ผลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ติงและต่อกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ

Effect of Collagen Hydrolysates from Clown Featherback (*Chitala ornata*) Skin on Angiotensin I - Converting Enzyme Inhibitory and Antioxidant Activities

อรุณลักษณ์ โชตินาครินทร์[1*] กีรติ ตันเรือน[1] พิมพ์ชนก พริกบุญจันทร์[2] และ ทิพย์วรินทร์ ริมลำดวน[3]

Arunluk Chodnakarin[1*], Keerati Tanruean[1], Pimchanok Phrigboonchan[2] and Thipwarin Rimlumduan[3]

[1]*สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

[2]*สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม*

[3]*สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และศิลปะศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน*

[1]*Biotechnology Department, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University*

[2]*Food Science and Technology Department, Faculty of food and Agricultural Technology, Pibulsongkram Rajabhat University*

[3]*Applied Biology Department, Faculty of Sciences and Liberal Arts, Rajamangala University of Technology Isan*

Received : 12 November 2017

Accepted : 6 February 2018

Published online : 9 February 2018

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาผลของระดับการย่อยสลายและขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากราย (*Chitala ornata*) ที่มีต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ติง (angiotensin I-converting enzyme, ACE) และการต้านอนุมูลอิสระ คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลากรายมีปริมาณผลผลิต 35.67% ของน้ำหนักแห้ง จากผลการศึกษารูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลากรายเป็นคอลลาเจน type I จากนั้นคอลลาเจนถูกย่อยด้วยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสที่ระยะเวลาการย่อยแตกต่างกัน (0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง) พบว่าคอลลาเจนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด คือ 35.09% รองมาคือเปปซิน (26.73%) และ ทริปซิน (22.03%) ตามลำดับ ที่ระยะเวลาการย่อย 8 ชั่วโมง ซึ่งคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging และ ferric reducing antioxidant power (FRAP) ได้ดีที่สุด เมื่อนำคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงมาแยกขนาดโมเลกุลของเพปไทด์ด้วยเยื่อกรองอัลตราฟิวเตชัน โดยแบ่งออกเป็น 4 ส่วนคือ crude hydrolysates, ขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน, ขนาดระหว่าง 10-30 กิโลดาลตันและขนาดน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน พบว่าคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่มีขนาดน้อยกว่า 10 กิโลดาลตันมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE (50.35%) และแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH (59.06%) และ FRAP (304.56 mM สมมูลของ $FeSO_4$)

คำสำคัญ : ปลากราย คอลลาเจนไฮโดรไลเซท เอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ติง การต้านอนุมูลอิสระ

***Corresponding author. E-mail** : siriangkanakun@psru.ac.th

Abstract

The objective of this study was to investigate effect of degree of hydrolysis and molecular weight of collagen hydrolysates from clown featherback (*Chitala ornata*) skin on angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory and antioxidant activities. Yield of collagen from clown featherback was 35-67% of dried skin. Based on SDS-PAGE, the collagen was classified as Type I. The collagen was hydrolyzed by various proteinases including trypsin, pepsin and alcalase at different hydrolysis time (0, 2, 4, 6 และ 8 h). The highest degree of hydrolysis was found in hydrolysates prepared from alcalase (35.09%), followed by pepsin (26.73%) and trypsin (22.03%), respectively at 8 h hydrolysis. Alcalase-induced hydrolysates (at 8 h) exhibited the highest ACE inhibitory and antioxidant activities based on 1, 1- diphenyl-2- picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The hydrolysates prepared from alcalase (at 8 h) were fractionated into 4 fractions: crude hydrolysates, >30 kDa, 10-30 kDa and <10 kDa using ultrafiltration membranes. The fraction with MW <10 kDa showed the highest ACE inhibitory activity (50.35%) and antioxidant activity based on DPPH radical scavenging (59.06%) and FRAP (304.56 mM $FeSO_4$ equivalent).

Keywords : clown featherback, collagen hydrolysates, angiotensin I-converting enzyme, antioxidant

บทนำ

โรคความดันโลหิตสูงเป็นโรคที่พบได้บ่อยมากในผู้ใหญ่และส่งผลให้ผู้ป่วยเสียชีวิตก่อนวัยอันควร มีการคาดการณ์ว่าภายในปี พ.ศ. 2568 จะมีผู้ป่วยที่มีภาวะความดันโลหิตสูงประมาณ 1.5 พันล้านคน (Kuo & Pu, 2011) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงคือเอนไซม์แอนจิโอเทนซินวัน-คอนเวอร์ติง(angiotensin I-converting enzyme, ACE) โดยเอนไซม์นี้จะเปลี่ยนสารตั้งต้นคือ angiotensin I เป็น angiotensin II ทำให้หลอดเลือดหดตัวมีผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น นอกจากนี้ ACE ยังสามารถย่อย bradykinin ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ร่างกายหลั่งออกมาเมื่อเกิดบาดแผลโดย bradykinin มีผลทำให้ความดันโลหิตต่ำลง แต่ ACE จะย่อยเพปไทด์ bradykinin ให้อยู่ในรูปที่ไม่มีผลต่อการลดความดันโลหิต ดังนั้น ACE จึงมีผลต่อการเพิ่มของ angiotensin II และลดปริมาณ bradykinin ซึ่งทั้งสองปัจจัยจะส่งเสริมให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูง ดังนั้นการใช้สารยับยั้ง ACE จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาภาวะความดันโลหิตสูงได้ดี ซึ่งสารยับยั้ง ACE ทางการค้า ได้แก่ enalaprilat, enalapril และ lisinopril โดยยาทั้งสามชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ดีแต่มีผลข้างเคียง เช่น ไอแห้ง เป็นผื่นที่ผิวหนัง สูญเสียการรับรส มีภาวะโพแทสเซียมในเลือดสูง เป็นต้น (Atkinson & Robertson, 1979; Sica, 2003) ปัจจุบันมีการรายงานถึงการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากธรรมชาติเพื่อเป็นสารยับยั้ง ACE โดยโปรตีนไฮโดรไลเซทจากส่วนก้างของปลาทูน่าและเจลาตินไฮโดรไลเซทจากหนังปลาแปซิฟิกคอด (*Gadus macrocephalus*) มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ (Lee *et al*., 2010; Himaya *et al*., 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลเซทที่ได้จากส่วนต่าง ๆ ของปลา เช่น ก้าง กระดูก เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเกล็ดมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Wiriyaphan *et al*., 2012; Ngo *et al*., 2010) ซึ่งอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคข้ออักเสบและโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น ถึงแม้จะมีรายงานการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนังหมูและหนังวัวอยู่บ้าง แต่พบว่าการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่สกัด

จากหนังหมูและหนังวัวมีข้อจำกัดเรื่องศาสนาและการใช้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากหนังวัวอาจจะประสบปัญหาโรควัวบ้า ดังนั้นการสกัดโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแหล่งโปรตีนอื่นเพื่อยับยั้งกิจกรรมของ ACE และการต้านอนุมูลอิสระน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ควรศึกษา

ระดับการย่อยสลายและขนาดของโปรตีนโฮโดรไลเซทเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE และการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งความสามารถในการยับยั้ง ACE เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากก้างปลาทูน่าเพิ่มมากขึ้น (Lee *et al*., 2010) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซทจากกระดูกปลาสวาย (*Pangasius pangasius*) มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อระดับการย่อยสลายสูงที่สุด (Baehaki *et al*., 2015) ขณะที่ Lee *et al*. (2010) พบว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 1-5 กิโลดาลตันแสดงศักยภาพในการยับยั้ง ACE ได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลระหว่าง 5-10 กิโลดาลตัน Wang *et al*. (2013) พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยคอลลาเจนจากเกล็ดปลาจวด (*Pseudosciaena crocea*) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 1 กิโลดาลตันมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ ดังนั้นเพื่อให้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงควรพิจารณาในเรื่องของระดับการย่อยสลายและขนาดของโปรตีนไฮโดรไลเซท

ปลากราย (*Chitala ornate*) เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่คนไทยนิยมบริโภค มักพบในแหล่งน้ำนิ่งและแม่น้ำทั่วประเทศไทย ปลาชนิดนี้มีเนื้อสีขาวและมีความสามารถในการเกิดเจลที่ดีดังนั้นจึงนิยมนำเนื้อปลากรายไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ทอดมันและลูกชิ้น ในระหว่างกระบวนการแล่เนื้อปลาจะมีหนังปลาที่ถือได้ว่าเป็นวัสดุเหลือทิ้งประมาณ 17-22% ของน้ำหนักทั้งหมด (Kittiphattanabawon *et al*., 2015) โดยวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้จะถูกส่งไปขายในโรงงานปลาป่นหรือโรงงานอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าต่ำ เพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับหนังปลากราย การผลิตคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่มีองค์ประกอบของเพปไทด์ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจทำให้เกิดแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจากหนังปลากรายอีกด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อศึกษาระดับการย่อยสลายและขนาดของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่มีผลต่อการยับยั้งกิจกรรมของ ACE และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมหนังปลากราย

ซื้อหนังปลากราย (clown featherback, *Chitala ornata*) จากตลาดริมแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดนครสวรรค์ จัดเก็บหนังปลาภายในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งและขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม จังหวัดพิษณุโลก ภายใน 2 ชั่วโมง เมื่อขนส่งมาถึงห้องปฏิบัติการ นำหนังปลากรายมาล้างทำความสะอาดและขูดส่วนเนื้อและเกล็ดที่ติดมาออก ตัดหนังปลาให้มีขนาด 0.5 x 0.5 เซนติเมตร และนำหนังปลาที่ได้มาสกัดคอลลาเจน

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากราย

การสกัดคอลลาเจนจากหนังปลากรายดัดแปลงจากวิธีของ Kittiphattanabawon *et al*. (2005) ในการสกัดตลอดทุกขั้นตอนทำภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เริ่มจากนำหนังปลากรายไปแช่ในสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 0.1 M ที่อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลายด่าง 1:30 (w/v) กวนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายด่างทุก ๆ 8 ชั่วโมง เพื่อนำส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนคอลลาเจนและเม็ดสีออก หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าพีเอชของน้ำล้างเป็นกลาง นำไป

แช่ในสารละลาย butyl alcohol เข้มข้น 10% โดยใช้อัตราส่วนหนังปลาต่อสารละลายเป็น 1:30 (w/v) กวนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเปลี่ยนสารละลายทุก ๆ 8 ชั่วโมง ต่อจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นจนกระทั่งค่าพีเอชของน้ำล้างเป็นกลาง แล้วนำมาแช่ในสารละลาย acetic acid เข้มข้น 0.5 M โดยอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายคือ 1:50 (w/v) พร้อมกับกวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บส่วนใสและนำส่วนตะกอนมาสกัดใหม่อีกครั้งด้วยสารละลาย acetic acid เข้มข้น 0.5 M โดยอัตราส่วนตัวอย่างต่อสารละลายคือ 1:10 (w/v) กวนอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มารวมกันและเติม sodium chloride ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2.6 M จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนเจลสีขาวขุ่นมาละลายด้วยสารละลาย acetic acid เข้มข้น 0.5 M หลังจากนั้นนำไป dialyzed ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 เท่า โดยเปลี่ยนน้ำทุก ๆ 8 ชั่วโมง จนกว่าจะได้พีเอชที่เป็นกลาง นำตัวอย่างที่ได้ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อเตรียมนำไปศึกษาต่อ

การศึกษาปริมาณผลผลิตคอลลาเจน (%)

วิเคราะห์ความชื้นตามวิธีการของ AOAC (2000) โดยชั่งน้ำหนักหนังปลากราย (บันทึกน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงในถ้วยอลูมิเนียมที่ผ่านการอบไล่ความชื้นและทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำถ้วยอลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างอบในตู้อบไฟฟ้าที่ตั้งอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ทำการอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำถ้วยอะลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง นำถ้วยอะลูมิเนียมที่บรรจุตัวอย่างไปชั่งน้ำหนักและนำไปอบซ้ำทุก ๆ 30 นาที ทำให้เย็นในโถดูดความชื้นจนกว่าจะได้น้ำหนักคงที่ (น้ำหนักที่ชั่งทั้ง 2 ครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัม) หาความชื้นของหนังปลากรายได้จากสูตร ความชื้น = (น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม) – น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ (กรัม))/น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม) จากนั้นปริมาณผลผลิตคอลลาเจน (dry basis) คำนวณได้ดังนี้

$$\text{ปริมาณผลผลิตคอลลาเจน (dry basis) (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักคอลลาเจนหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (กรัม)} \times 100}{\text{น้ำหนักหนังปลาสด (ที่หักลบความชื้น) เริ่มต้น (กรัม)}}$$

การศึกษารูปแบบโปรตีนคอลลาเจนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

ละลายคอลลาเจนในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate) เข้มข้น 5% บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายส่วนใสด้วยวิธี Lowry โดยใช้ bovine serum albumin เป็นสารละลายมาตรฐาน และวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนโดยใช้ polyacrylamide เข้มข้น 7.5% ตามวิธีของ Laemmli (Laemmli, 1970) โดยนำสารละสายส่วนใสผสมกับ gel loading buffer (Tris-HCl เข้มข้น 12.5 mM พีเอช 6.8, SDS เข้มข้น 4%, glycerol เข้มข้น 20%, ß-mercaptoethanol เข้มข้น 10% และ bromophenol blue เข้มข้น 0.1%) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 3 นาที ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ ย้อมสีด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 เข้มข้น 0.125% และล้างสีออกด้วย ethanol เข้มข้น 25% และกรด acetic เข้มข้น 10%

การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซท

การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซทดัดแปลงจากวิธีของ Piyadhammaviboon *et al.* (2012) โดยละลายคอลลาเจนในบัฟเฟอร์ McIlvain (พีเอช 2 และ 8) เข้มข้น 0.2 M อัตราส่วน 1:10 (w/w) เติมเอนไซม์ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสและควบคุมให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ โดยเอนไซม์เพปซินย่อยที่พีเอช 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ทริปซินและอัลคาเลสย่อยที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส อัตราส่วนของเอนไซม์ต่อคอลลาเจนคือ 1:100 (w/w) ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำร้อนแบบเขย่า เก็บตัวอย่างที่ได้จากการย่อยที่เวลา 0, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปให้ความร้อนในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปรับพีเอชของตัวอย่างให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลาย sodium hydroxide เข้มข้น 1 M หรือสารละลาย hydrochloric acid เข้มข้น 1 M นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใสที่ได้สำหรับการทดสอบต่อไป

การศึกษาระดับการย่อยสลาย

นำตัวอย่างที่ได้จากการย่อยของแต่ละเอนไซม์มาศึกษาระดับการย่อยสลายโดยทำตามวิธีของ Alder-Nissen (1979) ตัวอย่าง 50 µl ผสมกับบัฟเฟอร์ phosphate เข้มเข้น 0.215 M พีเอช 8.2 และ trinitrobenzenesulfonic acid เข้มข้น 0.5% ปริมาตร 0.5 ml บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติม hydrochloric acid เข้มข้น 0.1 N ปริมาตร 1 ml และตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 420 นาโนเมตรโดยใช้ glycine เป็นสารมาตรฐาน การกำหนดปริมาณกรดอะมิโนทั้งหมดในคอลลาเจนทำได้โดยเติม hydrochloric acid เข้มข้น 6 N (ตัวอย่างคอลลาเจน:กรด เท่ากับ 1:100) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียสโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำ (autoclave) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระดับการย่อยสลายคำนวณดังนี้

$$\text{Degree of hydrolysis (DH)} = [(hs - ho)/ht] \times 100\%$$

โดย hs = ปริมาณของ **α**-amino acid ของตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ, ho = ปริมาณของ **α**-amino acid ของตัวอย่างที่เวลาที่ 0 ชั่วโมง, ht = ปริมาณของ **α**-amino acid ทั้งหมดหลังจากย่อยด้วยกรด

การศึกษาความสามารถในการยับยั้ง ACE

คอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และเวลาที่แตกต่างกันถูกนำไปทดสอบการยับยั้ง ACE โดยดัดแปลงจากวิธีของ Park *et al.* (2003) คอลลาเจนไฮโดรไลเซทปริมาตร 50 µl ผสมกับสารละลาย ACE (25 mU/ml) ปริมาตร 50 µl บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม hippuryl-histidyl-leucine (6 mM ในบัฟเฟอร์ Tris เข้มข้น 50 mM ที่มี NaCl เข้มข้น 300 mM) ปริมาตร 100 µl บ่มตัวอย่างต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาหยุดปฏิกิริยาโดยเติม hydrochloric acid เข้มข้น 1 M ปริมาตร 200 µl จากนั้นสกัด hippuric acid โดยเติมสารละลาย ethyl acetate จำนวน 600 µl นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000×g เป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายส่วนใสชั้นบน (200 µl) ใส่หลอดทดลองและนำไประเหยเพื่อกำจัด ethyl acetate จากนั้นเติมน้ำร้อนปริมาตร 1 ml เพื่อละลาย hippuric acid วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 228 นาโนเมตร ระดับการยับยั้งคำนวณดังนี้

$$\text{Inhibition (\%)} = [1-(As/Ao)] \times 100$$

โดย Ao = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างควบคุม, As = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างสารทดสอบ

การศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging ดัดแปลงจากวิธีของ Shimada *et al.* (1992) คอลลาเจนไฮโดรไลเซทปริมาตร 150 µl ผสมกับ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) เข้มข้น 0.1 mM ในสารละลาย ethanol 95% ปริมาตร 1.35 ml บ่มตัวอย่างในสภาวะที่ไม่มีแสงสว่างเป็นเวลา 45 นาทีที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ระดับการยับยั้งคำนวณดังนี้

$$\text{DPPH radical scavenging (\%)} = [(Ao - As)/ Ao] \times 100$$

โดย Ao = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาในสภาวะที่ไม่มีคอลลาเจนไฮโดรไลเซท, As = ค่าการดูดกลืนแสงของปฏิกิริยาในสภาวะที่มีคอลลาเจนไฮโดรไลเซท

วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP)

ศึกษาความสามารถในรีดิวซ์ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทด้วยวิธี FRAP โดยดัดแปลงจากวิธีของ Benzie & Strain (1996) สารละลาย FRAP (บัฟเฟอร์ acetate เข้มข้น 0.3 M พีเอช 3.6 ปริมาตร 25 ml 2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine เข้มข้น 10 mM ละลายใน acetic acid เข้มข้น 40 mM ปริมาตร 2.5 ml $FeCl_3.6H_2O$ เข้มข้น 20 mM ปริมาตร 2.5 ml) ปริมาตร 1.5 ml ผสมกับคอลลาเจนไฮโดรไลเซท ปริมาตร 200 µl บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 8 นาที จากนั้นปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 10,000×g เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร คำนวณประสิทธิภาพในการรีดิวซ์โดยใช้ $FeSO_4$ เป็นสารมาตรฐาน

การศึกษาผลของขนาดคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่มีต่อความสามารถในการยับยั้ง ACE และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

คอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดจึงเลือกตัวอย่างนี้มาทำการแยกขนาดด้วยเยื่อกรองอัลตราฟิวเตชัน โดยขนาดที่ศึกษาคือ crude hydrolysates, ขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน, ขนาด 10-30 กิโลดาลตัน และขนาดน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน นำเพปไทด์ที่ได้จากแต่ละส่วนไปศึกษาความสามารถในการยับยั้ง ACE และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging และ FRAP ดังวิธีการที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การวิเคราะห์ข้อมูล

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design, CRD) นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปในการคำนวณทางสถิติ

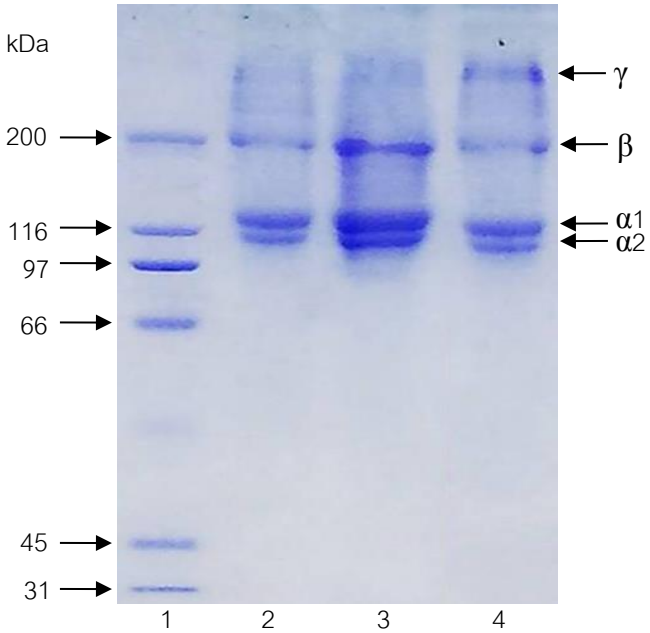
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาปริมาณผลผลิตคอลลาเจน

คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลากรายมีปริมาณผลผลิต 35.67% โดยน้ำหนักแห้ง ซึ่งปริมาณผลผลิตที่สกัดได้มีความใกล้เคียงกับคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาสลาด (*Notopterus notopterus*) และหนังปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยปริมาณผลผลิตที่ได้คือ 38.25% และ 39.40% ตามลำดับ (Thahom & Sompongse, 2015; Zeng *et al*., 2009) คอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาบางชนิดมีปริมาณผลผลิตมากกว่าคอลลาเจนจากหนังปลากราย ได้แก่ หนังปลากะพงญี่ปุ่น (*Lateolabrax japonicas*) หนังปลาซาบะ (*Scomber japonicas*) มีปริมาณผลผลิตคอลลาเจน 51.40 % และ 49.80% ตามลำดับ (Nagai & Suzuki, 2000b) ในขณะที่คอลลาเจนจากหนังปลาตาหวาน (*Priacanthus tayenus*) และหนังปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) มีปริมาณผลผลิต 10.94% และ 12.80% ตามลำดับ (Kittiphattanabawon *et al*., 2005; Singh *et al*., 2011) ซึ่งน้อยกว่าหนังปลากราย ทั้งนี้การที่ปริมาณผลผลิตคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันอาจเป็นเพราะความแตกต่างของวิธีการสกัด ชนิดของปลา พฤติกรรม ภูมิอากาศ และถิ่นอาศัย (Thahom & Sompongse, 2015)

การศึกษารูปแบบโปรตีนคอลลาเจนด้วยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอีเลคโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

จากภาพที่ 1 พบว่าคอลลาเจนจากหนังปลากรายมีแถบโปรตีน 4 แถบ คือ โปรตีน γ, β, α1 และ α2 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Giraud-Guille *et al*. (2000) ที่ได้รายงานว่าคอลลาเจนจากหนังปลาส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของโปรตีน γ, β, α1 และ α2

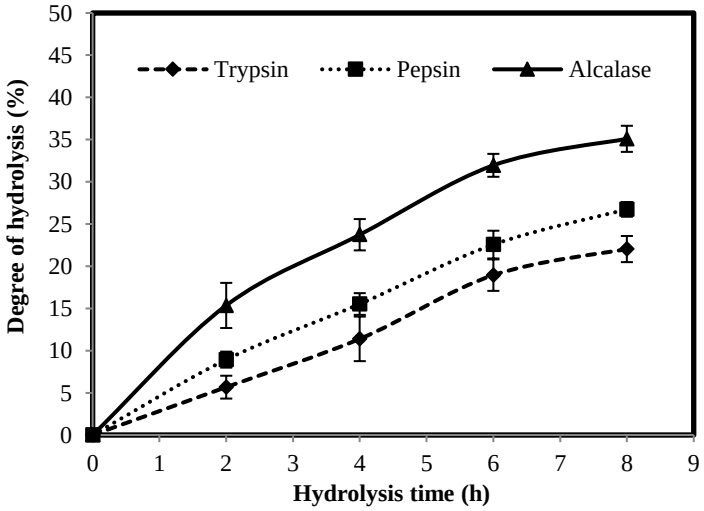


ภาพที่ 1 รูปแบบโปรตีนของคอลลาเจนจากหนังปลากรายวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE (1) = โปรตีนมาตรฐาน (2) = คอลลาเจนจากหนังปลากราย 10 µg (3) = คอลลาเจนจากหนังปลากราย 15 µg (4) = คอลลาเจน Type I จากหนังลูกวัว

เมื่อเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนจากหนังปลากรายและคอลลาเจนจากหนังลูกวัว type I พบว่าขนาดโมเลกุลของคอลลาเจนทั้ง 2 ชนิดมีความใกล้เคียงกันแสดงว่าคอลลาเจนจากหนังปลากรายเป็นคอลลาเจน type I คอลลาเจนส่วนใหญ่ที่ได้จากส่วนของหนัง เกล็ด และกระดูกของปลามักเป็นคอลลาเจน type I (Kittiphattanabawon *et al*., 2005; Wang *et al*., 2013; Nagai & Suzuki, 2000a) โดยปกติคอลลาเจน type I จะมีองค์ประกอบของโปรตีนอยู่ 2 รูปแบบคือ ($[\alpha 1]_2\ \alpha 2$) และ ($\alpha 1\alpha 2\alpha 3$) อย่างไรก็ตามถ้าคอลลาเจนจากหนังปลากรายมี $\alpha 3$ เป็นองค์ประกอบอยู่จะไม่สามารถสังเกตเห็นแถบโปรตีนของ $\alpha 3$ ได้เนื่องจากในการวิเคราะห์รูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตำแหน่งของ $\alpha 3$ จะอยู่ตำแหน่งเดียวกับ $\alpha 1$ (Kimura, 1992)

การศึกษาระดับการย่อยสลาย

คอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ แสดงระดับการย่อยสลายดังภาพที่ 2 ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มตัวอย่างมากขึ้น โดยระดับการย่อยสลายของทุกเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการย่อยสลาย เมื่อตัวอย่างถูกบ่มต่อจนถึงชั่วโมงที่ 8 พบว่าระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย Barzideh *et al*. (2014) รายงานว่าพันธะเพปไทด์ส่วนใหญ่ถูกย่อยอย่างรวดเร็วด้วยเอนไซม์ภายในช่วง 3-5 ชั่วโมงแรกของการย่อย



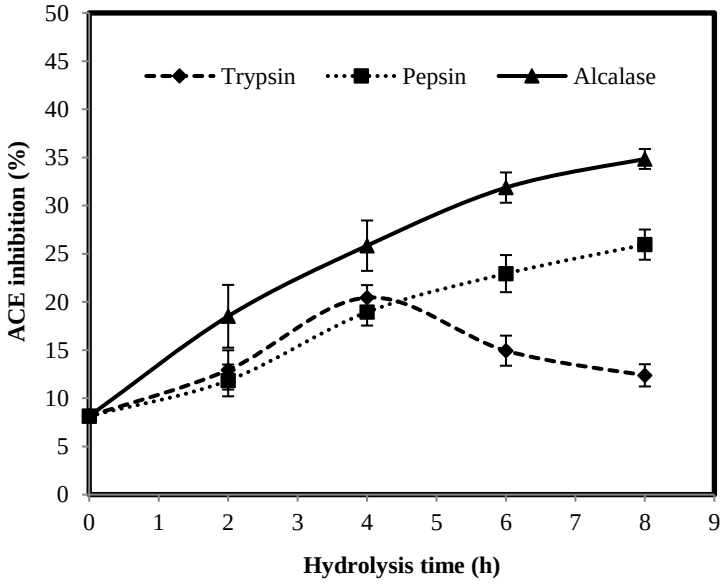
ภาพที่ 2 ระดับการย่อยสลายคอลลาเจนจากหนังปลากรายด้วยเอนไซม์ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

เมื่อเปรียบเทียบระดับการย่อยสลายของแต่ละเอนไซม์พบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ Aleman *et al*. (2011) ที่ได้รายงานว่าหนังปลาทูน่า (*Thunnus* spp.) และหนังปลาฮาลิบัท (*Hypoglossus* spp.) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์อื่น ๆ เอนไซม์ทริปซิน เปปซินและอัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มเอนโดโปรติเนส (endoproteinase) โดยเอนไซม์ทริปซินเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโน lysine และ arginine ที่ด้านคาร์บอกซิลของพันธะเพปไทด์

(Siepen *et al*., 2007) เอนไซม์เปปซินมีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น phenylalanine, tryptophan, tyrosine และกรดอะมิโน leucine และ glutamic acid (Simpson, 2000; You *et al*., 2010) ขณะที่เอนไซม์อัลคาเลสเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง (phenylalanine, tryptophan, tyrosine) กรดอะมิโนที่เป็นกรด (glutamic acid) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (methionine) กรดอะมิโนที่เป็นโซ่ตรง (leucine, alanine) กรดอะมิโนที่มีหมู่ -OH (serine) และกรดอะมิโนที่เป็นเบส (lysine) ดังนั้นการที่เอนไซม์อัลคาเลสมีความจำเพาะกว้างต่อกรดอะมิโนอาจจะทำให้คอลลาเจนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงกว่าเอนไซม์ทริปซินและเปปซิน อย่างไรก็ตามระดับการย่อยสลายพบสูงที่สุดเมื่อปลิงทะเล (*Actinopyga lecanora*) และหนังปลาอลาสกาพอลล็อค (*Theragra chalcogramma*) ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์โปรตาเมค ตามลำดับ (Ghanbari *et al*., 2015; Jia *et al*., 2010) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดของเอนไซม์ สารตั้งต้น และระยะเวลาในการย่อยสลายมีผลต่อระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดรไลเซท

การศึกษาความสามารถในการยับยั้ง ACE

คอลลาเจนจากหนังปลากรายที่ยังไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ใด ๆ แสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE อยู่ที่ 8.14% (ภาพที่ 3) เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้ง ACE ภายในเอนไซม์ชนิดเดียวกันพบว่าความสามารถในการยับยั้ง ACE เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น โดยเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและเปปซินแสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ดีที่สุดเมื่อมีการย่อยเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้สูงที่สุด ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE ระหว่างเอนไซม์พบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้สูงที่สุดคือ 34.84% ($p \leq 0.05$) รองมาคือเพปไทด์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน (25.95%) และทริปซิน (20.45%) ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองมีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lee *et al*. (2009) ที่ได้รายงานว่าโรติเฟอร์ทะเล (*Brachionus rotundiformis*) ไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ α-ไคโมทริปซิน นิวเทรส ปาเปน และทริปซิน Balti *et al*. (2010) พบว่าเพปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ดีจะมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ตำแหน่งที่สามจากปลายสายด้านคาร์บอกซิล นอกจากนี้เพปไทด์ที่มีองค์ประกอบของกรดอะมิโนเป็นกลุ่มที่ไม่ชอบน้ำ (aromatic หรือ branched side chain) เช่น proline, valine, phenylalanine และ tyrosine อยู่บริเวณปลายด้านคาร์บอกซิลจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE โดยเพปไทด์เหล่านี้จะเข้าจับที่บริเวณเร่ง (active site) ของ ACE (He *et al*., 2007; Philanto, 2000) การที่เอนไซม์อัลคาเลสมีความจำเพาะกว้างต่อกรดอะมิโนอาจจะทำให้เอนไซม์อัลคาเลสสามารถย่อยคอลลาเจนได้หลายตำแหน่ง และเอนไซม์อัลคาเลสยังเป็นเอนไซม์ในกลุ่มเอนโดโปรติเนส ซึ่งจะตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีนทำให้ได้เปปไทด์หลายขนาดคือขนาดกลางและขนาดสั้น (Doucet *et al.,* 2003; Adler-Nissen, 1986) จึงอาจจะส่งผลให้ได้เพปไทด์ที่มีความจำเพาะต่อการยับยั้ง ACE มากขึ้น จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพการยับยั้ง ACE ไม่ได้ขึ้นอยู่กับระดับการย่อยสลายเพียงอย่างเดียว แต่ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์ ระยะเวลาในการย่อย และอาจรวมถึงองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในสายเพปไทด์



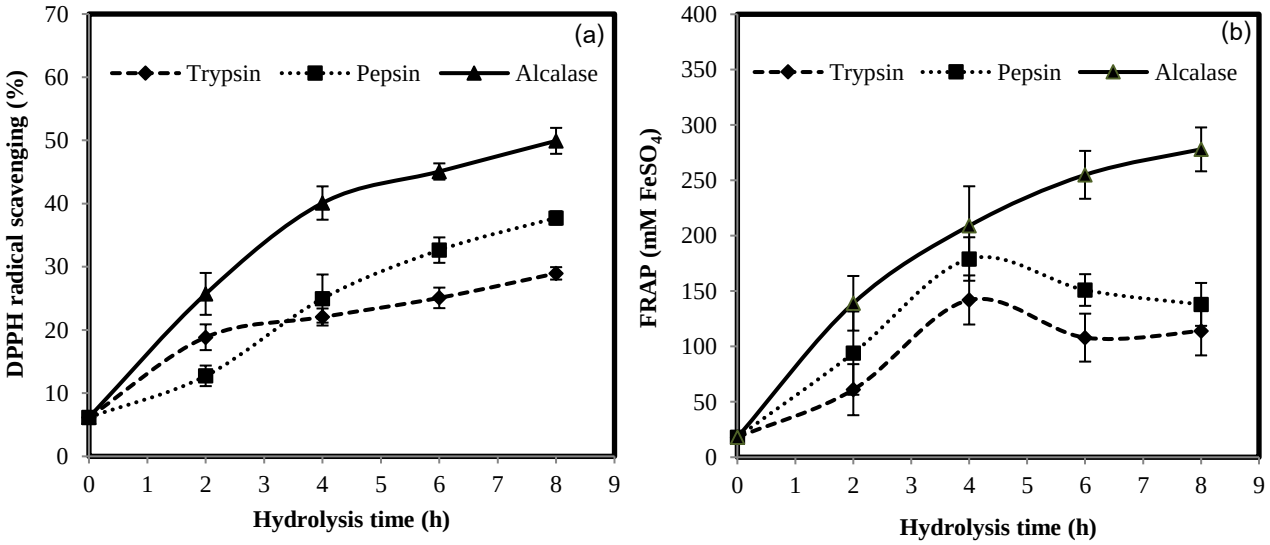
ภาพที่ 3 ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระ

วิธี DPPH radical scavenging

การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH radical scavenging เป็นการศึกษาประสิทธิภาพของสารตัวอย่างในการรวมตัวกับ DPPH ที่อยู่ในรูปอนุมูลอิสระ โดย DPPH คืออนุมูลอิสระที่เสถียรและสามารถรับอิเล็กตรอนได้ เมื่อได้รับอะตอมไฮโดรเจนจากโมเลกุลอื่นจะทำให้เปลี่ยนเป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ จากภาพที่ 4a เมื่อระดับการย่อยสลายของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทเพิ่มขึ้นทำให้ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงขึ้น โดยเพปไทด์ที่มีการย่อยด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) ซึ่งผลการทดลองของเอนไซม์ทั้งสามชนิดเป็นไปในทิศทางเดียวกันแสดงว่าระดับการย่อยสลายเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างมากต่อการผลิตเพปไทด์ที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 49.93% ในขณะที่การย่อยคอลลาเจนด้วยเอนไซม์ทริปซินทำให้ได้เพปไทด์ที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งอนุมูลอิสระต่ำที่สุด ($p \leq 0.05$) โดยสามารถยับยั้งได้ 28.96% ทั้งนี้อาจเป็นเพราะคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสมีระดับการย่อยสลายสูงกว่าเอนไซม์อื่น ๆ จึงทำให้ได้เพปไทด์ที่สามารถให้อะตอมไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระได้มากกว่า ส่งผลให้เพปไทด์เหล่านี้สามารถจับกับอนุมูลอิสระและเปลี่ยนให้เป็นโมเลกุลที่ไม่อยู่ในรูปของอนุมูลอิสระ (Pazinatto *et al.,* 2013) นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งอนุมูลอิสระมีความเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ซึ่งกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ที่แสดงบทบาทสำคัญในการยับยั้งอนุมูลอิสระคือกรดอะมิโนกลุ่มอะโรมาติก (tyrosine, histidine, tryptophan และ phenylalanine) กรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (valine, leucine และ alanine) และกรดอะมิโน methionine (Chen *et al*., 1998; Rajapakse *et al*., 2005)

ขณะที่มีรายงานว่าคอลลาเจนจากหนังปลากรายมีกรดอะมิโนกลุ่มไม่ชอบน้ำอยู่สูง (Kittiphattanabawon *et al*., 2015) จึงอาจจะส่งผลให้คอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งในการต้านอนุมูลอิสระ เพปไทด์จะทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระทั้งแบบปฐมภูมิและแบบทุติยภูมิโดยการดักจับอนุมูลอิสระ (scavenging free radicals) การยับยั้งการทำงานของออกซิเจนที่ขาดอิเล็กตรอน (singlet oxygen) และจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ (chelating metals) (Venskutonis, 2014)



ภาพที่ 4 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน เปปซิน และอัลคาเลสที่ระยะเวลาต่าง ๆ วิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging (a) และวิธี FRAP (b) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

วิธี FRAP

วิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) เป็นการวัดความสามารถของสารต้านอนุมูลอิสระในการให้อิเล็กตรอนอิสระ (reducing agent) โดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริค Fe^{3+} กับ TPTZ (Ferric tripyridyltriazine) ซึ่งสารประกอบเชิงซ้อนจะถูกรีดิวซ์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สามารถให้อิเล็กตรอนทำให้ได้เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอรัส Fe^{2+} กับ TPTZ (Ferrous tripyridyltriazine) จากผลการทดลองพบว่าคอลลาเจนที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ใด ๆ มีความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคได้สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ ($p \leq 0.05$) (ภาพที่ 4b) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์จะตัดพันธะเพปไทด์ภายในคอลลาเจนทำให้ได้เพปไทด์ที่สามารถให้อิเล็กตรอนได้มากกว่าจึงทำให้ประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคสูงกว่า นอกจากนี้ตัวอย่างที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสและมีระยะเวลาการย่อย 8 ชั่วโมงแสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคได้ดีที่สุด ($p \leq 0.05$) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยสลายเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคของเพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและเปปซินพบสูงที่สุดเมื่อตัวอย่างถูกย่อยเป็นเวลา 4 ชั่วโมงและความสามารถในการรีดิวซ์ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการย่อยมากกว่า 4 ชั่วโมง ดังนั้นระดับการย่อยสลายอาจจะไม่ใช่ปัจจัยหลักที่มีผลต่อการรีดิวซ์

เหล็กเฟอริคของเพปไทด์จากหนังปลากรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและเปปซิน Zambrowicz *et al.* (2012) รายงานว่าโปรตีนไข่แดงที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเป็นเวลา 4 ชั่วโมงแสดงระดับการย่อยสลายดีที่สุด ขณะที่เพปไทด์จากโปรตีนไข่แดงที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 1 ชั่วโมงมีประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของเอนไซม์ทั้งสามชนิดพบว่าเอนไซม์อัลคาเลสมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด ($p \leq 0.05$) รองมาคือเอนไซม์เปปซินและทริปซิน ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่านอกจากระดับการย่อยสลายแล้ว ชนิดของเอนไซม์และองค์ประกอบของกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ก็อาจจะมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการรีดิวซ์ด้วยเช่นกัน ซึ่งกรดอะมิโนภายในเพปไทด์ที่แสดงความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคอาจจะแตกต่างจากกรดอะมิโนที่มีความสามารถในการต้านอนุมูล DPPH

การศึกษาผลของขนาดคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่มีต่อความสามารถในการยับยั้ง ACE และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ

เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging และ FRAP (ภาพที่ 3 และ 4) ดังนั้นตัวอย่างนี้จึงถูกเลือกเพื่อนำมาแยกขนาดด้วยเยื่อกรองอัลตราฟิวเตชัน จากตารางที่ 1 พบว่าเพปไทด์ที่มีขนาดต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE และแสดงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH radical scavenging ได้ดีที่สุด ($p \leq 0.05$) ขณะที่เพปไทด์ที่มีขนาด 10-30 กิโลดาลตัน และขนาดต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันแสดงประสิทธิภาพในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริคได้ดีที่สุด ($p \leq 0.05$)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการยับยั้ง ACE และการต้านอนุมูลอิสระของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงและผ่านการแยกขนาดด้วยเยื่อกรองอัลตราฟิวเตชัน

Molecular weight	ACE inhibition (%)	DPPH radical scavenging (%)	FRAP (mM $FeSO_4$)
Crude hydrolysate	35.04 ± 0.96^{c}	49.68 ± 1.01^{c}	275.67 ± 3.06^{c}
>30 kDa	36.62 ± 1.14^{c}	51.94 ± 1.75^{bc}	287.53 ± 1.55^{b}
10-30 kDa	$43.11 + 1.59^{b}$	54.32 ± 1.14^{b}	294.60 ± 5.09^{a}
<10 kDa	50.35 ± 2.42^{a}	59.06 ± 1.20^{a}	304.56 ± 1.58^{a}

[a,b] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

จากผลการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าขนาดของเพปไทด์มีผลต่อประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากราย Philanto (2000) รายงานว่าเพปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนประมาณ 3-20 ตัวและเพปไทด์ที่มีสายสั้นมักมีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ดี Gómez-Ruiz *et al.* (2007) พบว่าเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่จะกีดขวางการเข้าจับที่บริเวณเร่ง (active site) ของ ACE จึงทำให้เพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ต่ำกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก Saiga *et al.* (2008) รายงานว่าเพปไทด์ที่ได้จากคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากขาไก่ที่มีลำดับเพปไทด์

Gly-Ala-Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Pro (697.4 ดาลตัน) มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ได้ดี นอกจากนี้ขนาดของเพปไทด์ยังมีผลต่อการต้านอนุมูลอิสระโดยเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กกว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ (Ranathunga *et al*., 2006) Je *et al*. (2005) กล่าวว่าเพปไทด์จากก้างปลาอลาสก้าพอลล็อค (*Theragra chalcogramma*) ที่มีขนาดต่ำกว่า 1 กิโลดาลตันมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด ในขณะที่โปรตีนเลือดหมูไฮโดรไลเซทสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุดเมื่อเพปไทด์มีขนาดต่ำกว่า 3 กิโลดาลตัน (Liu *et al*., 2010) Umayaparvathi *et al*. (2014) รายงานว่าเนื้อหอยนางรมไฮโดรไลเซทที่มีลำดับเพปไทด์ Leu-Ala-Asn-Ala-Lys (515.29 ดาลตัน) สามารถยับยั้งอนุมูล DPPH ได้สูงถึง 83.79% จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าขนาดของเพปไทด์ที่ได้จากหนังปลากรายมีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยเพปไทด์ที่มีขนาดเล็กมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีขนาดใหญ่

สรุปผลการวิจัย

การย่อยคอลลาเจนด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่แสดงระดับการย่อยสลายสูงที่สุดส่งผลให้คอลลาเจนไฮโดรไลเซทที่ได้มีความสามารถในการยับยั้ง ACE และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด เพปไทด์ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสเป็นเวลา 8 ชั่วโมงและมีขนาดต่ำกว่า 10 กิโลดาลตันเป็นกลุ่มเพปไทด์ที่แสดงฤทธิ์ทางชีวภาพได้ดีที่สุด จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าระดับการย่อยสลายและขนาดของเพปไทด์ที่ได้จากคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ดังนั้นคอลลาเจนไฮโดรไลเซทจากหนังปลากรายมีแนวโน้มที่จะใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพที่ได้จากธรรมชาติและมีคุณสมบัติในการควบคุมความดันโลหิตสูงและต้านอนุมูลอิสระได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนเงินทุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzensulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *27*, 1256-1262.

Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. London: Elsevier Applied Science Publishers.

Aleman, A., Gimenez, B., Montero, P., & Gomez-Guillen, M.C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology, 44,* 407-413.

AOAC. (2000). *Official Methods of Analysis.* 17th ed. Association of official analytical chemists. Gaithersburg: Md.

Atkinson, A.B., & Rovertson, J. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet, 2,* 836-839.

Baehaki, A., Nopianti, R., & Anggraeni, S. (2015). Antioxidant activity of skin and bone collagen hydrolyzed from striped catfish (*Pangasius pangasius*) with papain enzyme. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, 7,* 131-135.

Balti, R., Bougatef, A., El-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A., & Nasri, M. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90,* 2006-2014.

Barzideh, Z., Latiff, A.A., Gan, C., Abedin, M.Z., & Alias, A.K. (2014). ACE inhibitory and antioxidant activities of collagen hydrolysates from the ribbon jellyfish (*Chrysaora* sp.). *Food Technology and Biotechnology, 52,* 495-504.

Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. (1996). Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry, 239*, 70-76.

Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., & Nokihara, K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46,* 49-53.

Doucet, D., Otter, D.E., Gauthier, S.F., & Foegeding, E.A. (2003). Enzyme-induced gelation of extensively hydrolyzed whey proteins by alcalase: peptide identification and determination of enzyme specificity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50,* 6300-6308.

Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A., & Saari, N. (2015). Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences, 16*, 28870-28885.

Giraud-Guille, M.M., Besseau, L., Chopin, C., Durand, P., & Herbage, D. (2000). Structural aspects of fish skin collagen which forms ordered arrays via liquid crystalline states. *Biomaterial, 21,* 899-906.

Gómez-Ruiz, J.A., Ramos, M., & Recio, I. (2007). Identification of novel angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides from ovine milk proteins by CE-MS and chromatographic techniques. *Electrophoresis, 28,* 4202-4211.

He, H.L., Chen, X.L., Wu, H., Sun, C.Y., Zhang, Y.Z., & Zhou, B.C. (2007). High throughput and rapid screening of marine protein hydrolysates enriched in peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity by capillary electrophoresis. *Bioresource Technology, 98,* 3499-3505.

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 gelatine attenuates angiotensin-1 converting enzyme (ACE) activity and cellular oxidative stress. *Food Chemistry, 132,* 1872-1882.

Je, J.Y., Park, P.J., & Kim, S.K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International, 38,* 45-50.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y., & Zheng, G. (2010). Enzymatic hydrolysis of Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysates. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90,* 635-640.

Kimura, S. (1992). Wide distribution of the skin type I collagen α3 chain in bony fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B, 102,* 255-260.

Kittiphattanabawon, P., Benjukul, S., Sinthusamran, S., & Kishimura, Hideki. (2015). Characteristics of collagen from the skin of clown featherback (*Chitala ornata*). *International Journal of Food Science and Technology, 50,* 1972-1978.

Kittiphattanabawon, P., Benjukul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., & Tanaka, M. (2005). Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snaper (*Priacanthus tayenus*). *Food Chemistry, 89,* 363-372.

Kuo, P.L., & Pu, C. (2011). The contribution of depression to mortality among elderly with self-reported hypertension: Analysis using a national representative longitudinal survey. *Journal of Hypertension, 29,* 2084-2090.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly head of bacteriophage T4. *Nature, 277,* 680-685.

Lee, J.K., Hong, S., Jeon, J.K., Kim, S.K., & Byun, H.G. (2009). Purification and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from the rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Bioresource Technology, 100,* 5255-5259.

Lee, S.H., Qian, Z.J., & Kim, S.K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysates and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry, 118,* 96-102.

Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y.L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysates influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry, 118,* 403-410.

Nagai, T., & Suzuki, N. (2000a). Isolation of collagen from fish waste material-skin, bone and fins. *Food Chemistry, 68,* 277-281.

Nagai, T., & Suzuki, N. (2000b). Preparation and characterization of several fish bone collagens. *Journal of Food Biochemistry, 24,* 427-436.

Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Park, J.W., & Kim, S.K. (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods, 2,* 107-117.

Park, P.J., Je, J.Y., & Kim, S.K. (2003). Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of hetero-chitooligosaccharides prepared from partially different deacetylated chitosans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51,* 4930-4934.

Pazinatto, C., Malta, L.G., Pastore, G.M., & Netto, F.M. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology, 33,* 485-493.

Philanto, L. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory. *Trends in Food Science and Technology, 11,* 347-356.

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 byproducts. *Journal of aquatic food product technology, 21,* 265-278.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., & Kim, S.K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry, 16,* 562-569.

Ranathunga, S., Rajapakse, N., & Kim, S.K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *European Food Research and Technology, 222,* 310-315.

Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., & Morimatsu, F. (2008). Angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56,* 9586-9591.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40,* 945-948.

Sica, M.D., & Domenic, A. (2003). Combination angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker therapy: its role in clinical practice. *Journal of Clinical Hyperttension, 5,* 414-420.

Siepen, J.A., Keevil, E.J., Knight, D., & Hubbard, S.J. (2007). Prediction of missed cleavage sites in tryptic peptides aids protein identification in proteomics. *Journal of Proteome Research, 6,* 399-408.

Simpson, B.K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In N.M. Haard, & B.K. Simpson. (Eds.), *Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality.* (pp. 531-540). New York: Marcel Dekker.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry, 124,* 97-105.

Thahom, N., & Sompongse, W. (2015). Characterisation of acid-soluble collagen from skin of grey featherback (*Notopterus notopterus*). *Thai Journal of Science and Technology, 23*, 257-267. (in Thai)

Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugama, M., Sivagami, G., & Balasubramaniana, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine and Preventive Nutrition, 4,* 343–353.

Venskutonis, P.R. (2014). Natural antioxidants in food systems. In G. Bartosz. (Eds.), *Food oxidants and antioxidants: chemical, biological, and functional properties.* (pp. 235-301). New York: CRC Press.

Wang, B., Wang, Y.M., Chi, C.F., Luo, H.Y., Deng, S.G., & Ma, J.Y. (2013). Isolation and characterization of collagen and antioxidant collagen peptides from scales of croceine croaker (*Pseudosciaena crocea*). *Marine Drugs, 11,* 4641-4661.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., & Yongsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry, 132,* 104-111.

You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry, 120*, 810-816.

Zambrowicz, A., Pokora, M., Eckert, E., Szoltysik, M., Dbrowska, A., Chrzanowska, J., & Trziszka, T. (2012). Antioxidant and antimicrobial activity of lecithin free egg yolk protein preparation hydrolysates obtained with digestive enzymes. *Functional Foods in Health and Disease, 2,* 487-500.

Zeng, S.K., Zhang, C.H., Lin, H., Yang, P., Hong, P.Z., & Jiang, Z. (2009). Isolation and characterisation of acid-solubilised collagen from the skin of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry, 116,* 879-883.