



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระโดยใช้เอนไซม์ papain และเอนไซม์ bromelain
(Production of gelatin hydrolysate with ACE inhibitory and antioxidative activities by papain and bromelain)

นายสามารถ สายอูต

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
(เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้าน
อนุมูลอิสระโดยใช้เอนไซม์ papain และเอนไซม์ bromelain
(Production of gelatin hydrolysate with ACE inhibitory and
antioxidative activities by papain and bromelain)

นายสามารถ สายอูต

ตุลาคม 2560 – มีนาคม 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 153/2561

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรีที่ได้ให้ ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการของภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหารและภาควิชาชีวเคมีทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และร่วมมือกันทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

งานวิจัยในครั้งนี้ศึกษาผลของเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาวัวให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยทำการไฮโดรไลเสตเจลาตินจากหนังปลาทั้งสองชนิด การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ส่งผลต่อการมีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น โดยมีอัตราส่วนเอนไซม์ปาเปนต่อเจลาตินที่ 1.47% (E/S) เพื่อผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับ DH 40% เอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อการย่อยเจลาตินหนังปลาวัว เจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยร้อยละ 40 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระทดสอบโดย DPPH และ ABTS มากที่สุด ซึ่งเปปไทด์ที่ได้มีความสามารถในการต้านการเกิดออกซิเดชันได้ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอาหารและสุขภาพของผู้บริโภค การย่อยคอลลาเจนและเจลาตินด้วยเอนไซม์ปาเปนทำให้ได้เปปไทด์ที่ระดับ DH มากขึ้นเป็นการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE มากขึ้น หลังจากการทำบริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง mass spectrometer พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ใน fraction E คือ APSFSDIPNPIGSE การมีกิจกรรมการยับยั้ง ACE ที่สูง อาจเป็นเพราะการมีกรดอะมิโนชอบน้ำ (Ala) ที่ปลายหมู่คาร์บอกซีและการมีกรดอะมิโนวงแหวนบริเวณปลายสายเปปไทด์ การย่อยช่วยให้เจลาตินเปปไทด์มีสายสั้นลง และมีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนหมู่ hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้มากขึ้น องค์ความรู้ที่ได้ทำให้เข้าใจกระบวนการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นประโยชน์ต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่แก่ผู้มีความดันโลหิตสูงและผู้รักสุขภาพ

คำสำคัญ: การยับยั้งเอนไซม์ ACE, เจลาตินไฮโดรไลเสต, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, ปาเปน, โบรมีเลน

ABSTRACT

This work aims to evaluate the effect of bromelain and papain to prepare gelatin hydrolysates with ACE inhibitory activity and antioxidative activity. Fish skin gelatin from giant catfish and unicorn leatherjacket was hydrolyzed by bromelain and papain. Papain showed high specificity to weed fish skin gelatin. The production of gelatin hydrolyzate at digestion levels of 10, 20, 30 and 40 percent has an effect on increased antioxidant activity. With the ratio of enzyme to substrate of 1.47% (E/S), gelatin hydrolyzate had degree of hydrolysis (DH) with 40%. The gelatin hydrolyzate with DH 40% showed the highest in antioxidant activity tested by DPPH and ABTS, which has the ability to resist oxidation. Digestion of collagen and gelatin using papain leads to increased DH level of peptide, increasing the ACE inhibitory activity. The gelatin hydrolyzate was purified using gel filtration chromatography and analyzed amino acid sequence analysis using a mass spectrometer. The amino acid sequence of the purified peptide (fraction E) was APSFSDIPNPIGSE. The higher in ACE inhibitory activity might be due to the presence of hydrophobic amino acids (Ala) and aromatic ring amino acids at the end of the peptide chain. Hydrolysis collagen by using papain provided a shorter peptides. The peptides with hydrophobic amino acids at the end of chain increased the ACE inhibitory activity. Production of collagen peptides having ACE inhibitory and antioxidant activity process using enzymes could significantly benefit to produce alternative products that could serve as a potential source of functional food ingredients for health promotion.

Keyword: ACE Inhibitor, gelatin hydrolyzate, antioxidant activity, papain, bromelain

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทนำ	1
เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
เนื้อเรื่อง	5
รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย	5
ผลการวิจัยและวิจารณ์	11
ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α	11
ผลของระดับอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S) ต่อระดับการย่อย (degree of hydrolysis: DH)	12
ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสต	15
ผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสต	17
กิจกรรมการจับของไอออนเฟอร์รัส	19
กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินไฮโดรไลเสต	20

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ผลการยับยั้งเอนไซม์ ACE	23
รูปแบบโปรตีนโดยการวิเคราะห์ SDS-PAGE	25
กิจกรรมต้านออกซิเดชันของเจลาตินไฮโดรไลเสตในระบบไลโปโซม	27
กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตในระบบทางเดินอาหาร จำลอง	29
การแยกเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE	30
การลำดับกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้ง เอนไซม์ ACE	33
สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย	36
ผลผลิต	37
รายการอ้างอิง	38
ประวัตินักวิจัยและคณะ	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α	12
2	ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE	34

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เปรียบเทียบความแตกต่างของเอนไซม์โบรมิเลนและปาเปนต่อระดับการย่อยต่าง ๆ ของเจลาตินหนังปลาเรียวเขียว	13
2	เปรียบเทียบความแตกต่างของเอนไซม์โบรมิเลนและปาเปนต่อระดับการย่อยต่าง ๆ ของ เจลาตินหนังปลาหัว	14
3	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาหัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	16
4	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	17
5	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาหัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	18
6	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	18
7	กิจกรรมการจับโลหะของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาหัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	20
8	กิจกรรมการจับโลหะของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	20
9	กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาหัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	21
10	กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	22
11	กิจกรรมการต้านเอนไซม์ ACE ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาหัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	25
12	กิจกรรมการต้านเอนไซม์ ACE ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)	25

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
13	รูปแบบโปรตีนของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยในระดับต่าง ๆ โดยวิธี SDS-PAGE	27
14	ค่าเพอร์ออกไซด์ของ liposome ในสภาวะกระตุ้นให้เกิดการ oxidation หลังจากเติมสารต่างๆ	28
15	ค่า TBARS ของ liposome ในสภาวะกระตุ้นให้เกิดการ oxidation หลังจากเติมสารต่างๆ	29
16	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB) ในระบบทางเดินอาหารจำลอง	30
17	การแยกเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี ชนิด Sephacryl S-100 HR โดยติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm	32
18	กิจกรรมต้านเอนไซม์ ACE ของแต่ละ fraction ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี	32
19	กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของแต่ละ fraction ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี	33
20	การวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ($m/z = 715.84$, retention time = 54.10) ของเปปไทด์ APSFSDIPNPIGSE ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี	35

บทนำ

เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำการวิจัยมาก่อน

เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งความดันโลหิตสูงคือ โมเลกุลเปปไทด์ที่ช่วยลดความดันเลือด โดยเมื่อได้รับเปปไทด์นี้จะช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ควบคุมภาวะความดันโลหิต ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ angiotensin converting (ACE) เอนไซม์ ACE มีบทบาทสำคัญในการควบคุมความดันเลือดในระบบของ rennin-angiotensin และการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องนี้เป็นประโยชน์ต่อวงการแพทย์ที่จะเป็นเครื่องมือช่วยระงับอาการและภาวะความดันโลหิตสูงสำหรับผู้ป่วย (Ondetti et al., 1977; Chen et al., 2007) หลายงานวิจัยมีความพยายามสังเคราะห์สารยับยั้งเอนไซม์ ACE เช่น captopril, enalapril, alacepril และ lisinopril จนเป็นที่แพร่หลายในการใช้บำบัดภาวะความดันเลือดสูงรวมถึงภาวะหัวใจล้มเหลวในคน (Ondetti, 1977; Patchett et al., 1980) อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์สารยับยั้งเอนไซม์ ACE นั้นมีความเชื่อว่าจะทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อผู้ได้รับยาเหล่านี้ เช่น ผู้ป่วยมีอาการไอ มีกลิ่นรสไม่มารับประทาน มีอาการคันผิวหนัง และบางรายเกิดอาการ angioneurotic edema (Atkinson & Robertson, 1979) และในทศวรรษที่ผ่านมา จึงได้เกิดการวิจัยในหลายๆที่ทั่วโลก พยายามให้ความสำคัญและตามหาแหล่งสารยับยั้งเอนไซม์ ACE ทางธรรมชาติ ที่ได้จากแหล่งต่างๆ เช่น แหล่งโปรตีน ถึงแม้เปปไทด์เหล่านั้นอาจจะไม่มีฤทธิ์ที่เทียบเท่ากับสารยับยั้งสังเคราะห์แต่เปปไทด์ไม่มีผลข้างเคียงเหมือนสารสังเคราะห์ แหล่งของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE ส่วนใหญ่ได้จากผลิตภัณฑ์นม และยังมีการศึกษาเปปไทด์ที่สกัด และทำการแยกได้จากเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ รวมถึงจากโปรตีนพืชด้วย แหล่งต่างๆ ในสัตว์ นอกจากนี้คอลลาเจนและเจลาตินเป็นแหล่งของสารยับยั้งความดันเลือดสูงที่ดีอีกด้วย แต่การศึกษาวิจัยการย่อยคอลลาเจนและเจลาตินให้ได้เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ดังกล่าวยังมีอยู่น้อย แหล่งคอลลาเจนที่มีการศึกษามาแล้วได้แก่ คอลลาเจนหนังหมู (Anzai et al., 1997) หนังวัว (Ichimura et al., 2009) หนังและกระดูกตีนไก่ (Cheng et al., 2009; Saiga et al., 2008) แหล่งคอลลาเจนจากสัตว์ทะเล ได้แก่ หนังปลา (Byun & Kim, 2001; Nagai et al., 2006; Park et al., 2009) กระดูกอ่อนปลา (Nagai et al., 2006) เกล็ดปลา (Fahmi et al., 2004) ปลาหมึก (Alemán et al., 2011) และ ปลิงทะเล (Zhao et al., 2007)

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปัจจุบันภาวะความดันโลหิตสูง (Hypertension หรือ High blood pressure) เป็นโรคที่พบได้บ่อยมากขึ้นในแต่ละประเทศ โรคเรื้อรังนี้มีผลต่อประชากรผู้ใหญ่ในโลกถึงร้อยละ 30 โดยมักพบว่าผู้ชายมีภาวะความดันโลหิตสูงบ่อยกว่าในผู้หญิง และพบภาวะนี้ได้สูงขึ้นเมื่ออายุขัยสั้นลง ในบางประเทศ พบโรคนี้ได้สูงถึงร้อยละ 50 ในผู้มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป (Chockalingam, 2008) ความ

ดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญของโรคหลอดเลือดสมอง กล้ามเนื้อหัวใจตายเหตุขาดเลือด หัวใจวาย หลอดเลือดโป่งพอง และเป็นสาเหตุของโรคไตเรื้อรัง ปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง ได้แก่ ความสัมพันธ์เชิงซ้อนระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม รวมถึงพฤติกรรมการบริโภค ในขณะที่มีหลายสาเหตุของโรคความดันโลหิตสูง ทั้งนี้เอนไซม์ angiotensin-converting enzyme หรือ ACE (dipeptidyl carboxypeptidase, EC 3.4.15.1) เป็นเอนไซม์ที่รู้จักกันดีว่ามีผลต่อการควบคุมความดันโลหิต (Guang et al., 2012) เอนไซม์ ACE เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม metallopeptidase ที่ใช้สังกะสี (zinc) ในการทำงาน ซึ่งสามารถเปลี่ยนสาร angiotensin-I (หรือสาร decapeptide ในรูปไม่มีฤทธิ์) ในร่างกายให้เป็นสาร angiotensin-II (หรือสาร octapeptide ที่ทำหน้าที่ต่อการบีบตัวของหลอดเลือด) ซึ่งสาร angiotensin II จะทำให้หลอดเลือดหดตัว เกิดภาวะความดันโลหิตสูงขึ้น และกระตุ้นการหลั่งสาร aldosterone ซึ่งทำให้มีการดูดซึมเกลือโซเดียมกลับเข้าสู่ร่างกายที่บริเวณไต (Eriksson et al., 2002) นอกจากนี้เอนไซม์ ACE ยังสามารถทำลาย bradykinin ได้อีกด้วย (Skrbic & Igic, 2009)

ณ ปัจจุบัน การรักษาโรคความดันโลหิตสูงส่วนใหญ่คือการให้ยาลดความดันโลหิต หรือ สารเอซีอีอินฮิบิเตอร์ (ACE inhibitors) เช่น แคปโตพริล (captopril) อินาลาพริล (enalapril) ลิซินอพริล (lisinopril) รามิพริล (ramipril) และ เพอรินโดพริล (perindopril) เป็นต้น ถึงแม้การใช้สารสังเคราะห์ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ ACE แต่การใช้ยาอาจทำให้เกิดอาการข้างเคียง ก่อให้เกิดความรำคาญแก่ผู้ใช้ยาได้ (Vyssoulis et al., 2001) ดังนั้นจึงมีความสนใจและให้ความสำคัญกับสารยับยั้ง ACE ที่มาจากธรรมชาติมากขึ้น เปปไทด์และโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysate) มีฤทธิ์สามารถยับยั้ง ACE ได้ ซึ่งผลิตจากแหล่งโปรตีนต่างๆ มีหลายงานวิจัยได้ทำสกัดและทำบริสุทธิ์ ACE inhibitory peptide จากแหล่งโปรตีนต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรไลเซตจากไข่ปลาทูน่า ท้องแถบ (Intarasirisawat et al., 2013) เจลาตินไฮโดรไลเซตจากปลากระเบนหลังหนาม (Lassoued et al., 2015) เปปไทด์จากเนื้อปลาปากคม (Wu et al., 2015) เปปไทด์และไฮโดรไลเซตเหล่านี้สามารถบริโภคได้ปลอดภัยและไม่มีผลข้างเคียงเหมือนการใช้ยาสังเคราะห์ (Chen et al., 2009; Fang et al., 2008) ปกติเอนไซม์ ACE ชอบเลือกจับกับสารตั้งต้น หรือสารยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitors) ที่ปรากฏหมู่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ตรงตำแหน่งส่วนปลายด้าน carboxy (C-terminal) และการมีกรดอะมิโนโซ่กิ่ง (branched chain aliphatic amino acids) ตรงตำแหน่งส่วนปลายด้านอะมิโน (N-terminal) (Murray & FitzGerald, 2007; Qian et al., 2007) และขนาดของโมเลกุลเปปไทด์ขนาดเล็กยังมีอิทธิพลต่อการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ดีด้วย (Lassoued et al., 2015)

คอลลาเจนและเจลาตินเป็นแหล่งของโปรตีนที่สำคัญในการผลิตเปปไทด์และไฮโดรไลเซต ซึ่งแตกต่างจากโปรตีนจากแหล่งอื่น โดยปกติเมื่อนำโปรตีนทั่วไปมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเซตมักได้

เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างและหลากหลายมาก ยากต่อการทำบริสุทธิ์เพื่อให้ได้เปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนที่ต้องการ ในขณะที่เปปไทด์ที่ได้จากคอลลาเจนหรือเจลาตินมีความหลากหลายของเปปไทด์ที่น้อยกว่า ง่ายต่อการสกัดและทำบริสุทธิ์ เนื่องจากคอลลาเจนและเจลาตินมีองค์ประกอบของ glycine ทุกๆ สามตำแหน่งในสายเปปไทด์ โดยมีลำดับกรดอะมิโนคือ glycine-x-y ซึ่งมักพบ proline ที่ตำแหน่ง x และ hydroxyproline ที่ตำแหน่ง y นี้เป็นความเฉพาะของลำดับกรดอะมิโนที่พบในคอลลาเจนและเจลาตินเท่านั้น อย่างไรก็ตามการย่อย (hydrolysis) คอลลาเจนหรือเจลาตินนั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของคอลลาเจนเป็นโปรตีนสามสายที่บิดเป็นเกลียวแน่น (triple helix) ส่งผลต่อการใช้เอนไซม์ย่อยเป็นไปได้ไม่ค่อยดี และมีระดับการย่อยได้น้อย (degree of hydrolysis) ทำให้สายเปปไทด์ที่ได้ยาว เมื่อเป็นเช่นนี้กรดอะมิโนที่สามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้จะยังถูกขังอยู่ในสายโปรตีนนั้น ไม่ได้ปลดปล่อยและเพิ่มประสิทธิภาพของเปปไทด์อย่างแท้จริง จึงมีความจำเป็นในการหาหนทางในการย่อยคอลลาเจนและเจลาตินให้มีระดับการย่อยมากขึ้น การใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อการย่อยคอลลาเจนและเจลาติน เช่น collagenases และ gelatinases ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ทำได้ แต่เอนไซม์ดังกล่าวมีราคาแพง และมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้นมากกว่าการย่อยเปปไทด์ให้สั้นลง ดังนั้นการใช้เอนไซม์ glycyI endopeptidase ที่มีความจำเพาะต่อ glycine ที่พบมากในคอลลาเจน จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ราคาถูกและหาได้ทั่วไปในเขตโซนร้อน การใช้เอนไซม์นี้มีความเป็นไปได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยคอลลาเจนและเจลาตินให้ได้เปปไทด์สายสั้นลงและมีฤทธิ์ทางชีวภาพมากขึ้น

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1 ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ papain และ bromelain ต่อการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระ
- 2 ทำบริสุทธิ์เปปไทด์และศึกษาลำดับเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระ

ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โดยทั่วไปเอนไซม์ glycyI endopeptidase เป็นเอนไซม์ cysteine endopeptidase ที่อยู่ในกลุ่มเดียวกับเอนไซม์ papain พบได้มากในยางมะละกอ เป็นแหล่งทางเลือกที่ดีในการผลิตเจลาติน ไฮโดรไลเสตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ขณะเดียวกันเอนไซม์ bromelain ที่พบมากในสับปะรดก็มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนเช่นเดียวกัน เอนไซม์ bromelain เลือกจำเพาะต่อการตัดพันธะของกรดอะมิโน Gly- Ala- Leu- Lys- และ Tyr- ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดอะมิโนกลุ่ม hydrophobic หลัก

จากการตัดด้วยเอนไซม์นี้ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนกลุ่ม hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เป็นการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE มากขึ้น หากใช้การย่อยคอลลาเจนและเจลาตินแบบผสมผสานด้วยสองเอนไซม์ดังกล่าว จะช่วยให้ได้เจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสูงขึ้นจึงได้เจลาตินเปปไทด์สายสั้นลง และมีเปปไทด์ที่มีหมู่ hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้มากขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เจลาตินไฮโดรไลเสตที่ได้สามารถทำหน้าที่ในสมบัติต่างๆ เช่น กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Nikoo et al. 2015; Lassoued et al. 2015) การยับยั้งจุลินทรีย์ (Hong et al. 2014) การต้านมะเร็ง (Alemán et al. 2011) และสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆ สำหรับประยุกต์ใช้ในอาหาร (Intarasirisawat et al. 2012; Jemil et al. 2014) ทั้งนี้การนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลเป็นแหล่งของเจลาตินและการใช้เปลือกสับประรดและมะละกอเป็นแหล่งของเอนไซม์จะช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับแหล่งวัตถุดิบเหล่านั้น ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีหน้าที่ส่งเสริมสุขภาพ การลดความเสี่ยงการเกิดโรค และการลดค่าใช้จ่ายในการดูแลสุขภาพ การวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์จากสับประรดและมะละกอเพื่อให้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ รวมถึงศึกษาผลกระทบการย่อยด้วยเอนไซม์ต่อการผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต่างๆ และการประยุกต์ใช้คอลลาเจนเปปไทด์เพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมทางเลือกต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ประโยชน์ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้ คือ ได้องค์ความรู้ใหม่ในการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้มีความดันโลหิตสูงและประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ โดยผลกระทบที่สำคัญที่จะเกิดขึ้นในโอกาสต่อไป คือ เป็นการส่งเสริมให้เกิดการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือทางประมง สร้างมูลค่าเพิ่มให้กับวัสดุเหล่านั้น สามารถลดขยะเหลือทิ้งซึ่งเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่สำคัญ รวมทั้งเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้คอลลาเจนเปปไทด์ในทางเภสัชกรรมรวมถึงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อปรับปรุงคุณภาพอาหารต่อไป สำหรับความสำเร็จและความคุ้มค่าที่คาดว่าจะได้รับจากโครงการ ประกอบด้วย ผลสำเร็จเบื้องต้นที่คาดว่าจะได้รับ คือ การผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และออกฤทธิ์ทางชีวภาพเพื่อประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ

เนื้อเรื่อง

รายละเอียดเกี่ยวกับวิธีดำเนินการวิจัย

1 การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลาทะเล

นำหนังปลาทะเลแช่ในสารละลาย NaOH (0.2 M) ในอัตราส่วนหนังปลา 1 ส่วน สารละลาย NaOH 10 ส่วน (w/v) แช่ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และทำการกวนด้วยเครื่อง overhead stirrer เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในระหว่างการแช่หนังปลาทำการเปลี่ยนถ่ายสารละลาย NaOH ทุก 4 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำหนังปลาที่ได้แช่ในน้ำโดยปล่อยให้ น้ำไหลผ่านตัวอย่างตลอดจนกว่าค่า pH ของน้ำที่แช่ตัวอย่างมีค่าเป็นกลาง หลังจากนั้นนำหนังที่ได้ไปสกัดเจลาติน (อนุพันธ์คอลลาเจน) โดยใช้อัตราหนังตัวอย่างต่อน้ำ 1 ต่อ 10 (w/v) โดยมีสารละลายสกัดคือ acetic acid เข้มข้น 0.05 M ทำการสกัดในถังที่มีการกวนอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังการสกัดนำสารละลายส่วนใสมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น ก่อนนำสารละลายที่ได้ไปทำแห้งเยือกแข็งด้วยเครื่อง Scanvac Model Coolsafe 55 freeze dryer (Coolsafe, Lyngø, Denmark) จะได้เจลาตินผงเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.1 การหาปริมาณโปรตีน

ปริมาณโปรตีนวัดได้โดยใช้การทดสอบ Biuret ตามวิธีการของ Robinson and Hodgson (1940)

1.2 วิเคราะห์รูปแบบโปรตีนโดยเครื่อง electrophoresis

รูปแบบโปรตีนของเจลาตินวิเคราะห์โดยวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE (Laemmli, 1970) นำตัวอย่าง (1 กรัม) ละลายในสารละลาย SDS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 จำนวน 10 ml และให้ความร้อนแล้วที่ 85 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ได้สารละลายโปรตีนส่วนใส (supernatants) นำส่วน supernatant ผสมกับบัฟเฟอร์ (สารละลาย 0.5 M Tris-HCl ที่มี pH 6.8 โดยมีความเข้มข้นร้อยละ 4 (w/v) ของสาร SDS มีกลีเซอรอลร้อยละ 20 (v/v) และสาร β -mercaptoethanol ร้อยละ 10 (v/v) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) นำส่วนผสมที่ได้ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นโปรตีน 15 ไมโครกรัม โหลดลงในช่องว่างบนแผ่นเจล ซึ่งประกอบด้วยส่วนเจลทดสอบและเจลส่วนบนที่มีความเข้มข้นของ acrylamide ร้อยละ 7.5 (v/v) และร้อยละ 4 (v/v) ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ 15 mA ต่อ 1 แผ่นเจล ด้วยเครื่อง Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BioRad Laboratories, Inc., Richmond, CA., USA) หลังจากนั้นย้อมเจลด้วยสารละลาย Coomassie blue R-250 ร้อยละ 0.1 (w/v) ที่ละลายในสารละลาย methanol ร้อยละ 15 (v/v) และกรด acetic ร้อย

ละ 5 (v/v) เป็นเวลา 1 คืน ก่อนล้างสารย้อมด้วยสารละลาย methanol ร้อยละ 30 ที่มีกรด acetic acid ร้อยละ 10 จนได้แผ่นเจลที่มีพื้นหลังใส

2 การผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระ

2.1 การผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่ระดับการย่อยต่าง ๆ

นำเจลาตินจำนวน 4 g ละลายในน้ำกลั่น ก่อนปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลาย NaOH เข้มข้น 1 M หลังจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 50 ml และได้ปริมาณโปรตีนให้มีความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 2 ซึ่งหาค่าปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของ Lowry method (Lowry et al., 1951) เริ่มปฏิบัติการการย่อยโดยเติมเอนไซม์สกัดจากเปลือกผลไม้ในปริมาณที่ได้คำนวณมาแล้วโดยอาศัยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์ในรูปของ log กับระดับการย่อย (DH) เพื่อให้ได้เจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยเท่ากับร้อยละ 10, 20, 30 และ 40 ตามลำดับ หลังจากย่อยเจลาตินเป็นเวลา 1 ชั่วโมงทำการหยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มที่น้ำเดือดอุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (model W350, Memmert, Schwabach, Germany) เมื่อตัวอย่างเย็นลงนำสารละลายที่ได้หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5000 × g เป็นเวลา 10 นาที ณ อุณหภูมิ 25 °C เก็บส่วนใสและสารละลายไปทำแห้งแช่เยือกแข็งจนในที่สุดได้เป็นผงไฮโดรไลเสต นำผงไฮโดรไลเสตที่ได้ใส่ถุงพลาสติกปิดให้แน่นและเก็บไว้ในตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 °C

2.2 วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α

ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ในตัวอย่าง คอลลาเจนเปปไทด์วิเคราะห์โดยวิธีของ Benjakul and Morrissey (1997) เริ่มต้นโดยการเจือจางตัวอย่าง (125 μ l) ด้วยสารละลาย phosphate buffer (pH 8.2) เข้มข้น 0.2 M จำนวน 2.0 ml และเติมสารละลาย TNBS เข้มข้นร้อยละ 0.01 จำนวน 1.0 ml หลังจากนั้นผสมตัวอย่างให้เข้ากันก่อนบ่มที่ 50 °C นาน 30 นาทีในที่มืด หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย sodium sulphite เข้มข้น 0.1 M จำนวน 2.0 ml ปล่อยให้สารตัวอย่างเย็นก่อนวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 420 nm โดยใช้ l-leucine เป็นสารมาตรฐาน

2.3 คำนวณระดับการย่อย (degree of hydrolysis : DH)

คอลลาเจนเปปไทด์ที่ได้นำไปหาระดับการย่อยโดยวิธีของ Benjakul และ Morrissey (1997) ซึ่งคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

$$\text{ระดับการย่อย (\%DH)} = [(L_t - L_0)/(L_{\max} - L_0)] / 100$$

ซึ่งค่า L_t คือปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ที่ได้ปลดปล่อย ณ เวลาที่ t ค่า L_0 คือปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ที่พบในตัวอย่างเริ่มต้นและ ค่า L_{\max} คือปริมาณกรดอะมิโนชนิด α ที่ได้ย่อยโดยสมบูรณ์ในสารละลายกรด HCl เข้มข้น 6 N ที่ 100 °C นาน 12 ชั่วโมง

2.4 วิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE

การวิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE วัดโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ตามวิธีของ Cushman and Cheung (1971) เริ่มการทดลองโดยนำตัวอย่างสารละลาย (40 μ l) ผสมกับสารละลาย phosphate buffer (pH 8.3) จำนวน 100 μ l ซึ่งประกอบไปด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 0.3 M และสาร Hip-His-Leu (HHL) เข้มข้น 6.5 mM หลังจากนั้นนำสารละลาย ACE (เอนไซม์ ACE) จำนวน 20 μ l ผสมกับสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ข้างต้นก่อนนำไปบ่มที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 30 นาที เมื่อทำปฏิกิริยาเสร็จหยุดการทำงานของเอนไซม์โดยเติมสารละลาย HCl เข้มข้น 1 M จำนวน 200 μ l หลังทำปฏิกิริยาจะได้สาร hippuric acid ซึ่งสามารถสกัดออกมาได้ด้วยสารละลาย ethyl acetate (1.5 ml) หลังการสกัดนำตัวอย่างเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 1200 g นาน 15 นาที หลังจากนั้นนำส่วนใสไประเหยสาร ethyl acetate ออกโดยวิธี heat evaporation หลังจากการระเหยนำสาร hippuric acid ที่ได้ละลายน้ำ (3 ml) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (UNICO UV-2102, Shanghai, China) การทดลองทั้งหมดทำอย่างน้อยสามซ้ำ สำหรับค่ากิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE คำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Inhibition activity (\%)} = [(A_a - A_b)/(A_a - A_c)] \times 100\%$$

โดย A_a คือค่าการดูดกลืนแสงที่มีสาร ACE และ HHL แต่ไม่มีตัวอย่างเปปไทด์ A_b คือค่าการดูดกลืนแสงที่มีสาร ACE สาร HHL และตัวอย่างเปปไทด์ A_c คือค่าการดูดกลืนแสงที่มี สาร HHL แต่ไม่มีสาร ACE และตัวอย่างเปปไทด์

2.5 วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ (ABTS radical-scavenging activity)

วิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระแบบ ABTS radical-scavenging activity ทำตามวิธีของ Binsan et al. (2008) เริ่มต้นด้วยการผลิตสารละลาย ABTS โดยการผสมสารละลาย ABTS เข้มข้น 7.4 mM กับสารละลาย potassium persulphate เข้มข้น 2.6 mM นำสารละลายผสมทิ้งไว้ในที่มีตรอกการผลิตอนุมูลอิสระเป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้จำนวน 1 ml ละลายในน้ำ 50 ml หรือจนกว่าได้สารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เท่ากับ 1.1 ± 0.02 เมื่อได้สารละลายที่ต้องการแล้วเริ่มปฏิกิริยาโดยการผสมสารละลายตัวอย่างจำนวน 150 μ l กับสารละลาย ABTS จำนวน 2850 μ l ปล่อยให้มันนิ่งในที่มีดเป็นเวลา 30 นาทีก่อนทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 nm สารละลาย blank คือการใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ใช้ Trolox เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นในช่วง 50 ถึง 600 μ M และรายงานผลในรูปของ μ mol Trolox equivalents (TE)/g protein

2.6 กิจกรรมการจับประจุของอออนเหล็ก (Ferrous chelating activity)

กิจกรรมการจับประจุของอออนเหล็กวิเคราะห์โดยวิธีของ Thiansilakul et al. (2007) นำตัวอย่างไฮโดรไลเสต (200 μ l) ผสมกับน้ำกลั่น (800 μ l) หลังจากนั้นนำสารละลาย $FeCl_2$ เข้มข้น

2.0 mM จำนวน 0.1 ml และสารละลาย ferrozine เข้มข้น 5 mM จำนวน 0.2 ml เติมนลงผสมเข้าด้วยกัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยานาน 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 562 nm ใช้ EDTA (0–1.0 mM) เป็นสารมาตรฐาน ตัวอย่างควบคุมเตรียมด้วยการใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลเสต กิจกรรมการจับประจุของอ็อกซิเจนเหล็กภายในรูปของ $\mu\text{mol EDTA equivalents (EE)/g protein}$

2.7 กิจกรรมต้าน Hydrogen peroxide

กิจกรรมต้าน Hydrogen peroxide ทำตามวิธีของ Wettasinghe and Shahidi (2000) เริ่มโดยการนำสารละลายตัวอย่างจำนวน 1 ml ผสมกับสารละลาย hydrogen peroxide (เตรียมในสารละลาย phosphate buffer เข้มข้น 0.1 M ที่มีค่า pH 7.4) เข้มข้น 100 mM จำนวน 83 μl ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 40 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 230 nm ใช้ Trolox (0–10 mM) เป็นสารมาตรฐานรายงานกิจกรรมต้าน Hydrogen peroxide ในรูปของ $\mu\text{mol TE/g protein}$

2.8 ศึกษาการป้องกันของคอลลาเจนเปปไทด์ในระบบ lecithin liposome

นำ Lecithin ละลายในน้ำที่ปราศจากไอออนที่ความเข้มข้น 8 g/l โดยใช้เครื่อง sonicator (model Transsonic 460/H, Elma, Singen, Germany) หลังจากนั้นเติมตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลเสตจำนวน 3 ml ในสารละลาย lecithin liposome ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 100 และ 1000 ppm นำสารละลายตัวอย่างที่ได้ไป sonicate เป็นเวลา 20 นาที เพื่อเริ่มต้นปฏิกิริยา เติมนสารละลาย cupric acetate (0.15 μM) จำนวน 50 μl ผสมในตัวอย่าง lecithin liposome และเขย่าตลอดเวลาด้วยเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Unimax 1010, Heidolph, Schwabach, Germany) ที่ 37 °C ในภาวะไม่มีแสง การทดลองนี้เปรียบเทียบกับสารต้านอนุมูลอิสระสังเคราะห์คือ Trolox ที่ความเข้มข้น 100 ppm ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมงเพื่อนำไปวิเคราะห์ค่า conjugated diene ค่า peroxide value และค่า TBARS

2.9 วิเคราะห์ค่า peroxide (PV)

ค่า PV วิเคราะห์โดยวิธีของ Wu et al. (2003) นำสารละลาย liposome จำนวน 50 μl ผสมกับสารละลาย ethanol เข้มข้นร้อยละ 75 จำนวน 2.35 ml ตามด้วยสารละลาย ammonium thiocyanate ร้อยละ 30 จำนวน 50 μl สุดท้ายเติมนสารละลาย ferrous chloride เข้มข้น 20 mM ที่ละลายในสารละลาย HCl เข้มข้นร้อยละ 35 จำนวน 50 μl หลังจากนั้นนำผสมตัวอย่างให้เข้ากัน ตั้งไว้ 3 นาทีก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ cumene hydroperoxide เป็นสารมาตรฐาน และรายงานข้อมูลในรูปของ g cumene hydroperoxide/l liposome

2.10 วิเคราะห์หาสาร thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

การวิเคราะห์ค่า TBARS ทำตามวิธีของ Lee and Hendricks (1997) โดยนำตัวอย่าง Liposome จำนวน 0.5 ml ผสมกับสารละลาย TBARS (0.375% thiobarbituric acid, 15% TCA และ 0.25 M HCl) จำนวน 2.5 ml เมื่อส่วนผสมตัวอย่างเข้ากันดีแล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ระหว่างนี้สีชมพูในสารละลายเริ่มเปลี่ยนสี หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นด้วยการแช่น้ำแข็ง ก่อนนำตัวอย่างเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 × g เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 nm ด้วยเครื่อง UV-1601 spectrophotometer สำหรับการเปรียบเทียบสารมาตรฐานใช้ malondialdehyde (MDA) เป็นสารมาตรฐาน และรายงานข้อมูลในรูปของ as g MDA/l liposome

2.11 การวิเคราะห์ความมีเสถียรภาพของไฮโดรไลสในระบบจำลองทางเดินอาหาร

เจลาตินไฮโดรไลสในระดับ DH ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ใช้ทำการศึกษานี้ โดยสภาวะจำลองเป็นแบบ *in vitro* ด้วยวิธีของ Cinq-Mars et al. (2008) เริ่มแรกปรับค่า pH ของตัวอย่าง (จำนวน 15 ml ที่ความเข้มข้นโปรตีนร้อยละ 3) เป็น 2 ด้วยสารละลาย HCl เข้มข้น 6 M เติมเอนไซม์ pepsin (E/S 1:35 w/w) และนำตัวอย่างที่ผสมบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและเขย่าตลอดเวลาด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า (W350, Memmert, Schwabach, Germany) หลังจากนั้นปรับค่า pH ของตัวอย่างเป็น 6.8 ด้วยสารละลาย NaHCO₃ ก่อนปรับค่า pH เป็น 8.2 ด้วยสารละลาย NaOH และเติมเอนไซม์ pancreatin (E/S 1:25 w/w) และนำตัวอย่างที่ผสมบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงและเขย่าตลอดเวลา หยุดปฏิกิริยาด้วยการต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ก่อนนำไปเย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้เหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 × g นาน 15 นาที ก่อนปรับ pH เป็น 7 เพื่อทำการวิเคราะห์กิจกรรมต่างๆ ต่อไป

3 การทำบริสุทธิ์เปปไทด์จากคอลลาเจนไฮโดรไลส

3.1 การแยกส่วนเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระจากเจลาตินไฮโดรไลส

เจลาตินไฮโดรไลสที่เตรียมด้วยสภาวะที่ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระมากที่สุดเป็นตัวอย่างที่ใช้ในการแยกส่วนด้วย gel filtration chromatography นำสารละลายตัวอย่างไฮโดรไลสจำนวน 5 mL (เข้มข้น 500 mg/ml) โหลดลง Sephadex G-15 column (1.5 × 100 cm) (17-0032-01, GE Healthcare Bio-Science AB, Uppsala, Sweden) หลังจากนั้นชะด้วยสารละลาย sodium phosphate buffer (pH 7.0) เข้มข้น 50 mM ที่อัตราเร็ว 0.5 ml/min เก็บส่วนแยกตัวอย่างสารละลายทุกๆ 3 ml และวัดการดูดกลืนแสงที่ 220 และ 280 nm สารมาตรฐานที่ใช้ได้แก่ Insulin chain B (3,496 Da), vitamin B12 (1,355 Da), L-glutathione oxidized (612 Da) และ tyrosine (181 Da) โดยแต่ละส่วนแยกที่ได้นำไปวิเคราะห์กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity

3.2 การวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS โดยใช้เครื่อง HPLC

ตัวอย่างไฮโดรไลเซตที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ AChE ที่มีประสิทธิภาพสูง ถูกนำไป desalt ด้วย C18-Stagetip และวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) ที่ต่ออยู่กับแมสเสปคโตรมิเตอร์รุ่น Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap mass spectrometer โดยเปปไทด์ปริมาณ 200 ng ถูกแยกด้วย C18 reverse phase column (EASY-Spray, Thermo Fisher Scientific) ที่ต่ออยู่กับ nano-electrospray ion source และเครื่องแมสเสปคโตรมิเตอร์ ในการแยกเปปไทด์ Gradient เริ่มต้นจาก 95% solvent A (0.1% formic acid/ 99.9% H₂O) ไปจนถึง 95% solvent B (0.1% formic acid/ 99.9% acetonitrile) โดยใช้เวลาทั้งหมด 90 นาที วิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์หมวลเป็นแบบ data-dependent acquisition โดย Precursor ion ถูกวิเคราะห์ด้วย Orbitrap mass analyzer ที่มี resolution 70,000 โดยทำการตรวจวัดมวลในช่วง 400- 1600 m/z จากนั้น precursor ion ที่มีปริมาณสูงสุด 10 ลำดับแรกถูกส่งไปทำ fragmentation ด้วยวิธี collisionally induced dissociation และ product ion จะถูก scan อย่างต่อเนื่องที่ resolution 17,500 โดยการทดลองทั้งหมดถูกควบคุมด้วยซอฟต์แวร์ Thermo Xcalibur 2.2 ผลการทดลองที่ได้ในรูปแบบ mass spectrum ถูกนำไปแปลผลโดยใช้วิธี MS/MS ion search และ decoy search โดยเปรียบเทียบข้อมูลกับโปรตีนที่มีใน Uniprot KnowledgeBase ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม Actinopterygii โดยอาศัยโปรแกรม Proteome Discoverer 2.2 ที่เชื่อมต่อกับ SEQUEST search engine และเปปไทด์ที่ได้จากการแปลผลจะถูกคัดกรองที่ระดับ false discovery rate เท่ากับ 0.01

4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำในแต่ละปัจจัยที่ศึกษา วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปัจจัยที่ศึกษาด้วยวิธี Tukey's test และวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อประมวลผลทางสถิติ Minitab ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัยและวิจารณ์

ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α

จากการวิเคราะห์ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ของเจลาติน (L_0) เจลาตินที่ถูกย่อยโดย สมบูรณ์ด้วยกรด (L_{max}) และเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและโบรมีเลน (L_t) ของ หน้ปลาเรียวเขียวและหน้ปลาวัวที่ระยะเวลาการย่อยเดียวกัน ใช้ L-leucine เป็นสารมาตรฐาน โดยปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสตของปลาทั้งสองชนิดแสดงดัง ตารางที่ 1 พบว่า L_{max} มีปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α สูงที่สุดเนื่องจากเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์ด้วย กรด ซึ่งปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α บ่งบอกได้ถึงการตัดพันธะหรือการย่อยสลายของโปรตีน สำหรับ ค่า L_0 จะเห็นได้ว่ามีปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α มีค่าต่ำเนื่องจากเป็นเจลาตินที่ไม่ได้ถูกย่อยด้วยกรด หรือเอนไซม์ใด ๆ จึงส่งผลให้พบปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α น้อย ส่วนค่า L_t พบว่าทั้งเอนไซม์ โบรมีเลนและเอนไซม์ปาเปนเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นส่งผลให้มีปริมาณกลุ่มอะมิ โนชนิด α มากขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากเมื่อปริมาณเอนไซม์มากขึ้นมีโอกาสจับกับสับเสตรทได้มาก ขึ้น ส่งผลให้มีการย่อยที่มากกว่าจึงตรวจวัดปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ได้มาก และเนื่องมาจาก เอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์โบรมีเลนเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอส (Protease) ซึ่งสามารถตัด พันธะเปปไทด์ในโมเลกุลของโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์ที่สั้นลง (Kristinsson & Rasco, 2000) และเป็นเอนไซม์ที่มีลักษณะการตัดสายยาวของโพลีเปปไทด์แบบเอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในโซ่โมเลกุลของโปรตีนได้เป็น เปปไทด์สายสั้น ๆ และมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนสูงเนื่องจากมีความจำเพาะต่อสับเสตรทที่เป็นเปปไทด์โมเลกุลใหญ่หลายชนิดทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547)

เมื่อเปรียบเทียบเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนที่อัตราส่วนระหว่างเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น เท่ากันพบว่า ปาเปนสามารถผลิตปริมาณอะมิโนชนิด α ได้มากกว่า บ่งชี้ถึงความสามารถในการย่อย สลายสารตั้งต้นอย่างจำเพาะ ซึ่งเอนไซม์ปาเปนถือเป็นเอนไซม์ glycy endopeptidase ที่จำเพาะ ต่อการย่อยโปรตีนที่ตำแหน่งที่พบกรดอะมิโน glycine มาก โดยเฉพาะเจลาตินมีกรดอะมิโนชนิดนี้ มาก จึงสามารถย่อยโปรตีนสายใหญ่ให้สั้นลงได้ดี เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยหน้ปลา เรียวเขียวและหน้ปลาวัวด้วยเอนไซม์ปาเปนพบว่า หน้ปลาวัวมีความจำเพาะต่อเอนไซม์มากกว่า หน้ปลาเรียวเขียว สาเหตุดังกล่าวอาจเกิดจากลำดับกรดอะมิโนในตัวอย่างแต่ละชนิด และ ความจำเพาะระหว่างเอนไซม์และสารตั้งต้น ดังนั้นเอนไซม์ปาเปนจึงเหมาะสมสำหรับใช้ย่อยเจลาติน เพื่อให้ได้โปรตีนสายสั้น

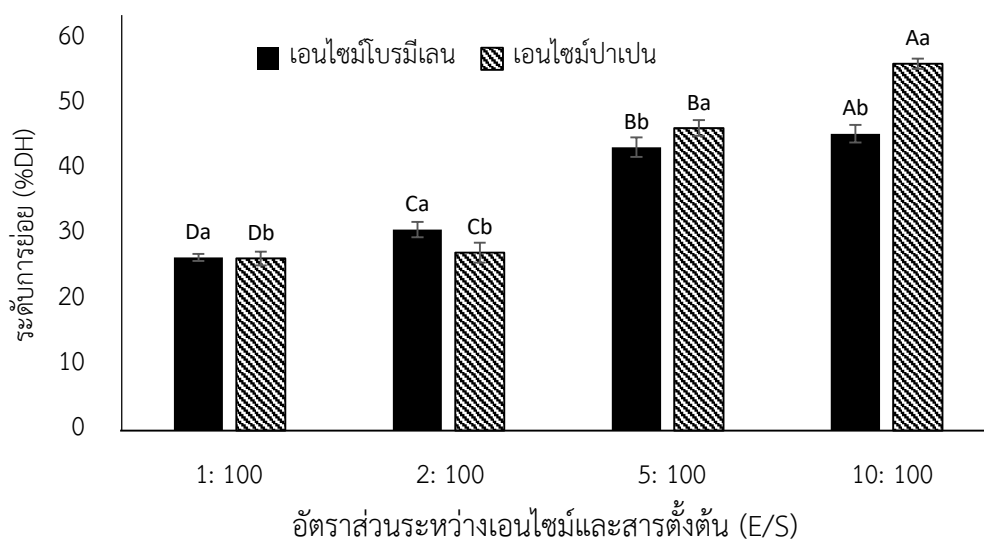
ตารางที่ 1 ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α

ตัวอย่าง	ปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ในหน่วย mM (Mean \pm SD)	
	หนังปลาเรียวเขียว (R)	หนังปลาหัว (U)
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์โบรมีเลน อัตราส่วน 1: 100 (E/S)	36.92 \pm 0.22	34.28 \pm 0.37
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์โบรมีเลน อัตราส่วน 2: 100 (E/S)	42.75 \pm 1.66	52.57 \pm 0.33
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์โบรมีเลน อัตราส่วน 5: 100 (E/S)	58.79 \pm 0.09	52.21 \pm 0.83
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์โบรมีเลน อัตราส่วน 10: 100 (E/S)	62.80 \pm 0.49	70.13 \pm 0.83
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน อัตราส่วน 1: 100 (E/S)	36.67 \pm 0.37	39.39 \pm 0.80
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน อัตราส่วน 2: 100 (E/S)	37.91 \pm 0.21	59.57 \pm 3.48
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน อัตราส่วน 5: 100 (E/S)	64.03 \pm 1.16	75.71 \pm 2.31
เจลาตินย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน อัตราส่วน 10: 100 (E/S)	77.47 \pm 1.84	86.93 \pm 2.65

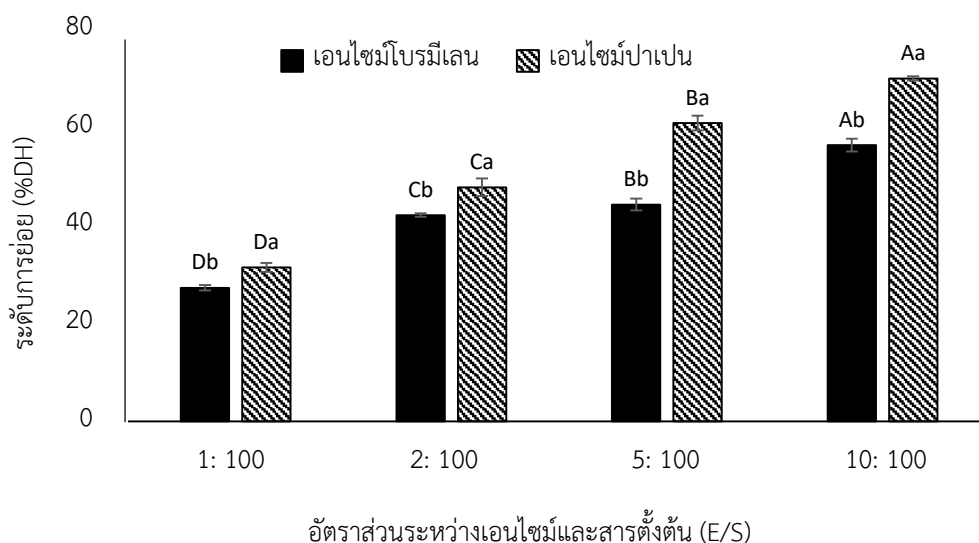
ผลของระดับอัตราส่วนเอนไซม์ต่อสารตั้งต้น (E/S) ต่อระดับการย่อย (degree of hydrolysis: DH)

เมื่อนำปริมาณกลุ่มอะมิโนชนิด α ของแต่ละตัวอย่างมาคำนวณในสมการระดับการย่อยเพื่อหาปริมาณเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อย 10 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณอัตราส่วนของเอนไซม์โบรมีเลนและเอนไซม์ปาเปนต่อสารตั้งต้นที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระดับการย่อยมีประสิทธิภาพมากขึ้นทั้งตัวอย่างเจลาตินหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาหัว ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Baek and Cadwallader (1995) ที่กล่าวว่าเมื่อใช้เอนไซม์เพิ่มมากขึ้น ค่าระดับการย่อยสลายก็จะมากขึ้นจนถึงระดับหนึ่งค่าระดับการย่อยสลายจะค่อย ๆ คงที่ ทั้งนี้เนื่องมาจากการใช้เอนไซม์มากขึ้น ทำให้โอกาสที่เอนไซม์จะจับกับโมเลกุลของโปรตีนมีมากขึ้น จึงทำให้เกิดการย่อยสลายเพิ่มขึ้น และเมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยของเอนไซม์แต่ละชนิดต่อการย่อยเจลาติน ระดับการย่อยของเอนไซม์โบรมีเลนและเอนไซม์ปาเปนของเจลาตินหนังปลาเรียวเขียวพบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เอนไซม์โบรมีเลนที่ความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ กาญจนภาพร นนทะลุน และ อาภัสสร ศิริจริยวัตร (2561) ที่

ศึกษาการใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ปาเปนและโบรมีเลนที่มีต่อความนุ่มของเนื้อ พบว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนทำให้เนื้อนุ่มกว่าการใช้เอนไซม์โบรมีเลนที่ความเข้มข้นเดียวกัน เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะในการย่อยโปรตีนมากกว่าเอนไซม์โบรมีเลนและเอนไซม์ปาเปนมีค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสมากกว่าเอนไซม์โบรมีเลนที่ความเข้มข้นเดียวกัน โดยเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์โบรมีเลนมีกลไกการทำงานแบบ Salfydryl protease หรือ Cryteine protease เอนไซม์กลุ่มนี้จัดเป็น Neutral protease มี pH ที่เหมาะสมในช่วง 6.0-7.5 เป็นพวกเอนโดเปปติเดสมีอนุโมลซัลไฟดริลอยู่ที่บริเวณเร่ง ถูกยับยั้งโดยสารที่เรียกว่า Sulfhydryl reagents (Silverstain & Kazdy, 1795) และจะสังเกตเห็นว่าแม้ที่ความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ำยังสามารถย่อยโปรตีนได้ดีในระดับหนึ่ง เนื่องจากเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์โบรมีเลนเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อพันธะเปปไทด์ จึงทำให้สามารถย่อยโปรตีนได้



ภาพที่ 1 เปรียบเทียบความแตกต่างของเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนต่อระดับการย่อยต่าง ๆ ของเจลลาตินหนังปลาเรียวเขียว



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบความแตกต่างของเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนต่อระดับการย่อยต่าง ๆ ของ เจลาตินหนังกปลาวัว

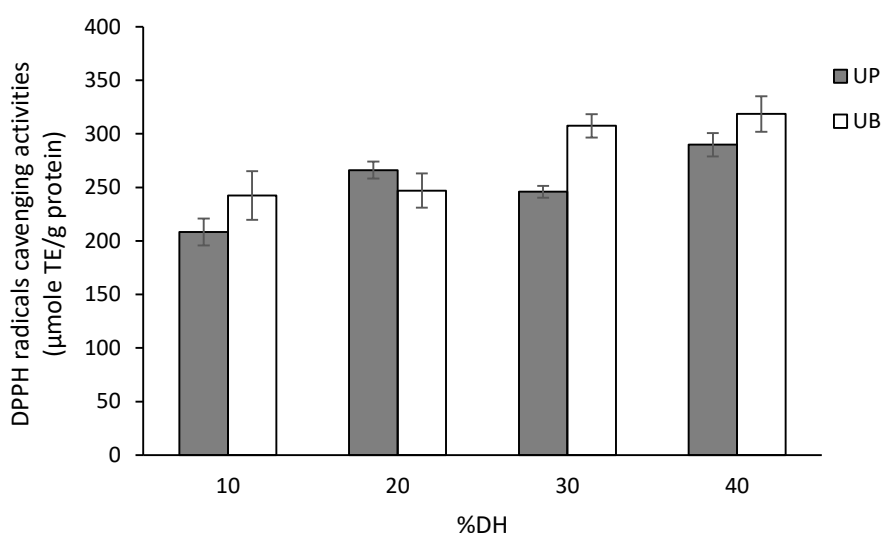
เมื่อทำการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับระดับการย่อย (DH) ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลเป็นแบบ exponential จะสามารถใช้สมการเส้นตรงจากกราฟเพื่อคำนวณหรือใช้ในการหาความเข้มข้นของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อยที่ต้องการได้ พบว่าถ้าต้องการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ระดับการย่อย 10, 20, 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ การผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากเจลาตินหนังกปลาวัวเขียวโดยใช้เอนไซม์โบรมีเลน ต้องใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่ระดับ 0.16, 0.50, 1.52 และ 4.63 ต่อ 100 (E/S) ตามลำดับ ส่วนการใช้เอนไซม์ปาเปนต้องใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่ระดับ 0.40, 0.81, 1.78 และ 3.38 ต่อ 100 (E/S) ตามลำดับ และถ้าต้องการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังกปลาวัวโดยใช้เอนไซม์โบรมีเลนต้องใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่ระดับ 0.20, 0.43, 1.04 และ 2.52 ต่อ 100 (E/S) ตามลำดับ ส่วนการใช้เอนไซม์ปาเปนต้องใช้อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่ระดับ 0.24, 0.44, 0.80 และ 1.47 ต่อ 100 (E/S) ตามลำดับ จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นได้ว่าการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังกปลาวัวเขียวเมื่อใช้เอนไซม์โบรมีเลนจะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์ปาเปนที่ระดับการย่อยเดียวกัน กล่าวได้ว่าเอนไซม์โบรมีเลนมีประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินหนังกปลาวัวเขียวมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์น้อย ๆ ส่วนการผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังกปลาวัวเมื่อใช้เอนไซม์ปาเปนจะใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์โบรมีเลนให้ได้ระดับการย่อยเดียวกัน กล่าวได้ว่าเอนไซม์ปาเปนมีประสิทธิภาพในการย่อยเจลาตินหนังกปลาวัวมากกว่า ที่เป็นเช่นนี้อาจขึ้นอยู่กับขนาดและลำดับกรดอะมิโนเริ่มต้น ความยาวของสายโซ่ที่ต่างกัน เป็นต้น ซึ่งการย่อยของแต่ละ

เอนไซม์แตกต่างกัน จึงส่งผลทำให้ผลการย่อยที่ได้แตกต่างกันด้วย โดยเอนไซม์โบรมีเลนมีจุดตัดกว้าง จำเพาะกับตำแหน่งกรดอะมิโนไลซีน อะลานีน ไทโรซีน โกลซีน และแอสพาราจีน (Silverstain & Kezdy, 1975) ทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ในโมเลกุลโปรตีน ส่วนเอนไซม์ปาเปนชอบย่อยที่ตำแหน่งกรดอะมิโนแอสพาราจีน โกลซีน กลูตามีน และกรดแอสพาดิก (สุรพงษ์ พิณีกลาง และคณะ, 2555)

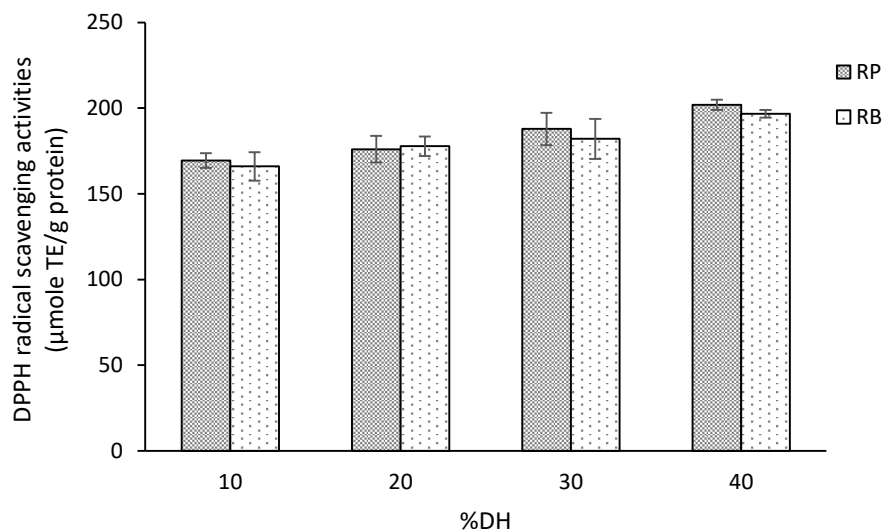
ผลการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสต

ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธีทดสอบกับอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์โบรมีเลนและเอนไซม์ปาเปนที่ระดับการย่อยต่าง ๆ จากการสกัดหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาหัว ดังแสดงในภาพที่ 3 และ 4 โดยเทียบความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่ระดับการย่อยต่าง ๆ ของตัวอย่างกับความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox ถ้าระดับการย่อยนั้น ๆ มีค่าการต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่ากับการใช้สารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้นมาก บ่งบอกได้ว่าที่ระดับการย่อยนั้น ๆ มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH มาก จากผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเจลาตินควบคุม หรือตัวอย่างเจลาตินที่ไม่ได้ถูกไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ มีค่าที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ เนื่องจากตัวอย่างเจลาตินที่มีสายยาว ขนาดใหญ่ มักตกตะกอนในสถานะที่มีแอลกอฮอล์ จะทำให้เกิดการสลายละลายขึ้น ดังคำกล่าวของ สินีนาถ สุขไกว (2555) ที่กล่าวว่าตัวทำละลายอินทรีย์เช่นแอลกอฮอล์ จะเกิดพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีน ทำให้โปรตีนละลายน้ำได้น้อยลงและตกตะกอน ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มีค่ามาก จึงไม่สามารถบ่งบอกถึงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ได้ จากผลการทดลองของเจลาตินที่ย่อยด้วยเอนไซม์พบว่าที่ระดับการย่อยของเจลาตินทั้งสองชนิดที่ระดับ 40% มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงที่สุด ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yang et al. (2008) ที่กล่าวว่าขนาดโมเลกุลเปปไทด์ที่มีน้ำหนักน้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าโมเลกุลเปปไทด์ที่มีน้ำหนักมาก จึงมีกรดอะมิโนปลายสายที่ทำหน้าที่ทางชีวภาพมากขึ้น ส่งผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่าง ๆ เจลาตินหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาหัวที่ไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์โบรมีเลนพบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปน ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากโบรมีเลนสามารถย่อยโปรตีนจนได้ลำดับและขนาดของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ที่เหมาะสมได้ โดยสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของเปปไทด์มีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโน โครงสร้างและการเป็น hydrophobicity ของสายเปปไทด์ (Davalos et al., 2004) เพราะฉะนั้นการใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกันในการย่อยจึงส่งผลให้เกิดความแตกต่างของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและการใช้เจลาตินที่แตกต่างกันก็มีผลเช่นเดียวกัน ความยาวของสายโปรตีนและลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน มีผลต่อฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน ดังที่งานวิจัยของ Aleman et al. (2011) กล่าวว่าไว้ว่าตำแหน่งการมีอยู่ของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์มีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างของเปป

ไทด์ยังมีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในระบบต่าง ๆ และพบว่าเจลาตินหนังปลาวัวยี่ย่อยด้วยเอนไซม์โบรมีเลนมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH สูงสุดที่ระดับการย่อย 40 โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jamdra et al. (2010) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงด้วยเอนไซม์อัลคาเลส พบว่าเมื่อระดับการไฮโดรไลเสตของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากถั่วลิสงมีระดับสูงขึ้นไปถึงระดับหนึ่ง ประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของโปรตีนไฮโดรไลเสตก็จะคงที่ ซึ่งกลไกการยับยั้งกิจกรรมของอนุมูลอิสระโดยเปปไทด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างถ่องแท้แต่หลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านี้ยับยั้งการเกิด lipid peroxidation การต้านอนุมูลอิสระและการจับโลหะหนักทรานซิชัน (Kim et al., 2001)



ภาพที่ 3 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวยี่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมีเลน (UB)

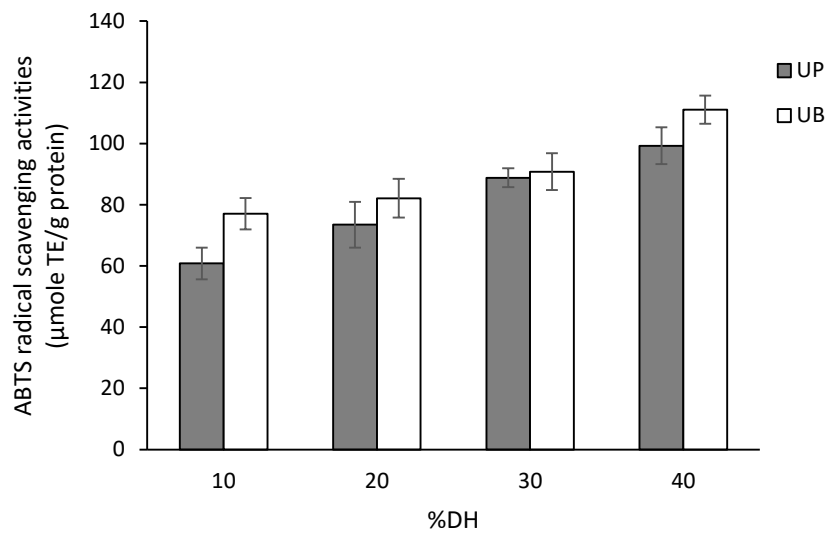


ภาพที่ 4 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วย เอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

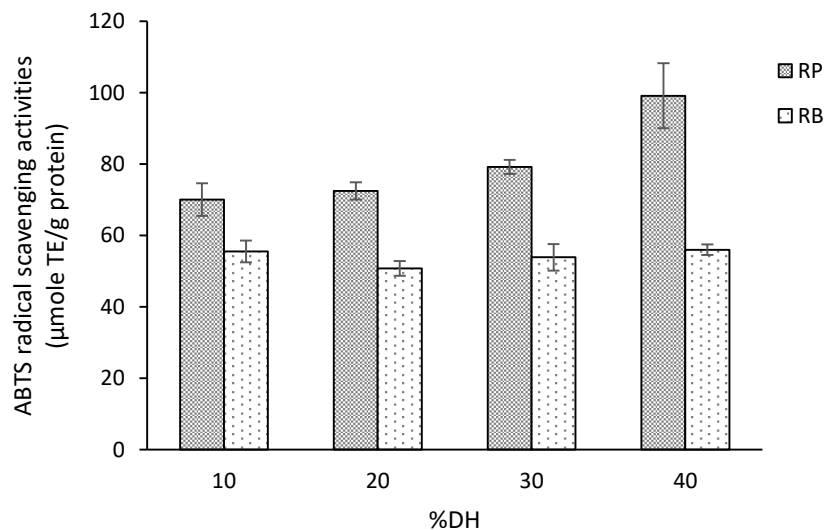
ผลการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสต

ค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลเสตด้วย เอนไซม์โบรมิเลนและเอนไซม์ปาเปนที่ระดับการย่อยต่าง ๆ จากหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาหัว ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6 จากการศึกษาความสามารถในการต้านออกซิเดชันด้วยการเกิด สารประกอบเชิงซ้อนกับอนุมูล ABTS (Binsan et al., 2011) ที่ระดับการย่อยต่าง ๆ พบว่า ตัวอย่าง เจลาตินไฮโดรไลเสตของหนังปลาทั้งสองชนิดที่ระดับการย่อย 40 เปอร์เซ็นต์ทั้งที่ย่อยด้วยเอนไซม์ โบรมิเลนและเอนไซม์ปาเปนมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากที่สุด ($P < 0.05$) ระดับการย่อยที่ มากทำให้เกิดเปปไทด์ที่มีทั้งขนาดและกรดอะมิโนที่เหมาะสมในการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ได้มากที่สุด และพบว่าเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้การต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากขึ้น ซึ่งผล สอดคล้องกับงานวิจัยของ สินีนาถ สุขไกว (2555) ที่กล่าวว่าค่าความสามารถดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นโดย สัมพันธ์กับค่าระดับการย่อยสลาย ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยโมเลกุลของเจลาตินด้วยเอนไซม์ทำให้ได้เปป ไทด์ซึ่งมีขนาดโมเลกุลและลำดับกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าความแตกต่างของตัวอย่างเจลาตินมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระ โดยพบว่าเจ ลาดินจากเรียวเขียวมีการต้านอนุมูลอิสระ ABTS น้อยกว่าหนังปลาหัว อาจเกิดจากลำดับกรดอะมิโน ที่แตกต่างกันทำให้มีความสามารถในการออกฤทธิ์ยับยั้งต่างกัน และความแตกต่างของเอนไซม์มีผล ต่อการต้านอนุมูลอิสระ Khantaphant and Benjakul (2008) กล่าวว่าความแตกต่างของ ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของไฮโดรไลเสตที่เอนไซม์ต่างชนิดกันที่ระดับการย่อยสลาย ต่างกัน เกิดจากการที่ไฮโดรไลเสตมีกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบ ลำดับของกรดอะมิโนและความ

ยาวสายโซ่ที่ต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปไฮโดรไลสจะประกอบไปด้วยเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถให้ไฮโดรเจนและทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระทำให้เกิดสารที่มีความคงตัว ซึ่งทำให้หยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลนั้นได้



ภาพที่ 5 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

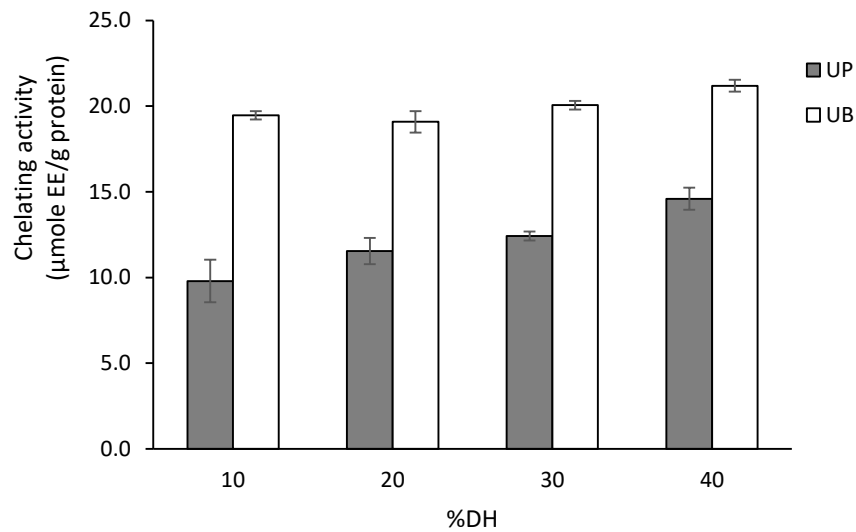


ภาพที่ 6 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลสจากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

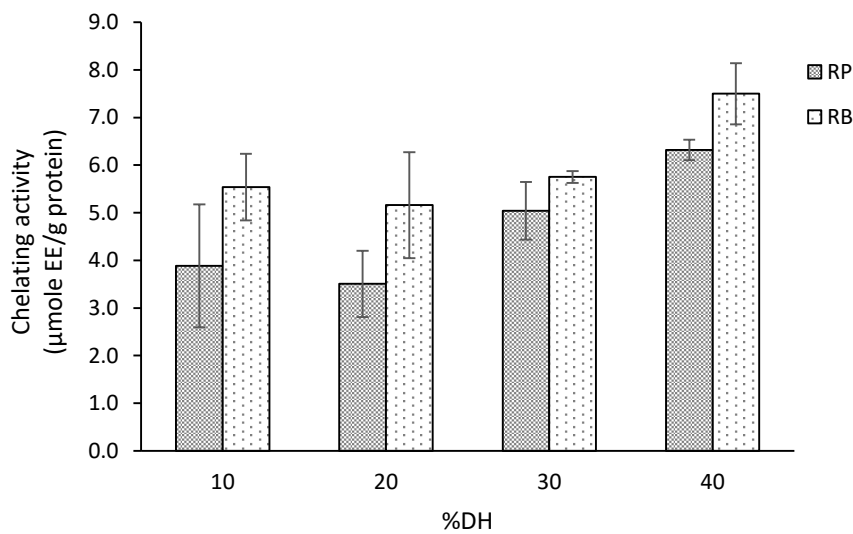
อนุมูลอิสระเป็นสารที่ประกอบด้วยอิเล็กตรอนเดี่ยว 1 ตัว หรือมากกว่า ซึ่งถูกสร้างขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ ถ้าไม่ถูกยับยั้งโดยสารต้านอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระจะทำลายเซลล์และทำให้การทำงานของเอนไซม์ที่สำคัญเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจไปทำลายไซโตพลาสซึมและอวัยวะเล็ก ๆ ในเซลล์และอาจขัดขวางการซึมผ่านของสารอาหารต่าง ๆ เข้าสู่เซลล์ ทำให้เซลล์ตายได้ จากงานวิจัยมากมายพบว่า อนุมูลอิสระมีผลต่อการเสื่อมสภาพของเซลล์และการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ (ประสงค์ เทียนบุญ, 2553) ดังนั้นสารต้านอนุมูลอิสระส่งผลทำให้ลดการเกิดโรคเรื้อรังต่าง ๆ เช่นโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน เป็นต้น ซึ่งพบว่าโรคนี้เกี่ยวข้องกับความดันโลหิตสูงเช่นกัน

กิจกรรมการจับของไอออนเฟอร์รัส

กิจกรรมการจับของไอออนเฟอร์รัสของเจลาตินไฮโดรไลเสตทั้งสองแหล่งหลังย่อยด้วยเอนไซม์แสดงในภาพที่ 7 และ 8 แสดงให้เห็นว่ามีจับโลหะเพิ่มขึ้นเมื่อ DH เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) โดยพบว่ากิจกรรมของเจลาตินไฮโดรไลเสตหนึ่งปลาวัวมีค่ามากกว่าของปลาเรียวเขี้ยวอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) เมื่อเทียบ DH เดียวกันใช้เอนไซม์โบรมิเลนสามารถจับโลหะรูป 3 บวกได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนบางรายงานวิจัยแสดงถึงกิจกรรมการจับโลหะของโปรตีนสายสั้น ขึ้นอยู่กับความแตกแยกของลำดับกรดอะมิโนในเปปไทด์ (Kittiphattanabawon et al. 2012) ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มความสามารถในการจับไอออนโลหะ เช่น การมีของกลุ่มอะมิโนกลุ่มอะโรเมติก Hyp, Pro, Ala หรือ Gly ตรงส่วนปลาย N-terminus ของเปปไทด์จะมีความสามารถในการจับไอออนโลหะมากขึ้น (Mendis et al. 2005; . 2010; Kittiphattanabawon และคณะ 2012) ความสำคัญของความสามารถในการจับโลหะนั้นเป็นเพราะว่าการพบโลหะทรานซิชันในอาหารจะเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมการเกิดออกซิเดชันของไขมัน (Klompong et al. 2007) ดังนั้นเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มี % DH สูงกว่าสามารถทำหน้าที่เป็นสารจับโลหะซึ่งสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในอาหารได้



ภาพที่ 7 กิจกรรมการจับโลหะของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

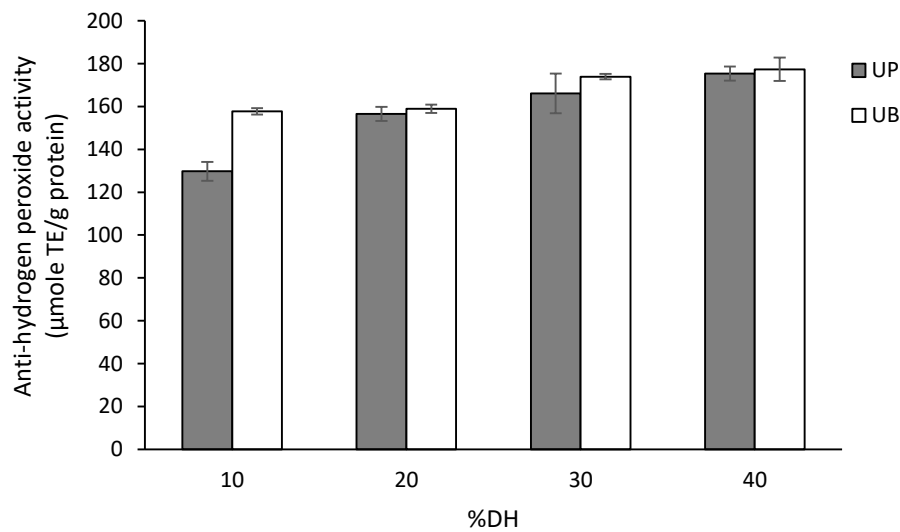


ภาพที่ 8 กิจกรรมการจับโลหะของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเซียวย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

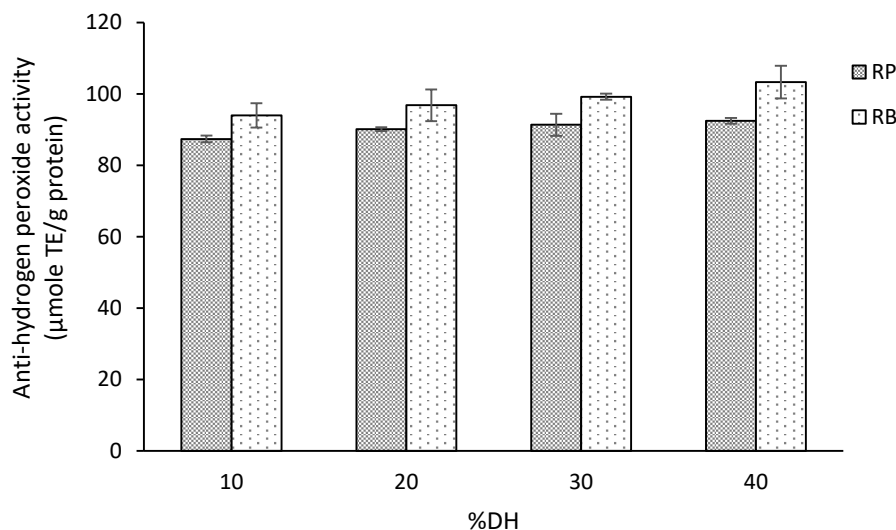
กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินไฮโดรไลเสต

ผลการทดสอบฤทธิ์ป้องกันสารอนุมูลอิสระไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยและปลาเรียวเซียวย่อยแสดงในภาพที่ 9 และ 10 ที่ระดับ DH สูง เจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวย่อยและปลาเรียวเซียวย่อยแสดงในภาพที่ 9 และ 10 ที่ระดับ DH สูง

โตรีไลเสตสามารถยับยั้งอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ดีกว่าในระดับ DH ต่ำ ($P \leq 0.05$) และการใช้เอนไซม์โบรมิเลนย่อยตัวอย่างเจลาตินจากหนังปลาทั้งสองชนิดมีค่ายับยั้งอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เจลาตินโตรีไลเสตที่ระดับ DH 40 มีค่ายับยั้งอนุมูลไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากที่สุด ($P < 0.05$)



ภาพที่ 9 กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินโตรีไลเสตจากหนังปลาที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)



ภาพที่ 10 กิจกรรมการต้านไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากหนังปลาเรียวเขียวที่
ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

กลไกในการยับยั้งกิจกรรมของอนุมูลอิสระโดยเปปไทด์ยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างถ่องแท้ แต่หลายการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเปปไทด์เหล่านั้นโดยการยับยั้งการเกิด lipid peroxidation การต้านอนุมูลอิสระและการจับโลหะหนักทรานซ์ซัน บางการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเปปไทด์จากเจลาตินสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ดีกว่าเปปไทด์จากโปรตีนแหล่งอื่น (Kim et al., 2001) นอกจากนี้เปปไทด์จากแหล่งคอลลาเจนสามารถป้องกันเซลล์จากอนุมูลอิสระที่เป็นตัวการทำลายเซลล์ ซึ่งการขจัดสารอนุมูลอิสระเป็นกลไกสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อรักษาเซลล์จากการเกิดการ oxidation จนทำให้เซลล์ตาย Kim et al. (2001) รายงานถึงเปปไทด์ที่แยกได้จากเจลาตินหนังปลา Alaska Pollack ว่า สามารถปกป้องเซลล์ตับหนูทดลองจากการทำร้ายโดย organic hydroperoxide t-BHP ที่เป็นตัวเร่งการเกิด oxidation ในงานวิจัยอื่นที่คล้ายคลึงกัน เปปไทด์จากเจลาตินหนังหมีก็มีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพป้องกันเซลล์ fibroblasts ของปอดมนุษย์จาก t-BHP-induced cytotoxicity (Mendis et al., 2005) นอกจากนี้ เจลาตินเปปไทด์ที่แยกได้จากหนังปลา hoki สามารถส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อย่างเอนไซม์ glutathione peroxidase เอนไซม์ catalase และ เอนไซม์ superoxide dismutase ในเซลล์ hepatoma ของมนุษย์ (Mendis et al., 2005)

ไม่เพียงแต่การมีองค์ประกอบของชนิดกรดอะมิโนเท่านั้น ตำแหน่งการมีอยู่ของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ยังมีบทบาทสำคัญในการทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ โครงสร้างของเปปไทด์ยังมีอิทธิพลต่อการยับยั้งการเกิด oxidation ในระบบต่างๆ รวมถึงกลไกการทำงานร่วมหรือการขัดขวางกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการวางลำดับและตำแหน่งของกรดอะมิโน และอย่างที่กล่าวไว้ตอนต้น

ความจำเพาะต่อการตัดเปปไทด์ด้วยเอนไซม์จะส่งผลต่อระดับการย่อยและขนาดของเปปไทด์ที่ได้ จนเป็นผลในการต้านอนุมูลอิสระ ในบางงานวิจัยพบว่าการใช้เอนไซม์ alcalase ผลิตเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะได้ผลผลิตที่มีฤทธิ์ดีกว่าการใช้เอนไซม์อื่นๆ อย่าง เอนไซม์ collagenase, เอนไซม์ pepsin, เอนไซม์ trypsin, เอนไซม์ chymotrypsin หรือ เอนไซม์ neutrase (Alemán et al., 2011a; Qian et al., 2008) นอกจากนี้ขนาดของโมเลกุลเปปไทด์ที่มีน้ำหนักน้อยจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมาก บางรายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่าเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาตาเดียวที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 700 Da มีฤทธิ์ต้านการเกิด oxidation ที่สูงกว่าเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีน้ำหนักโมเลกุลเปปไทด์มาก (Yang et al., 2008)

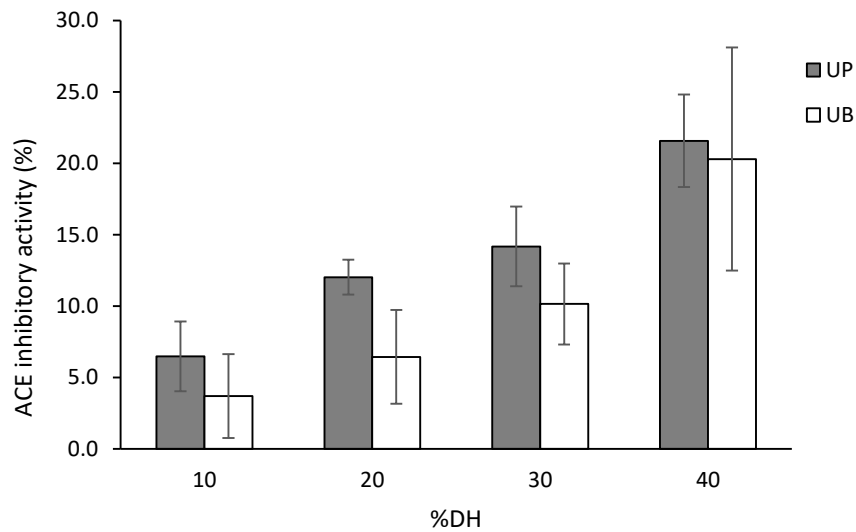
ผลการยับยั้งเอนไซม์ ACE

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การยับยั้ง ACE ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาทั้งสองชนิดที่ระดับ DH ต่างกัน พบว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยในระดับ DH สูง เป็นการเพิ่มกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE ดังนั้น ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับระดับ DH ซึ่งตัวอย่างเจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีค่า DH แสดงถึงการมีขนาดโมเลกุลที่เล็กลงหรือเป็นเปปไทด์สายสั้น ซึ่งตัวอย่างเจลาตินจากหนังปลาวัวมีการยับยั้งเอนไซม์ ACE มากกว่า ($P < 0.05$) หนังปลาเรียวเซียที่ระดับ DH เท่ากัน เมื่อเทียบตัวอย่างหนังปลาวัวกันระดับ DH เดียวกัน พบว่า การใช้เอนไซม์ปาเปนผลิตเจลาตินไฮโดรไลเสตมีฤทธิ์ต้านกิจกรรม ACE ได้ดีกว่าการใช้เอนไซม์โบรมิเลน ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามการเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาเรียวเซียโดยใช้เอนไซม์ปาเปนหรือเอนไซม์โบรมิเลนได้ไฮโดรไลเสตมีฤทธิ์ต้านกิจกรรม ACE ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$)

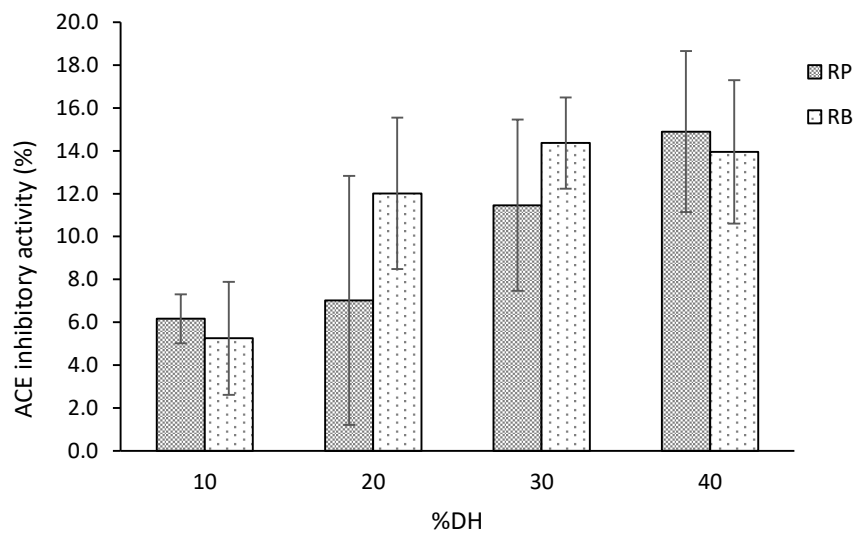
จากการศึกษาวิจัยอื่น ๆ พบว่าผลมีแนวโน้มไปทางเดียวกัน โดยเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่มีสายสั้นและมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่น้อยจะเหมาะสมและเจาะจงต่อ active site ของเอนไซม์ ACE มากกว่าเปปไทด์สายยาวขนาดใหญ่หรือยิ่งระดับการย่อยมากส่งผลให้การยับยั้งเอนไซม์ ACE มากขึ้น จากงานวิจัยของ Ondetti and Cushman (1982) กล่าวว่าลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์มีอิทธิพลต่อการจับกับเอนไซม์ ACE ซึ่งจำเพาะต่อ active site ของเอนไซม์ โดยเอนไซม์ ACE เลือกที่จะจำเพาะต่อสารตั้งต้นหรือสารยับยั้งที่มีหมู่กรดอะมิโนไม่ชอบน้ำ รวมถึงหมู่ aromatic และ branched side chain ตรงปลายสายด้าน C-terminal (Cheung et al., 1980; Murray & FitzGerald, 2007) ดังนั้นการใช้เอนไซม์และเจลาตินที่ต่างชนิดกัน น่าจะส่งผลให้ผลการยับยั้งเอนไซม์ ACE แตกต่างกันด้วย การยับยั้งเอนไซม์ ACE ในร่างกายนั้นสำคัญ เนื่องจาก ACE ทำให้หลอดเลือดหดตัวทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น และกระตุ้นการหลั่งสาร aldosterone ทำให้มีการดูดซึมเกลือโซเดียมกลับเข้าร่างกายที่บริเวณไต การยับยั้งเอนไซม์ ACE จะส่งผลทำให้หลอดเลือดจะ

ขยายตัวออก ทำให้ความดันโลหิตลดลง และยังชลอการเสื่อมของไต ดังนั้นการย่อยเจลาตินด้วย เอนไซม์ปาเปนที่ระดับ DH สูงสามารถยับยั้งภาวะความดันโลหิตสูงได้

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระมีผลต่อภาวะความดันโลหิตสูงจากวารสารพิษวิทยาไทยของ กนกวรรณ จารุกัจจร, วิไลดา สินทร์ และ ชรินทร์ญา พิมพ์สอน (2557) เรื่องความสัมพันธ์ของภาวะเครียดออกซิเดชันและภาวะไขมันในเลือดสูง กล่าวว่าภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากความไม่สมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์ในร่างกาย คือมีปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าอนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งของโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง อาทิ โรคเบาหวาน โรคไขมันในเลือดสูง โดยโรคเหล่านี้เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง ภาวะเครียดออกซิเดชันเกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับระบบต้านออกซิเดชันในร่างกาย ส่งผลให้อีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งผลต่อภาวะความดันโลหิตสูง เปปไทด์หรือไฮโดรไลเสตจากคอลลาเจนและเจลาตินผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ทางการค้าต่างๆ ได้นำมาใช้ในการผลิตเปปไทด์ซึ่งได้แก่ trypsin, chymotrypsin, pepsin, alcalase, properase E, pronase, collagenase, bromelain และ papain (Kim et al., 2001b; Lin and Li, 2006; Mendis et al., 2005a; Yang et al., 2008) นอกจากนี้การใช้เอนไซม์จากไส้ปลาก็นิยมนำมาศึกษาเพื่อผลิตไฮโดรไลเสต (Jung et al., 2005; Phanturat et al., 2010) เอนไซม์โปรติเอสมีความจำเพาะต่อการย่อยโปรตีนต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีน องค์ประกอบของกรดอะมิโนอิสระ รวมถึงลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ด้วย และนั่นนำไปสู่การทำงานเชิงหน้าที่ของเปปไทด์ที่ได้ (Wu et al., 2003) เอนไซม์ Alcalase เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่นิยมกันมากในงานวิจัยหลายๆ เรื่อง เอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์นี้เป็นที่นิยมเนื่องจากการย่อยโปรตีนให้ได้ระดับการย่อยที่สูง และไม่มีความจำเพาะว่าจะเลือกย่อยโปรตีนชนิดไหน นอกจากนี้ยังใช้เวลาที่สั้นภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง (Benkajul & Morrissey, 1997) เอนไซม์นี้ได้นำไปใช้ในการย่อยหนังปลา Alaska Pollack, ปลาหมึก squid *Todarodes pacificus* และปลาหมึก giant squid เพื่อผลิตเป็นไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กและให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่สูงอีกด้วย (Giménez et al., 2009; Nam et al., 2008) ดังนั้นเจลาตินไฮโดรไลเสตจึงเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการออกซิเดชันและความดันโลหิตได้



ภาพที่ 11 กิจกรรมการต้านเอนไซม์ ACE ของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)



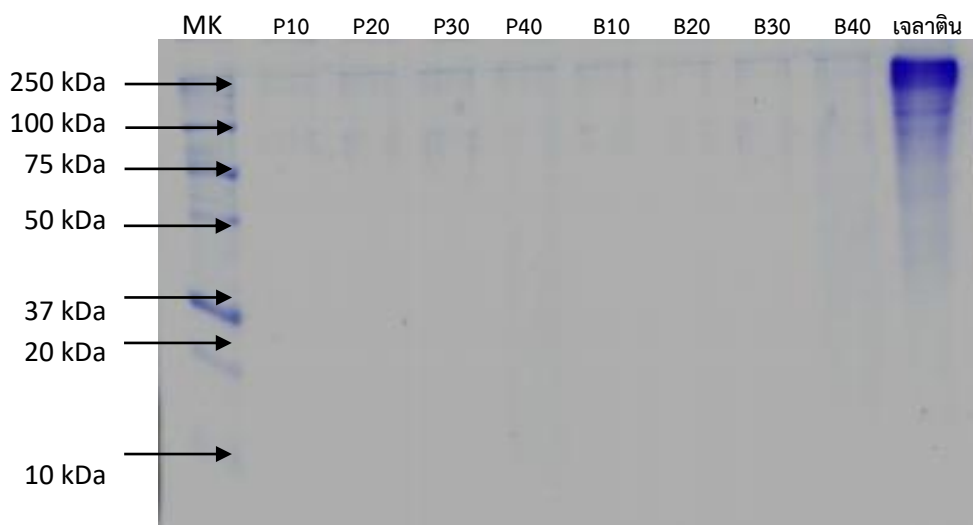
ภาพที่ 12 กิจกรรมการต้านเอนไซม์ ACE ของเจลาตินไฮโดรไลสได้จากหนังปลาเรียวเขียวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB)

รูปแบบโปรตีนโดยการวิเคราะห์ SDS-PAGE

รูปแบบของโปรตีนที่วิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE ภายใต้สภาวะ reducing ของตัวอย่างเจลาตินและเจลาตินไฮโดรไลสที่สกัดได้จากหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาวัวที่ไม่ผ่านและผ่านการ

ย่อยด้วยเอนไซม์ พบว่าเจลาตินหนังปลาเรียวเขียวที่ไม่ได้ผ่านการย่อย (เจลาตินเริ่มต้น) ไม่ปรากฏแถบแบนของโปรตีนที่เด่นชัด บ่งบอกถึงการสกัดเจลาตินที่ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอ ทำให้ได้โปรตีนขนาดโมเลกุลที่เล็ก เจลาตินเป็นสายพอลิเมอร์ของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ต่อกันเป็นสายยาว มีน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 15 ถึง 300 กิโลดาลตัน และ เจลาตินประกอบไปด้วยโปรตีนที่มีสายโซ่แบบ สายแอลฟา (α_1 and α_2 chain ~116 kDa) สายเบต้า (β chain ~200 kDa) และสายแกมมา (γ chain) (Hung et al., 2004) ดังนั้นควรมีแถบของเจลาตินปรากฏขึ้นบนแผ่นเจล ที่ไม่ปรากฏแถบนั้นอาจเนื่องมาจากเจลาตินที่สกัดจากหนังปลาเรียวเขียวเกิดการปนเปื้อนของเอนไซม์ ขณะที่ทำการทดลองจึงทำให้เกิดการย่อยสลายไปจนได้โมเลกุลขนาดเล็กจนไม่ปรากฏแถบแบนหรืออาจเกิดจากการสกัดที่ไม่เหมาะสม เมื่อเทียบกับเจลาตินหนังปลาวัวที่ไม่ได้ผ่านการย่อยพบว่าปรากฏแถบแบนของโปรตีนที่ชัดเจน บ่งบอกถึงความเป็นเจลาตินที่ชัดเจน และพบว่าเอนไซม์โบรมีเลนและปาเปนมีความสามารถในการย่อยเจลาตินได้อย่างมีประสิทธิภาพเพราะเจลาตินหลังการไฮโดรไลสเสดไม่ปรากฏแถบแบนของโปรตีนเมื่อใช้ระดับความเข้มข้นของเอนไซม์มากขึ้น การย่อยสลายของเจลาตินจะเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ส่งผลถึงสมบัติเชิงหน้าที่ของเจลาตินด้วย (Tavemier, 1989) ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎี กล่าวว่าการย่อยสลายสูง โปรตีนจะถูกย่อยสลายจนได้เปปไทด์สายสั้นและกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก น้ำหนักโมเลกุลจึงต่ำลง

ขนาดเฉลี่ยของน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสเสดเป็นปัจจัยที่มีสำคัญในแง่ของการทำหน้าที่เชิงชีวภาพ เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลสเสดมีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ต่างๆ การใช้ระบบ ultrafiltration membrane จะสามารถช่วยให้ได้กลุ่มของเปปไทด์ที่ต้องการนั้นแคบลง เช่น ได้ขนาดโมเลกุลที่ต้องการและมีฤทธิ์เฉพาะที่ต้องการ ซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีนที่ใช้เริ่มต้น (Picot et al., 2010) นี้เป็นระบบที่จะมีบทบาทมากขึ้นในการผลิตเปปไทด์ในอนาคต ซึ่ง ณ ตอนนี้มี การศึกษาการแยกเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ จากคอลลาเจนแล้วมากมาย (Alemán et al., 2011b; Hai-Lun et al., 2006; Hernández-Ledesma et al., 2004; Hernández-Ledesma et al., 2005; Mendis et al., 2005a; Saiga et al., 2008; Zhao et al., 2007)

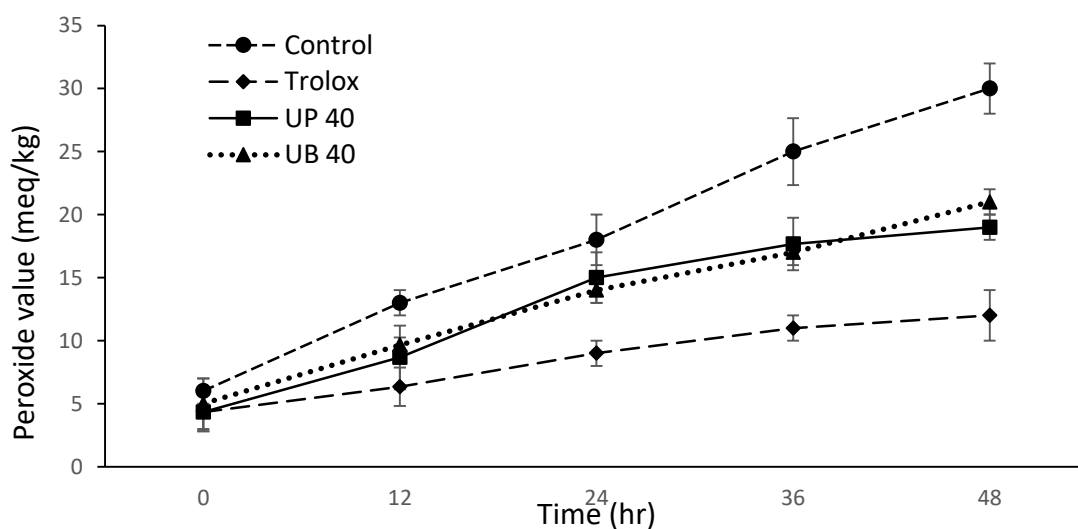


ภาพที่ 13 รูปแบบโปรตีนของเผลาดินไฮโดรไลสเสตจากหน้งปลาวัวที่ย่อยในระดบัต่าง ๆ โดยวิธี SDS-PAGE (MK = ตัวอย่างโมเลกุลมาตรฐาน, P10-40 = เผลาดินย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ระดบัการย่อยต่าง ๆ (10-40% DH), B10-40 = เผลาดินย่อยด้วยเอนไซม์โบรมิเลนที่ระดบัการย่อยต่าง ๆ (10-40% DH))

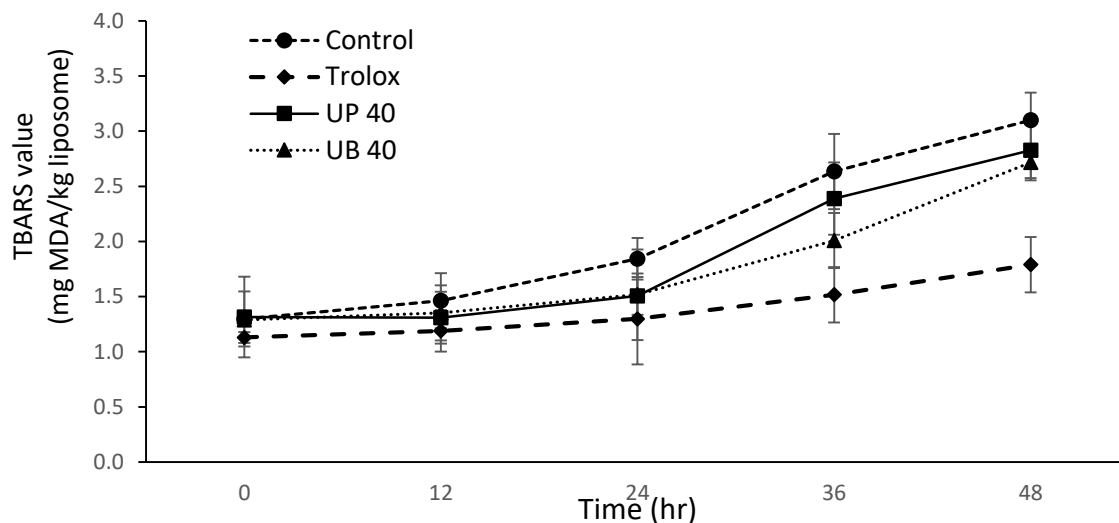
กิจกรรมต้านออกซิเดชันของเผลาดินไฮโดรไลสเสตในระบบไลโปโซม

จากผลการทดลองข้างต้น เผลาดินไฮโดรไลสเสตของหน้งปลาวัวมีกิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวเคมีมากกว่าจากปลาเรียวเซียวจึงนำ เผลาดินไฮโดรไลสเสตของหน้งปลาวัวมาศึกษาต่อ สำหรับกิจกรรมต้านออกซิเดชันของเผลาดินไฮโดรไลสเสตในระบบไลโปโซมมีการติดตามการเกิดออกซิเดชันนั้นได้ด้วยค่า PV และ TBARS ซึ่งค่า PV เป็นการตรวจสอบการเกิดออกซิเดชันของไขมันชั้นต้น ขณะที่ TBARS เป็นการติดตามปริมาณสารประกอบอัลดีไฮด์ จากผลทดลองภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงทุกตัวอย่างแสดงค่า PV และ TBARS สูงขึ้นต่อเนื่อง ตัวอย่าง UP และ UB ที่ระดบัเข้มข้น 1,000 ppm สามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของระบบเลซิดินไลโปโซมได้เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามตัวอย่าง UP และ UB มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันที่น้อยกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ trolox ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงทุกตัวอย่างแสดงค่า PV และ TBARS สูงขึ้นต่อเนื่อง โดยทั่วไปการยับยั้งการออกซิเดชันของสารขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างของการยับยั้งการออกซิเดชันระหว่างตัวอย่าง UP และ UB สำหรับระบบที่มีสาร trolox เข้มข้น 100 ppm นั้นมีการเพิ่มขึ้นของค่า PV และ TBARS เพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่สังเกตได้ชัดเจนในช่วงเวลา 0-24 ชั่วโมง ค่า TBARS มีค่าน้อยและเพิ่มเพียงเล็กน้อย ซึ่งบ่งบอกถึงประสิทธิภาพในการป้องกันการ

เกิดออกซิเดชันของสาร trolox ปกติค่า PV จะลดลงเมื่อเวลาเร่งให้เกิดการออกซิเดชันเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ต่อสารประกอบอื่นที่เป็นผลิตภัณฑ์ทุติยภูมิ (Frankel et al. 1997; Pena-Romos และ Xiong 2002) แต่ในการทดลองนี้มีระยะเวลาทดสอบที่สั้นเกิดกว่า จะเกิดการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ได้ โดยทั่วไประบบไลโปโซมเป็นการจำลองการป้องกันการเกิดออกซิเดชันของไขมันในเซลล์เมมเบรนที่นิยมเพื่อวิเคราะห์ความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระหรือสารอาหารในการป้องกันการทำลายเซลล์ของอนุมูลอิสระ (Frankel et al. 1997) ตัวอย่าง UP และ UB มีส่วนประกอบของเปปไทด์สารสั้นที่มีขั้วที่ทำปฏิกิริยากับฟอสโฟลิปิดในระบบ liposomes เพื่อป้องกันอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในระหว่างการเกิด lipid peroxidation อนุมูลอิสระถูกยับยั้งได้ขึ้นอยู่กับความสั้นยาวของสายเปปไทด์ รวมถึงการมีกรดอะมิโนที่ปลายสายที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งอนุมูลอิสระและความสามารถในการถ่ายโอนอิเล็กตรอนของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์ได้ ผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเจลาตินไฮโดรไลเสตสามารถยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน และชะลอการเกิดการสลายตัวของไฮโดรเปอร์ออกไซด์ไปเป็นผลิตภัณฑ์ไขมันทุติยภูมิ ดังนั้นเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากหนังปลาวัวโดยย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและโบรมิเลนสามารถยับยั้งการออกซิเดชันของไขมันในระบบไลโปโซมได้



ภาพที่ 14 ค่าเปอร์ออกไซด์ของ liposome ในสภาวะกระตุ้นให้เกิดการ oxidation หลังจากเติมสารต่างๆ (trolox, เจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB))

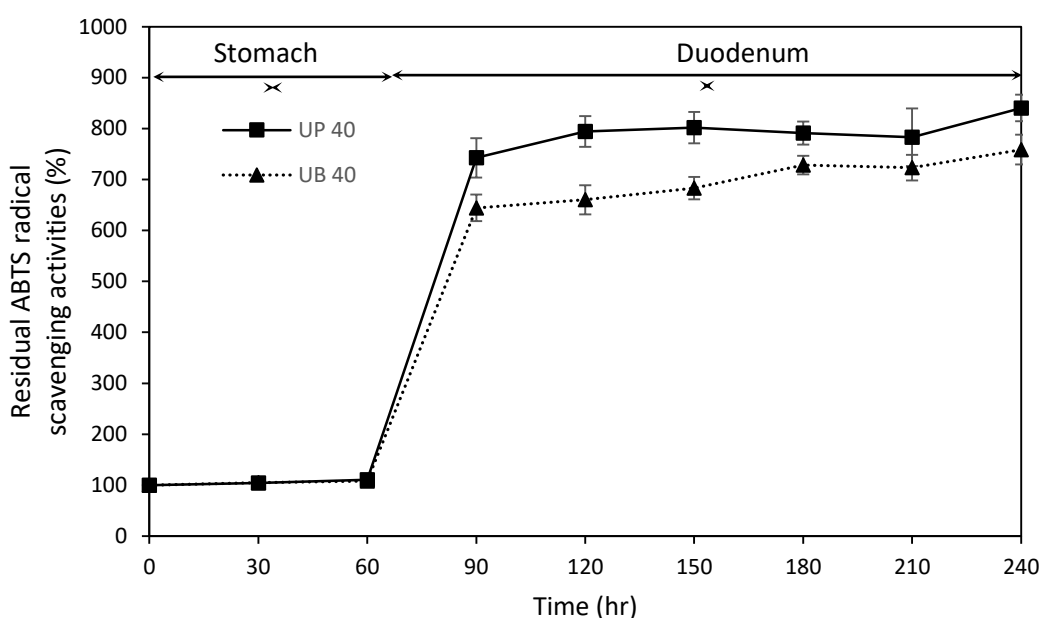


ภาพที่ 15 ค่า TBARS ของ liposome ในสภาวะกระตุ้นให้เกิดการ oxidation หลังจากเติมสารต่างๆ (trolox, เจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB))

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตในระบบทางเดินอาหารจำลอง

กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสต (UP และ UB) ในระบบทางเดินอาหารจำลองแสดงในภาพที่ 16 เมื่อตัวอย่าง UP และ UB อยู่ในสภาวะจำลองของกระเพาะไม่มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่ (ช่วง 60 นาทีแรก) ในสภาวะนี้ ตัวอย่าง UP และ UB ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin ซึ่งเอนไซม์นี้มีความจำเพาะต่อการตัดโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีพันธะเปปไทด์ที่ตำแหน่ง C-terminal ที่มีกรดอะมิโนฟีนอลอะลานีน ลิวซีน และกรดกลูตามิก (You et al. 2010) ซึ่งพบไม่มากในตัวอย่าง UP และ UB จึงไม่ส่งผลต่อการถูกย่อยของตัวอย่างทำให้กลุ่มกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่ยับยั้งอนุมูลอิสระไม่มีการเปลี่ยนแปลงมาก อย่างไรก็ตามบางรายงานการวิจัยพบว่าเปปไทด์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่า 3,000 Da มีความไวต่อเปปซินในระหว่างการย่อยอาหารในกระเพาะอาหาร หลังจากนั้นตัวอย่างจะอยู่ในสภาวะของลำไส้เล็กและใหญ่จำลองโดยมีการเติมเอนไซม์เพปซินส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ที่มากขึ้นถึงร้อยละ 600-800 โดยทั่วไปโปรตีนสายสั้นมีความไวต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินซึ่งส่งผลเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโนและลำดับของเปปไทด์ในตัวอย่าง ทำให้มีหมู่ฟังก์ชันที่ทำหน้าที่ยับยั้งอนุมูลอิสระได้มากขึ้น การเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ภายในเวลา 60 นาที เพราะการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่ปลายสายเปปไทด์มากขึ้นเนื่องจากการตัดของเอนไซม์ทริปซิน หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นเริ่มลดลงและคงที่ตลอดระยะเวลา 240 นาที หากเปรียบเทียบตัวอย่าง UP และ UB ตัวอย่าง UP แสดงกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS มากกว่า ($P < 0.05$) การย่อยในระบบทางเดินอาหารด้วยเอนไซม์ pancreatin เป็นการเพิ่มกิจกรรมการกำจัด

อนุมูลอิสระ ABTS ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีอาหารผ่านลำไส้เล็ก ทำให้เปปไทด์มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ในระหว่างการย่อยในลำไส้เอนไซม์จากตับอ่อนหลายชนิด เช่น ทริปซินและโปรตีเอสอื่นๆ ทำงานร่วมกันส่งผลต่อเปปไทด์ในการมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีมากขึ้น (Megías et al. 2009) หลายงานวิจัยให้ข้อมูลว่า เอนไซม์จากตับอ่อนไม่เพียงแต่จะย่อยโปรตีนให้ได้เปปไทด์สายสั้นลงเท่านั้น แต่ยังเพิ่มการผลิตกรดอะมิโนอิสระมากขึ้นจากเปปไทด์ นอกจากนี้ยังเพิ่มคุณสมบัติ hydrophilic ของเปปไทด์หลังการย่อย (You et al. 2010) ดังนั้นในระบบทางเดินอาหารจำลองกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระโปรตีนไฮโดรไลเสตจะเพิ่มขึ้นได้อีกหลังผ่านส่วนของลำไส้เล็ก



ภาพที่ 16 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) และโบรมิเลน (UB) ในระบบทางเดินอาหารจำลอง

การแยกเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE

เจลาตินไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนมีกิจกรรมออกฤทธิ์ทางชีวภาพมากที่สุด (ตัวอย่าง UP) จึงนำมาศึกษาต่อโดยการแยกองค์โปรตีนของเจลาตินไฮโดรไลเสตเพื่อเข้าใจการมีขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ซึ่งการทดลองนี้ทำการแยกด้วยคอลัมน์ Sephacryl S-100 HR และติดตามโปรตีนด้วยคลื่นความยาวแสงที่ 280 nm ซึ่งรูปแบบการแยกของตัวอย่าง UP มีการแยกออกเป็นกลุ่มโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันจำนวน 6 กลุ่ม และ fraction ที่แสดงค่าการดูดกลืนแสงมาก ได้แก่ fraction B C D

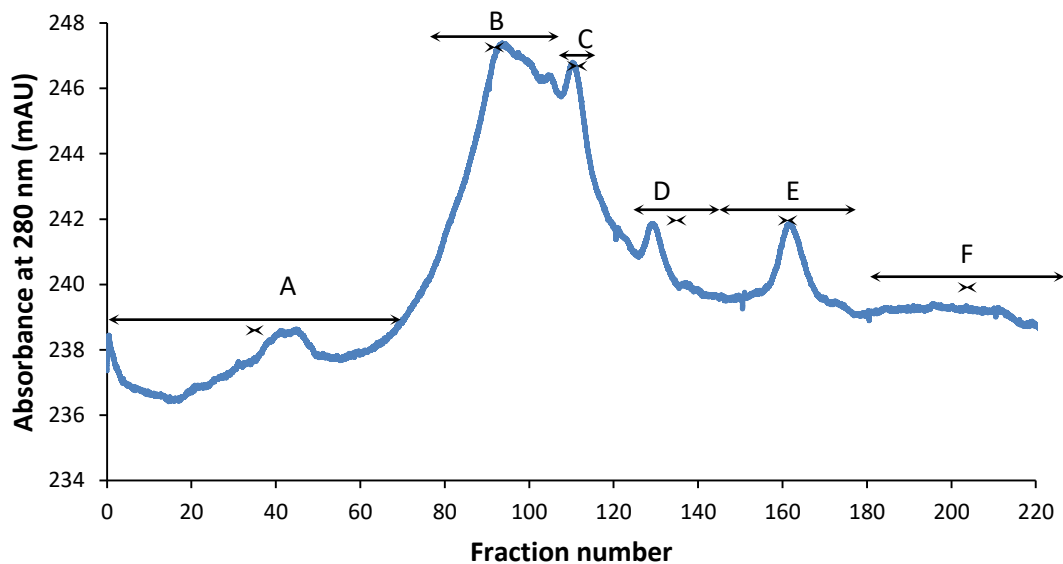
และ E แต่ละ fraction นำทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE พบว่า fraction E มีกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS และกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE มากที่สุด ซึ่ง fraction E มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 210 Da

ผลการวิจัยหลายเรื่องชี้ให้เห็นว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงกว่าเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า (Lin et al., 2012; Quirós et al., 2007; Miguel et al., 2009) เช่น เปปไทด์จากโปรตีนไฮโดรไลสที่มี MW <5 kDa (Jung และ Kim, 2006) และเจลาตินไฮโดรไลสจากปลิงทะเลที่มี MW <1 kDa (Zhao et al., 2007) แสดงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้มากที่สุด

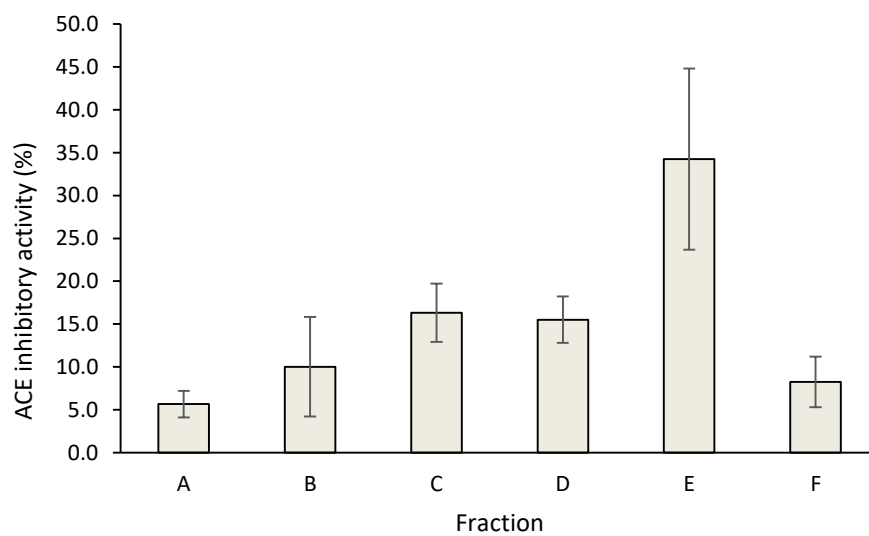
ถึงแม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างสายเปปไทด์และกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE จะไม่เป็นที่เข้าใจในกลไกเชิงลึก แต่เปปไทด์ที่ได้ศึกษาเหล่านั้น มีแนวโน้มร่วมเหมือนกัน โดยเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่มีสายสั้นและมีขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่น้อย จะเหมาะสมและเจาะจงต่อ active site ของเอนไซม์ ACE มากกว่าเปปไทด์สายยาวขนาดใหญ่ จากการศึกษาพบว่าลำดับของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์มีอิทธิพลต่อการจับกับเอนไซม์ ACE ซึ่งจำเพาะต่อ active site ของเอนไซม์ (Ondetti & Cushman, 1982) เอนไซม์ ACE เลือกที่จะจำเพาะต่อสารตั้งต้นหรือสารยับยั้งที่มีหมู่กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acid) รวมถึงหมู่ aromatic และ branched side chains ตรงปลายสายด้าน C-terminal (Cheung et al., 1980; Murray & FitzGerald, 2007) การมีกรดอะมิโน Arg หรือ Lys ตรงปลายสาย C-terminal ได้รับการยืนยันว่ามีฤทธิ์ยับยั้งที่ดี (Ariyoshi, 1993; Cheung et al., 1980; Meisel, 2003) กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ได้จากคอลลาเจนและเจลาตินอาจมีความสัมพันธ์กับการมีกลุ่มกรดอะมิโนแบบ hydrophobic ในสายเปปไทด์มาก และการมีจำนวนกรดอะมิโน Pro ที่สูงด้วย ชนิดของกรดอะมิโนจึงมีบทบาทสำคัญต่อประสิทธิภาพในการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และอีกหลายการวิจัยได้ศึกษาลำดับของกรดอะมิโนในเปปไทด์ซึ่งได้จากแหล่งธรรมชาติที่สามารถใช้เป็นสาร ACE peptide inhibitors (Contreras et al., 2009; Gómez-Ruiz et al., 2004a; Gómez-Ruiz et al., 2004b; Pihlanto et al., 2008; Quirós et al., 2007)

งานวิจัยแบบ in vivo ที่ศึกษาความสามารถของเปปไทด์ใช้เป็นฤทธิ์ต้านความดันเลือดสูงมักทดลองในหนู (spontaneously hypertensive rats: SHR) ซึ่งก็เป็นแบบจำลองที่ยอมรับสำหรับภาวะความดันเลือดสูงในคน เปปไทด์จากคอลลาเจนที่แยกได้มีฤทธิ์ยับยั้งนี้ในหลายๆ การศึกษาวิจัยจากงานวิจัยแบบ SHR พบว่าเปปไทด์จากคอลลาเจนหนึ่งไก่อ ที่มีลำดับ Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro สามารถลดความดันโลหิตในสัตว์ทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญ (Cheng et al., 2009; Iwai et al., 2008; Saiga et al., 2008) ยิ่งไปกว่านั้นเจลาตินไฮโดรไลสที่ได้จากหนังหมูและหนังวัวช่วยลดภาวะความดันเลือดสูง หลังจากหนูทดลองได้รับทางอาหาร (Faria et al., 2008) ในบางงานวิจัยเจลาตินจากปลิงทะเลหลังจากย่อยเปปไทด์ให้ได้สายสั้นมีฤทธิ์ในการลดความดันเลือดในหนูทดลอง

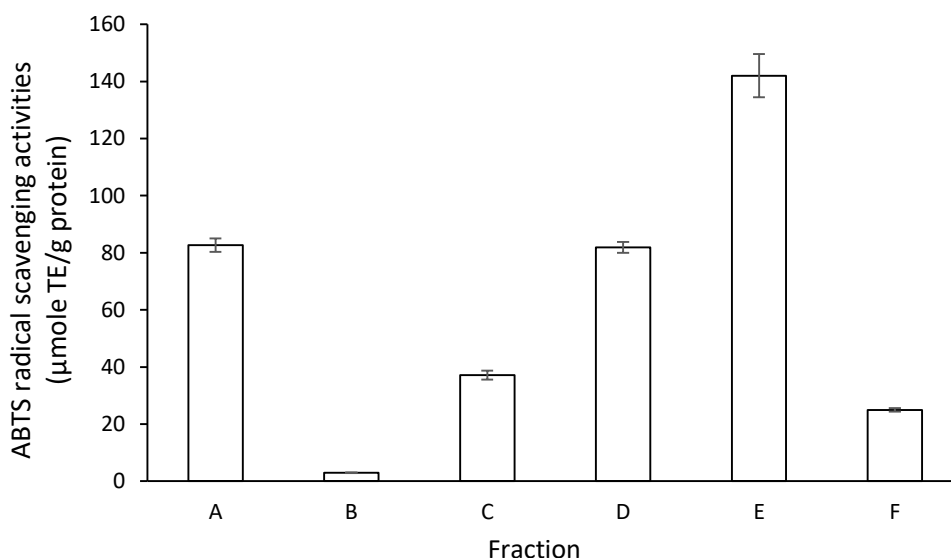
(Zhao et al., 2007) และเปปไทด์สายสั้นอย่าง Gly-Pro และ Gly-Phe-Hyp-Gly-Pro ที่ได้จากคอลลาเจนหนังหมูมีฤทธิ์ในการยับยั้งที่สูงเมื่อทดลองในหนู (Ichimura et al., 2009)



ภาพที่ 17 การแยกเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) ด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี ชนิด Sephacryl S-100 HR โดยติดตามการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 nm



ภาพที่ 18 กิจกรรมต้านเอนไซม์ ACE ของแต่ละ fraction ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี



ภาพที่ 19 กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของแต่ละ fraction ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาว่าที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี

การลำดับกรดอะมิโนของเจลาตินไฮโดรไลเสตที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE

จากผลกิจกรรมต้านเอนไซม์ ACE และต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของแต่ละ fraction จึงเลือก fraction E ไปวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วยเครื่อง mass spectrometer พบว่าลำดับกรดอะมิโนของ fraction E คือ APSFSDIPNPIGSE (ภาพที่ 20) การมีกิจกรรมการยับยั้ง ACE ที่สูงอาจเป็นเพราะการมีกรดอะมิโนชอบน้ำ (Ala) ที่ปลายหมู่คาร์บอกซีและการมีกรดอะมิโนวงแหวนบริเวณปลายสายเปปไทด์ (Cheung และ Chushman, 1971; Qian และคณะ, 2007) นอกจากนี้ยังมีเปปไทด์ที่มี m/z เท่ากับ 740 ได้ถูกระบุว่าเป็น LGEYGFQNALIVR ลำดับของกรดอะมิโนของเปปไทด์มีคุณสมบัติทางอิเล็กทริกต่าและความไม่ชอบน้ำและกรดอะมิโนขนาดใหญ่ เช่น อะลานีน วาลีน และ โพรลีน มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE ที่มาก

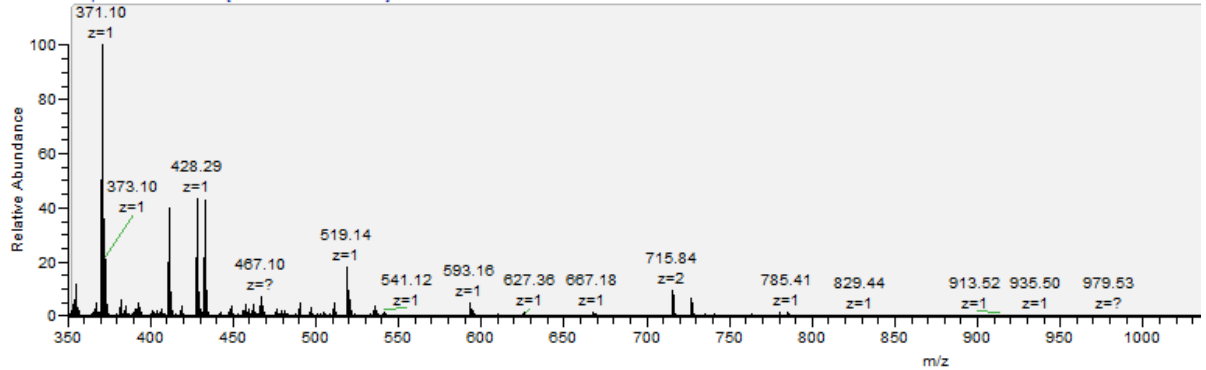
การย่อยคอลลาเจนและเจลาตินด้วยเอนไซม์ปาเปนทำให้ได้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนกลุ่ม hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เป็นการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE มากขึ้น ช่วยให้ได้เจลาตินไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสูงขึ้นจึงได้เจลาตินเปปไทด์สายสั้นลง และมีเปปไทด์ที่มีหมู่ hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้มากขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์เจลาตินไฮโดรไลเสตที่ได้สามารถทำหน้าที่ในสมบัติต่างๆ เช่น กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระ (Nikoo et al. 2015; Lassoued et al. 2015) การยับยั้งจุลินทรีย์ (Hong et al. 2014) การ

ต้านมะเร็ง (Alemán et al. 2011) และสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆ สำหรับประยุกต์ใช้ในอาหาร (Intarasirisawat et al. 2012; Jemil et al. 2014)

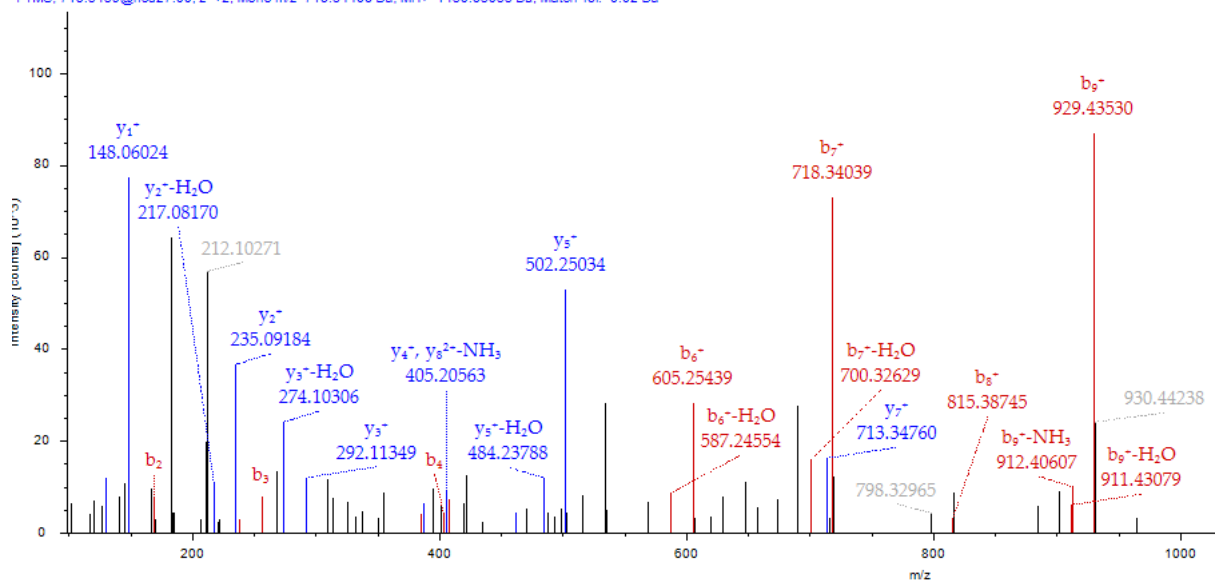
ตารางที่ 2 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ ACE

ลำดับ	Peptides	m/z (Da)	Charge	MH+ (Da)	Xcorr
1	APSFSDIPNPIGSE	715.84406	+2	1430.68083	2.73
2	LGEYGFQNALIVR	740.40216	+2	1479.79704	2.69
3	SPEVIESPPEINTVQ	819.91449	+2	1638.8217	2.57
4	SPEVIESPPEIN	655.82764	+2	1310.648	2.57
5	DAFLGSFLYEYSR	784.37537	+2	1567.74346	2.36
6	SPDLPKLKPD	555.31378	+2	1109.62029	2.26

Gelatin-repeat #15816 RT: 54.10 AV: 1 NL: 1.93E7
T: FTMS + p NSI Full lock ms [350.0000-1400.0000]



Gelatin-repeat.raw #16818 RT: 54.1059 min
FTMS, 715.8439@nod27.00, z=+2, Mono m/z=715.84406 Da, MH+=1430.68083 Da, Match Tol=0.02 Da



ภาพที่ 20 การวิเคราะห์ผลการวัดสัดส่วนมวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio) ($m/z = 715.84$, retention time = 54.10) ของเปปไทด์ APSFSDIPNPIGSE ที่ได้จากเจลาตินไฮโดรไลเสตจากหนังปลาวัวที่ย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (UP) หลังแยกด้วยวิธีเจลฟิลเทรชันโครมาโทกราฟี

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัย

การผลิตเจลาตินไฮโดรไลสเสตจากหนังปลาเรียวเขียวและหนังปลาหัวด้วยเอนไซม์โบรมีเลน และปาเปนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน-คอนเวอร์ติง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เอนไซม์ปาเปนมีความจำเพาะต่อการย่อยเจลาตินหนังปลาหัว อัตราส่วนเอนไซม์มากขึ้นส่งผลต่อระดับ DH มากขึ้น และทำให้มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแบบ DPPH และ ABTS มากขึ้น การย่อยคอลลาเจนและเจลาตินด้วยเอนไซม์ปาเปนทำให้ได้เปปไทด์ที่ระดับ DH มากขึ้น เป็นการเพิ่มฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE มากขึ้น การย่อยช่วยให้เจลาตินเปปไทด์มีสายสั้นลง และมีเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนหมู่ hydrophobic ปลายสายมากขึ้น เพิ่มประสิทธิภาพในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ACE ได้มากขึ้น องค์ความรู้ที่ได้ทำให้เข้าใจกระบวนการผลิตคอลลาเจนเปปไทด์ที่ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ ACE และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เป็นประโยชน์ต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ทางเลือกใหม่แก่ผู้มีความดันโลหิตสูงและผู้รักสุขภาพ

ผลผลิต

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ

Lomchapok, M. Chowthai, W. Choksawangarn, W., & Saiut, S. (2018). The effect of proteases and degree of hydrolysis on production of gelatin hydrolysate with antimicrobial activities. *In Proceeding of Innovation of Functional Foods in Asia (IFFA)* (pp. 16-35). Phayao, University of Phayao.

Sai-Ut S. & Choksawangarn, W. Antioxidative activities of fish skin gelatin hydrolysate produced by papain and bromelain in simulated gastrointestinal tract and lecithin liposome. *In Proceeding of Food and Applied Bioscience International Conference 2020 (FAB 2020)* (pp. 89). Chiangmai, Chiangmai University.

การยื่นจดสิทธิบัตร

-

ผลงานเชิงพาณิชย์ ภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป

-

ผลงานเชิงสาธารณะ

-

เอกสารอ้างอิง

- Akagündüz, Y. Mosquera, M. Giménez , B. Alemán, A. Montero, P. Gómez-Guillén, M. C. (2014). Sea bream bones and scales as a source of gelatin and ACE inhibitory peptides. *LWT - Food Science and Technology*. 55: 2, 579–585.
- Alemán, A. Pérez-Santín, E. Bordenave-Juchereau, S. Arnaudín, I. Gómez-Guillén, M.C. Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 44: 4, 1044–1051
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT e Food Science and Technology*, 44, 407-413.
- Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santín, E., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptides sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125, 334-341.
- Anzai, H., Kajiwara, N., Seryou, A., Kono, T., Yamaguchi, Y., Yoshiyama, S., et al. (1997). Abstracts of the 51st annual meeting of Japanese Society of Nutrition and Food Science, p. 86.
- Badii, F., & Howell, N. K. (2006). Fish gelatin: structure, gelling properties and interaction with egg albumen proteins. *Food Hydrocolloids*, 20, 630-640.
- Benjakul, S. Morrissey, M.T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, pp. 3423–3430
- Beynen, A. C., van Geene, H.W., Grim, H. V., Jacobs, P., & van der Vlerk, T. (2010). Oral administration of gelatin hydrolysate reduces clinical signs of canine osteoarthritis in a double blind, placebo-controlled trial. *American Journal of Animal and Veterinary Science*, 5(2), 95-99.
- Binsan, W. Benjakul, S. Visessanguan, W. Roytrakul, S. Tanaka, M. Kishimura H. (2008). Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Food Chemistry*, 106, pp. 185–193

- Byun, H. G., & Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin. *Process Biochemistry*, 36, 1155-1162.
- Chelh, I. Gatellier, P. Santé-Lhoutellier V. (2006). Technical note: a simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. *Meat Sci*, 74, pp. 681–683.
- Cheng, F. Y., Liu, Y. T., Wan, T. C., Lin, L. C., & Sakata, R. (2008). The development of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from chicken bone protein. *Animal Science Journal*, 79, 122-128.
- Cheng, F. Y., Wan, T. C., Liu, Y. T., Chen, C. M., Lin, L. C., & Sakata, R. (2009). Determination of angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides in chicken leg bone protein hydrolysate with alcalase. *Animal Science Journal*, 80, 91-97.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti, M. A., Sabo, E. F., & Cushman, D. W. (1980). Binding of peptide substrate and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 255, 401-407.
- Chockalingam A. (2008). World hypertension day and global awareness. *Canadian Journal of Cardiology*, 24, pp. 441–444.
- Cúneo, F., Costa-Paiva, L., Pinto-Neto, A. M., Morais, S. S., & Amaya-Farfan, J. (2010). Effect of dietary supplementation with collagen hydrolysates on bone metabolism of postmenopausal women with low mineral density. *Maturitas*, 65, 253-257.
- Eriksson, U. Danilczyk, U. Penninger J.M. (2002). Just the beginning: Novel functions for angiotensin-converting enzymes *Current Biology*, 12. 745–752.
- Fahmi, A., Morimura, S., Guo, H. C., Shigematsu, T., Kida, K., & Uemura, Y. (2004). Production of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sea bream scales. *Process Biochemistry*, 39, 1195-1200.
- Faria, M., da Costa, E. L., Gontijo, J. A. R., & Netto, F. M. (2008). Evaluation of the hypotensive potential of bovine and porcine collagen hydrolysates. *Journal of Medicinal Food*, 11(3), 560-567

- Gilsenan, P. M., & Ross-Murphy, S. B. (2000). Rheological characterizations of gelatins from mammalian and marine sources. *Food Hydrocolloids*, 14, 191-195.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., & Gómez-Guillén, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114(3), 976-983.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., & Montero, P. (2009). Fish gelatin: a renewable material for the development of active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, 20, 3-16.
- Guang, C. Phillips, R.D. Jiang, B. Milani F. (2012). Three key proteases angiotensin-I converting enzyme (ACE), ACE2 and rennin within and beyond the renin-angiotensin system *Archives of Cardiovascular Disease*, 105. 373-385
- Hai-Lun, H., Xiu-Lan, C., Cai-Yun, S., Yu-Zhong, Z., & Bai-Cheng, Z. (2006). Analysis of novel angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from proteasehydrolyzed marine shrimp *Acetes chinensis*. *Journal of Peptide Science*, 12, 726-733.
- Haug, I. J., Draget, K. I., & Smidsrød, O. (2004). Physical and rheological properties of fish gelatin compared to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*, 18(2), 203-213.
- Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Ramos, M., & Recio, I. (2004). Application of high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the identification of biologically active peptides produced by milk fermentation and simulated gastrointestinal digestion. *Journal of Chromatography A*, 1049(1e2), 107-114.
- Hernández-Ledesma, B., Dávalos, A., Bartolomé, B., & Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3), 588-593.
- Himaya, S.W.A. Ngo, D.H. Ryu, B. Kim, S.K. (2012). An active peptide purified from gastrointestinal enzyme hydrolysate of Pacific cod skin gelatin attenuates

- angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. 6th International Conference on Water in Food.132: 4. 1872–1882.
- Hong, P. K. Gottardi, D. Ndagijimana, M. Betti, M. (2014). Glycation and transglutaminase mediated glycosylation of fish gelatin peptides with glucosamine enhance bioactivity. *Food Chemistry*. 142, 285–293.
- Huang, S.L. Hung, C.C. Jao, C.L.Tung, Y.S. Hsu. K.C. (2014). Porcine skin gelatin hydrolysate as a dipeptidyl peptidase IV inhibitor improves glycemic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Functional Foods*. 11, 235–242.
- Ichimura, T., Yamanaka, A., Otsuka, T., Yamashita, E., & Maruyama, S. (2009). Antihypertensive effect of enzymatic hydrolysate of collagen and Gly-Pro in spontaneously hypertensive rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 73, 2317-2319.
- Intarasirisawat, R. Benjakul, S. Visessanguan, W. Wu, J. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135, 4, 3039-3048
- Intarasirisawat, R. Benjakul, S. Wu, J. Visessanguan W. (2013). Isolation of antioxidative and ACE inhibitory peptides from protein hydrolysate of skipjack (*Katsuwana pelamis*) roe *Journal of Functional Foods*, 5. 1854–1862.
- Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chemistry*, 77, 81-84.
- Jemil, I. Jridi, M. Nasri, R. Ktari, N. Ben R. Salem, S.-B. Mehiri, M. Hajji, M. Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*, 49, 6, 963-972
- Johnston-Banks, F. A. (1990). Gelatin. In P. Harris (Ed.), *Food gels* (pp. 233e289). London: Elsevier Applied Science Publishers.
- Jongjareonrak, A., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2006). Isolation and characterisation of acid and pepsin-solubilised collagens from

- the skin of Brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Chemistry, 93(3), 475-484.
- Jung, W. K., Park, P. J., Byun, H. G., Moon, S. H., & Kim, S. K. (2005). Preparation of hoki (*Johnius belengerii*) bone oligophosphopeptide with a high affinity to calcium by carnivorous intestine crude proteinase. Food Chemistry, 91, 333-340.
- Kim, S. E., & Mendis, E. (2006). Bioactive compounds from marine processing byproducts: a review. Food Research International, 39, 383-393.
- Kim, S. K., Byun, H. G., Park, P. J., & Shahidi, F. (2001). Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides purified from bovine skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49(6), 2992-2997.
- Lassoued, I. Mora, L. Nasri, R. Jridi, M. Toldrá, F. Aristoy, M.C. Barkia, A. Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. Journal of Functional Foods. 13, 225–238
- Lin, L. Lv, S. Li, B. 2012. Angiotensin-I-converting enzyme (ACE)-inhibitory and antihypertensive properties of squid skin gelatin hydrolysates. Food Chemistry. 131: 1, 225–230.
- Lin, L., & Li, B. (2006). Radical scavenging properties of protein hydrolysates from Jumbo flying squid (*Dosidicus eschrichtii* Steenstrup) skin gelatin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 86(14), 2290-2295.
- Lowry, O.H. Rosebrough, N.J. Farr, A.L. Randall. R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193, pp. 267–275.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H., & Kim, S. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sciences, 77(17), 2166-2178.
- Moore, S. Stein W.H. (1957). A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. J Biol Chem, 211, pp. 907–913.
- Moskowitz, R. W. (2000). Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 30(2), 87-89.

- Murray, B.A. FitzGerald R.J. (2007). Angiotensin converting enzyme inhibitory peptides derived from food proteins: Biochemistry, bioactivity and production Current Pharmaceutical Design, 13. 773–791
- Nagai, T., Nagashima, T., Abe, A., & Suzuki, N. (2006). Antioxidative activities and angiotensin I-converting enzyme inhibition of extracts prepared from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) cartilage and skin. International Journal of Food Properties, 9(4), 813-822.
- Nam, K. A., You, S. G., & Kim, S. M. (2008). Molecular and physical characteristics of squid (*Toradores pacificus*) skin collagens and biological properties of their enzymatic hydrolysates. Journal of Food Science, 73(4), 249-255.
- Ngo, D.H. Kang, K.H. Ryu, B. Vo, T.S. Jung, W.K. Byun, H.G. Kim, S.K. (2015). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry.174: 1, 37–43.
- Nikoo, M. Benjakul, S. Xu, X. (2015). Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. Food Chemistry.181: 295–303.
- Norland, R. E. (1990). Fish gelatin. In M. N. Voight, & J. K. Botta (Eds.), Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability (pp. 325e333). Lancaster: Technomic Publishing Co.
- Ondetti, M. A., Rubin, B., & Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. Science, 196, 441-443.
- Patchett, A. A., Harris, E., Tristram, E. W., Wyvratt, M. J., Wu, M. T., Taub, et al.. (1980). Nature, 298, 280-283.
- Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Roytrakul, S. (2010). Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. LWT-Food Science and Technology, 43(1), 86-97.
- Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandajon, L., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., et al. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an

- industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1819-1826.
- Pihlanto, A., Akkanen, S., & Korhonen, H. (2008). ACE-inhibitory and antioxidant properties of potato (*Solanum tuberosum*). *Food Chemistry*, 109, 104-112.
- Qian, Z. J., Jung, W. K., & Kim, S. K. (2008). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* shaw. *Bioresource Technology*, 99, 1690-1698.
- Qian, Z.J. Jung, W.K. Lee, S.H. Byun, H.G. Kim S.K. (2007). Antihypertensive effect of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide from bullfrog (*Rana catesbeiana* Shaw) muscle protein in spontaneously hypertensive rats *Process Biochemistry*, 42. 1443–1448
- Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, M., Alexandre, A., et al. (2007). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*, 17, 33-41.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., et al. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9586-9591.
- Saito, M., Kiyose, C., Higuchi, T., Uchida, N., & Suzuki, H. (2009). Effect of collagen hydrolysates from salmon and trout skins on the lipid profile in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21), 10477-10482.
- Skrbic, R. Ijic R. 2009. Seven decades of angiotensin (1939–2009) Peptides, 30. 1945–1950
- Thiansilakul, Y. Benjakul, S. Shahidi. F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. *Journal of Food Biochemistry*, 31, pp. 266–287.
- Wang, J., Wang, Y., Tang, Q., Wang, Y., Chang, Y., Zhao, Q., et al. (2010). Antioxidant activities of low-molecular-weight gelatin hydrolysate isolated from the sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Journal of Ocean University of China*, 9(1), 94-98.

- Watanabe-Kamiyama, M., Muneshige, S., Shin, K., Yasuki, T., Hideyuki, S., Fumiki, M., et al. (2010). Absorption and effectiveness of orally administered low molecular weight collagen hydrolysate in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(2), 835-841.
- Weng, W. Tang, L. Wang, B. Chen, J. Su, W. Osako, K. Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (*Prionace glauca*) skin gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. 11, 342–351.
- Wettasinghe, M. Shahidi. F. (2000). Scavenging of reactive-oxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chemistry*, 70, pp. 17–26
- Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36, 949-957.
- Wu, S. Feng, X. Lan, X. Xu, Y. Liao. D. (2015). Purification and identification of Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory peptide from lizard fish (*Saurida elongata*) hydrolysate. *Journal of Functional Foods*. 13, 295–299.
- Yang, H., Wang, Y., Zhou, P., & Regenstein, J. M. (2008). Effects of alkaline and acid pretreatment on the physical properties and nanostructures of the gelatin from channel catfish skins. *Food Hydrocolloids*, 22, 1541-1550.
- Zhang, G., Liu, T., Wang, Q., Chen, L., Lei, J., Luo, J., et al. (2009). Mass spectrometric detection of marker peptides in tryptic digests of gelatin: a new method to differentiate between bovine and porcine gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(7), 2001-2007.
- Zhao, Q., Xue, C. H., Li, Z. J., Tang, Q. J., Wang, Y. M., & Wang, J. F. (2009). Neuroprotective effects of gelatin hydrolysates from *Stichopus japonicus* on hydrogen peroxide-induced PC12 cell damage. In *Proceedings of 2009 International conference of natural product and traditional medicine*, Vols. 1 and 2. 393-397.
- Zhao, Y., Li, B., Liu, Z., Dong, S., Zhao, X., & Zeng, M. (2007). Antihypertensive effect and purification of an ACE inhibitory peptide from sea cucumber gelatin hydrolysate. *Process Biochemistry*, 42, 1586-1591.

- Zhuang, Y. L., Sun, L. P., Zhao, X., Hou, H., & Li, B. F. (2010). Investigation of gelatin polypeptides of jellyfish (*Rhopilema esculentum*) for their antioxidant activity in vitro. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 222-228.
- Zhuang, Y., Hou, H., Zhao, X., Zhang, Z., & Li, B. (2009). Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *Journal of Food Science*, 74(6), H183-H188.
- Zuckley, L., Angelopoulou, K., Carpenter, M. S. S., Meredith, B. A., Kline, G., Rowinski, M., et al. (2004). Collagen hydrolysate improves joint function in adults with mild symptoms of osteoarthritis of the knee. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 36(5), S153-S154.