บทคัดย่อ

ปัจจุบันมีการเพิ่มมูลค่า พัฒนา และใช้ประโยชน์เลือดจระเข้เพิ่มมากขึ้น แต่ยังขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมี และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ ที่มีอยู่ในเลือด รวมถึงส่วนต่างๆ ที่แยกจากเลือดจระเข้พันธุ์ไทย การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญโดยเจาะเก็บเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) อายุ 2-4 ปี ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงจากภาคต่างๆ (กลาง ตะวันออก และใต้) พบว่าในเลือดครบโปรตีนมีปริมาณมากที่สุด (87.4 g/100g) รองลงมาคือ ไขมัน (2.4 g/100g) และคาร์โบไฮเดรต (0.6 g/100g) ส่วนในซีรัมพบมีโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ปริมาณ 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g ตามลำดับ โดยในเลือดครบมีโปรตีน ฟอสฟอรัส และเหล็กมากกว่าในซีรัม วิตามินที่พบในเลือดจระเข้ปริมาณมากที่สุดได้แก่ วิตามินซี รองลงมา คือ วิตามินบี2, วิตามินบี6, วิตามินบี1, และ วิตามินบี12 ตามลำดับ วิตามินที่พบปริมาณน้อยที่สุดคือ วิตามินเอ องค์ประกอบทางเคมีในเลือดจระเข้ฯ ที่ถูกเพาะเลี้ยงในภาคต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันเด่นชัด กรดอะมิโนที่พบปริมาณมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ Glutamic acid (9960.25 mg/100g), Leucine (7761.15 mg/100g), Aspartic acid (7538.34 mg/100g), Lysine (7508.79 mg/100g) และ Alanine (5442.63 mg/100g) ตามลำดับ กรดอะมิโนที่พบปริมาณน้อยที่สุด 3 อันดับสุดท้าย ได้แก่ Tryptophan (1006.58 mg/100g), Methionine (1197.69 mg/100g) และ Isoleucine (2054.58 mg/100g) ตามลำดับ การศึกษารูปแบบโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในภาวะที่มีเมอร์เคปโทเอทานอลเป็นสารรีดิวซ์ ที่ 10% (w/v) ของเจลส่วนแยก พบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนจากตัวอย่างเลือดจระเข้ส่วนที่แตกต่างกัน

การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดโดยไม่ทำลายชีวิตจากจระเข้พันธุ์ไทย (*C. siamensis*) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง เจาะเก็บเลือดจระเข้จากแอ่งเลือดดำหลังกระโหลก ปริมาณ 100 มิลลิลิตรต่อตัว และทิ้งมีช่วงห่างของระยะการเจาะเก็บเลือดแต่ละครั้ง ไม่น้อยกว่า 12 สัปดาห์ โดยไม่มีผลกระทบกับการดำรงชีวิตของจระเข้ ซึ่งปริมาณการเจาะเลือดที่เหมาะสมในแต่ละครั้งควรมีการศึกษาต่อไป

การศึกษาฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดครบแห้ง (FD-WB) และส่วนประกอบของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ซีรัม (S) และซีรัมแห้ง (FD-S)) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานและเชื้อรา พบว่า FD-WB (100 mg/ml) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและเชื้อราได้ อีกทั้ง S และ FD-S (100 mg/ml) นั้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ อย่างไรก็ตาม S และ FD-S มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. aerogenes* ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 และ *P. aeruginosa*

ATCC 27853 ได้ และยังมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *C. neoformans* และ *Aspergillus* sp. ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. albicans* แต่อย่างไรก็ตามทั้ง S และ FD-S ไม่สามารถฆ่าเชื้อรา ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าซีรัมสด และซีรัมแห้ง มีศักยภาพในการเป็นสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิดได้

การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันประกอบด้วยภูมิคุ้มกันแต่กำเนิด (innate immunity) และภูมิคุ้มกันปรับใช้ (adaptive immunity) ซึ่งทำหน้าที่ร่วมกันในการกำจัดจุลชีพที่อาจเป็นอันตรายต่อร่างกาย ในบรรดาเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่หลากหลาย แมโครเฟจ (macrophage) และลิมโฟไซต์ (lymphocyte) เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่สำคัญในการเป็นศูนย์กลางของการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อการติดเชื้อ จากการศึกษาการกระตุ้นให้เซลล์เหล่านี้ทำหน้าที่อย่างเหมาะสม โดยใช้เลือดจระเข้และส่วนต่างๆ ที่แยกจากเลือดจระเข้ พบว่าซีรัมจระเข้และพลาสมาระเหิดแห้งมีประสิทธิภาพสูงสุดในการเพิ่มประสิทธิภาพการกลืนกินแบคทีเรียและอนุภาค microspheres ของเซลล์ แสดงให้เห็นว่าสารออกฤทธิ์ที่สำคัญน่าจะเป็นส่วนประกอบของน้ำเลือด

แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ (Angiotensin converting enzyme, ACE) เป็นเอนไซม์ที่พบในระบบเรนนิน-แองจิโอเทนซิน มีหน้าที่ในการควบคุมความดันโลหิต สมดุลน้ำและอิเลคโตรไลท์ของร่างกาย การใช้สารยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติง (ACE inhibitor) เป็นวิธีหนึ่งที่ได้ผลในการรักษาโรคความดันโลหิตสูง งานวิจัยนี้ศึกษาการผลิตเปปไตด์ที่สามารถเป็น ACE inhibitor จากเลือดจระเข้ไทย โดยใช้การย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินและทริปซินที่สภาวะต่างๆ ผลการศึกษาพบว่า ACE inhibitor ที่มีฤทธิ์สูง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 447.35 µg/ml สามารถผลิตได้จากการใช้เอนไซม์เปปซินย่อยเลือดจระเข้เป็นเวลา 10 ชั่วโมง โดยส่วนของเม็ดเลือดที่แยกมาได้จากเลือดจระเข้ให้ฤทธิ์ที่สูงที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 404.12 µg/ml จากการศึกษาการจำลองสภาวะการย่อยอาหารในร่างกายมนุษย์พบว่า การรับประทานเลือดจระเข้สามารถผลิต ACE inhibitory peptide ได้เช่นกัน แต่ ACE inhibitory peptide ที่ผลิตได้มีฤทธิ์ต่ำกว่าเปปไตด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์เปปซิน

จากการสังเกตการสมานบาดแผลของผิวหนังจระเข้ภายหลังการต่อสู้กัน จึงได้ทำการศึกษาผลของเลือดจระเข้ที่มีต่อการหายของแผลทั้งผลในหลอดทดลอง และในร่างกาย (*in vitro – in vivo* effect) โดยศึกษาพิษต่อเซลล์ของเลือดจระเข้ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์ไฟโบรบลาส (fibroblast) และเซลล์เคอราติโนไซท์ (keratinocyte) และผลต่อการหายของแผลในหนูทดลอง (Re-epithelization in animal model) จากการศึกษาพบว่า ผลการทดลองทั้ง *in vitro* และ *in vivo* เลือดจระเข้ทั้งซีรัมและพลาสมามีผลดีกว่าชุดควบคุมใน *in vitro* effect แต่ไม่แตกต่างใน *in vivo* model และผลจากพลาสมา ที่เหนือกว่าซีรัม น่าจะเป็นผลจากเฮพาริน (heparin) มากกว่า เพราะเฮพารินมี

ผลเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ด้วยตัวมันเอง อย่างไรก็ตามการพัฒนาสารสกัดจากเลือดจระเข้เพื่อนำไปใช้ในทางคลินิก ควรจะต้องผ่านระบบการคัดกรองความบริสุทธิ์ของสารสกัดและความปลอดภัยที่อาจเกิดจากการปนเปื้อนทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์

คำสำคัญ : จระเข้ เลือดจระเข้ สัตว์สมุนไพร องค์ประกอบทางเคมี โปรตีน เพปไทด์ คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เพปไทด์ต้านจุลชีพ ภูมิคุ้มกัน การรักษาบาดแผล ฤทธิ์ต้านความดัน ผลิตภัณฑ์จระเข้ ผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

Abstract

Recently, crocodile blood has been added value, developed and increase in its use. However, the knowledge about chemical compositions and biological properties of Siamese crocodile blood and its fractions has been limited. The analyses of crocodile blood main chemical compositions were collected from Siamese crocodile (*Crocodylus siamensis*) in ages of 2-4 years those were captived in difference parts (Middle, Easthern and Southern parts). Results shows that in whole blood the protein had the highest concentration (87.4 g/100g), followed by total fat (2.4 g/100g) and total carbohydrate (0.6 g/100g). The serum demonstrated protein, total carbohydrate and total fat concentrations in amount of 69.0, 8.2 และ 6.9 g/100g, respectively. In addition, crocodile whole blood had higher levels of protein, phosphorus and iron than in serum. Analysis vitamin components of crocodile blood samples (whole blood, serum) revealed vitamin-C had the highest concentration follow by vitamin-B2, vitamin-B6, vitamin-B1 and vitamin-B12, respectively. Vitamin-A was the lowest content in crocodile bloods. No major differences were observed between blood chemical composition and captive places of crocodile. The five major amino acids were Glutamic acid (9960.25 mg/100g), Aspartic acid (7538.34 mg/100g), Lysine (7508.79 mg/100g) and Alanine (5442.63 mg/100g). The three minor amino acids were Tryptophan (1006.58 mg/100g), Methionine (1197.69 mg/100g) and Isoleucine (2054.58 mg/100g). The protein patterns of crocodile blood were studied by SDS-PAGE method in mercaptoethanol-reducing condition at 10% (w/v) separating gel. The pattern was distinct in difference of crocodile blood types.

The donation of crocodile blood was studied by development of blood collection process on animal life maintains in captive Siamese crocodile (*C. siamensis*). The blood collection at the anterior dorsal sinus in a 100 milliliters volume every 12 weeks was not effect the life style of crocodile blood donors. However, the optimal blood volume has remained to be elucidated.

The antibacterial and antifungal activities of freeze-dried (FD-WB) and blood components (serum, S and freeze-dried serum, FD-S) Siamese crocodile blood were studied against the ATCC strains of bacteria and fungus. The result showed FD-WB (100 mg/ml) could not inhibit bacteria and fungus. In addition, S and FD-S (100 mg/ml) could not inhibit gram positive bacteria. However, S and FD-S inhibited gram negative bacteria such as *E. aerogenes*

ATCC 13048, *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 27736, *S. typhimurium* ATCC 13311 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, and inhibit *C. neoformans* and *Aspergillus* sp., but could not inhibit *C. albicans*. Both S and FD-S did not have minimum fungicidal concentration; MFC. The result showed that the FS and FDS from Siamese Crocodile have a potential of antibacterial and antifungal agent.

The immune system is a crucial defense mechanism of the body that fights infection. It is made up of a wide variety of effector cells and molecules. As parts of the immune system, phagocytes and lymphocytes have central roles in innate and adaptive immunity, respectively. Hence, appropriate stimulation of those cells in a certain circumstances will help the body to battle against harmful microbe. The Siamese crocodile blood and its fractions induced the phagocytic activity of macrophage, cell proliferation, and cytokine secretion from human PBMC, were investigated. The results show that crocodile serum and freeze-dried plasma blood was the most efficient blood products for induction of bacterial and microspheres phagocytic activity of the cells. This effect is possibly caused by the substances inside the serum rather than the blood cells.

Angiotensin converting enzyme (ACE), a multifunctional enzyme present in the rennin-angiotensin system, has a prominent role in the regulations of blood pressure as well as water and electrolyte balance. One of the successful remedy for hypertensive management is an application of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE inhibitor). This study was focused on the production of ACE inhibitory peptide from Siamese crocodile blood. Various peptic and tryptic hydrolysis conditions were applied to generate ACE inhibitory peptide from the blood. The results showed that potent ACE inhibitors can be obtained from 10-hour hydrolysis of pepsin with an IC_{50} of 447.35µg/ml. A blood cell portion of the crocodile blood yielded the highest ACE inhibitory activity with an IC_{50} of 404.12µg/ml. Digestive condition model indicated that ACE inhibitory peptides can be produced from a consumption of crocodile blood. However, the peptides obtained from the digestive condition possessed weaker ACE inhibitory activity than did peptides derived from the peptic hydrolysis.

Base on the observation of healing process on crocodile skin after fighting without any intervention, crocodile blood extraction to wound healing both *in vitro* and *in vivo* result were done. The cytotoxicity test to fibroblast and keratinocyte in vitro and re-epitheliration in animal model were examined. All results showed both serum and plasma of crocodile blood may have some proliferative effect *in vitro* test and plasma showed superior result. Anyways, in animal

model either serum or plasma of crocodile blood failed to accelerate wound healing compare to control site; Zinc paste. Moreover the superior effect of plasma seemed like that was the effect from heparin. Literature reviews showed heparin has its own proliferative effect. However, before developing an animal product for real clinical applications needs to purify the product and also prove of it will not carry animal biological product contamination to human.

Key word: Crocodile, Crocodile blood, Medicinal animal, Chemical compound, Protein, Peptide, Carbohydrate, Lipid, Antimicrobial peptide, Immunity, Wound healing, ACE-inhibitor, Crocodile product, Functional food