสารละลาย potassium persulfate เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางสารละลายด้วย 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:20 เพื่อใช้ทดสอบกับสารละลายตัวอย่าง สารละลายตัวอย่างกากน้ำปลาหรือสารละลายกรดแอสคอร์บิกปริมาตร 10 µL ถูกเติมลงไปในสารละลาย ABTS ปริมาตร 1 mL แล้วตรวจสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร

(2.1.4) ความสามารถในการรีดิวซ์ ถูกตรวจสอบโดยวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) โดยสารละลาย FRAP ประกอบไปด้วย 0.28 mM acetate buffer pH 3.6 ปริมาตร 7 mL, สารละลาย 2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) ใน 40 mM HCl ปริมาตร 0.7 mL และสารละลาย ferric chloride hexahydrate ปริมาตร 0.7 mL ในการทำปฏิกิริยา สารละลาย FRAP ปริมาตร 180 μL จะถูกบ่มกับสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐาน ferrous sulphate ที่ความเข้มข้นต่างๆ (15, 30, 60, 120, 240, 480 μM) ปริมาตร 20 μL ใน 96-well plate เป็นเวลา 30 นาที แล้วทำการวัดความสามารถในการให้อิเล็กตรอนโดยติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 596 nm

(2.1.5) 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 ด้วยเครื่อง microplate reader spectrophotometer ทุกๆ 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 144 ชั่วโมง

* 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 จะถูกเติมลงไปในสารผสม แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที การเกิดสารเชิงซ้อนของ Fe^{2+} และ Ferrozine สามารถติดตามได้จากการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ด้วยเครื่อง VersaMax™ absorbance microplate reader โดยมี positive control คือ EDTA ความสามารถในการจับของ Fe^{2+} และเปปไทด์คำนวณได้จากสมการที่ 2

%chelating activity = [A(control)-A(peptide)/A(control)]×100.....(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 และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 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

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

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* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวก *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 จากนั้นโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว Mueller Hinton Broth (MHB) ใน 96-well plate เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (antibacterial activity assay) ในกลุ่มควบคุม แบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB จะถูกเจือจางให้มีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.1 เพื่อใช้เป็น starter จากนั้น นำ starter ปริมาตร 1 µL มาเจือจางต่อด้วย อาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ปริมาตร 99 µL แล้วบันทึกการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดความขุ่นที่ OD_{600} เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มทดลอง แบคทีเรียแต่ละสายพันธ์จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MHB ที่ผสมกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้งเพื่อยืนยันผลการทดลอง

(2.5) ความสามารถในการยับยังการเจริญของเซลล์มะเร็ง

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-glutamine และ 1% NEAA ในอาหาร เซลล์ทุกชนิดจะถูกเลี้ยงในภาวะ 5% (v/v) CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งนั้นจะตรวจวัดโดยวิธี MTT โดยกำหนดปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ใช้ทดสอบต่อตัวอย่างคือ 4×10^3 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ 200 μL ใน 96-well plate และทำการบ่มในภาวะ 37 องศาเซลเซียส 5% (v/v) CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะผสมกับส่วนสกัดจากกากน้ำปลา และบ่มที่สภาวะ 5% (v/v) CO_2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การยับยั้งเซลล์มะเร็งจะถูกตรวจสอบโดยเติมสารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 mg/mL ปริมาตร 50 μL และบ่มต่ออีก 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลาย MTT ให้กลายเป็น formazan crystals (ผลึกสีม่วง) ซึ่งจะถูกละลายด้วย 100% DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตรด้วยเครื่อง microplate reader และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ (cell survival) จากสมการที่ 4

$$\%\ \text{การอยู่รอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จากเซลล์ที่ได้รับสารตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ของเซลล์ควบคุม}} \times 100 \quad \text{.....(สมการที่ 4)}$$

(3) การแยกส่วนและทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ

ส่วนสกัดจากกากน้ำปลาที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากการทดลองในข้อ 2 จะถูกนำมาแยกส่วนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วย membrane filtration (GE Healthcare, NJ, USA) โดยใช้ molecular weight cut-off filter สำหรับน้ำหนักโมเลกุล 3 kDa และ 10 kDa (GE Healthcare, NJ, USA) ในขั้นแรก membrane filter ขนาด 10 kDa cut-off ถูกนำมา equilibrate ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 400 μL แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 xg เป็นเวลา 20 นาที จากนั้น เติมตัวอย่างกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพปริมาตร 400 μL ลงใน filter แล้วทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14000 xg เป็นเวลา 20 นาที ส่วน retentate ถูกเก็บเป็นแฟรกชันที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 10 kDa สำหรับ filtrate จะถูกนำไปแยกส่วนต่อด้วย molecular weight cut-off filter ขนาด 3 kDa ด้วยวิธีเดียวกัน ส่วน retentate ของขั้นตอนนี้ถูกเก็บเป็นแฟรกชันที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 3 kDa แต่น้อยกว่า 10 kDa และส่วน filtrate ถูกเก็บเป็นแฟรกชันที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa จากนั้นกากน้ำปลาทั้ง 3 แฟรกชันถูกนำมาปรับปริมาตรให้เท่ากันเพื่อตรวจวัดความเข้มข้นของโปรตีนและทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

หลังจากนั้น ส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกแยกด้วย macro spin column ที่มี stationary phase เป็น C18, C8 และ C4 (Harvard Apparatus, MA, USA) เพื่อแบ่งกลุ่มเปปไทด์ที่มีความไฮโดรโฟบิกที่ต่างกัน โดยตัวอย่างกากน้ำปลาจะถูกเติม formic acid ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1%(v/v) macro spin column ถูก equilibrate ด้วย 0.1% formic acid ปริมาตร 500 μL เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 xg เป็นเวลา 4 นาที จากนั้น ตัวอย่างกากน้ำปลาปริมาตร 200 μL ถูกเติมลงบน macro spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 xg เป็นเวลา 4 นาที โมเลกุลที่สามารถจับกับ C18 ได้จะถูกชะด้วย elution buffer (70% acetonitrile/ 0.1% formic acid) ปริมาตร 100 μL จำนวน 2 ครั้ง ส่วนที่เป็น flow through ของคอลัมน์ C18 จะถูกนำไปใช้เป็นตัวอย่างสำหรับคอลัมน์ที่บรรจุ C8 และ C4 ตามลำดับ แต่ละแฟรกชันที่ได้จาก macro spin column จะถูกนำไประเหยแห้ง แล้วละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 μL เพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีน และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพอีกครั้งหนึ่ง

ต่อจากนั้น ส่วนที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจะถูกแยกด้วย reverse-phase chromatography โดยใช้ (Zorbax C18 column, Agilent Technologies) ต่อกับ Waters™ 600 HPLC และ Waters Dual λ absorbance detector (Waters Corporation) และแต่ละ fraction จะถูกทดสอบฤทธิ์ ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโน (Sheih *et al,* 2009)

(4) การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย tandem mass spectrometry

เปปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จะถูกนำมาวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค HPLC-MS/MS สารละลายตัวอย่างจะถูกแยกโดย C18 reverse phase nanocolumn (PepSwift monolithic column, 100 μm x 50 mm) ที่ต่อกับ HPLC (Ultimate 3000 LC system, Dionex Ltd, Altrincham, UK) ตัวอย่างจะถูกแยกโดยใช้ linear gradient เป็นเวลาทั้งหมด 20 นาที จาก 10% solvent B (80% acetronitrile/ 19.9% H_2O/ 0.1% formic acid) ถึง 70% solvent B และล้างคอลัมน์ด้วย 90% solvent B โดย solvent A ที่ใช้คือ 0.1% formic acid เปปไทด์ที่ผ่านการแยกด้วย HPLC จะถูกส่งไปวิเคราะห์มวลและลำดับกรดอะมิโนด้วย HCTultra PTM Discovery System (Bruker Daltonics Ltd, Hamburg, Germany) โดยผ่านการทำให้เกิดไอออนด้วย electrospray ionization วิธีการวิเคราะห์มวลที่ใช้คือ data-dependent acquisition โดย precursor ion ที่มีปริมาณสูงที่สุด 5 ลำดับแรกจะถูกส่งไปทำ fragmentation ด้วย collision-induced dissociation เพื่อที่จะตรวจวัดค่ามวลของ product ion สำหรับระบุลำดับกรดอะมิโน โดยค่า mass range ของ precursor ion ถูกกำหนดไว้ที่ 50-3000 m/z

ข้อมูลที่ได้จะถูกแปรผลโดยใช้เครื่องมือทาง Bioinformatics โดยวิเคราะห์ tandem mass spectra ด้วย database search engine เช่น MASCOT (Perkins *et al*, 1999) เพื่อระบุลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์โดยเปรียบเทียบข้อมูลจากการทดลองกับในฐานข้อมูลโปรตีน โดยเลือกใช้ non-enzymatic search เนื่องจากมีเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนในกากน้ำปลาจึงไม่สามารถระบุ

specificity ของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ tandem mass spectra ที่ได้จะถูกแปรผลด้วย De Novo sequencing (PEAKS, ON, Canada) และ manual interpretation ควบคู่ไปด้วย เพื่อเป็นการครอบคลุมการวิเคราะห์ผลการทดลองหากโปรตีนนั้นไม่มีอยู่ในฐานข้อมูล ทั้งนี้ฐานข้อมูลโปรตีนที่ใช้ในการแปรผล ได้แก่ UniProt KnowledgeBase (www.uniprot.org) การระบุชนิดของเปปไทด์จะใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ โดยค่าทางสถิติที่พิจารณา ได้แก่ MASCOT score, E-value และ false discovery rate (Choi and Nesvizhskii, 2008)

(5) การสังเคราะห์เปปไทด์บริสุทธิ์และการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์

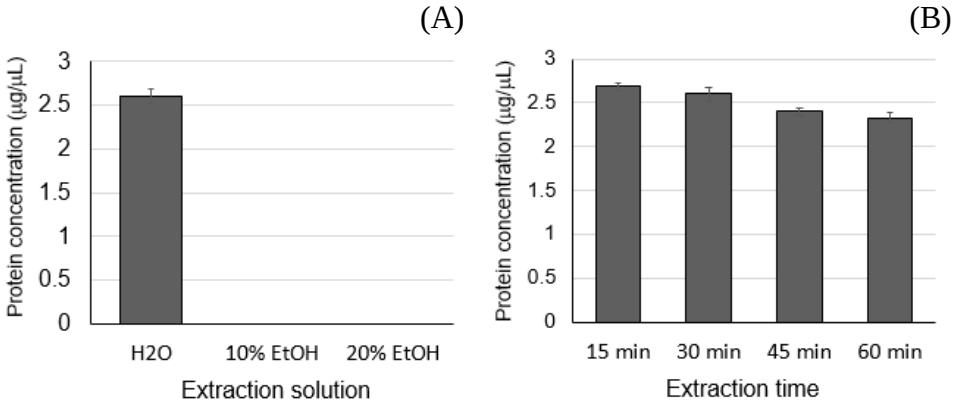
เปปไทด์บริสุทธิ์ถูกสังเคราะห์จากบริษัท ChinaPeptides Co., Ltd (China) โดยใช้วิธี solid phase peptide synthesis (Merrifield, 1963) และตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย HPLC และ mass spectrometry เปปไทด์ที่สังเคราะห์ได้ถูกนำมาละลายน้ำที่ความเข้มข้น 1 mg/mL จากนั้น ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH เพื่อเปรียบเทียบกับเปปไทด์ผสมก่อนการทำบริสุทธิ์ และทดสอบเสถียรภาพของฤทธิ์ทางชีวภาพที่ช่วงความเข้มข้นของเกลือ NaCl ตั้งแต่ 0 M – 1 M โดยใช้วิธีทดลองที่ระบุในข้อ 2.1

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

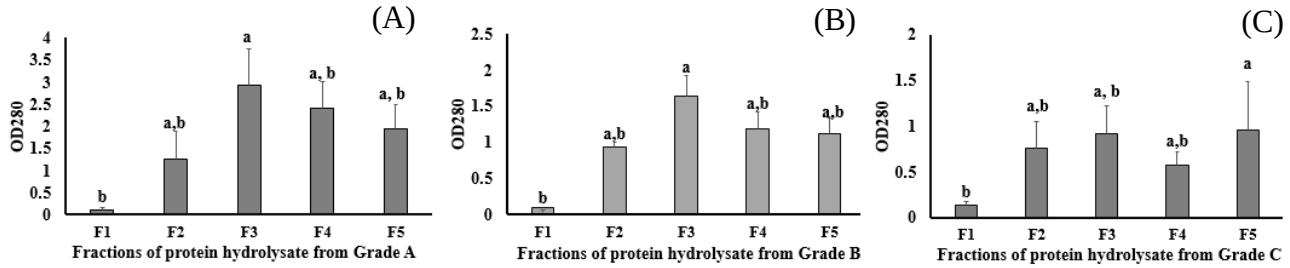


รูปที่ 2 ความเข้มข้นของโปรตีนที่สกัดได้จากกากน้ำปลาที่สภาวะต่างๆ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดระหว่าง **(A)** สารละลายที่ใช้ในการสกัดโปรตีน **(B)** เวลาที่ใช้ในการสกัดโปรตีน

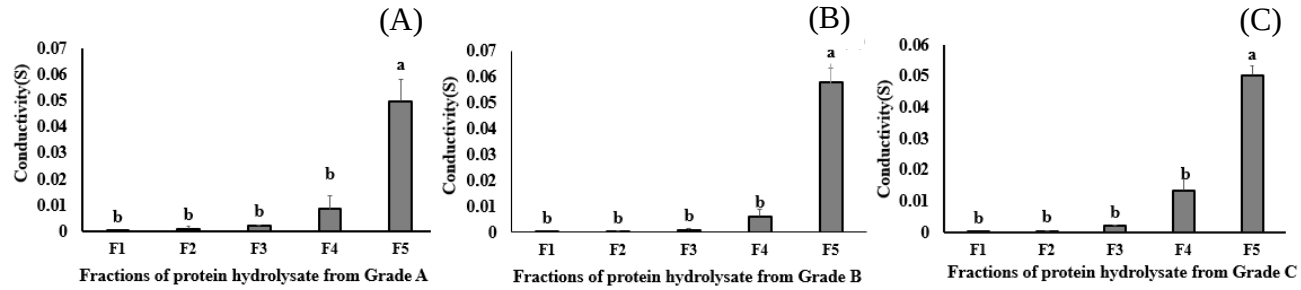
(1.2) ผลการศึกษาวิธีที่เหมาะสมสำหรับแยกเกลือจากส่วนสกัดกากน้ำปลา

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 ในการศึกษา

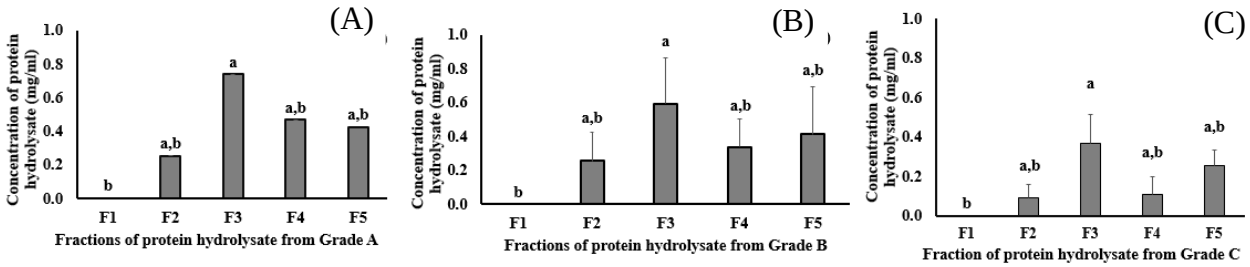
ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไปเนื่องจากมีปริมาณโปรตีนสูงและมีปริมาณไอออนต่ำ นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยได้ตรวจวัดปริมาณโปรตีน/เปปไทด์ในตัวอย่างกากน้ำปลาด้วย Lowry's protein assay เพื่อยืนยันผลการทดลองจากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 มีความเข้มข้นของโปรตีนสูงสุดที่ fraction 3 **(รูปที่ 5 (A-C))** เมื่อทำการรวม fraction ที่มีปริมาณโปรตีนสูงและมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ (F2-F4) ของกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพพบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ **(รูปที่ 6)**



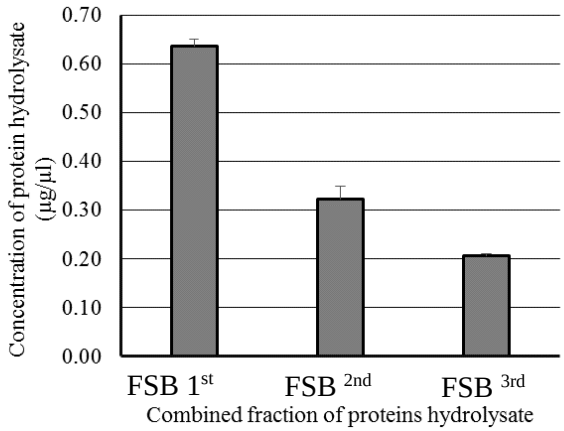
รูปที่ 3 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



รูปที่ 4 ค่าการนำไฟฟ้า ของ fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



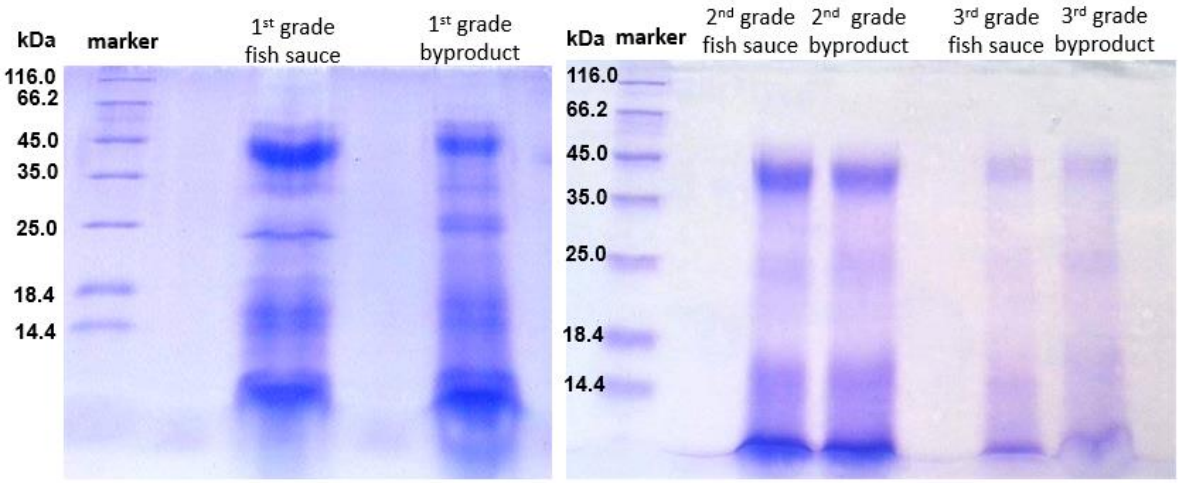
รูปที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีนใน fraction ที่ได้จากการแยกกากน้ำปลา **(A)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 1 **(B)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ **(C)** ระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ด้วย gel-filtration chromatography



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 (สุศนีย์ พิพัฒนานุกูล, 2558)



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

(2) องค์ประกอบของกากน้ำปลา

กากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพถูกตรวจวัดองค์ประกอบโดยน้ำหนัก ด้วยวิธีมาตรฐานของ American Organization of Analytical Chemists International (AOAC International, 1997) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเถ้า (ash) ซึ่งคิดเป็น 59.59% – 58.96% ขององค์ประกอบทั้งหมด รองลงมาเป็น ความชื้น (moisture) โปรตีน (protein) คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ไขมัน (fat) และไฟเบอร์ (fiber) ตามลำดับ **(ตารางที่ 2)** องค์ประกอบส่วนที่เป็นเถ้าน่าจะเป็นผลมาจากกระดูกของปลา และเกลือที่ใช้ในกระบวนการผลิต เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธีของ Kjeldahl พบว่าอยู่ในช่วง 5.44% – 8.52% โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด รองลงมาเป็นระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองไม่สอดคล้องกับการวิเคราะห์ด้วย Lowry's protein assay เนื่องจากวิธีของ Kjeldahl เป็นการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen content) ในขณะที่ Lowry's protein assay มีความจำเพาะต่อการตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่มีพันธะเปปไทด์ตั้งแต่ 4 พันธะขึ้นไป

ตารางที่ 2 องค์ประกอบ (proximate composition) ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3

FSB grades	Ashes (%)	Moisture Content (%)	Crude fiber (%)	Carbohydrate content (%)	Protein content (%)	Fat content (%)
1st	59.59 ± 0.36	26.76 ± 0.69	0.006 ± 0.00	5.67 ± 0.95	7.81 ± 0.13	0.17 ± 0.00
2nd	68.96 ± 0.99	19.45 ± 0.54	0.014 ± 0.00	5.99 ± 1.14	5.44 ± 0.33	0.16 ± 0.01
3rd	62.33 ± 0.66	25.16 ± 0.81	0.222 ± 0.00	3.75 ± 0.20	8.52 ± 0.25	0.24 ± 0.01

(3) ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ

(3.1) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

คณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ โดยตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH, อนุมูล hydroxyl และอนุมูล ABTS, ทดสอบความสามารถในการรีดิวซ์สารละลาย Fe^{3+} และความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation เพื่อวิเคราะห์คุณสมบัติในการให้ไฮโดรเจนและให้อิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระ รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชัน พบว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH **(รูปที่ 8)** โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้สูงที่สุดใน fraction ที่ 4 (%inhibition = 91.03 ± 7.90 %) ซึ่งมีความสามารถเทียบเท่ากับ ascorbic acid ที่ความ

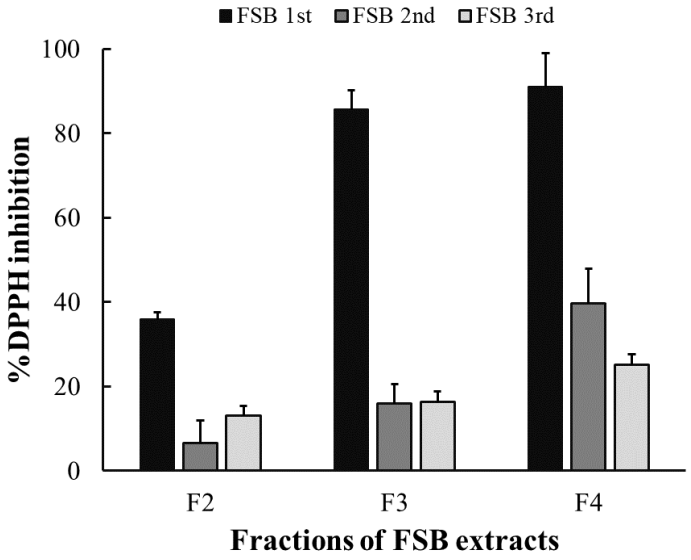
เข้มข้น 27.27 μg/mL ซึ่งใช้เป็น positive control ส่วนกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ได้น้อยกว่า 50%

สำหรับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ได้ดีกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ โดยมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl สูงสุด 82.42 ± 2.58% ใน fraction ที่ F4 ส่วนกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ใน fraction ที่ F3 สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ 69.83 ± 12.17% และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ในทุก fraction มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ได้น้อยกว่า 50% **(รูปที่ 9)**

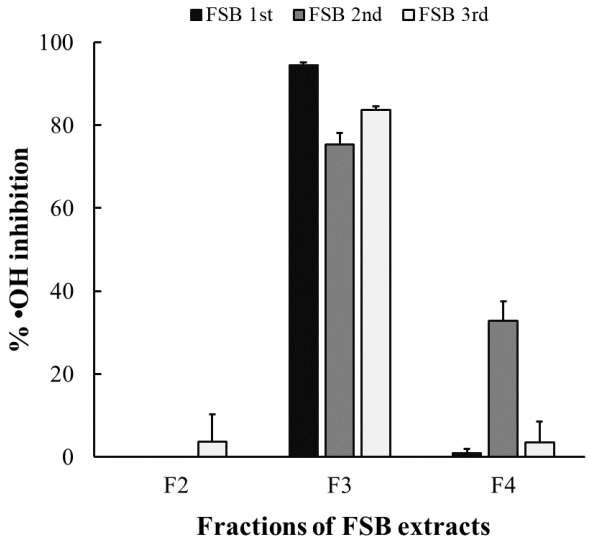
ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีค่าสูงที่สุดใน fraction ที่ F2 ส่วนกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 fraction ที่ F4 สามารถยับยั้งอนุมูล ABTS ได้มากกว่า F2 และ F3 อย่างไรก็ตาม ในทุก fraction พบว่าค่า %inhibition มีค่าต่ำ โดยอยู่ระหว่าง 2-9% แสดงถึงประสิทธิภาพที่ไม่ดีในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS **(รูปที่ 10)**

ความสามารถในการรีดิวซ์สารละลาย FRAP ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีค่าสูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และ 3 โดยพบค่าสูงสุดอยู่ที่ fraction F3 ซึ่งคิดเป็นความสามารถในการรีดิวซ์เทียบเท่ากับสารละลาย FeSO4 เข้มข้น 54.34 ± 0.93 mM **(รูปที่ 11)**

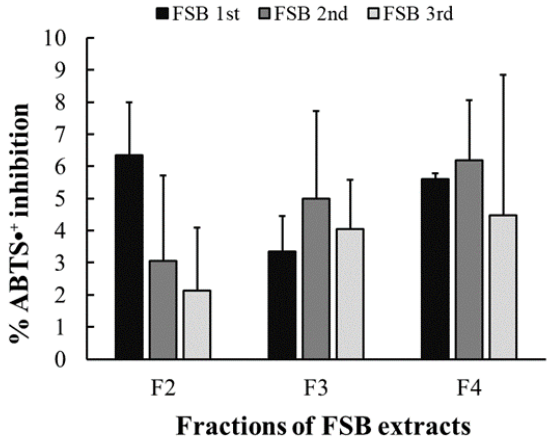
สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation นั้น ไม่พบ fraction ของกากน้ำปลาที่สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ โดยทำการติดตามปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดไขมันทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 12 วัน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปริมาณการเกิด peroxide ของตัวอย่างกรดไขมันที่มีกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพผสมอยู่ด้วยไม่แตกต่างจากในชุดควบคุม **(รูปที่ 12)** (นภัสวรรณ ปัญญา (2559) และเพชรลดา โฆษิตานนท์ (2558))



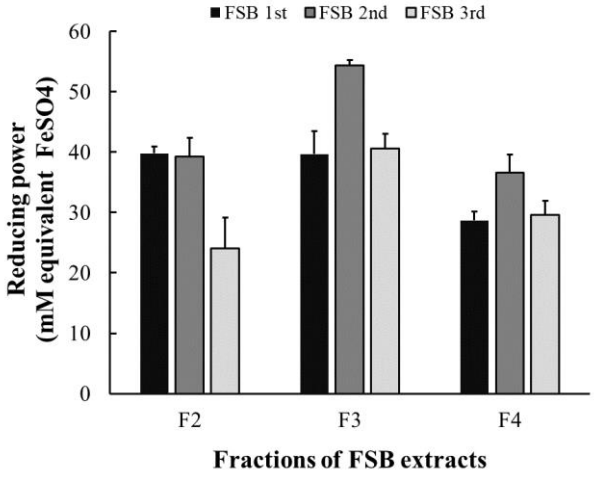
รูปที่ 8 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4



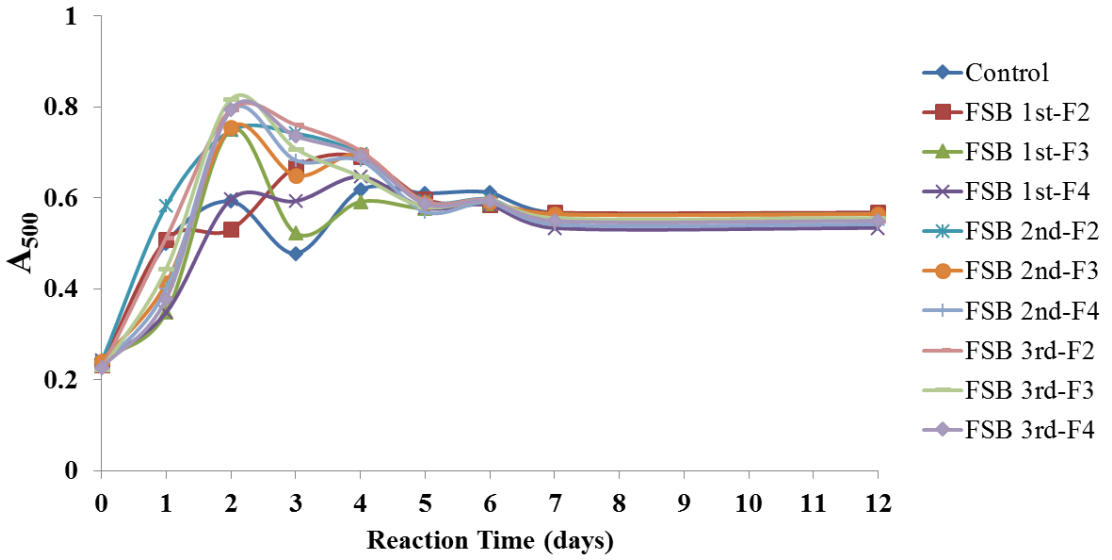
รูปที่ 9 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล hydroxyl ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4



รูปที่ 10 ความสามารถในการกำจัดอนุมูล ABTS ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4

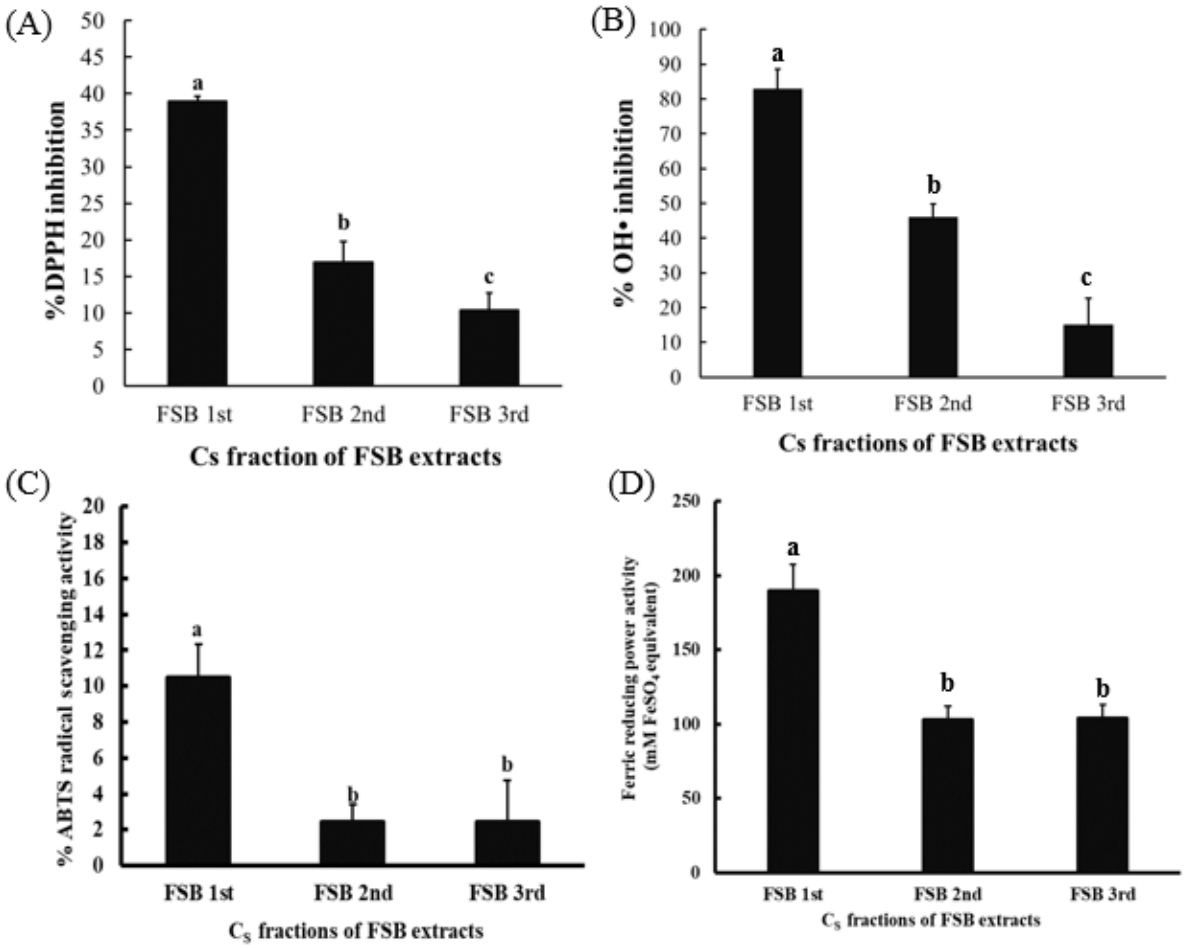


รูปที่ 11 ความสามารถในการรีดิวซ์ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4



รูปที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ แสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลามีคุณสมบัติในการต้านอนุมูล DPPH ยับยังการเกิดอนุมูล hydroxyl และมีความสามารถในการรีดิวซ์ แต่มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS ที่ไม่ดี และไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด นอกจากนี้ กลุ่มผู้วิจัยพบว่าการแยก fraction ของกากน้ำปลาด้วย Sephadex G-15 ที่มีการใช้ซ้ำในหลายการทดลองส่งผลให้ค่า standard deviation ของข้อมูลมีค่าสูง กลุ่มผู้วิจัยจึงทำการทดลองต่อโดยการรวม fraction ที่ F2 F3 และ F4 ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพเข้าด้วยกัน เนื่องจากเป็น fraction ที่มีปริมาณโปรตีนที่ตรวจวัดได้ และมีปริมาณเกลือต่ำ **(รูปที่ 3, รูปที่ 4 และ รูปที่ 5)** ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแสดงดัง**รูปที่ 6** และผลการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระแสดงดัง **รูปที่ 13** แนวโน้มของผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนมีค่าสูงขึ้นด้วย โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของโปรตีนที่สูงกว่าด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงศึกษาค่าความเข้มข้นของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพที่ทำให้แอคทิวิตี้ลดลงครึ่งหนึ่ง (ค่า IC_{50}) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูล DPPH ที่สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 และ 2 ตามลำดับ **(ตารางที่ 3)** และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ฤทธิ์ในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ที่สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 และ 1 ตามลำดับ **(ตารางที่ 4)** สำหรับการยับยั้งอนุมูล ABTS ค่า IC_{50} มีค่าสูงถึง 3.03 - 3.37 mg/mL ซึ่งแสดงให้เห็นประสิทธิภาพที่ไม่ดีในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS **(ตารางที่ 5)** (นภัสวรรณ ปัญญา, 2559; เพชรลดา โฆษิตานนท์, 2558)



รูปที่ 13 ความสามารถของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพในการต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และ **(D)** ความสามรถในการรีดิวซ์

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± 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 4 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

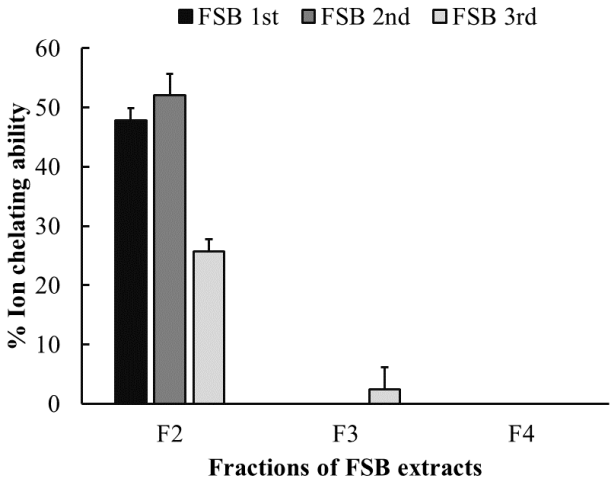
ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	IC_{50} (mg/mL)
1	0.78 ± 0.07
2	0.36 ± 0.01
3	0.75 ± 0.06

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งอนุมูล ABTS ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

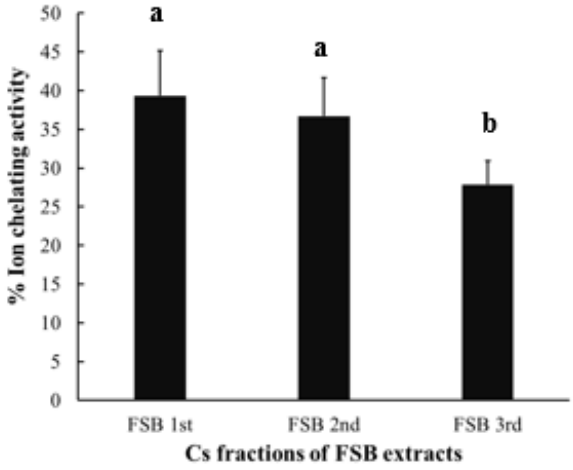
ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	IC_{50} (mg/mL)
1	3.37± 0.24
2	3.03± 0.24
3	3.34± 0.30

(3.2) ความสามารถในการจับตัวกับไอออนของโลหะ

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการแย่งจับกับไอออน Fe^{2+} ของกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ พบว่า 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 14)** เมื่อทำการรวม fraction ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และ 2 มีความสามารถในการแย่งจับกับไอออนโลหะที่สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 39.36 ± 5.85 และ 36.72 ± 4.96% **(รูปที่ 15)** และจากการทดลองหาค่าความเข้มข้นของโปรตีน/เปปไทด์ที่สามารถจับกับไอออนของโลหะได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีค่า EC_{50} ที่ดีที่สุด เท่ากับ 1.00 ± 0.12 mg/mL **(ตารางที่ 6)** (นภัสวรรณ ปัญญา (2559) และเพชรลดา โฆษิตานนท์ (2558))



รูปที่ 14 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4



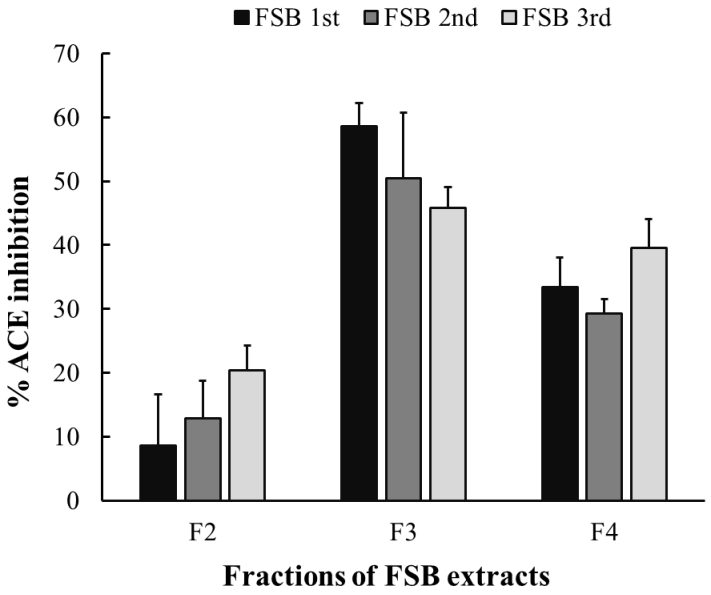
รูปที่ 15 ความสามารถในการจับกับไอออนโลหะของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 หลังจากรวม fraction ที่ F2 F3 และ F4

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถจับกับไอออนโลหะได้ร้อยละ 50 (EC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

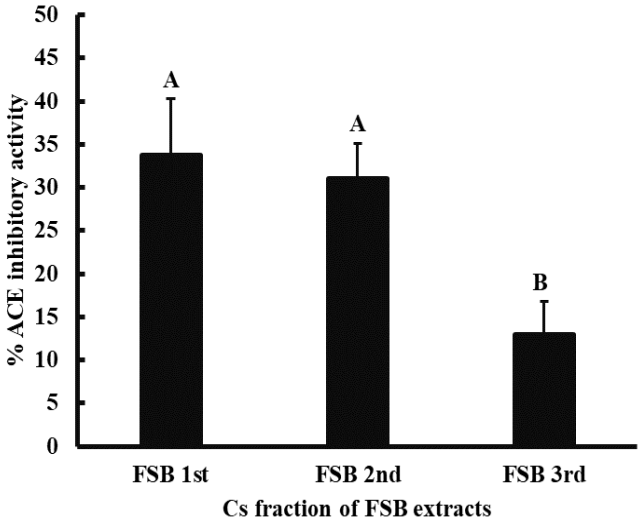
ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลา	EC_{50} (mg/mL)
1	> 2.00
2	1.00 ± 0.12
3	> 2.00
EDTA	$< 1.86 \times 10^{-4}$

(3.3) การยับยั้งการทำงานของ Angiotensin-converting enzyme (ACE)

ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ถูกตรวจสอบโดยการติดตามผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์นี้ เมื่อใช้สารตั้งต้นเป็น Hippuryl-L-histidyl-L-leucine โดยสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นคือ hippuric acid ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 228 nm ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 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 16)** และเมื่อนำ fraction ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพมารวมกันเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ **(ตารางที่ 7)** ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่า %inhibition ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ดังแสดงใน**รูปที่ 17**



รูปที่ 16 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 จาก fractionที่ F2 F3 และ F4



รูปที่ 17 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1, 2 และ 3 หลังจากรวม fraction ที่ F2 F3 และ F4

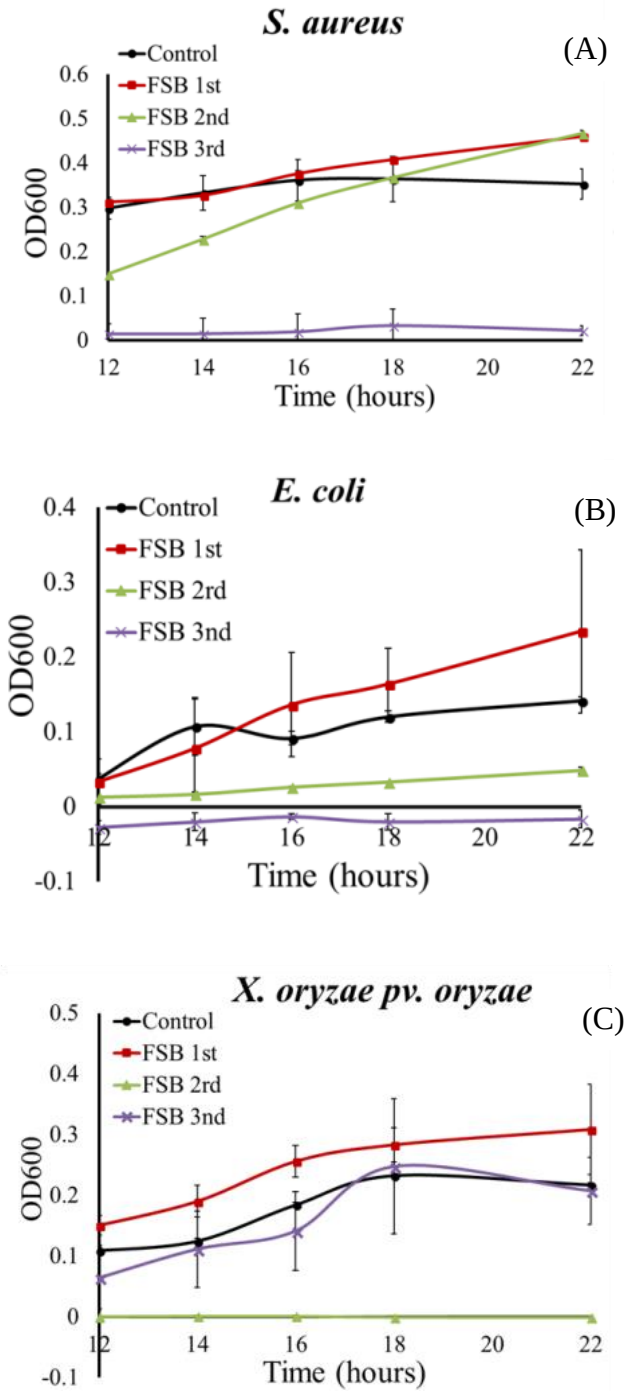
ตารางที่ 7 ความเข้มข้นของโปรตีน/ เปปไทด์ ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) ข้อมูลที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

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

(3.4) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

ฤทธิ์ทางชีวภาพของกากน้ำปลาในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพถูกตรวจสอบด้วยแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคผิวหนังในคน, *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคระบบทางเดินอาหารในคน, และ *X. oryzae pv. oryzae* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรคขอบใบแห้งในข้าว โดยผู้วิจัยทำการติดตามการเจริญของแบคทีเรียทั้งสามชนิดด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพที่ความเข้มข้น 2 mg/mL เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีกากน้ำปลาซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* ได้ดีกว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 1 ตามลำดับ **(รูปที่ 18 (a) และรูปที่ 18 (b))** ในขณะที่กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *X. oryzae pv. oryzae* ได้สูงที่สุด **(รูปที่ 18 (c))** รวมทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ดี ในทางตรงกันข้าม กากน้ำปลาระดับชั้น

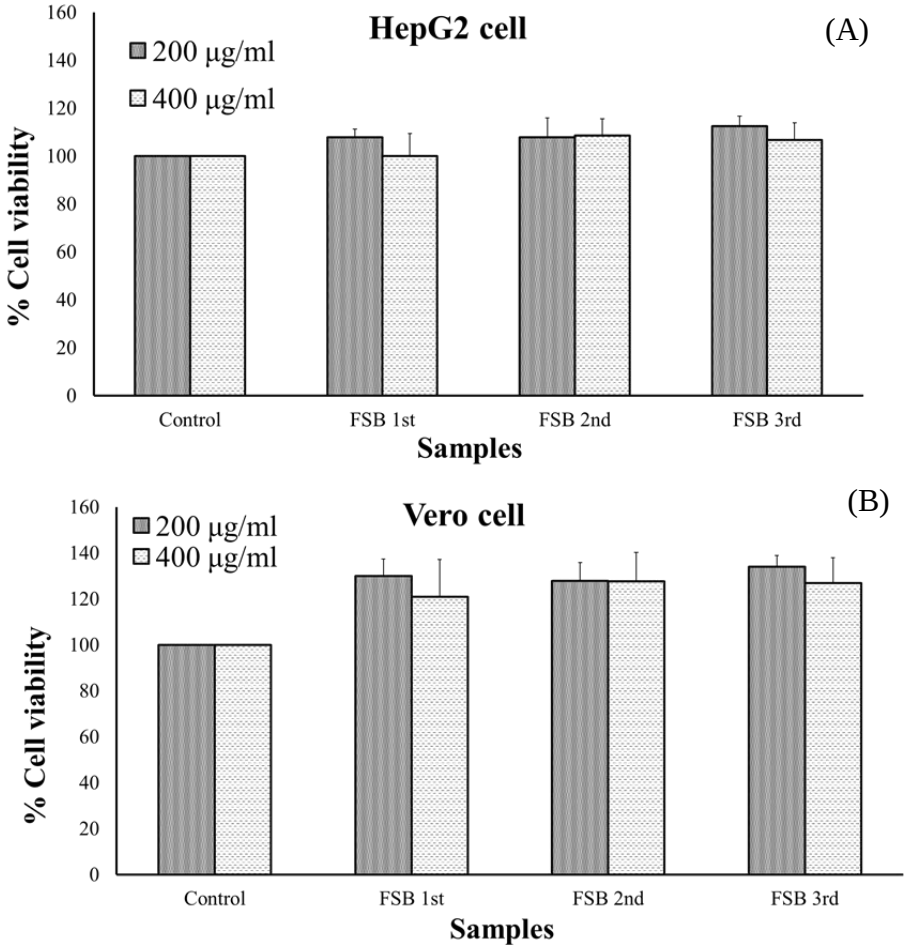
คุณภาพที่ 1 ไม่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแต่สามารถกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดได้ ทั้งนี้ ผู้วิจัยไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ความเข้มข้น 0.5 mg/mL และ 1 mg/mL (Khositanon *et al*., 2018)



รูปที่ 18 ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย **(A)** *S. aureus*, **(B)** *E. coli* และ **(C)** *X. oryzae pv. oryzae* ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 2 mg/mL (Khositanon *et al*., 2018)

(3.5) ความสามารถในการยับยังการเจริญของเซลล์มะเร็ง

ความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งของกากน้ำปลาถูกตรวจสอบด้วยวิธี MTT assay เพื่อทำการวิเคราะห์การเจริญ (cell proliferation) ของเซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell line) ที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ ที่ความเข้มข้น 200 μg/mL และ 400 μg/mL เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งตับ HepG2 แต่สามารถเร่งการเจริญของเซลล์ได้เล็กน้อย โดยมีค่า %viability อยู่ระหว่าง 106.81 ± 7.07% และ 112.51 ± 4.27% **(รูปที่ 19 (A))** เมื่อพิจารณาการเจริญของเซลล์ปกติ (Vero cell line) ที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม พบว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพสามารถเร่งการเจริญของเซลล์ที่ไม่ใช่เซลล์มะเร็งได้ดี **(รูปที่ 19 (B))** โดยมีค่า %viability อยู่ระหว่าง 120.97 ± 16.28% และ 134.06 ± 4.92%



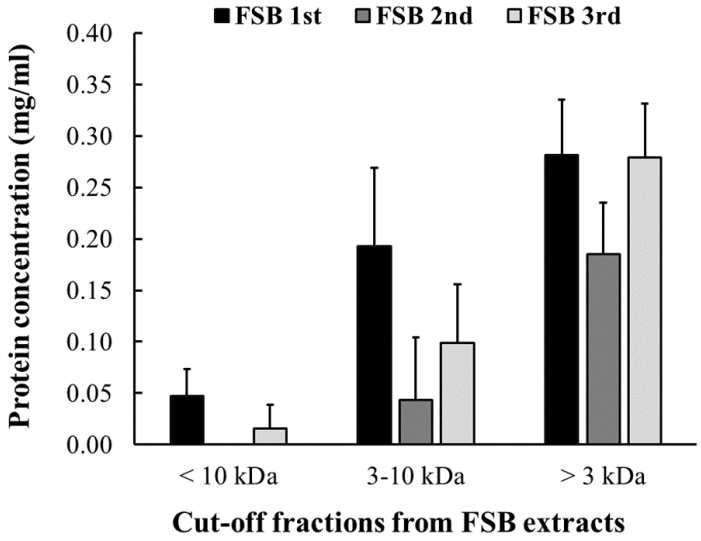
รูปที่ 19 ผลของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ที่ความเข้มข้น 200 μg/mL และ 400 μg/mL ต่อการเจริญของ **(A)** เซลล์มะเร็งตับ HepG2 cell line และ **(B)** เซลล์ปกติ Vero cell line (Khositanon *et al*., 2018)

(4) ผลการแยกแฟรกชันของเปปไทด์ตามขนาดโมเลกุล และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแฟรกชัน

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารกัดกากน้ำปลา พบว่ากากน้ำปลามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme (ACE) ที่ดี ผู้วิจัยจึงศึกษาวิธีแยกกลุ่มของเปปไทด์เพื่อแบ่งส่วนเปปไทด์ตามขนาดโมเลกุล โดยใช้ molecular weight cut off filter ที่สามารถแบ่งเปปไทด์เป็นสามกลุ่ม คือ กลุ่มที่มีขนาดมากกว่า 10 kDa, ขนาดระหว่าง 3-10 kDa และขนาดเล็กกว่า 3 KDa เพื่อทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ ACE ของแฟรกชันย่อย และนำไปสู่การทำบริสุทธิ์เปปไทด์ต่อไป

(4.1) ความเข้มข้นของโปรตีน

จากการวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ พบว่าโปรตีนหรือเปปไทด์ส่วนใหญ่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3 kDa กลุ่มที่มีความเข้มข้นของโปรตีนรองลงมาคือขนาดโมเลกุลระหว่าง 3-10 kDa กลุ่มโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 10 kDa มีความเข้มข้นน้อยที่สุด **(รูปที่ 20)** เมื่อพิจารณาในแต่ละช่วงโมเลกุล พบว่า กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นของโปรตีน/เปปไทด์ สูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 3 และ 2 ตามลำดับ

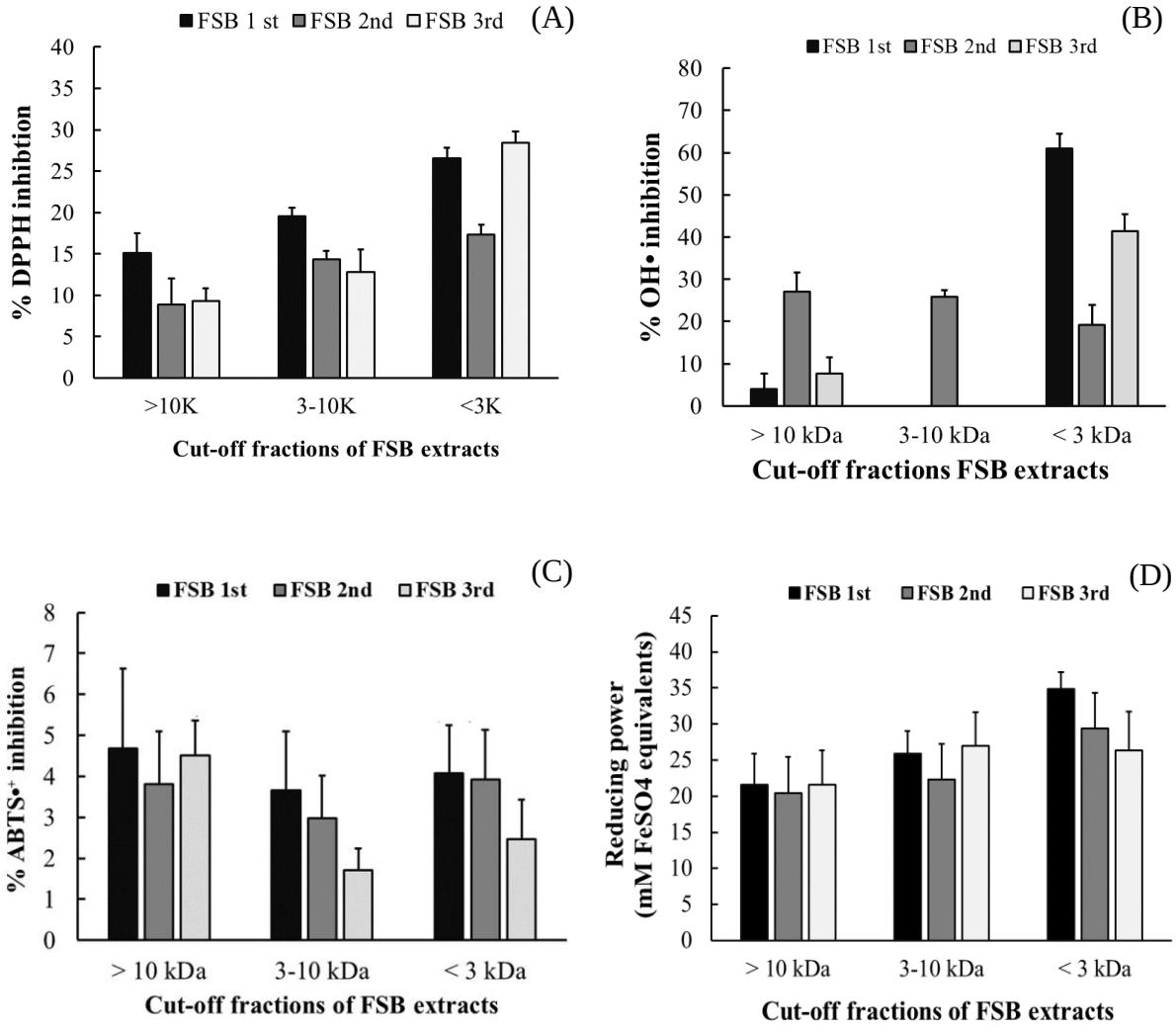


รูปที่ 20 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) เมื่อผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter

(4.2) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

คุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์แต่ละช่วงขนาดโมเลกุลของทั้งสามระดับชั้นคุณภาพถูกตรวจสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay, ABTS

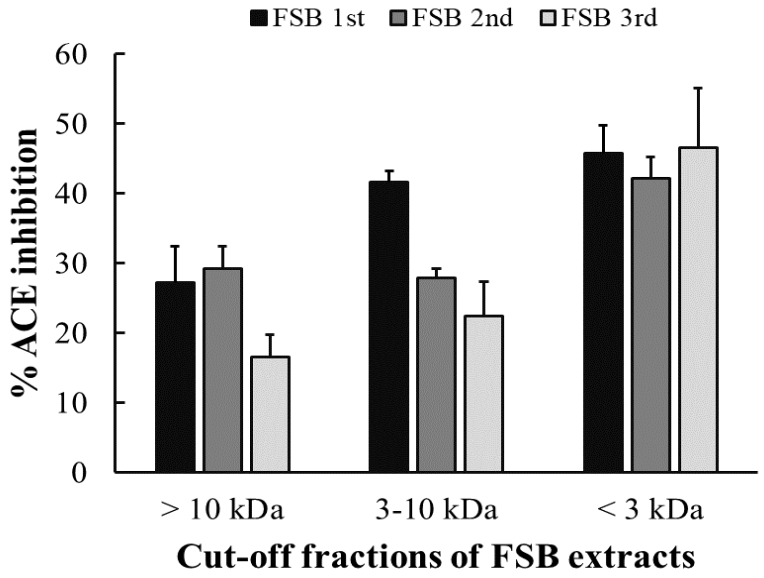
radical scavenging assay และ FRAP assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ขนาดโมเลกุลมีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูล DPPH, hydroxyl และความสามารถในการรีดิวซ์ FRAP แต่ไม่มีผลต่อฤทธิ์ต้านอนุมูล ABTS **(รูปที่ 21(A), รูปที่ 21(B), รูปที่ 21(C) และ รูปที่ 21(D)** โดยเมื่อพิจารณากลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3kDa พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด (28.44 $\pm$ 1.36%) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ได้ดีที่สุด (60.92 $\pm$ 3.56%) และยังสามารถรีดิวซ์ FRAP ได้สูงที่สุดอีกด้วย โดยมีค่าเทียบเท่ากับ $FeSO_4$ เข้มข้น 34.87 $\pm$ 2.33 mM นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับคุณภาพที่ทุกช่วงโมเลกุล ไม่มีคุณสมบัติในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS (นภัสวรรณ ปัญญา, 2559; เพชรลดา โฆษิตานนท์, 2558)



รูปที่ 21 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter จากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS และ **(D)** ความสามรถในการรีดิวซ์

(4.3) ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE พบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3 kDa สามารถยับยั้งแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์/โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 3-10 kDa และขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 10 kDa ตามลำดับ โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีค่า % inhibition สูงที่สุดอยู่ที่ 46.61 ± 8.45% รองลงมาเป็นกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 และระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ตามลำดับ **(รูปที่ 22)**



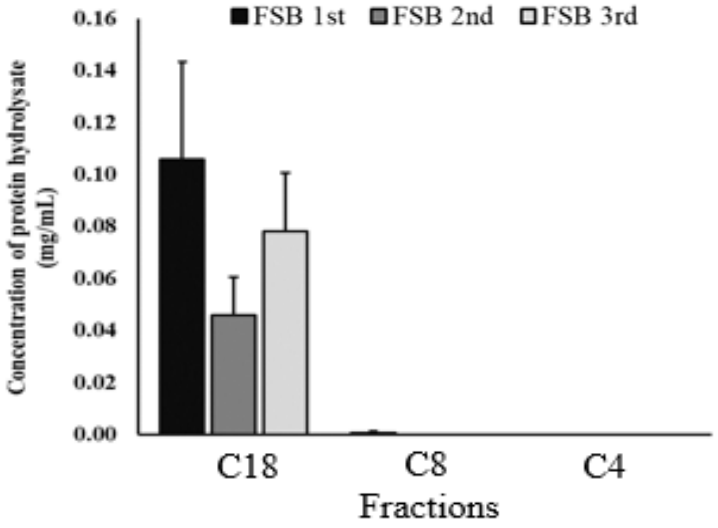
รูปที่ 22 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter

(5) ผลการแยกแฟรกชันของเปปไทด์ตามความไฮโดรโฟบิก และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของแฟรกชัน

ผลการทดลองจากการแยกเปปไทด์ตามน้ำหนักโมเลกุลแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์ขนาดเล็ก (<3 kDa) มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์/โปรตีนขนาดใหญ่ แฟรกชันที่มีแอคทิวิตี้สูงถูกนำมาแยกส่วนอีกครั้ง โดยอาศัยคุณสมบัติความไฮโดรโฟบิกของเปปไทด์ โดยอาศัย reverse phase resin ที่มีหมู่ฟังก์ชัน C4 C8 และ C18 ที่บรรจุอยู่ใน spin column เพื่อแบ่งเป็นกลุ่มที่มีความไฮโดรโฟบิกน้อย (C4 fraction) กลุ่มไฮโดรโฟบิกปานกลาง (C8 fraction) และกลุ่มไฮโดรโฟบิกมาก (C18 fraction) ก่อนที่จะทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งเอนไซม์ ACE และนำไปสู่การทำบริสุทธิ์เปปไทด์ต่อไป

(5.1) ความเข้มข้นของโปรตีน

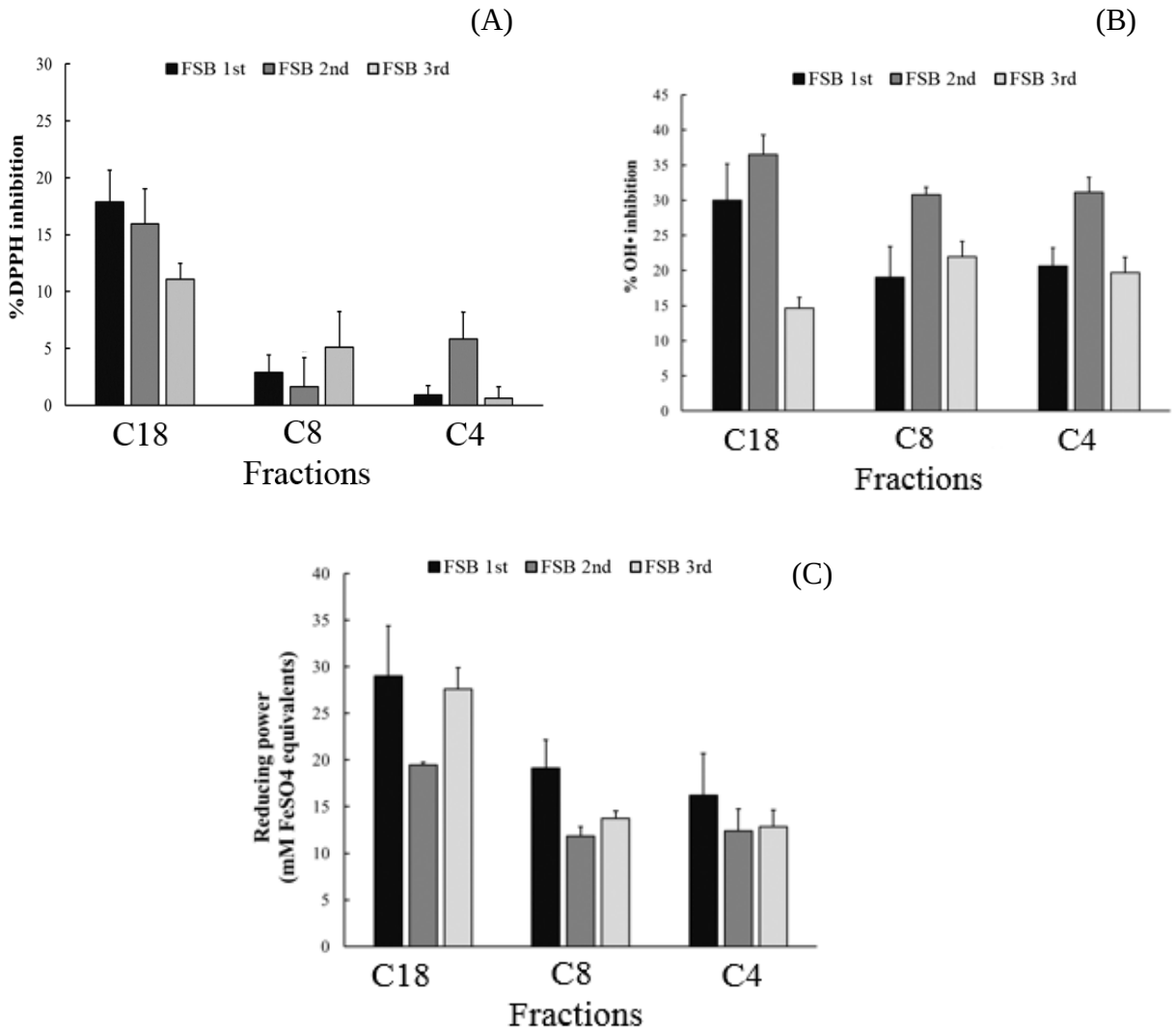
เปปไทด์/โปรตีนจากกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพในแฟรกชัน C18 resin มีความเข้มข้นสูงกว่า C8 และ C4 ตามลำดับ **(รูปที่ 23)** โดยส่วนที่สามารถจับกับ C18 ใน spin column มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงประมาณ 0.04 – 0.1 mg/mL ซึ่งมีค่าลดลงจากการแยกส่วนด้วย 3 kDa molecular weight cut off filter ประมาณ 3-4 เท่า ส่วนเปปไทด์ที่สามารถจับกับ C8 resin และ C4 resin มีปริมาณน้อยมาก โดยไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วย Lowry's protein assay



รูปที่ 23 ความเข้มข้นของโปรตีนจากกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 (FSB 1st) กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 (FSB 2nd) และกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) เมื่อผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิกด้วย reverse-phase resin (C18 C8 และ C4)

(5.2) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ

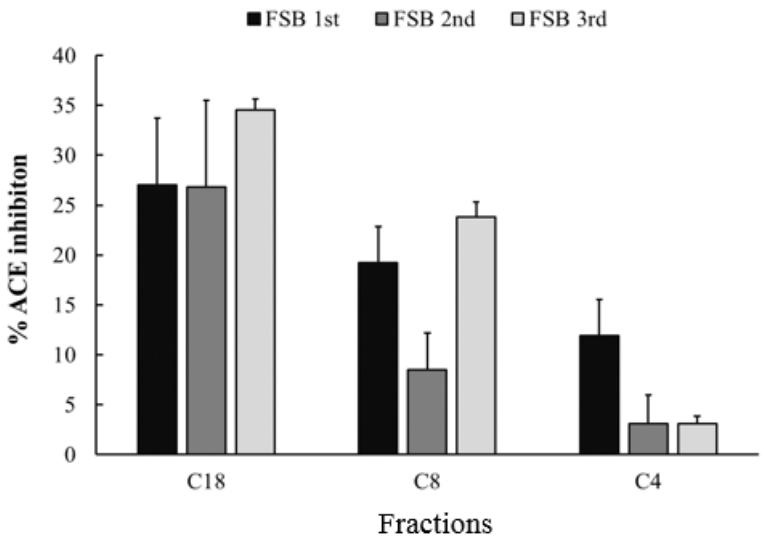
ผลจากการทดลองแยกแฟรกชันของกากน้ำปลาตามขนาดโมเลกุล แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์จากกากน้ำปลาไม่มีคุณสมบัติที่ดีในการยับยั้งอนุมูล ABTS ดังนั้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของแฟรกชันที่มีความไฮโดรโฟบิกแตกต่างกันถูกวิเคราะห์โดย DPPH radical scavenging assay, hydroxyl radical scavenging assay และ FRAP assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แฟรกชันของกากน้ำปลาที่มีความไฮโดรโฟบิกมาก (C18) จะมีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ยับยั้งอนุมูล hydroxyl และรีดิวซ์สารละลาย FRAP ได้ดีกว่าแฟรกชันที่มีความไฮโดรโฟบิกลดลง **(รูปที่ 24(A) รูปที่ 24(B) และรูปที่ 24(C))** (นภัสวรรณ ปัญญา, 2559 และ เพชรลดา โฆษิตานนท์, 2558)



รูปที่ 24 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากนำปลาแต่ละระดับชันคุณภาพหลังผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิก จากการทดสอบด้วย **(A)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH **(B)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl และ **(C)** ความสามารถในการรีดิวซ์

(5.3) ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE พบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีความไฮโดรโฟบิกสูง (C18) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีความไฮโดรโฟบิกลดลง (C8 และ C4) **(รูปที่ 25)** ซึ่งค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งแปรผันตรงกับความเข้มข้นของเปปไทด์ในแต่ละแฟรกชัน



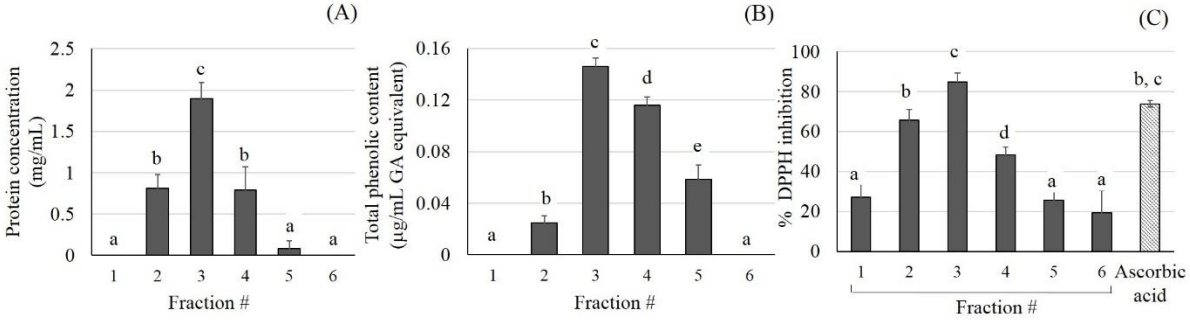
รูปที่ 25 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพหลังผ่านการแยกตามความไฮโดรโฟบิก

(6) ผลการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์บริสุทธิ์ (Choksawangkarn et al., 2018)

กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 (FSB 3rd) ถูกเลือกมาใช้ในการทำบริสุทธิ์เปปไทด์ เนื่องจากเป็นระดับชั้นคุณภาพที่ถูกทิ้งเป็นของเสียภายหลังกระบวนการผลิตน้ำปลา และไม่สามารถนำไปใช้สร้างมูลค่าในเชิงอุตสาหกรรมได้เพิ่มเติม อีกทั้งยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี กากน้ำปลาถูกนำมาแยกเกลือออกจากโปรตีน/เปปไทด์ด้วย gel filtration chromatography โดยแบ่งออกเป็น 6 แฟรกชันย่อย ผลการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนแสดงให้เห็นว่าแฟรกชันที่ 3 มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุด รองลงมาเป็นแฟรกชันที่ 2 และ 4 **(รูปที่ 26(A))** ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการตรวจสอบปริมาณโปรตีนด้วย Ninhydrin test **(ตารางที่ 8)** เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกรวมด้วยวิธี Folin-ciocaltau พบว่าแฟรกชันที่ 3 มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากที่สุด **(รูปที่ 26(B))** ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการมีอยู่ของกรดอะมิโนไทโรซีนอิสระซึ่งมี side chain เป็นหมู่ฟีนอล หรือจากการมีอยู่ของเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนไทโรซีนเป็นองค์ประกอบ **(ตารางที่ 8)** โดยกรดอะมิโนไทโรซีนอาจส่งผลให้ตัวอย่างกากน้ำปลามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ดี

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาแต่ละแฟรกชันถูกแสดงในรูปของ % DPPH inhibition โดยแฟรกชันที่ 3 แสดงความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ดีที่สุด (84.8 $\pm$ 4.3%) รองลงมาเป็นแฟรกชันที่ 2, 4, 1, 5 และ 6 ตามลำดับ **(รูปที่ 26(B))** เมื่อทำการตรวจวัดความเข้มข้นของกากน้ำปลาในแต่ละ fraction ที่สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ครึ่งหนึ่ง (IC_{50}) พบว่าแฟรกชันที่ 2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.57 $\pm$ 0.05 µg/µL ในขณะที่แฟรกชันที่ 3 มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.25 $\pm$ 0.16 µg/µL จากนั้น ตัวอย่างกากน้ำปลาในแฟรกชันที่ 2 และ 3 ถูก

นำไปย่อยด้วยเอนไซม์ ProteinaseK ความเข้มข้น 50 µg/mL ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าแฟรกชันที่ 2 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ลดลงถึง 54 % ในขณะที่แฟรกชันที่ 3 มีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ลดลง 26% แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในตัวอย่างกากน้ำปลาน่าจะมาจากเปปไทด์ เนื่องจากเมื่อผ่านการย่อยให้มีขนาดเล็กลงแล้วส่งผลให้ตัวอย่างมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วย

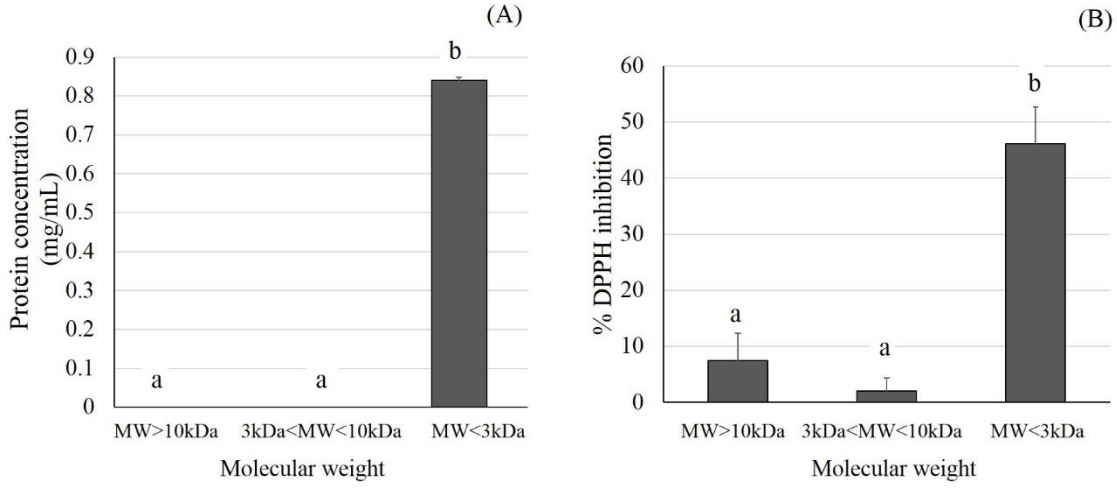


รูปที่ 26 (A) ความเข้มข้นของโปรตีน **(B)** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ในรูปของความเข้มข้นสมมูลเมื่อเทียบกับ gallic acid **(C)** ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของแต่ละแฟรกชันย่อยที่ได้จากสารสกัดกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ค่าที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง $\pm$ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยตัวอักษรกำกับบนแผนภูมิที่แตกต่างกัน (a-d) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูล ($p<0.05$) (Choksawangkarn et al., 2018)

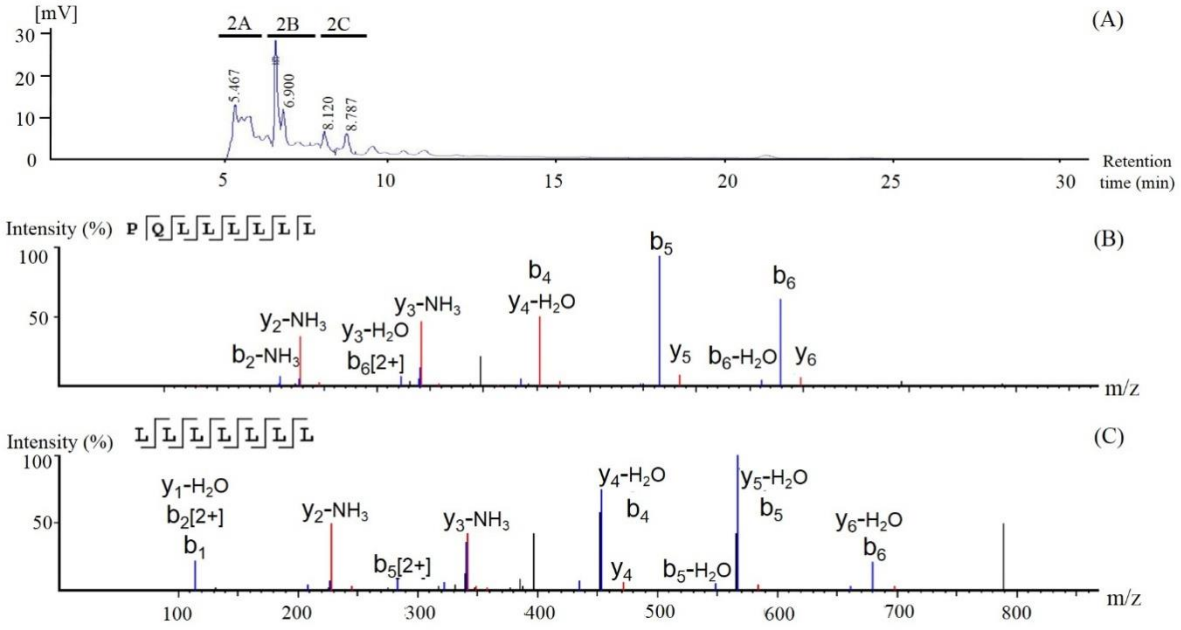
ตารางที่ 8 ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบที่มีหมู่อะมิโนด้วย Ninhydrin test และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีนอิสระด้วย paper chromatography ในแฟรกชันที่ 1-6

Fraction number	Ninhydrin test	Free tyrosine tested using paper chromatography
1	-	-
2	++	-
3	+++	+
4	+	+
5	-	+
6	-	-

หลังจากผ่านการแยกด้วย gel filtration chromatography แฟรกชันที่มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ถูกนำมาแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut-off filter เพื่อแบ่งเปปไทด์ออกเป็นกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน พบว่ากลุ่มเปปไทด์ขนาดเล็ก (<3 kDa) มีปริมาณสูงกว่ากลุ่มเปปไทด์ขนาดกลาง (3-10 kDa) และขนาดใหญ่ (>10 kDa) และยังมีความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ที่สูงที่สุดด้วย (**รูปที่ 27(A) และรูปที่ 27(B)**) ดังนั้น กลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กจึงถูกนำไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค HPLC โดยอาศัยการแยกด้วย C18 reverse phase column และตรวจวัดด้วย UV detector ที่ความยาวคลื่น 215 และ 220 นาโนเมตร โครมาโทแกรมที่ได้จากการ HPLC แสดงดัง**รูปที่ 28(A)** จะเห็นได้ว่าเปปไทด์ส่วนมากถูกชะออกมาในช่วงแรก เปปไทด์ถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามลำดับการถูกชะใน HPLC โดยแบ่งป็นแฟรกชันย่อย 2A (5.00-6.50 นาที) 2B (6.50-7.00 นาที) และ 2C (7.00-8.50 นาที) แต่ละแฟรกชันย่อย ถูกนำไปตรวจสอบค่า %DPPH inhibition และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-ESI-MS/MS ซึ่งอาศัยโปรแกรม PEAKS (Zhang et al., 2012) สำหรับแปลผล mass spectrum ด้วยวิธี *De Novo* sequencing เปปไทด์ที่อยู่ในแฟรกชัน 2A มีลำดับกรดอะมิโน PQLLLLLL (**รูปที่ 28(B) และตารางที่ 9)** และแฟรกชันย่อย 2A ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH 59.05 ± 2.42% ส่วนเปปไทด์จากแฟรกชัน 2B มีลำดับกรดอะมิโน LLLLLL (**รูปที่ 28(C) และตารางที่ 9)** และแฟรกชันย่อย 2B ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH 63.39 ± 4.99% สำหรับในแฟรกชัน 2C พบค่าการยับยั้งอนุมูล DPPH สูงถึง 68.43 ± 1.44% แต่ไม่สามารถระบุลำดับกรดอะมิโนได้ อาจเนื่องมาจากมีปริมาณที่น้อยเกินไปที่จะสามารถตรวจวัดได้ด้วย LC-MS/MS



รูปที่ 27 (A) ช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนในแฟรกชันที่ 2 **(B)** ความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ของกลุ่มโปรตีนช่วงน้ำหนักโมเลกุลต่างๆ ตัวอักษรกำกับบนแผนภูมิที่แตกต่างกัน (a-b) แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของข้อมูล ($p<0.05$) (Choksawangkarn et al., 2018)



รูปที่ 28 (A) โครมาโทแกรมจาก HPLC ของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 แฟรกชันที่ 2 แสดงให้เห็นถึงการแบ่งแฟรกชันย่อย 2A 2B และ 2C, (B) mass spectra ของเปปไทด์ PQLLLLLL (m/z = 462.26, z = +2) จากแฟรกชันย่อย 2A และ (C) mass spectra ของเปปไทด์ LLLLLLL (m/z = 405.73, z = +2) from จากแฟรกชันย่อย 2B (Choksawangkarn et al., 2018)

ตารางที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของแฟรกชันย่อยของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 ที่ถูกแยกด้วย HPLC และลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ถูกระบุชนิดได้ด้วย MS/MS

HPLC subfraction	% DPPH inhibition (*n*=3)	Peptide sequence	ALC (average local confidence)	m/z	Charge state
2A	59.05 ± 2.42	PQLLLLLL	93%	462.26	+2
2B	63.39 ± 4.99	LLLLLLL	99%	405.73	+2
2C	68.43 ± 1.44	–	–	–	–

(7) การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์สังเคราะห์

เปปไทด์บริสุทธิ์ที่ทราบลำดับกรดอะมิโนจากการวิเคราะห์ด้วย mass spectrometer ถูกสังเคราะห์จากบริษัท Chinapeptide Co.,Ltd. (China) และเปปไทด์บริสุทธิ์ถูกทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging assay ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์บริสุทธิ์มีฤทธิ์ยับยั้งอนุมูล DPPH ที่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนทำบริสุทธิ์ ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.57 $\pm$ 0.05 µg/µL เมื่อละลายเปปไทด์บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 1 µg/µL ในน้ำ ค่าความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ของเปปไทด์ PQLLLLLL และ LLLLLLL มีค่าเท่ากับ 11.08 $\pm$ 1.07% และ 13.02 $\pm$ 1.45% ตามลำดับ และเมื่อทดลองเปลี่ยนสารละลายที่ใช้เป็นบัฟเฟอร์ NH_4HCO_3 เข้มข้น 50 mM และเกลือ NaCl เข้มข้น 10 mM และ 100 mM เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูล DPPH มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับเปปไทด์ที่ละลายในน้ำ **(ตารางที่ 10)** ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า กลไกการทำงานของเปปไทด์ในกากน้ำปลาจำเป็นต้องอาศัยการทำงานร่วมกับโมเลกุลอื่นๆ เพื่อเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพ (Synergistic Effect) ทำให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลงเมื่ออยู่ในรูปเปปไทด์บริสุทธิ์

ตารางที่ 10 ฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์บริสุทธิ์สังเคราะห์ที่ละลายในสารละลาย 4 ชนิด คือ H_2O, 50 mM NH_4HCO_3, 10 mM NaCl และ 100 mM NaCl

peptide sequence	% DPPH inhibition (*n*=3)			
	H_2O	50 mM NH_4HCO_3	10 mM NaCl	100 mM NaCl
PQLLLLLL (1 µg/µL)	11.08 $\pm$ 1.07	6.94 $\pm$ 0.74	0	0
LLLLLLL (1 µg/µL)	13.02 $\pm$ 1.45	9.20 $\pm$ 0.08	0	10.08 $\pm$ 0.69

อภิปรายผลการทดลอง

กากน้ำปลาเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตน้ำปลาซึ่งประกอบไปด้วยโปรตีนและเปปไทด์ขนาดต่างๆ โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 เป็นของแข็งที่เหลือจากการหมักน้ำปลาเป็นระยะเวลา 18 เดือน และใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นอีก 6 เดือน จากนั้น กากที่เหลือจากการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 สามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 โดยการหมักน้ำปลานานขึ้นอีก 6 เดือน และมีผลิตภัณฑ์พลอยได้ (byproduct) ที่เกิดขึ้นเป็นกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 จากการตรวจสอบด้วย SDS-PAGE พบว่าขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่พบในน้ำปลาและกากน้ำปลามีความใกล้เคียงกัน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนจากตัวปลายังไม่สามารถละลายในน้ำปลาได้ทั้งหมด และไม่พบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า 48 kDa คณะผู้วิจัยได้ศึกษาวิธีสกัดโปรตีนจากกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ โดยเปรียบเทียบการใช้น้ำและสารละลายเอทานอลในน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อเป็นการลด ความมีขั้วของสารละลาย และเพิ่มโอกาสในการละลายน้ำของโปรตีนหรือเปปไทด์ในกลุ่มที่มีขั้วน้อย หรือกลุ่มไฮโดรโฟบิก ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเป็นตัวทำละลายให้ปริมาณโปรตีนที่สูงกว่าสารละลายเอทานอล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่โปรตีนหรือเปปไทด์ที่เหลือในกากน้ำปลามีขนาดโมเลกุลเล็ก 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

สารสกัดกากน้ำปลามีเกลือที่ละลายน้ำอยู่ในปริมาณสูงทำให้รบกวนการตรวจวัดฤทธิ์ทางชีวภาพได้ 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 และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณไอออนที่มีในตัวอย่างด้วยการวัดความสามารถในการนำไฟฟ้า พบปริมาณเกลือเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆจาก fraction F1 จนถึง fraction F5 ซึ่ง fraction สุดท้ายนี้มีค่าการนำไฟฟ้าแตกต่างจาก fraction อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของ fraction F2 F3 และ F4 ที่มีความเข้มข้นเปปไทด์สูง และมีค่าการนำไฟฟ้าต่ำ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในสารสกัดกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้น

คุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นสูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ลดลงในน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ต่ำลง

มีรายงานวิจัยจำนวนมากได้กล่าวถึงการใช้ประโยชน์จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ โดยนำโปรตีนมาย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น trypsin bromelain flavozyme เป็นต้น เพื่อสร้างเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์จับกับไอออนของโลหะ ลดความดันโลหิต ยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง เป็นต้น (Shahidi and Zhong, 2008) และเนื่องจากกากน้ำปลามีองค์ประกอบเป็นโปรตีนจากปลา และมีเอนไซม์ที่ได้จากระบบย่อยอาหารของปลา รวมถึงเอนไซม์จาก halophilic bacteria ที่เจริญในบ่อหมัก (อรวรรณ คงพันธุ์, 2553; Lopetcharat, 2003) ซึ่งสามารถย่อยโปรตีนได้ที่ degree of hydrolysis ที่แตกต่างกัน กากน้ำปลาจึงสามารถจัดเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซท และในแต่ละระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลาอาจมี degree of hydrolysis ที่แตกต่างกัน ประกอบกับมีลำดับกรดอะมิโน และความยาวของเปปไทด์ที่แตกต่างกันจึงน่าจะส่งผลให้มีทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกันด้วย

เนื่องจากอนุมูลอิสระก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตได้หลายกลไก (mechanism) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลาจึงถูกตรวจสอบด้วย 5 วิธี ที่แตกต่างกัน ดังนี้ (1) DPPH radical scavenging assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการให้ไฮโดรเจนอะตอมกับอนุมูลอิสระ (2) hydroxyl radical scavenging assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการยับยั้ง reactive oxygen specie ที่มีความไวสูง (3) ABTS radical scavenging assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS (4) ferric reducing antioxidant power (FRAP) สำหรับตรวจสอบความสามารถในการรีดิวซ์ ferric และ (5) lipid peroxidation assay สำหรับตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของลิพิด

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในกากน้ำปลาทุกระดับชั้นคุณภาพ (fraction F2-F4) ความเข้มข้นของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอย่างชัดเจน โดยจะเห็นได้ว่า F3 มีปริมาณโปรตีนสูงที่สุดในกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพ ในขณะที่ F4 มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH ได้ดีที่สุด ทั้งนี้มีความเป็นไปได้ว่าโมเลกุลที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสูงอาจมีปริมาณน้อย หรือมีโมเลกุลขนาดเล็กและประกอบด้วยพันธะเปปไทด์น้อยกว่า 4 พันธะ ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบด้วย Lowry's protein assay ได้ 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 พบว่าความเข้มข้นโปรตีนแปรผันตรงกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ โดยในกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 2 และ 3 พบความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl สูงที่สุดที่ fraction F3 และเมื่อทำการรวม fraction ย่อยของกากน้ำปลาพบว่า กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการต้านอนุมูล hydroxyl ได้ดีที่สุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.36 ± 0.01 mg/mL เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งอนุมูล ABTS พบว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพมีคุณสมบัติที่

ไม่ดีในการให้อิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS โดยสังเกตุจากค่า %inhibition ที่มีค่าต่ำกว่า 7% และมีค่า IC_{50} สูงกว่า 3 mg/mL จากทุกระดับชั้นคุณภาพ เมื่อพิจารณาความสามารถในการรีดิวซ์สารละลาย FRAP พบว่าแฟรกชันรวมของกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 สามารถรีดิวซ์สารละลาย FRAP ได้ดีกว่าอีกสองระดับชั้นคุณภาพ นอกจากนี้ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ ไม่มีคุณสมบัติยับยั้งการเกิดเปอร์ออกซิเดชันของลิพิด ควรมีการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อศึกษากลไกอื่นๆในการต้านอนุมูลอิสระ

สำหรับการทดสอบความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะเพื่อลดโอกาสในการสร้างอนุมูลอิสระของปฏิกิริยาที่มีไอออนเหล่านี้เป็นตัวเร่ง พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำปลาไม่มีความสอดคล้องกับประสิทธิภาพในการแย่งจับกับไอออนของโลหะ เนื่องจากใน fraction ย่อย F2 มี % chelation ที่สูงกว่า F3 และ F4 ในกากน้ำปลาทุกระดับชั้นคุณภาพ และเมื่อทำการรวม fraction F2-F4 พบว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความสามารถในการแย่งจับกับโลหะ Fe^{2+} จากการเกิดสารเชิงซ้อนกับ ferrozine ได้ดีกว่าอีกสองระดับชั้นคุณภาพ ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับความสามารถในการยับยั้งอนุมูล hydroxyl ที่มีค่าสูงที่สุด ในกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 อย่างไรก็ตาม ค่า EC_{50} มีค่าสูงถึง 1.00 ± 0.12 mg/mL แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการแย่งจับกับไอออนของโลหะของกากน้ำปลายังมีค่าน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับตัวควบคุมเชิงบวก

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

สำหรับความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ผู้วิจัยติดตามการเจริญของแบคทีเรียสามชนิดที่ก่อโรคในคนและในพืชโดยครอบคลุมทั้งในกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบ 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 ชนิด ได้ดี ทั้ง *E.coli* และ *X. oryzae pv. oryzae*ในขณะที่กากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 แสดงให้เห็นฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียทุกชนิด เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อควบคุม (Khositanon *et al*., 2018) ฤทธิ์ต้านจุลชีพที่แตกต่างกันของกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพอาจเป็นผลมาจากขนาดโมเลกุล degree of hydrolysis และลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน เนื่องจากผ่านการหมักด้วยระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลให้ได้รับเอนไซม์โปรตีเอสจากแบคทีเรียต่างประเภทภายในบ่อหมักน้ำปลา (ศิริลักษณ์ นามวงษ์, 2553) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 อาจมีกลไกในการทำลายเชื้อแบคทีเรียที่แตกต่างกัน เนื่องจาก

ระดับชั้นคุณภาพที่ 2 มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ อาจเป็นกลุ่มที่มีประจุบวกที่สามารถสร้างปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลที่มีประจุลบบนผิวเซลล์ (outer membrane) ได้ สำหรับกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 3 มีฤทธิ์ต่อทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ น่าจะมีกลไกอื่นๆในการเข้าทำลายเซลล์ 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 ซึ่งเป็นค่าที่มากกว่าความเข้มข้นของเปปไทด์จากไฮโดรไลเซทรูปแบบอื่นๆที่มีรายงานในวารสารวิชาการ

ฤทธิ์ทางชีวภาพอีกประเภทหนึ่งที่ผู้วิจัยให้ความสนใจคือความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดยติดตามการมีชีวิตรอดของเซลล์มะเร็งตับชนิด HepG2 ในสภาวะที่มีกากน้ำปลาแต่ละระดับชั้นคุณภาพในอาหารลี้ยงเซลล์ เทียบกับสภาวะการเจริญแบบปกติ และศึกษาการมีชีวิตรอดของเซลล์ที่ไม่ใช่มะเร็งชนิด Vero ควบคู่ไปด้วย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพที่ความเข้มข้น 400 μg/mL ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง HepG2 และไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเซลล์ปกติชนิดVero โดยความมีชีวิตรอดของเซลล์มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการกระตุ้นการเจริญของเซลล์ทั้งสองชนิด อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เปปไทด์ขนาดเล็กในกากน้ำปลาเป็นสารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต (Zhang *et al*., 2012)

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพทั้ง 5 ชนิดดังที่กล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติที่ดีของกากน้ำปลาในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE คณะผู้วิจัยจึงศึกษาการแยกส่วนย่อยของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE โดยเมื่อผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วย molecular weight cut off filter พบว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก <3 kDa มีความสามารถในการยับยั้งอนุมูล DPPH, ยับยั้งอนุมูล hydroxyl, รีดิวซ์ Fe^{3+}, และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่ากลุ่มเปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 3 kDa และในการทดลองต่อเนื่องที่ศึกษาผลของความไฮโดรโฟบิกของเปปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่า 3 kDa ต่อฤทธิ์ทางชีวภาพ แสดงให้เห็นว่าแฟรกชันที่มีความไฮโดรโฟบิกสูง (C18) ของกากน้ำปลาทั้ง 3 ระดับชั้นคุณภาพ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ที่ดีกว่าแฟรกชันที่มีความไฮโดรโฟบิกต่ำ (C4 และ C8) ผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากสัตว์ทะเล โดยมีรายงานว่าเปปไทด์ขนาดเล็กที่มีความไฮโดรโฟบิกสูงจะมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ที่ดี (Hong et al., 2008; Liu et al., 2016; Ngoh and Gan, 2016; Sun et al., 2011) ทั้งนี้ มีรายงานวิจัยที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดของกรดอะมิโนในเปปไทด์ที่มีต่อฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำการวิเคราะห์ความถี่ที่พบกรดอะมิโนในเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ 42 ชนิด พบว่ากรดอะมิโนที่พบมากที่สุด 3 ลำดับแรกจัดเป็นกรดอะมิโนที่มีความไฮโดรโฟบิกสูง ได้แก่ glycine, proline และ valine ซึ่งคิดเป็นความถี่สูงถึง 33% ของกรดอะมิโนทั้งหมด (Zou et al., 2016) นอกจากนี้ การมี

อยู่ของกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกที่ปลาย C-terminus ของเปปไทด์จะช่วยให้การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น เนื่องจากกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกในเปปไทด์สามารถแย่งจับกับสารตั้งต้นที่บริเวณ N-terminal catalytic site ของเอนไซม์ได้ดี (Hong et al., 2008; Turner and Hooper, 2002; Vermeirssen et al., 2004)

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่พบในกากน้ำปลาได้รับการยืนยันว่าเป็นผลมาจากโมเลกุลเปปไทด์ในตัวอย่าง เนื่องจากเมื่อทำการย่อยเปปไทด์ด้วยเอนไซม์ ProteinaseK ซึ่งเป็น non-specific enzyme แล้วพบว่าความสามารถในการกำจัดอนุมูล DPPH ลดลงถึง 54% เมื่อเปปไทด์จากกากน้ำปลาผ่านการแยกส่วนและทำบริสุทธิ์ด้วย reverse-phase HPLC แล้ว พบว่ามีเปปไทด์ 2 ชนิดที่สามารถระบุชนิดได้ด้วย tandem mass spectrometry และ De Novo sequencing ได้แก่ PQLLLLLL และ LLLLLLL ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่มีความไฮโดรโฟบิกสูง และมีความสอดคล้องกับเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่มีรายงานในฐานข้อมูล โดยกรดอะมิโน leucine และ proline มีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดอนุมูลอิสระและยับยั้ง reactive oxygen species ผ่านกลไกการส่งต่อไฮโดรเจนและอิเล็กตรอน นอกจากนี้ leucine และ proline ยังจัดเป็นกรดอะมิโน 2 ใน 3 ชนิดที่พบในความถี่สูงที่สุดในเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ (Ngoh and Gan, 2016; Zhuang et al., 2013; Zou et al., 2016) นอกจากนี้ การมีอยู่ของกรดอะมิโน leucine ที่ปลาย N-terminus จัดเป็นคุณลักษณะเฉพาะอย่างหนึ่งที่พบได้มากในเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ (Zou et al., 2016) อย่างไรด็ตาม เมื่อทำการสังเคราะห์เปปไทด์บริสุทธิ์ PQLLLLLL และ LLLLLLL แล้วพบว่าเปปไทด์ทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการทำบริสุทธิ์ในสารสกัดกากน้ำปลา ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าในกลไกการออกฤทธิ์ของเปปไทด์ทั้งสองชนิดนี้เป็นแบบเสริมฤทธิ์ (synergistic effect) โดยต้องอาศัยการทำงานร่วมกัน หรืออาศัยการทำงานร่วมกับโมเลกุลของสารอื่นในกากน้ำปลา ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษากลไกการทำงานของเปปไทด์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

1. กากน้ำปลามีโปรตีน/เปปไทด์เป็นองค์ประกอบ โดยกากน้ำปลาระดับชั้นคุณภาพที่ 1 มีความเข้มข้นโปรตีนสูงกว่าระดับชั้นคุณภาพที่ 2 และ 3 ตามลำดับ

2. เปปไทด์ที่สกัดได้จากกากน้ำปลามีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ จับกับไอออนของโลหะ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin-converting enzyme และยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แต่ไม่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

3. ระดับชั้นคุณภาพของกากน้ำปลาที่แตกต่างกันส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน

4. เปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 3 kDa และมีคุณสมบัติไฮโดรโฟบิก ที่สกัดจากกากน้ำปลาทั้งสามระดับชั้นคุณภาพ มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลสูงและมีคุณสมบัติไฮโดรฟิลิก

ข้อเสนอแนะ

1. เปปไทด์จากกากน้ำปลาสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าในอุตสาหกรรมน้ำปลาและอุตสาหกรรมอาหารรูปแบบอื่นๆ สำหรับเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และใช้เป็นอาหารบำรุงสุขภาพสำหรับลดความดันโลหิต อย่างไรก็ตาม เปปไทด์กึ่งบริสุทธิ์ที่ผ่านการแยกบางส่วนแสดงให้เห็นฤทธิ์ทางชีวภาพที่สูงกว่าเปปไทด์บริสุทธิ์ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสริมฤทธิ์ของโมเลกุลหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลการทำงานของเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin converting enzyme เพื่อเป็นแนวทางในการเสริมฤทธิ์ทางชีวภาพของเปปไทด์ให้ดียิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

คันธารัตน์ ประทุมวัลย์, อนุวัตร แจ้งชัด, ไพศาล วุฒิจำนงค์, ชุติมา ไวศรายุทธ์ (2549) การพัฒนาอาหารสัตว์โดยใช้กากเหลือจากการผลิตน้ำปลา. *เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44 : สาขาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเศรษฐศาสตร์ สาขาบริหารธุรกิจ,* 386-393

นภัสวรรณ ปัญญา (2560) ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลา. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เพชรลดา โฆษิตานนท์ (2559) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกากน้ำปลา. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศิริลักษณ์ นามวงษ์ (2553) ศักยภาพของแบคทีเรียทนเค็มและแบคทีเรียชอบเค็มปานกลางทางเทคโนโลยีชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา* 15, 122-132

สุศนีย์ พิพัฒนานุกูล (2558) การศึกษาองค์ประกอบและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกากน้ำปลา. ปริญญานิพนธ์. ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

หนังสือสถิติหน่วยธุรกิจการประมง (2554) กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง เอกสารฉบับที่ 13/2556

อรวรรณ 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 Phamarcol* 133, 117-138.

AOAC International (1997) Official Methods of Analysis, Methods 920.87, 920.39, 923.03 and 925.10, 16th ed. Washington, DC, USA.

AOAC International (2000) Official Methods of Analysis, Methods 962.09, 17th ed. Gaithersburg, MD, USA.

Benjakul S, Morrissey MT (1997) Protein Hydrolysates from Pacific Whiting Solid Wastes. *J Agric Food Chem* 45, 3423-3430.

Blainski, A, Lopes, GC, de Mello JC (2013) Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from Limonium brasiliense L. *Molecules* 18, 6852-6865.

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.

Choksawangkarn W., Phiphattananukoon S., Jaresitthikunchai J., Roytrakul S. (2018) Antioxidative peptides from fish sauce by-product: Isolation and characterization. *Agriculture and Natural Resources* 52, 460-466.

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 (1 9 7 1) 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.

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, Iawsipo 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.

Liu R, Xing L, Fu Q, Zhou GH Zhang WG (2016) A Review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products. Antioxidants (Basel) 5, 32.

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

Merrifield, RB (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 85, 2149–2154.

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.

Ngoh YY, Gan CY (2016) Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and α-amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chem*. 190, 331-337.

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.

Piyadhammaviboon 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.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26, 1231-1237.

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.

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.

Wiriyaphan 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.

Zhang J, Xin, L, Shan B, Chen W, Xie M, Yuen D, Zhang W, Zhang Z, Lajoie GA, Ma B (2012) PEAKS DB: de novo sequencing assisted database search for sensitive and accurate peptide identification. *Mol Cell Proteomics* 11, M111.010587.

Zhuang H, Tang N, Yuan Y (2013) Purification and identification of antioxiadant peptides from corn gluten meal. *J Funct Foods* 5, 1810-1821.

Zou TB, He TP, Li HB, Tang HW, Xia EQ (2016) The structure-activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules* 21, 72.