



รายงานการวิจัย

การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง เพื่อผลิตสารเสริมคุณภาพเจลและ
เพปไทด์ที่ยับยั้ง ACE และต้านออกซิเดชั่น

(Utilization of fishery byproducts for gel-enhancing agent and ACE
inhibitory and antioxidant peptides)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การใช้วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง เพื่อผลิตสารเสริมคุณภาพเจลและ
เพปไทด์ที่ยับยั้ง ACE และต้านออกซิเดชัน

(Utilization of fishery byproducts for gel-enhancing agent and ACE
inhibitory and antioxidant peptides)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551-2552

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2556

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2551-2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณศิริพร ศิริอังคณากุล คุณพรพิมล สังกข์เพิ่ม และคุณชมภูนุช วิริยะพันธ์ ที่ได้ปฏิบัติงานวิจัยจนสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณศิริัญญา ป้องจันทา และคุณศศิธร แก้วเผือก ที่ช่วยจัดทำรูปเล่มของรายงาน ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารการเบิกจ่าย และจัดทำบัญชีด้วยความเรียบร้อย

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง โดยศึกษาการใช้ประโยชน์โปรตีนจากน้ำล้างเนื้อปลา การผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเอนจิโอเทนซิน (Angiotensin converting enzyme, ACE) และโปรตีนไฮโดรไลเซสที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากวัสดุเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมีรวมถึงก้าง กระดุก และ เศษหนัง และวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการกำจัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยใช้โปรตีนสแหล่งใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. และโปรตีนสทางการค้าคือ เพปซิน ทริปซิน และ อัลคาเลส จากการศึกษพบว่าโปรตีนที่เก็บเกี่ยวได้จากน้ำล้างเนื้อปลาในมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและสามารถเพิ่มค่าเฉลี่ยของซูริมีปลาทรายแดงเมื่อเติมในระดับ 0.18% และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการให้ความร้อน และยังสามารถลดการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อเนื่องจากโปรตีนส จากการทำบริสุทธิ์พบว่ามียาโปรตีนสแอลฟา-1 ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน มีขนาดโมเลกุล 40 และ 55 กิโลดาลตัน โดยสารยับยั้งบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อทริปซินและสามารถลดการย่อยสลายของมายโอซินสายหลักของซูริมีปลาตาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โปรตีนไฮโดรไลเซสจากก้าง กระดุก และ เศษหนังที่ผ่านการย่อยโดยโปรตีนส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซสจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงนำมาแยกส่วนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) และแยกตามขนาด (size exclusion chromatography) หลังจากแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีตามขนาดได้เพปไทด์ 3 ส่วนคือ B1 B2 และ B3 โดยเพปไทด์ B3 มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS และมีคุณสมบัติรีดิวซ์เหล็กสูงสุด ในขณะที่ส่วน B2 และ B3 มีความสามารถเด่นในการจับกับเหล็กและอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ ส่วนเพปไทด์ในส่วน B1 และ เพปไทด์สังเคราะห์ (FLGSFLYEYSR) ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเพปไทด์จากส่วน B3 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HepG2

การเปรียบเทียบไฮโดรไลเซสของคอลลาเจนหนังปลานิลและหนังปลาอุกบึกอยู่จากการย่อยด้วยเพปซิน อัลคาเลส ทริปซินและโปรตีนสจาก *Virgibacillus* sp. SK39 พบว่าไฮโดรไลเซสจากเพปซินมีความสามารถยับยั้งกิจกรรมของ ACE ได้สูงสุดที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysate) 30% ผลจากการแยกไฮโดรไลเซสด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง สามารถจำแนกได้สามส่วนคือ ส่วนที่มีขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ขนาดระหว่าง 5-30 กิโลดาลตัน และ ขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน ไฮโดรไลเซสที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมยับยั้ง ACE สูงที่สุด และความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมของ ACE 50% (IC₅₀) มีค่าเท่ากับ 9.01±0.04 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซิน) ต่อมิลลิลิตร เพปไทด์หลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลสามารถยับยั้งกิจกรรมของ ACE ได้ 72.06% ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม สมมูลไกลซิน ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-Tandem mass spectrometry

ของเพปไทด์ที่มีกิจกรรมยับยั้ง ACE สูงสุดประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนและไกลซีนที่ปลายสายคาร์บอกซิลของเพปไทด์ (C-terminus) และกรดอะมิโนด้านปลายสายอะมิโน (N-terminus) ส่วนมากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นคาร์บอนสายตรง (Aliphatic amino acid)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมงสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้โดยอาศัยเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวและเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตสารยับยั้งโปรตีนเนส หรือเพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งกิจกรรมของ ACE และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์โภชนเภสัชได้ต่อไป

Abstract

Objectives of this study were to various approaches to fully utilize byproducts from fishery industry with emphasis on wash water of fish mince, collagen hydrolysates with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, and protein hydrolysates with antioxidant properties from surimi wastes, including frame, bone and skin (FBS) and refiner discharge (RD) using proteinases from a novel source, *Virgibacillus* sp. and commercial proteinases: pepsin, trypsin and Alcalase. It was found that crude sarcoplasmic proteins obtained from common carp mice wash water showed inhibitory activity toward trypsin and increased textural properties of threadfin bream surimi, particularly those set at 40°C, when added at 0.18%. In addition, it reduced proteolysis caused by endogenous proteinases of threadfin bream surimi. Based on protein purification scheme, the protein exhibiting inhibitory activity was identified to be the carp α -1 proteinase inhibitor, which was glycoprotein with molecular weight of 40 and 55 kDa. The purified inhibitor exhibited inhibitory activity toward trypsin and reduced proteolysis of myosin heavy chain of bigeye snapper surimi.

FBS protein hydrolysates prepared from *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase showed higher antioxidant than RD and was, therefore, fractionated using anion exchange and size exclusion chromatography (SEC). Three fractions, namely, B1, B2 and B3, were obtained after SEC. Fraction B3 exhibited the highest antioxidant activity base on 2,2'-azinobis (3-wthyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) value, while metal chelation and hydroxyl radical scavenging ability were distinctive in fraction B2 and B3. Fraction B1 and a synthetic peptide selected from the pooled *de novo* peptides of fraction B3, FLGSFLYEYSR, had a cellular radical scavenging effect when HepG2 cells were treated with hydrogen peroxide (H₂O₂).

Collagen hydrolysates from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and hybrid catfish (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) were obtained using pepsin, Alcalase, trypsin and proteinase from *Virgibacillus* sp. SK39. Pepsin produced peptides exhibiting the highest ACE inhibitory activity with a degree of hydrolysis (DH) of 30%. The hydrolysate of hybrid catfish skin was fractionated into 3 fractions: MW>30 kDa, 5-30 kDa and <5 kDa using cross-flow ultrafiltration. The fraction with MW <5 kDa showed the highest ACE inhibitory activity with IC₅₀ of 9.01±0.04 µg (glycine equivalent)/ml. The pooled fraction after gel filtration showed ACE inhibitory activity at 72.06% at 0.2 µg glycine equivalent. LC-Tandem mass spectrometry of the pooled fraction revealed that

peptides exhibiting ACE inhibitory activity were composed of arginine and lysine at C-termini, while N-termini contained aliphatic amino acids.

This study revealed that byproducts from fishery industry could be fully utilized using proper recovery and enzyme technology to obtain proteinase inhibitor or bioactive peptides with ACE inhibitory and antioxidant activity, which could be developed to be functional ingredients or nutraceutical products.

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
สารบัญเรื่อง.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	2
การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	4
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	27
ขอบเขตของการวิจัย.....	27
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย.....	27
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
2.1 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลา.....	29
2.2 สมบัติการยับยั้งกิจกรรม ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท.....	34
2.3 เพปไทด์ต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิ.....	37
บทที่ 3 ผลการวิจัย.....	43
3.1 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลา.....	44
3.2 สมบัติการยับยั้งกิจกรรม ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท.....	53
3.3 เพปไทด์ต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิ.....	62
บทที่ 4 สรุปและข้อเสนอแนะ.....	69
บรรณานุกรม.....	71
ประวัตินักวิจัย.....	86

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1.1	เพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตจากพืช..... 14
ตารางที่ 1.2	เพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระจาก แหล่งต่างๆ..... 20
ตารางที่ 3.1	การทำบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก โปรตีนซาร์โคพลาสมิคของปลาไน. 48
ตารางที่ 3.2	ผลการระบุชนิดของ โปรตีน โดย LC-MS/MS..... 40
ตารางที่ 3.3	ผลการยับยั้งโปรตีนเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไน..... 52
ตารางที่ 3.4	ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์คอลลาเจนจากหนัง ปลานิลและหนังปลาชุกบักอูย..... 54
ตารางที่ 3.5	ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจาก หนังปลาชุกบักอูยที่ผ่านการแยกขนาดด้วยอัลตราฟิลเตรชัน..... 56
ตารางที่ 3.6	ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ที่ยับยั้ง ACE จากการวิเคราะห์แบบ <i>de novo</i> peptide sequencing 61
ตารางที่ 3.7	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและผลผลิตของ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูก ก้าง และเศษหนังปลาทรายแดงและตัวอย่างหลังแยกด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel..... 64
ตารางที่ 3.8	ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของ โปรตีนไฮโดรไลเสทจากกระดูก ก้าง และเศษหนังปลาทรายแดงที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 30 prep size exclusion และผลผลิตที่ได้..... 64
ตารางที่ 3.9	ลำดับกรดอะมิโนของ โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS..... 66
ตารางที่ 3.10	ความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS (mM Trolox) ของเพปไทด์สังเคราะห์แต่ละชิ้น และเพปไทด์ผสมที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเพปไทด์จากส่วน B3 ที่ความเข้มข้น สุดท้าย 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร..... 67

สารบัญรูปร่าง

		หน้า
รูปที่ 1.1	Hypertensive mechanism of angiotensin.....	9
รูปที่ 1.2	Activity of ACE on (A) angiotensin I and (B) hippuryl-L-histidyl-L-leucine.....	11
รูปที่ 1.3	Chemical structures of the ACE-inhibitors enalaprilat, enalapril and lisinopril.....	12
รูปที่ 3.1	ความสามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียส EW: egg white power (โปรตีนไข่ขาว), WPC: whey protein concentrate (โปรตีนเวย์), SPI: soy protein isolate (โปรตีนถั่วเหลือง), SP: crude sarcoplasmic protein (โปรตีนซาร์โค-พลาสมิก).....	44
รูปที่ 3.2	ผลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดจากปลาไนและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ จุดแตกหักของเจลจากซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของแคลเซียม 0, 0.1, 0.3 และ 0.5%; SP: ตัวอย่างที่เติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด.....	46
รูปที่ 3.3	ผลของการเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและอุณหภูมิในการบ่มที่ระดับต่างๆต่อการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดง เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5%, SP: ตัวอย่างที่เติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด.....	47
รูปที่ 3.4	โครมาโตแกรมการทำบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกปลาไน การแยกด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุลบ (a), การจับจำเพาะด้วยลิแกนด์ concanavalin A (b) และการแยกตามขนาดโมเลกุล (c).....	48
รูปที่ 3.5	รูปแบบโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากปลาไนภายใต้สภาวะนอนรีดิวิง.....	49
รูปที่ 3.6	รูปแบบโปรตีนในสภาวะก่อนและหลังเติมเอนไซม์ PNGase F Std: standard molecular weight, 1: โปรตีนในสภาวะก่อนเติมเอนไซม์ PNGase F, 2: โปรตีนในสภาวะหลังเติมเอนไซม์ PNGase F.....	51
รูปที่ 3.7	เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของโปรตีนยับยั้งทริปซินแอลฟา-1.....	52
รูปที่ 3.8	รูปแบบโปรตีนของซูริมิปลาหวานบ่มที่อุณหภูมิ 40 (เลนที่ 2-5) และ 65 (เลนที่ 6-9) องศาเซลเซียส ที่การเติมสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 บริสุทธิ์จากปลาไนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ MHC: มัยโอซินสายหนัก, AC: แอคติน, TM: โทรโปมัยโอซิน.....	53
รูปที่ 3.9	ระดับการย่อยคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาคูกบ็อกโดยเพปซินที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ.....	55
รูปที่ 3.10	ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาคูกบ็อกที่ย่อยโดยเพปซินที่ระดับการย่อยต่างๆ.....	55

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3.11	การแยกเปปไทด์ที่ยัง ACE ที่มีขนาดต่ำกว่า 5 กิโลดาลตัน โดย carboxymethyl (CM)-Sephrose cation exchange column (A). เปปไทด์ที่จับกับคอลัมน์ จะโดยความเข้มข้นของสารละลายเกลือตั้งแต่ (0-1.0 โมลาร์) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต 10 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) ด้วยอัตราการชะเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายทุกๆ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเปปไทด์ fraction I และ II ไปวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE โดยใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์ 0.5 ไมโครกรัม (glycine equivalent)/มิลลิลิตร (B)	58
รูปที่ 3.12	รูปแบบการแยกของเปปไทด์ fraction II โดยการแยกผ่านคอลัมน์ Superdex 30 prep grade (A) โดยการชะด้วยน้ำกลั่นที่อัตราการชะเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร/นาที ติดตามปริมาณเปปไทด์ของแต่ละส่วนที่แยกออกมาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 นาโนเมตร และเก็บสารละลายที่ความถี่ทุกๆ 0.5 มิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE แสดงดังกราฟ B ที่ระบุเป็น I และ II คือตัวอย่าง G-I และ G-II ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของเปปไทด์ 0.2 ไมโครกรัม (glycine equivalent)/มิลลิลิตร (B)	59
รูปที่ 3.13	รูปแบบการแยกของเปปไทด์โดยใช้คอลัมน์ Superdex peptide 10/300 GL. ซึ่งชะด้วยน้ำกลั่นที่อัตราการชะเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร/นาที และติดตามปริมาณเปปไทด์ที่ 215 นาโนเมตร.....	60
รูปที่ 3.14	การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Anion exchange chromatography (a) ของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผลิตจากโครงกระดูก ก้างและหนังปลาทรายแดง ที่ย่อยด้วยโปรตีนจาก <i>Virgibacillus</i> sp. SK33 นาน 8 ชั่วโมง และ การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography (b) ของตัวอย่างหลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography.....	63
รูปที่ 3.15	ความสามารถในการจับอนุโมลิสระหว่างในเซลล์ HepG2 ของตัวอย่าง fraction B1 และเปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ 10 และ 20 ไมโครลิตร/มิลลิกรัม.....	68

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ซูริมิคือผลิตภัณฑ์เนื้อปลาที่ผ่านการล้างน้ำและแช่แข็ง ซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปลู๊ด ลูกชิ้น เต้าหู้ปลา และผลิตภัณฑ์อาหารทะเลสำเร็จรูปอื่นๆ ในช่วง 15 ปีที่ผ่านมาอุตสาหกรรมการส่งออกเนื้อปลาแช่แข็งและผลิตภัณฑ์ซูริมิมีการเติบโตอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกซูริมิที่ใหญ่เป็นอันดับสองของโลกรองจากสหรัฐอเมริกา (www.globefish.org) ในปี 2555 ปริมาณการส่งออกซูริมิของไทยไปประเทศหลักที่สำคัญได้แก่ ญี่ปุ่น รองลงมาคือ ยุโรปและรัสเซีย เกาหลี สิงคโปร์และไต้หวัน ปริมาณการส่งออกซูริมิไปประเทศดังกล่าวรวมทั้งหมด 57,200 เมตริกตัน (www.surimischool.org) จากสถิติในปี พ.ศ. 2548-2555 ผลผลิตซูริมิเฉลี่ยของประเทศไทยประมาณ 102,250 เมตริกตันต่อปี (www.groundfishforum.com)

ในขั้นตอนการผลิตซูริมิมักมีการใช้น้ำจำนวนมากเพื่อกำจัดซาร์โคพลาสมีกโปรตีน การผลิตซูริมิทุกๆ 1 กิโลกรัม จำเป็นต้องใช้น้ำในกระบวนการล้างเนื้อปลาประมาณ 10 ลิตร ดังนั้นในการผลิตซูริมิ 102,250 เมตริกตัน จึงมีการใช้น้ำไม่ต่ำกว่า 1022 ล้านลิตรต่อปี ซึ่งเป็นภาระต่อการบำบัดและเป็นต้นทุนในการผลิตอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้

Lin et al. (1995) รายงานว่าในน้ำล้างซูริมิประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ (water soluble protein) ที่สูญเสียระหว่างขั้นตอนการล้าง ซึ่งมีปริมาณโปรตีนคิดเป็นร้อยละ 1.4 ของน้ำล้างที่ได้และยังไม่มีรายงานอย่างเป็นทางการว่าการสูญเสียโปรตีนในระหว่างกระบวนการผลิตซูริมิในประเทศไทยเป็นเท่าใด แต่หากใช้ข้อมูลดังกล่าวของ Lin et al. (1995) เป็นฐานในการคำนวณ อาจประมาณได้ว่าการผลิตซูริมิ 102,250 เมตริกตัน จะมีโปรตีนสูญเสียในน้ำล้างประมาณ 14,315 เมตริกตัน ซึ่งนับเป็นปริมาณที่มาก

โปรตีนที่สูญเสียในระหว่างกระบวนการล้างคือซาร์โคพลาสมีกโปรตีน ซึ่งประกอบด้วย เอนไซม์และโปรตีนชนิดต่างๆ เป็นที่เข้าใจมาตลอดว่าโปรตีนที่ละลายน้ำได้เหล่านี้รบกวนการเกิดเจลของมายโอไฟบริลลาร์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดเจล อย่างไรก็ตามในระยะหลังมีรายงานการวิจัยว่าซาร์โคพลาสมีกโปรตีน มีผลช่วยเสริมความแข็งแรงของเจลจากโปรตีนมายโอไฟบริลลาร์ (Okazaki et al., 1986; Morioka and Shimizu, 1990; Morioka and Shimizu, 1993) นอกจากนี้เอนไซม์ที่ถูกชะล้างออกจากกระบวนการล้างบางชนิดมีประโยชน์ในการช่วยเสริมความแข็งแรงของเจลเช่นกัน Worratao and Yongsawatdigul (2003) พบว่าซาร์โคพลาสมีกที่สกัดได้จากปลานิลมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำการเกิด cross-linking โปรตีนกล้ามเนื้อได้ นอกจากนี้จิรววัฒน์ (2546) พบว่าเมื่อนำน้ำล้างจากเนื้อปลานิล เดิมลงในซูริมิปลาปากคม ค่าความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้นและยังเกิดการเชื่อมข้ามสายโปรตีน (cross-link) ของปลาปากคมอีกด้วย ผลดังกล่าวเกิดจากเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในน้ำล้าง จากการทำวิจัยอย่างต่อเนื่อง ผู้วิจัยยังพบว่าน้ำล้างเนื้อปลาทรายแดงยังมีสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนส (proteinase inhibitor) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งกิจกรรม

เอนไซม์ทริปซินและโปรตีนในปลาปากคม (lizardfish) ได้ดี ส่งผลให้คุณภาพของเจลซูริมีปลาปากคมดีขึ้น จะเห็นได้ว่าโปรตีนชาร์โคพลาสมิกมีประโยชน์หากสามารถเก็บเกี่ยวและนำกลับมาใช้เพื่อเพิ่มมูลค่าผลผลิต แทนที่จะปล่อยทิ้งในรูปของน้ำเสียหรือน้ำทิ้งจากโรงงาน นอกจากปลาทรายแดงแล้ว ปลาตาหวาน (bigeye snapper) ปลาจวด (croaker) และปลาหนวดถาชี (goat fish) เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตซูริมี นอกจากนี้ปลาไน (carp) ก็เป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นวัตถุดิบของการผลิตซูริมี การเพาะเลี้ยงปลาไนจากทั่วโลกในช่วงปี 2011 มีสูงถึง 3.7 ล้านเมตริกตัน (FAO, 2013) นอกจากนี้ปลาไนยังเป็นปลาที่ไม่มีปัญหาในเรื่องของเอนไซม์โปรตีนจากการศึกษาเบื้องต้นทางผู้วิจัยพบว่าการเติมโปรตีนชาร์โคพลาสมิกจากปลาไนช่วยส่งเสริมให้เนื้อสัมผัสของซูริมีเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งอาจเนื่องมาจากสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนในปลาไนมีศักยภาพในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนในซูริมีได้ดี ดังนั้นการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลาไนอาจเป็นทางเลือกในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนในซูริมี ยังไม่มีการศึกษาคุณสมบัติของชาร์โคพลาสมิกโปรตีนเหล่านี้ว่าเป็นระบบ การได้มาซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติของชาร์โคพลาสมิกโปรตีนของปลาสายพันธุ์ต่างๆนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเก็บเกี่ยวโปรตีนเหล่านี้มาใช้ประโยชน์

ปริมาณวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมซูริมีและปลาแล่แช่แข็ง (frozen fillet) ที่เป็นของแข็ง เช่น เศษกระดูก หัวปลา ใส้ปลา และอื่นๆ ที่เกิดขึ้นยังคิดเป็นปริมาณร้อยละ 55 ของปลาทั้งตัว (Morrissey et al., 2005) ในการผลิตซูริมีทุกๆ 1 กิโลกรัมจะทำให้ได้วัสดุเหลือทิ้งประมาณ 1.8 กิโลกรัม และจากข้อมูลการผลิตในปี พ.ศ. 2545-2546 พบว่าปริมาณวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งในประเทศไทยคิดเป็น 252,000 เมตริกตัน โดยทั่วไปวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้จะถูกส่งต่อไปขายในโรงงานปลาป่น หรือโรงงานอาหารสัตว์ซึ่งมูลค่าต่ำ ได้มีรายงานการวิจัยการนำวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งจากปลาไปใช้ประโยชน์ โดยผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท เช่น วัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งจากปลาแซลมอน (salmon) มีคุณค่าสารอาหาร เช่น กรดอะมิโน, กรดไขมัน eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid ในปริมาณสูง (Liaset et al., 2003) นอกจากนี้ยังมีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทใช้เป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ในระยะหลังมีการรายงานถึงคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแอนจิโอเทนซิน (angiotensin converting enzyme, ACE) ซึ่งมีผลในการลดความดันโลหิต คุณสมบัติในการเป็นสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant) และสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของเพปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสท มีงานในต่างประเทศมากมายซึ่งแสดงถึงคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของ ACE ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมประมง แต่ยังไม่พบว่ามีการศึกษาในประเทศไทย การวิจัยเพื่อผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของ ACE อาจทำให้เกิดแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงและยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งจำนวนมากจากอุตสาหกรรมซูริมีอีกด้วย

อุตสาหกรรมซูริมิเป็นอุตสาหกรรมอาหารทะเลที่สำคัญของประเทศ ในอดีตข้อได้เปรียบของประเทศไทยเมื่อเปรียบเทียบกับประเทศคู่แข่งคือการมีแหล่งวัตถุดิบที่อุดมสมบูรณ์และแรงงานราคาถูก จึงทำให้อุตสาหกรรมดังกล่าวเติบโตขึ้นอย่างต่อเนื่อง จนทำให้ประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตซูริมิรายใหญ่ของโลก แต่ด้วยปริมาณวัตถุดิบที่ลดลงในปัจจุบัน แหล่งวัตถุดิบหลักจึงได้จากการทำประมงในประเทศเพื่อนบ้าน ด้วยระยะทางที่ห่างไกล การขนส่งวัตถุดิบจึงใช้เวลานาน ต้นทุนในการผลิตจึงเพิ่มขึ้นพร้อมกับความสดของวัตถุดิบที่ลดลง ส่งผลกระทบถึงคุณภาพของซูริมิในที่สุด ดังนั้นหากไม่มีการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต ศักยภาพในการแข่งขันของอุตสาหกรรมซูริมิไทยในเวทีโลกย่อมลดลง การเก็บเกี่ยวโปรตีนจากน้ำล้างเนื้อปลาเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบให้คุ้มค่า เป็นการลดปัญหาในการกำจัดน้ำทิ้ง และเพิ่มผลผลิต และหากโปรตีนที่เก็บเกี่ยวได้สามารถเพิ่มความแข็งแรง (gel strength) ของเจล ย่อมเป็นการปรับปรุงคุณภาพของซูริมิอีกทางหนึ่ง โดยไม่จำเป็นต้องพึ่งพาสารเติมแต่งที่ผลิตจากต่างประเทศ เช่น ไข่ขาวผง หรือเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ (Microbial transglutaminase, MTGase) นอกจากนี้การผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ ACE และสารต้านออกซิเดชัน จากวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งย่อมเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งเหล่านั้นแทนการใช้เป็นเพียงวัตถุดิบราคาถูกในการผลิตปลาป่น ในการวิจัยนี้มุ่งศึกษาวัสดุเหลือทิ้งและน้ำล้างจากกระบวนการผลิตซูริมิ และปลานิลซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีการส่งออกในรูปแบบปลาแช่แข็งในปริมาณสูง ผลงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปสู่การพัฒนากระบวนการเก็บเกี่ยวโปรตีนซาร์โคพลาสเมก และการผลิตไบโอแอคทีฟเพปไทด์ (bioactive peptide) จากวัสดุเหลือทิ้งเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ซึ่งหากประสบความสำเร็จ ศักยภาพในการแข่งขันของอุตสาหกรรมซูริมิ และอุตสาหกรรมอาหารทะเลของประเทศในตลาดโลกย่อมสูงขึ้น เกิดการพัฒนาอย่างยั่งยืน ส่งผลให้ภาคแรงงาน และอุตสาหกรรมต่อเนื่อง เช่น อุตสาหกรรมประมง พัฒนาตามไปด้วย

การทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

1. สารยับยั้งโปรตีนเนสจากปลา

ปลาบางชนิดมีเอนไซม์โปรตีนเนสอยู่ในกล้ามเนื้อในปริมาณที่ค่อนข้างสูง ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้ส่งผลให้คุณภาพของปลาลดต่ำลง เนื่องจากเอนไซม์โปรตีนเนสย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อทำให้เนื้อปลานิ่มและยุ่ย ดังนั้นในร่างกายของปลาจึงจำเป็นต้องมีสารยับยั้งเอนไซม์เพื่อควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนส สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสพบได้จากส่วนต่างๆของปลา

Cao et al. (2000) รายงานว่าเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคส ไอโซเมอเรส (phosphoglucose isomerase) เป็นองค์ประกอบที่อยู่ในกล้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) ของปลาจวดขาว (white croaker) สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสชนิดซีรีนซึ่งจับตัวกับมัธยโไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลา

ปากคม (lizard fish) ได้เป็นอย่างดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากวัว (bovine trypsin) ไคโมทริปซินจากวัว (bovine chymotrypsin) และเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีรีนซึ่งจับตัวกับมัยโอไฟบริลจากก้ามเนื้อปลาไน (common carp) ได้ นอกจากนี้ Sun et al. (2009) ยังพบว่าเอนไซม์ฟอสโฟกลูโคส ไอโซเมอร์เรสจากก้ามเนื้อลาย (skeletal muscle) ของปลาแคร์ฟ (crucian carp) สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีรีนซึ่งจับตัวกับมัยโอไฟบริลจากก้ามเนื้อปลาแคร์ฟได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากครูเซียนแคร์ฟ (crucian carp trypsin) ไคโมทริปซินจากครูเซียนแคร์ฟ (crucian carp chymotrypsin) เอนไซม์ทริปซินจากปลาแมนดาริน (mandarin fish trypsin) เอนไซม์ทริปซินจากวัว (bovine trypsin) และเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีรีนซึ่งจับตัวกับมัยโอไฟบริลจากก้ามเนื้อปลาจวดขาวได้ เอนไซม์ฟอสโฟกลูโคส ไอโซเมอร์เรสมิขนาดโมเลกุล 120 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel filtration และมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 55 และ 65 กิโลดาลตัน เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ดังนั้นเอนไซม์นี้จะมีโครงสร้างเป็นหน่วยย่อย (sub unit) 2 หน่วย นอกจากนี้ฟอสโฟกลูโคส ไอโซเมอร์เรสสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีรีนซึ่งจับตัวกับมัยโอไฟบริลจากก้ามเนื้อปลาแคร์ฟแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) Sangorrin et al. (2001) รายงานว่า สารยับยั้งเอนไซม์จากก้ามเนื้อปลาจวดขาวมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 65 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน อีลาสเตสและซบพิลลิซินได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มของซิสเตอีน (โบรมิเลนและปาเปน) และเมททาโลโปรตีนเอส (เทอร์โมไลซิน) ได้และมีคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน Nurhayati, Rusyadi, Suwandi, and Nugraha (2013) ได้ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์คาทิปซินจากก้ามเนื้อปลาแคทฟิช (catfish) โดยพบว่าสารยับยั้งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 16.65 กิโลดาลตัน ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พีเอช 8 นอกจากนี้กิจกรรมของสารยับยั้งถูกกระตุ้นเมื่อเติม Mn^{2+} อย่างไรก็ดีตามการเติม Ca^{2+} and Co^{2+} ส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของสารยับยั้งลดลง Toyohara, Makinodan, Tanaka, and Ikeda (1983) พบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและคาลเปินจากก้ามเนื้อปลาไน Yamada et al. (1985) รายงานว่าคาลปาสแตติน (calpastatin) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์คาลเปินจากก้ามเนื้อปลาไนมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 37 และ 78 กิโลดาลตันเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งทั้งสองยังคงเท่าเดิมเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค gel filtration แสดงว่าสารยับยั้งแต่ละตัวเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว Hara and Ishihara (1987) ได้ทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจากโปรตีนก้ามเนื้อปลาไน ซึ่งสารยับยั้งนี้มีคุณสมบัติคล้ายกับแอลฟา-1 (alpha-1 proteinase inhibitor) จากซีรัมของมนุษย์ มีจุดไอโซอิเล็กทริก (isoelectric point) ที่พีเอช 5.3 และพีเอชที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งได้ดีคือพีเอชช่วง 7.0-9.5 สารยับยั้งนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซินและอีลาสเตสได้ ขนาดโมเลกุลของสารยับยั้งประมาณ 100 กิโลดาลตันเมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค gel filtration แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่ามีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 56 กิโลดาลตัน นั่นแสดงว่าโปรตีนชนิดนี้ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย (sub unit)

อย่างไรก็ตามสารยับยั้งแอลฟา-1 จากส่วนต่างๆของปลาในเช่น perimeningeal fluid, ซีรัม (serum), น้ำอสุจิ (seminal plasma) และน้ำเลือด (blood plasma) เป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวโดยมีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 54-62 กิโลดาลตัน (Huang et al., 1995; Aranishi, 1999; Wojtczak et al., 2007; Mickowska, 2009) Ylonen et al. (1999) รายงานว่าที่ผิวหนังของปลาแอตแลนติก แซลมอน (Atlantic salmon) มีสารยับยั้งเอนไซม์ซิสเตอีนอยู่ 2 ชนิดคือคิโนโนเจน (kininogen) มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 52 กิโลดาลตัน และซาลาริน (salarin) มีขนาดโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน สารยับยั้งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้สามารถยับยั้งเอนไซม์ปาเปนและฟิซินได้ อย่างไรก็ตามไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งคิโนโนเจนและซาลารินยังเป็นไกลโคโปรตีนโดยมีน้ำตาลมาเกาะ ในขณะที่ Patterson (1991) รายงานว่าส่วนใหญ่แล้วสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 มีน้ำตาลมาเกาะที่ตำแหน่ง N-linked เท่านั้น Huang et al. (1995) ได้พิสูจน์ว่าสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 ในส่วนของ perimeningeal fluid จากปลาจีน (bighead carp) มี N-linked เกาะอยู่ 2 ตำแหน่ง แต่ไม่พบ O-linked ผลการศึกษานี้คล้ายกับ Mak et al. (2004) ที่พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนสในกลุ่มซีรีนหรือเซอร์ปิน (serpin) จากน้ำอสุจิของปลาเรนโบว์เทราต์ (rainbow trout) มี N-linked มาเกาะ 2 ตำแหน่ง โดยยังคงไม่พบการเกาะของ O-linked ปริมาณน้ำตาลของ perimeningeal fluid จากปลาจีน และน้ำอสุจิจากปลาเรนโบว์เทราต์มีอยู่ร้อยละ 15 และ 16 ตามลำดับ Carrell et al. (1982) รายงานว่าปริมาณน้ำตาลของสารยับยั้งในกลุ่มเซอร์ปินจะอยู่ในช่วงร้อยละ 10-20

Wojtczak et al. (2007) พบสองไอโซฟอร์มของสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 จากน้ำอสุจิ (seminal plasma) ของปลาใน ทั้งสองไอโซฟอร์มเป็นไกลโคโปรตีน เมื่อศึกษาปฏิกิริยา deglycosylation ด้วยเอนไซม์ Peptide -N-Glycosidase F (PNGase F) เอนไซม์นี้จะไปตัดพันธะระหว่างโปรตีนและน้ำตาลที่บริเวณ N-linked (Asn-Xxx-Ser/Thr ซึ่ง Xxx เป็นกรดอะมิโนชนิดใดๆ ยกเว้น Pro) ทำให้น้ำตาลที่เกาะกับโปรตีนที่บริเวณ N-linked หลุดออกไปส่งผลให้ขนาดโมเลกุลลดลง จากผลการศึกษาพบว่าไอโซฟอร์ม A มีขนาดโมเลกุลลดลงจาก 55.5 กิโลดาลตันเป็น 48.5 กิโลดาลตัน และไอโซฟอร์ม B มีขนาดโมเลกุลลดลงจาก 54 กิโลดาลตันเป็น 47.5 กิโลดาลตัน หลังจากเติมเอนไซม์ PNGase F ดังนั้นปริมาณคาร์โบไฮเดรตของไอโซฟอร์ม A และ B อยู่ที่ร้อยละ 12.6 และ 12.1 ตามลำดับ Guzdek et al. (1990) พบว่าคาร์โบไฮเดรตไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 อย่างไรก็ตามน้ำตาลช่วยเพิ่มความสามารถในการคงตัวต่อความร้อนโดยขึ้นอยู่กับความยาวของสายน้ำตาล (Nakamura et al., 1998; Nakamura et al., 1993)

โครงสร้างของสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 จะมีส่วนที่เรียกว่า reactive center loop ซึ่งบริเวณนี้มีตำแหน่ง P1-P1' อยู่ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนที่ 30-40 จากปลายสายด้านคาร์บอกซิล โดยมีกรดอะมิโน Met ที่ตำแหน่ง P1 และมีกรดอะมิโน Ser ที่ตำแหน่ง P1' ตำแหน่ง P1-P1' จะใช้เป็นข้อมูลเพื่อระบุชนิดของเอนไซม์โปรตีนสสามารถยับยั้งได้ Mickowska (2009) ได้ศึกษาการจับตัวกัน

ระหว่างสารยับยั้งโปรตีนสแอลฟา-1 จากน้ำเลือด (blood plasma) ของปลาไนและเอนไซม์ทริปซิน พบว่าเมื่อเอนไซม์และสารยับยั้งตัวจับกันจะส่งผลให้มีขนาดโมเลกุลรวมน้อยกว่าผลรวมของขนาดโมเลกุลระหว่างเอนไซม์และสารยับยั้ง เนื่องจากเอนไซม์จะตัดพันธะระหว่าง P1-P1' ของสารยับยั้ง ส่งผลให้ P1 จับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนต์ ขณะที่พอลิเพปไทด์ทางด้านปลายสายคาร์บอกซิลซึ่งเป็นด้าน P1' ได้หลุดออก จึงทำให้ขนาดโมเลกุลรวมของสารเชิงซ้อนระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์น้อยกว่าผลรวมของสารยับยั้งและเอนไซม์ประมาณ 3-4 กิโลดาลตัน นอกจากนี้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินยังพบในโปรตีนกล้ามเนื้อของปลาจวดขาวและปลาเฮก (hake) (Busconi et al., 1984; Martone et al., 1991) Piyadhamviboon and Yongsawatdigul (2010) พบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 95, 41 และ 37 กิโลดาลตันจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดง (threadfin bream) สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ และความสามารถในการทนต่อความร้อนลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Siriangkanakun and Yongsawatdigul (2012) รายงานว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 35, 41, 44, 50 และ 69 กิโลดาลตันจากโปรตีนกล้ามเนื้อปลาไนมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีนเหล่านี้ยังสามารถยับยั้งโปรตีนเอสในซูริมิได้ ส่งผลให้ค่าเนื้อสัมผัสของซูริมิเพิ่มขึ้น โดยพบว่าการเติมโปรตีนสกัดจากกล้ามเนื้อปลาไนลงในซูริมิปลาทรายแดงร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ส่งผลให้ค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักเพิ่มขึ้นร้อยละ 58.8% และ 18.6% สำหรับการให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียสและเพิ่มขึ้นร้อยละ 104.9% และ 36.2% สำหรับการให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าของเหลวที่อยู่ในส่วนของรังไข่ (ovarian fluid) จากปลาไนและเยื่อหุ้มตัวอ่อน (chorion) จากปลาไนมีซิสเตติน (cystatin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มของซิสเตอีนได้ (Tsai et al 1996; Chang et al., 1998) Yamashita and Konagaya (1991) รายงานว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 16 กิโลดาลตันจากไข่ของปลา chum salmon มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์ซิสเตอีน นอกจากนี้สารยับยั้งเอนไซม์ซิสเตอีนยังพบในไข่ของปลาแปซิฟิกเฮอริง (Pacific herring) ชัมแซลมอน (chum salmon) พอนด์ สเมล (pond smelt) กลาสฟิช (glassfish) และอลาสก้า พอลลอค (Alaska pollock) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 120, 89, 84.5, 17 and 16.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Ustadi et al., 2005) Li et al. (2008) รายงานว่าเลือดปลาชัมแซลมอน (chum salmon) มีสารยับยั้งเอนไซม์ซิสเตอีนซึ่งมีขนาดโมเลกุล 70 กิโลดาลตัน เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ gel filtration แสดงว่าโปรตีนนี้เป็นพอลิเพปไทด์สายเดี่ยว และพบว่าเป็นไกลโคโปรตีน Nagashima et al. (2004) พบสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีขนาดโมเลกุล 47 และ 57 กิโลดาลตัน จากเมือกผิวหนัง (skin mucus) ของปลาพัพเพอร์ (puffer fish) นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งทั้งคู่มิคุณสมบัติเป็นไกลโคโปรตีน

แอลฟา 2 แมคโครโกลบูลิน (α_2 -macroglobulin) สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสได้ทั้ง 4 ประเภท ได้แก่โปรตีนเอสประเภทซีรีน ซิสเตอีน แอสพาติก และเมทาโลโปรตีนเอส โดยแอลฟา 2 แมคโครโกลบูลินแต่ละโมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีนเอสได้เพียง 1 โมเลกุล ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แอลฟา 2 แมคโครโกลบูลิน ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (sub unit) ในขณะที่ สารยับยั้งประเภทนี้ที่พบในปลาส่วนมากมี 2 หน่วยย่อย เช่น แอลฟา 2 แมคโครโกลบูลินจากน้ำเลือด (plasma) ของปลาเพลซ (plaice) ซีร์มของปลาเรนโบว์เทราต์ (rainbow trout) และน้ำเลือดของปลากิลเฮด ซีบรีม (gilthead seabream) (Starkey and Barrett, 1982; Ellis, 1987; Funkenstein et al., 2005) Li and Lu (2006) รายงานว่าแอลฟา 2 แมคโครโกลบูลินจากน้ำเลือดปลาหญ้า (grass carp) มี 2 หน่วยย่อยที่ต่างกันคือมีขนาดโมเลกุล 95 และ 80 กิโลดาลตัน Freedman (1991) พบแอลฟา 2 แมคโครโกลบูลินจากซีร์มของปลาเรนโบว์เทราต์ (rainbow trout) และบรูคเทราต์ (brook trout) Chuang et al. (2008) พบแอลฟา 2 แมคโครโกลบูลินในน้ำเลือดของปลาเก๋า (grouper) สารยับยั้งนี้เป็นไกลโคโปรตีนความสามารถในการยับยั้งโปรตีนเอสลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ทำงานได้ดีที่พีเอช 10 และประสิทธิภาพการทำงานต่ำที่พีเอช 2-6

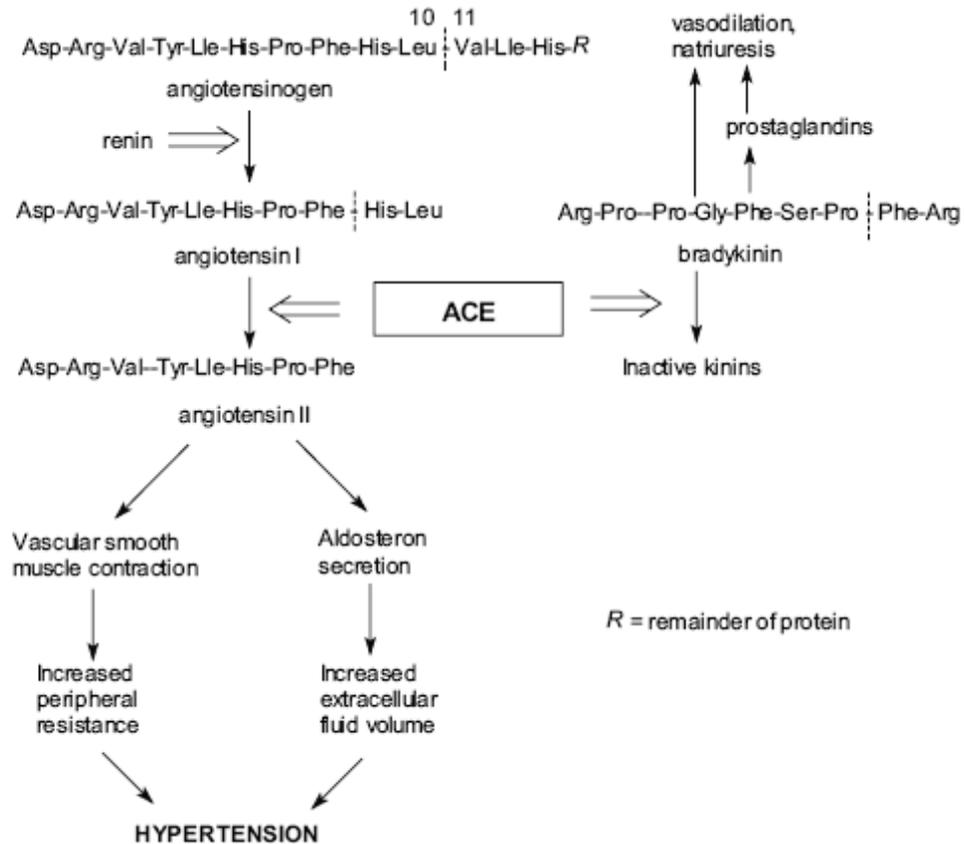
เอนไซม์โปรตีนเอสมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อความสามารถในการฟอर्मเจลของซูริมิ โดยเอนไซม์นี้จะย่อยสลายโปรตีนมายโอไฟบริลลาร์ส่งผลให้โครงข่ายของเจลและผลิตภัณฑ์ซูริมิที่ได้มีลักษณะอ่อนตัวลงพร้อมกันนี้ยังทำให้คุณภาพของซูริมิลดลงไปด้วย เอนไซม์โปรตีนเอสที่นับว่าเป็นปัญหาใหญ่ต่อคุณภาพของเจลคือเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งเอนไซม์นี้ก่อให้เกิดปัญหาการย่อยสลายโปรตีนในปลาหลายชนิด เช่น ปลาปากคม ปลาแอตแลนติก แมนฮาเด้น เป็นต้น ดังนั้นการเติมสารยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เพื่อลดการอ่อนตัวของซูริมิเจลจึงเป็นแนวทางในการแก้ปัญหา

โปรตีนชาร์โคพลาสติกเป็นโปรตีนที่อยู่ในกล้ามเนื้อซึ่งสามารถละลายได้ทั้งในน้ำและสารละลายเกลือเจือจาง โปรตีนชนิดนี้ถูกเชื่อว่ามันมีผลในการยับยั้งความสามารถในการฟอर्मเจลของโปรตีนมายโอไฟบริลลาร์ ดังนั้นจึงได้มีการกำจัดโปรตีนชาร์โคพลาสติกออกในขั้นตอนการผลิตซูริมิ อย่างไรก็ตามมีหลายการศึกษารายงานว่าโปรตีนชาร์โคพลาสติกช่วยเพิ่มคุณสมบัติทางด้านเนื้อสัมผัสของซูริมิ ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสที่อยู่ในโปรตีนชาร์โคพลาสติกช่วยทำให้เกิดการเชื่อมโยงของสายโปรตีนมากขึ้นจึงส่งผลให้เนื้อสัมผัสของซูริมิเพิ่มมากขึ้นด้วย นอกจากนี้ทางคณะวิจัยยังพบว่าโปรตีนชาร์โคพลาสติกมีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ดังนั้นการเติมโปรตีนชาร์โคพลาสติกลงในซูริมิน่าจะช่วยลดปัญหาการอ่อนตัวของซูริมิเจลและส่งผลให้เนื้อสัมผัสของซูริมิดีขึ้น นอกจากนี้การศึกษาเพิ่มเติมถึงโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์โดยการทำให้บริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่อยู่ในโปรตีนชาร์โคพลาสติกเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งเพราะจะนำมาซึ่งองค์ความรู้พร้อมทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้สารยับยั้งที่มีอยู่ในธรรมชาติชนิดนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2. Angiotensin I-converting enzyme (ACE)

2.1 Renin Angiotensin System

Renin Angiotensin System (RAS) เป็นระบบหลักที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงในร่างกาย (Eriksson et al., 2002) RAS จะถูกกระตุ้นหลังจากที่ความดันโลหิตลดต่ำลง โดยเรนินซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน ถูกสังเคราะห์จาก juxtaglomerular cells ที่ไตและปลดปล่อยเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกายในที่สุด เรนินมีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ทำหน้าที่ในการตัดพันธะเพปไทด์ของโมเลกุล angiotensinogen เปลี่ยนเป็น angiotensin I ซึ่งอยู่ในสภาพที่ยังไม่ทำงาน จากนั้น angiotensin converting enzyme (ACE) จะทำหน้าที่ตัดกรดอะมิโนสองตัวคือ His-Leu จากปลายด้านคาร์บอกซิลของ angiotensin I ได้ผลิตภัณฑ์ angiotensin II ซึ่งมีผลทำให้ความดันเลือดสูงขึ้น (รูปที่ 1.1) นอกจากนี้ยังมีผลต่อ Bradykinin ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ร่างกายหลั่งออกมาเมื่อเกิดบาดแผลหรือการกระทบกระเทือน โดย bradykinin มีผลให้ความดันเลือดต่ำลง แต่ ACE จะย่อยเพปไทด์ที่ปลายสายคาร์บอกซิลของ bradykinin เป็น kinin ซึ่งไม่มีผลต่อการลดความดันเลือด ดังนั้น เอนไซม์ ACE จึงมีผลต่อการเพิ่มของ angiotensin II ซึ่งมีผลเพิ่มความดันโลหิต และลดปริมาณ bradykinin ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่มีผลลดความดันโลหิต



รูปที่ 1.1 Hypertensive mechanism of angiotensin (Barbosa-Filho, 2006)

Angiotensin II ที่เกิดขึ้นจะมีผลต่อการทำงานของไต โดย angiotensin II จะไปกระตุ้น adrenal cortex ให้หลั่ง aldosterone เพิ่มขึ้นทำให้เกิดการดูดกลับของโซเดียม (Na^+) ลดการขับน้ำออก มีผลให้ความดันเพิ่มสูงขึ้น และยังสามารถไปกระตุ้น AT₁ receptor ที่อยู่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดทำให้หลอดเลือดหดตัวส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว (Kovacs et al., 2002) การยับยั้งระบบ rennin angiotensin เพื่อลดภาวะความดันโลหิตสูงทำได้โดยการใช้สารยับยั้งการทำงานของ RAS ซึ่งประกอบด้วยยาสังเคราะห์ 2 กลุ่ม คือ 1) angiotensin receptor blockers (ARBs) จะแย่งจับแบบแข่งขัน (competitive binding) ตรงตำแหน่ง AT₁ receptor กับ angiotensin II และ 2) angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ ACE ที่จะทำให้เกิด angiotensin II และลด bradykinin

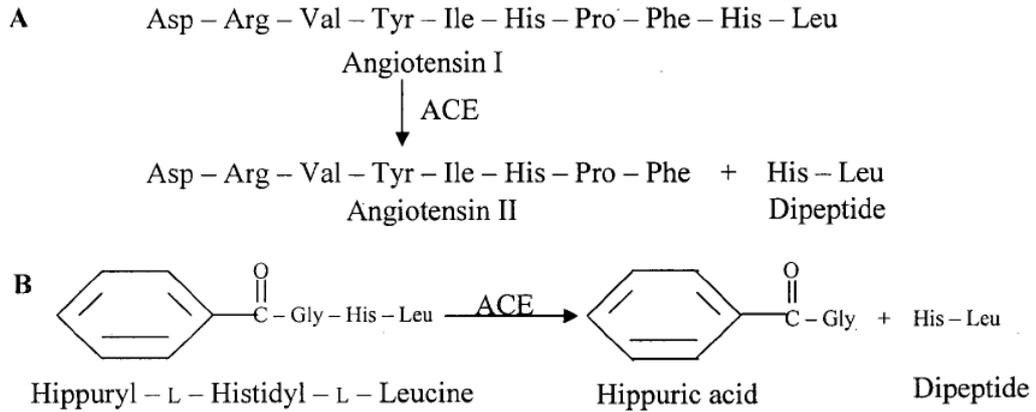
2.2 โครงสร้างของเอนไซม์ angiotensin-I converting enzyme

Angiotensin converting enzyme (ACE, EC 3.4.15.1) หรือ kininase II หรือ dipeptidyl carboxypeptidase เป็นไกลโคโปรตีน มีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 642-1306 ตัว เป็น tran-membrane dipeptidyl peptidase ที่มี 2 ไอโซฟอร์ม คือ somatic ACE (sACE) และ testicular ACE (tACE) ที่ถูกถอดรหัสจากยีนเดี่ยวที่มีจุดเริ่มต้นการสังเคราะห์ (initiation sites) ที่ต่างกัน (Oscar, 2005) เป็น metalloenzyme มีกรดอะมิโน His-Glu-Met-Gly-His จับกับสังกะสี (Zn^{2+}) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ (Sturrock et al., 2004) สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยคลอไรด์ จัดเป็น non specific enzyme ที่สามารถตัดสารตั้งต้นได้หลากหลายในการทดสอบแบบ *in vitro* เอนไซม์นี้แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ตามบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active sites) ได้แก่ เอนไซม์ที่มีบริเวณเร่งปฏิกิริยาอยู่ปลายด้านคาร์บอกซิลหรือที่เรียกว่า C-domain (612 amino acids) และเอนไซม์ที่มีบริเวณเร่งอยู่บริเวณปลายสายด้านอะมิโน N-domain (650 amino acids) แต่เอนไซม์ในกลุ่ม C-domain มีบริเวณเร่งย่อย (subsites) แบ่งเป็น S1, S1' และ S2' บริเวณเร่งย่อยทั้ง 3 ตำแหน่งจะจับกรดอะมิโนชนิดที่แตกต่างกันในสายเพปไทด์ โดยสามารถจับกับเพปไทด์สายสั้นที่มีกรดอะมิโนชนิดที่ไม่มีขั้วที่อยู่ตำแหน่ง C-terminal ได้ดี (Brew, 2003) อย่างไรก็ตาม ACE ไม่สามารถตัดกรดอะมิโนโพรลีน ที่ติดกับกรดอะมิโนชนิดอื่นได้ ดังนั้น ACE ไม่มีผลในการทำลาย angiotensin II ซึ่งเป็นสารเพิ่มความดัน (Chi et al, 2008)

2.3 *In vitro* assay for ACE inhibitory activity

การวัดกิจกรรมของสารยับยั้งการทำงานของ ACE ทำได้โดยการวัดกิจกรรมของ ACE ด้วยสารตั้งต้นสังเคราะห์ hippuryl-L-histidyl-L-leucine (HHL) ทำให้เกิดการปลดปล่อย hippuric acid (HA) และ His-Leu ปริมาณของ hippuric acid จะสะท้อนถึงกิจกรรมของ ACE ซึ่งสามารถติดตามได้ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 1.2) (Cushman and Cheung, 1971) วิธีการนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมยาและอาหาร มีการปรับวิธีการบางส่วนจากการวิจัยโดยการเปลี่ยนความ

เข้มข้นของ ACE ชนิดของสารตั้งต้นและความเข้มข้นของสารตั้งต้น จากนั้นได้มีการพัฒนามาใช้การตรวจวัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวที่มีสมรรถนะสูง (HPLC) (Wu and Ding, 2002) และใช้คอลัมน์ในการแยก HHL และ HA



รูปที่ 1.2 Activity of ACE on (A) angiotensin I and (B) hippuryl-L-histidyl-L-leucine (Cushman and Cheung, 1971)

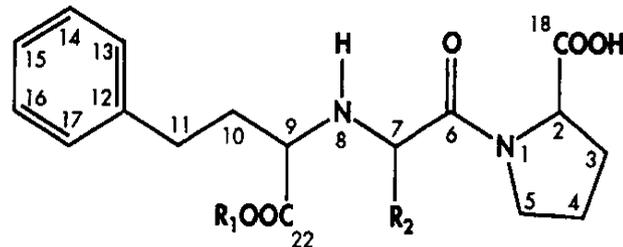
2.4 เพลิดเพลินที่ยับยั้ง Angiotensin I-converting enzyme

2.4.1 สารยับยั้ง ACE ทางการค้า

การใช้ยาที่เป็นสารยับยั้ง ACE เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาความดันโลหิตสูง ยาในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์ โดยยาชนิดแรกที่ถูกพัฒนาขึ้นคือ captopril ซึ่งเป็นยาในรูปแบบยารับประทาน รูปที่ 1.3 แสดงโครงสร้างของสารยับยั้ง ACE ทางการค้า 3 ชนิดคือ enalaprilat, enalapril และ lisinopril โดย enalapril เป็นยาที่อยู่ในรูป prodrug คือตัวมันเองไม่มีฤทธิ์ แต่จะสามารถออกฤทธิ์ได้เมื่อยาผ่านกระบวนการย่อยโดยร่างกาย (metabolize) โดยตัวยาคจะถูกเปลี่ยนโดยกระบวนการ deesterification เป็นสารที่เป็นกรดไดคาร์บอกซิล (dicarboxylic acid) คือ enalaprilat ซึ่งมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาเหมือน enalapril และมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนานกว่า โดย enalapril มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 1.3 ชั่วโมง แต่ enalaprilat มีค่าครึ่งชีวิต 11 ชั่วโมง ทั้ง enalapril และ enalaprilat สามารถขับออกทางไตได้

Lisinopril มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับ enalaprilat เป็นยาที่สามารถออกฤทธิ์ได้โดยตรง เนื่องจากสามารถละลายน้ำได้ดี แต่การดูดซึมของยาจากระบบทางเดินอาหารเกิดขึ้นได้ไม่สมบูรณ์ เมื่อยาเข้าสู่ร่างกายจะถูกขับออกทางไต โดยไม่ถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับ ยามีครึ่งชีวิตประมาณ 7-12

ชั่วโมง เมื่อรับประทานเข้าสู่ร่างกายมีค่า bioavailability ประมาณ 25-30 % แต่มีช่วงเวลาการออกฤทธิ์ที่นานกว่า enapril (Swaan et al., 1995) Captopril เป็นยาที่มีโครงสร้างที่ประกอบด้วยกลุ่มซัลฟไฮไดรล (sulhydryl, SH) จัดเป็นยาต้านแบบสามารถถูกดูดซึมได้รวดเร็ว มี bioavailability ประมาณ 70% อาหารมีผลลดการดูดซึมประมาณ 30-40% ยาถูกเปลี่ยนแปลงที่ตับได้สาร disulfide และถูกขับออกทางไต ยามีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 3 ชั่วโมง โดย captopril จะจับกับ ACE ได้ดีที่บริเวณเร่งและเป็นการจับแบบแข่งขันกับ angiotensin I (Cushman et al., 1987) ถึงแม้ว่ายาทั้งสามชนิดนี้จะมีสามารถในการยับยั้งการทำงานของ ACE ที่สูงแต่ก็มีผลเสียข้างเคียงเช่น ไอแห้ง เป็นพื้นที่ผิวหนัง สูญเสียการรับรส ลมพิษ เกิดภาวะ hyperkalemia คือมีระดับ K^+ ในเลือดสูง (Atkinson and Robertson, 1979; Sica, 2003)



	R_1	R_2
Enalapril	$-C_2H_5$	$-CH_3$
Enalaprilat	$-H$	$-CH_3$
Lisinopril	$-H$	$-(CH_2)_4NH_2$

รูปที่ 1.3 Chemical structures of the ACE-inhibitors enalaprilat, enalapril and lisinopril (Swaan et al., 1995)

2.4.2 อาหารที่มีสมบัติยับยั้ง ACE

เริ่มมีการศึกษาสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง ACE จากธรรมชาติ โดยพบว่าเปปไทด์ของอาหารหลายชนิดเป็นแหล่งของสารยับยั้งการทำงานของ ACE (FitzGerald et al., 2004) โดยทั่วไปเปปไทด์จะอยู่ในสภาพที่ยังไม่ทำงาน โดยอยู่ในรูปของโปรตีนในอาหาร แต่สามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์โปรติเอสจากระบบทางเดินอาหารหรือจากกระบวนการแปรรูปอาหารได้ (Meisel, 1997) จากนั้นจึงถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย และแสดงสมบัติยับยั้ง ACE (Vercruysse, Camp and Amagghe,

2005) มีการศึกษาถึงเปปไทด์ที่มีสมบัติในการลดความดันจากอาหารอย่างกว้างขวาง แหล่งอาหารที่พบ bioactive peptide ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้ง ACE คือ ผลิตภัณฑ์นม โปรตีนจากปลา เนื้อสัตว์และโปรตีนจากพืช

2.4.2.1 เปปไทด์ยับยั้ง ACE ที่ผลิตจากพืช

โปรตีนจากพืชที่สามารถลดความดันโลหิตได้ เช่น ถั่วเขียว โปรตีนจากข้าวโพด งา ผักโขม ถั่วเหลือง เป็นต้น (Hong et al., 2008) Mallikarjan et al. (2007) พบว่าสมบัติในการยับยั้ง ACE ของเปปไทด์ขึ้นอยู่กับเอมิไซม์ที่ใช้และตำแหน่งในการตัดพันธะเปปไทด์ Matoi et al (2004) รายงานว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากข้าวสาลี (wheat gliadin) สามารถแสดงกิจกรรมในการลดความดันโลหิตได้ Shin et al (2001) รายงานว่าเปปไทด์ที่ได้จากถั่วเหลืองหมักของประเทศเกาหลีที่มีลำดับเปปไทด์ His-His-Leu (HHL) สามารถยับยั้ง ACE จากการทดลองใน *in vitro* ได้เป็นอย่างดี และสามารถลดความดันโลหิตในหนูลงได้เมื่อนำเข้าไปในปริมาณ 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Shin et al., 2001) ตารางที่ 1.1 แสดงแหล่งของสารยับยั้ง ACE ที่ได้จากพืช

2.4.2.2 เปปไทด์ยับยั้ง ACE ที่ผลิตจากโปรตีนนม

เปปไทด์ยับยั้ง ACE ในนมส่วนใหญ่อยู่ในสภาพที่ยังไม่แสดงกิจกรรม ต้องอาศัยการย่อยด้วยเอมิไซม์โปรติเอส Meisel et al. (1997) รายงานว่ากระบวนการหมักสามารถช่วยปลดปล่อยเปปไทด์ยับยั้ง ACE ได้ รวมไปถึงเอมิไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้นมเป็นแหล่งเปปไทด์ยับยั้ง ACE ที่ดีอีกแหล่งหนึ่ง มีการรายงานว่ามีแบคทีเรียหลายชนิดที่พบในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นมสามารถสร้างเอมิไซม์โปรติเอส เพื่อปลดปล่อยเปปไทด์ยับยั้ง ACE ทำให้ผลิตภัณฑ์ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เนยแข็ง มีเปปไทด์ยับยั้ง ACE เป็นส่วนประกอบ (Gobbetti et al., 2000; Meisel et al., 1997) Meihel (2005) รายงานว่าเปปไทด์จากนมที่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE ค่าความเข้มข้นของไฮโดรไลสที่ใช้ยับยั้งการทำงานของ ACE ลง 50% (IC_{50}) อยู่ในช่วง 100-500 ไมโครโมล/ลิตร ตัวอย่างเช่น β -lactoglobulin ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็นเปปไทด์ 2 ท่อนคือ Ile-Pro-Ala (IPA) และ Ala-Leu-Pro-Met (ALPM) ที่มีค่า IC_{50} เท่ากับ 141 และ 928 ไมโครโมล/ลิตร ตามลำดับ

2.4.2.3 เปปไทด์ยับยั้ง ACE ที่ผลิตจากโปรตีนสัตว์

มีรายงานการพบเปปไทด์ยับยั้ง ACE จากเนื้อสัตว์เช่น ปลา ไก่ วัว กระบือ Saiga et al. (2006; 2008) พบว่าเปปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโน Hyp-Gly-Leu-Hyp-Gly-Phe ซึ่งแยกได้จากเนื้ออกไก่สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ รวมถึงโปรตีนกระดูกส่วนขาของไก่ที่ถูกย่อยด้วยเอมิไซม์ Alcalase ด้วยเช่นกัน Lee et al. (2011) ศึกษาการย่อยหนังปลา skate ด้วยเอมิไซม์ Alcalase, α -chymotrypsin, neutrase, pepsin, papain and trypsin พบว่าเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วย α -chymotrypsin แสดงกิจกรรมยับยั้ง ACE ได้สูงสุด Byun and Kim (2001) แยกเปปไทด์จาก

หนังของปลา Alaska Pollock ลำดับกรดอะมิโน Gly-Pro-Leu และ Gly-Pro-Met ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้ง ACE ได้ โดยมีค่าการยับยั้ง IC_{50} เท่ากับ 2.6 และ 17.13 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ

ตารางที่ 1.1 เปปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ผลิตจากพืช (Li et al., 2008)

Amino acid sequence	IC_{50} (μ M)	Origin
VLIVP	169	Glycinin
LVY	1.80	Seasame
LSA	7.81	Seasame
LKY	0.78	Seasame
LQP	1.04	Seasame
IVVA	315.3	<i>Cholorella vulgaris, Spirulina platenis</i>
AEL	63.8	<i>Cholorella vulgaris, Spirulina platenis</i>
FAL	26.3	<i>Cholorella vulgaris, Spirulina platenis</i>
IAPG	11.4	<i>Cholorella vulgaris, Spirulina platenis</i>
KDYRL	26.5	Mung bean
LRY	0.15/0.23	Pea
MRWRD	2.1	Spinach Rubisco
MRW	0.6	Spinach Rubisco
VW	1.4	Sake lees
LRP	0.27	α -Zein
LSP	1.7	α -Zein
TQVY	18200	Rice
RDHP	-	Rice

2.5 โครงสร้างของเปปไทด์ยับยั้งเอนไซม์ ACE

ประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ด้วยเปปไทด์ขึ้นอยู่กับชนิดของกรดอะมิโนที่ปลายสายด้านคาร์บอกซิล และความยาวของสายเปปไทด์ รวมทั้งขึ้นอยู่กับแหล่งและวิธีการผลิต เปปไทด์ เปปไทด์ปลายสายด้านคาร์บอกซิล (C-terminal) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วสามารถยับยั้ง ACE ได้ดีกว่ากรดอะมิโนที่มีขั้ว (Imayasu et al., 1994) และถ้าตำแหน่งปลายสายเป็นกรดอะมิโนโพรลีน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE ได้ดี นอกจากนี้มวลโมเลกุลของเปปไทด์ที่มี

ขนาดเล็กจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง ACE ได้ดีกว่าเพปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า Kang et al., (2009) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้ง ACE ด้วยเจลาตินไฮโดรไลเซทจากผลผลิตพลอยได้จากการผลิตซูริมิปลา Alaska Pollock และแยกเพปไทด์ตามขนาดโมเลกุลด้วยเทคนิคอัลตราฟิวเตรชัน (Ultrafiltration) ที่ 3, 5, 10 และ 30 กิโลดาลตัน พบว่า เพปไทด์ที่มีขนาดมวลโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้มากที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.21 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3. โปรตีนไฮโดรไลเซทและเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านออกซิเดชัน

3.1 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซท

โปรตีนไฮโดรไลเซทคือส่วนผสมที่ประกอบไปด้วยเพปไทด์และกรดอะมิโนที่เป็นผลผลิตจากการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ ทั้งจากเอนไซม์ที่ตัดปลายสายโปรตีนและที่ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีน หรือโปรตีนที่ได้จากการย่อยด้วยกรดหรือด่าง หรือจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Samaranayaka et al., 2010; Sarmadi and Ismail, 2010) การใช้เอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีนเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน เนื่องจากใช้ระยะเวลาสั้น ได้ระดับการย่อยสูงและมวลโมเลกุลของเพปไทด์ที่ได้มีขนาดตามที่ต้องการ (Samaranayaka and Li-chan, 2011) เอนไซม์โปรตีนเอสที่นิยมใช้ในการย่อยโปรตีนมักมาจากเครื่องในของสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ เอนไซม์โปรตีนเอสทางการค้าที่นำมาใช้เพื่อผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันคือ Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, pepsin trypsin, chymotrypsin, pancreatin, papain, และ bromelain (Je et al., 2007)

เอนไซม์ Alcalase เป็นเอนไซม์ทางการค้าที่ผลิตจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนที่สูงสุด (Guérard et al., 2001) และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรตีนเอสอื่นๆยังพบว่า Alcalase ให้ผลผลิตของเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน และเพปไทด์สายสั้นที่ได้มีความต้านทานการย่อยในระบบทางเดินอาหารได้สูง (Park et al., 2001; Kim et al., 2001) Alcalase เป็นเอนไซม์ที่ตัดพันธะเพปไทด์ภายในสายโปรตีน (endoproteinase) ทำให้ได้เพปไทด์ที่มีขนาดสั้นและขนาดกลาง (Klompong et al., 2008) Alcalase มีความจำเพาะที่กว้าง โดยมีความจำเพาะสูงต่อกรดอะมิโนที่เป็นวง (Phe, Try, Tyr) กรดอะมิโนที่เป็นกรด (Glu) กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ (Met) กรดอะมิโนที่เป็นโซ่ตรง (Leu, Ala) กรดอะมิโนที่มีหมู่ -OH (Ser) และกรดอะมิโนที่เป็นเบส (Lys) (Doucet et al., 2003) เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยปลา silver carp ด้วยเอนไซม์ Alcalase แสดงกิจกรรมในการจับอนุมูลอิสระได้ดีกว่าการย่อยด้วยเอนไซม์ Flavourzyme (Dong et al., 2008)

Flavourzyme เป็นเอนไซม์ที่สามารถตัดพันธะเพปไทด์ภายในโครงสร้างโปรตีนและตัดจากปลายสายโปรตีน มีความจำเพาะที่กว้าง ผลผลิตที่ได้จะเป็นเพปไทด์สายสั้นๆและกรดอะมิโนอิสระ

(van der Ven et al., 2002) มีการนำเอนไซม์ Flavourzyme มาใช้ผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากโปรตีนปลา เช่น ปลาทูแซก ปลานิล เป็นต้น

Neutrasedผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีโลหะอยู่ในโครงสร้าง (metalloendoproteinase) มีหมู่อะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic amino acids) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถตัดพันธะเพปไทด์บนสายโปรตีนหลายตำแหน่ง (Zhao and Hou, 2009) และมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันด้วยโปรตีนจากข้าวในส่วนที่เป็นเอนโดสเปิร์ม (Zhang et al., 2010)

เอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร (pepsin, trypsin, chymotrypsin และ pancreatin) สามารถผลิตเพปไทด์ที่สามารถจับกับอนุมูลที่มีหมู่-OH ได้ (Byun et al., 2009; You et al., 2010) เอนไซม์เพปซินมีความจำเพาะกับกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น Phe, Trp, Tyr และกรดอะมิโน Leu และ Glu ที่อยู่ด้านหมู่คาร์บอกซิลของพันธะเพปไทด์ (Simpson, 2000; You et al., 2010) ดังนั้นการตัดด้วยเอนไซม์เพปซินจะทำให้ได้เพปไทด์ที่มี Tyr, Phe หรือ Leu ที่ปลายด้านอะมิโน (N-terminal) (Savoie et al., 2005) เอนไซม์ทริปซินมีความจำเพาะต่อ Lys หรือ Arg ที่ด้านคาร์บอกซิลของพันธะเพปไทด์ส่วนเอนไซม์ α -chymotrypsin จะตัดพันธะเพปไทด์ที่ด้านคาร์บอกซิลเป็นกรดอะมิโนของ Leu, Tyr, Phe, Trp และ Met (Robyt and White, 1987)

ผลผลิตที่ได้จากการย่อยด้วยสารสกัดซึ่งได้จากตับอ่อนของหมู (Pancreatin) ซึ่งมีเอนไซม์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ สามารถย่อยโปรตีนให้ได้กรดอะมิโน Val, Leu และ Phe (Mullally et al., 1994) และมีการใช้ Pancreatin ในการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากโปรตีนในมันฝรั่ง (Kudo et al., 2009) การใช้เอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจะทำให้ได้เพปไทด์ที่ทนต่อการย่อยอาหารของร่างกาย (Qian et al., 2008a)

นอกจากโปรตีนสทางการค้าแล้วการใช้โปรตีนจากแหล่งอื่นเพื่อผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันยังมีการศึกษาไม่มากนัก เคยมีการศึกษาการใช้เอนไซม์จากปลาชนิดต่างๆ เพื่อนำมาผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน เช่นเอนไซม์ที่สกัดจากลำไส้ของปลาทู จากก้างของปลาทูน่าครีบบเหลือง (yellowfin sole frame) และจากโปรตีนจากก้างของปลา Alaska Pollock (Jun et al., 2004; Je, et al., 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งของปลาซาร์ดีนได้ด้วยเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในของปลาซาร์ดีน (Bougatef et al., 2010) การใช้เอนไซม์ที่แตกต่างกันในการย่อยโปรตีนทำให้ได้รูปแบบของเพปไทด์ขนาด และลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน (Chen et al., 1995; Jeon et al., 1999; Wu et al., 2003)

Sinsuwan et al. (2008) ได้รายงานถึงสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนสที่สร้างจาก *Virgibacillus* sp. SK33 ซึ่งคัดแยกมาจากน้ำปลาที่หมักเป็นระยะเวลา 1 เดือน ที่ pH 8-11 ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตเอนไซม์ได้หลายชนิด ซึ่งมีขนาด 56, 46,

42, 32, 25 และ 19 กิโลดาลตัน โดยเอนไซม์โปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK33 ยังแสดงกิจกรรมคล้ายกับ subtilisin-like alkaline serine proteinase นอกจากนี้ยังสามารถย่อยโปรตีนของปลากระดูกได้ ดีกว่าเอนไซม์ Alcalase ทางการค้าอีกด้วย นอกจากนี้เอนไซม์โปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK33 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความจำเพาะที่หลากหลาย โดยสามารถตัดพันธะของ insulin B ที่หลากหลาย รวมไปถึง Gln⁴, Cys⁷, Glu¹³, Ala¹⁴, Leu^{15,17}, Tyr^{16,26}, Arg²², Phe^{24,25}, and Lys²⁹ (Sinsuwan et al., 2010) ทำให้เอนไซม์โปรตีนที่ผลิตจาก *Virgibacillus* sp. SK33 มีแนวโน้มที่จะมีศักยภาพสำหรับกระบวนการผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชัน

3.2 แหล่งของโปรตีนไฮโดรไลเซตและเพปไทด์ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ

ปัจจุบันนี้นักวิจัยเริ่มให้ความสนใจกับคุณสมบัติในการนำมาใช้ทางยา (Nutraceutical) จากโปรตีนไฮโดรไลเซตที่ได้จากสัตว์และพืช เพปไทด์ที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่มาจากผลิตภัณฑ์อาหารได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย และเป็นสารเพื่อสุขภาพ (Healthy compound) ราคาถูก มีกิจกรรมสูง และง่ายต่อการดูดซึม (Sarmadi and Ismaili, 2010) โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากการย่อยโดยเอนไซม์จากพืช เช่น ถั่วเหลือง (Moure et al., 2006), จมูกข้าวสาลี (Zhu et al., 2006), เมล็ดข้าวโพด (Zein) (Kong and Xiong, 2006) โปรตีนจากน้ำมันคาโนลา (Chumby et al., 2008) บักวีท (Buckwheat) (Tang et al., 2009) cotton leafworm (Vercruyssen et al., 2009) ถั่วลิสง (Jamdar et al., 2010) Amaranth (Tironi and Anón, 2010) และ ข้าวบาร์เลย์ (Bamdad et al., 2011) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระที่ได้มาจากการย่อยโดยเอนไซม์จากสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ได้แก่ ไช้แดง (Sakanaka et al., 2004; Sakanaka and Tachibana, 2006) นม (Rival et al., 2001; Hogan et al., 2009) โปรตีนเวย์ (Peña-Ramos and Xiong, 2001; Peng et al., 2009) ฮีโมโกลบินของหมู (Chang et al., 2007) พลาสมาของหมู (Liu et al., 2009) และไก่ (Liu et al., 2011) ผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำและผลพลอยได้ก็มีการรายงานว่าเป็นแหล่งที่ดีของเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ เช่น ปลาทู (Wu et al., 2003) หมึก (Jumbo flying squid) (Lin and Li, 2006) ปลาทูแขก (Round scad) (Thiansilakul et al., 2007) ปลาข้างเหลือง (Yellow stripe trevally) (Klompong et al., 2008) ปลากระพงแดงข้างแฉก (Brownstripe red snapper) (Khantaphant and Benjakul, 2008) ปลานิล (Tilapia) (Raghavan et al., 2008) ตับปลาทูน่า (Tuna liver) (Je, Lee, Lee, and Ahn, 2009) ปลาหมอ (Loach) (You et al., 2010) ปลาดาบเงิน (Black scabbardfish) (Batista et al., 2010) และหอยเป๋าฮื้อ (Pacific abalone) (Zhou et al., 2012)

3.3 การทำบริสุทธิ์โปรตีนไฮโดรไลเซต

การหาลำดับกรดอะมิโนและคุณลักษณะของเพปไทด์มีความสำคัญสำหรับการศึกษากลไกในการต้านอนุมูลอิสระและอาจให้ข้อมูลเกี่ยวกับคุณลักษณะของเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ (Raghavan et al., 2008) นอกจากนี้การหาลำดับของกรดอะมิโนยังมีประโยชน์ต่อการ

สังเคราะห์เพปไทด์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารและยา มีหลายงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับการแยกและ ระบุสารประกอบที่คุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยใช้การแยกผ่านเยื่อกรอง (Membrane filtration) โครมาโตกราฟี และแมสสเปกโตรเมตรี (Chen et al., 2012) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้จะ ถูกทดสอบการยับยั้ง ปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (Lipid oxidation) การดักจับอนุมูลอิสระ (Radicals scavenging) และความสามารถในการจับกับโลหะ (Metal chelating ability) ตารางที่ 1.2 แสดงเพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆ Kim et al. (2001) พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากหนังปลา Alaska Pollock แสดงความสามารถในการเป็นสารต้าน อนุมูลอิสระอีกทั้งยังมีสนับสนุนให้สารต้านอนุมูลอิสระอย่าง α -tocopherol ทำงานได้ดีขึ้น และ ลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์จากหนังปลา Alaska Pollock ที่ประกอบไปด้วย GPOGPOGPOGPOG แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าเพปไทด์ที่มีลำดับกรดอะมิโนเป็น GEOGPOGPOGPOGPOG และได้สรุปว่าฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์จากหนัง Alaska Pollock ขึ้นอยู่กับลำดับกรดอะมิโน Mendis et al. (2005a) พบว่าเพปไทด์จากเจลาตินของหมึก (Jumbo squid skin gelatin) มีศักยภาพในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันที่สูงและมากกว่า สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากธรรมชาติอย่าง α -tocopherol นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการดัก จับอนุมูลอิสระในปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน (OH° , R° , RO° และ ROO°) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และลำดับกรดอะมิโนของเพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงใน ปลาหมึกจัมโบ้ คือ FDSGPAGVL (880.18 คาลตัน) และ NGPLQAGQPGER (1241.59 คาลตัน) ยิ่ง ไปกว่านั้น Rajapakse (2005a) พบว่าเพปไทด์ที่มาจากกล้ามเนื้อของหมึกยักษ์ (Giant squid muscle) ประกอบไปด้วย กรดอะมิโน 7 และ 13 ตัว ซึ่งมีศักยภาพในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยการ ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) และมีฤทธิ์มากกว่า 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้น Je et al. (2005) ศึกษา โปรตีนไฮโดรไลสจากกระดูกปลาอลาสก้าพอลล็อก (Alaska Pollock frame) ที่มีขนาดต่ำกว่า 1 กิโลคาลตัน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูง นอกจากนี้เพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (LPHSGY; 672 คาลตัน) มีบทบาทในการดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล (OH°) โดยคณะผู้วิจัยรายงานว่า ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระมาจากการที่เพปไทด์นี้มีกรดอะมิโนที่มีวงแหวน imidazole ที่ทำหน้าที่ ในการจับกับโลหะนอกจากนี้ยังมีกรดอะมิโนไทโรซีนซึ่งเป็นตัวให้ไฮโดรเจน (Hydrogen donor) กับอนุมูลอิสระ Kim et al. (2007) ศึกษาเพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากโปรตีนไฮโดรไลสที่มาจาก ก้างปลาโฮกิ (Hoki frame) พบว่าเพปไทด์ที่ได้มีขนาด 1801 คาลตัน และลำดับกรดอะมิโนคือ ESTVPERTHPACPDFN โดยเพปไทด์นี้สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันได้สูง กว่า α -tocopherol และมีประสิทธิภาพในการดักจับสารอนุมูลอิสระพวก DPPH, OH° , O_2 , R° , RO°

และ ROO° เนื่องจากเพปไทด์นี้ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่มีซัลเฟอร์ 44% ทำให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของกรดไขมันกับเพปไทด์และให้โปรตอห์นกับอนุพลอิสระของไขมันได้

ตารางที่ 1.2 เพปไทด์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์และมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระจากแหล่งต่างๆ

แหล่งของเพปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
1. ปลา				
เจลาตินของหนังปลาลาสก้าโพ ด็อก (Alaska pollack skin gelatin)	GEOGPOGPOGPOGPO G และ GPOGPOGPOGPOG	ย่อยโดยใช้เอนไซม์แอล คาเลส และ โปรเนสอี (Pronase E)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินโอเลอิก และป้องกันเซลล์ตับของหนูจากการออกซิ เดชัน โดย TBHP	Kim et al. (2001)
ปลาทุ่นำครีบเหลือง Yellowfin sole (<i>Limanda aspera</i>) frame	RPDFDLEPPY	เอนไซม์เพปซินตาม ด้วยเอนไซม์จากลำไส้ ปลาแมกเคอเรล (Mackerel intestines crude enzyme (MICE))	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินโอเลอิก	Jun et al. (2004)
ก้างปลาลาสก้าพอลล็อก (Alaska Pollack frame)	LPHSGY	เอนไซม์จากลำไส้ปลา แมกเคอเรล (MICE)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินโอเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล	Je et al, (2005)
กล้ามเนื้อปลาไหลทะเล(Conger eel muscle)	LGLNGDDVN	ทริปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินโอเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล	Ranathunga et al, (2006)
กระดูกสันหลังปลาทุ่นำ (Tuna backbone)	VKAGFAWTANQQLS	เพปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินโอเลอิก ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH	Je et al. (2007)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ).

แหล่งของเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
ก้างปลาโฮกิ (<i>Johnius belengerii</i>)	ESTVPERTHPACPDFN	เพปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ MRC-5 จากการถูก ทำลายโดย TBHP และสามารถป้องกันผล จากการที่ DNA ถูกทำลาย	Kim et al, (2007)
ผลพลอยได้จากกล้ามเนื้อปลาโอ ตาโต (Bigeye tuna dark muscle by-products)	LNLPTAVYMVT	เพปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดัก จับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH	Je et al. (2008)
กล้ามเนื้อปลาหญ้า (Grass carp muscle)	PSKYEPFV	แอลคาเลส 2.4 ลิตร	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล	Ren et al., (2008)
กล้ามเนื้อดำจากปลาทูน่า (Tuna dark muscle by-products)	LPTSEAAKY from OR และ PMDYMVT from PR	Orientase (OR) and protease XXIII (PR)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดักจับอนุมูล DPPH	Hsu (2010)
เจลาตินจากเก็ลดีปลานิล (Nile tilapia (<i>Oreochromis niloticus</i>))	DPALATEPDPMPF	แอลคาเลส	ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ และสามารถป้องกันผล จากการที่ DNA ถูกทำลาย	Ngo et al, (2010)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ).

แหล่งของเพปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
ปลาหมอ (Loach)	PSYV	ปาเปน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก, คักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและ DPPH สามารถจับกับทองแดง	You et al. (2010)
ผลพลอยได้จากปลาซาร์ดีน (<i>Sardinella aurita</i>)	LHY, LARL, GGE, GAH, GAWA, PHYL และ GALAAH, และ LHY	เอนไซม์จากเครื่องในปลาซาร์ดีน (CESV)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และคักจับอนุมูล DPPH	Bougatef et al. (2010)
เครื่องในปลาทู (Horse mackerel(<i>Magalaspis cordyla</i>))	ACFL	เพปซินแล้วตามด้วยทริปซิน กับ แอลฟาไคโรโมทริปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก, คักจับอนุมูลไฮดรอกซิลและ DPPH	Sampath Kumar et al, (2011)
เจลาตินจากหนังปลานิล (<i>Tilapia (Oreochromis niloticus)</i>)	EGL และ YGDEY	Multifect neutral and followed by pronase E	คักจับอนุมูลไฮดรอกซิล DPPH และซูเปอร์ออกไซด์	Zhang et al, (2012)
Marine rotifer, <i>Brachionus rotundiformis</i>	LLGPGLTNHA และ DLGLGLPGAH	เพปซิน	คักจับอนุมูล DPPH	Byun et al. (2009)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ)

แหล่งของเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
2. สัตว์น้ำอื่นๆ				
กล้ามเนื้อหมึกยักษ์ (Giant squid (<i>Dosidicus gigas</i>))	NADFGLNGLEGLA and NGLEGLK	ทริปซิน	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ MRC-5 จากการถูก ทำลายโดย TBHP	Rajapakse et al, (2005a)
ซอสหอยแมลงภู่นึ่ง (Fermented marine blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>) sauce)	HFGBPFH	การย่อยสลายตัวเอง	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ MRC-5 จากการถูก ทำลายโดย TBHP	Rajapakse et al, (2005b)
ซอสหอยแมลงภู่นึ่ง (Fermented marine blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>) sauce)	FGHPY	การย่อยสลายตัวเอง	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล	Jung et al, (2005)
หนังกบยักษ์แอฟริกา (<i>Rana catesbeiana</i> Shaw.)	LEELEEELEGCE	แอลคาเลส	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล DPPH และ ซูปเปอร์ออกไซด์	Qian et al, (2008b)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ).

แหล่งของเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
หอยนางรม (<i>Crassostrea gigas</i>)	LKQELEDLLEKQE	เพปซินแล้วตามด้วยทริปซิน กับ แอลฟาไคโรโมทริปซิน	ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร้ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ และสามารถป้องกันผลจากการที่ DNA ถูกทำลาย	Qian et al. (2008a)
หอยแมลงภู่มิ (<i>Mytilus edulis</i>)	YPPAK	นิวเทส (Neutrase)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล DPPH และซูเปอร์ออกไซด์	Wang et al. (2013)
3. สัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์				
ไลโซไซม์จากไข่ขาว (Hen egg white lysozyme)	NTDGSTDYGILQINSR	เอนไซม์ผสม (ทริปซิน และปาเปน)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล DPPH และสามารถจับโลหะ Fe ²⁺	Memarpoor-Yazdi et al, (2012)

ตารางที่ 1.2 (ต่อ).

แหล่งของเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
ซาร์โคพลาสมิกจากตับวัว (Bovine liver sarcoplasmic)	FGKEFTPVLQADFQK	เทอร์โมไลซิน	และดักจับอนุมูล DPPH และสามารถจับโลหะ Fe ²⁺	Di Bernardini et al. (2011)
	FGDLSTADAVMNNPK			
	LHVDPENFKL			
	VLSAADKGNVKA			
	FSDVHPEYGSR			
	AQKPDVLTGGGNPVGDK			
	LNS			
	AAQKPDVLTGGGNPVGD			
	KLNS LVQDVVFTDEMAH			
	VGMPDDIIQKGKD			
4. พืช				
เบต้า-คอนไกลินิน (β -conglycinin (7s protein))	VNPHDHQN	โปรตีนเอสเอส	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลิโนเลอิก	Chen et al. (1995)
	LVNPHDHQN			
	LLPHH			
	LLPHHADADY			
	VIPAGYP			
	LQSGDALRVPSGTTY			

ตารางที่ 1.2 (ต่อ).

แหล่งของเปปไทด์	ลำดับกรดอะมิโน	การเตรียม	กิจกรรม	อ้างอิง
ถั่วเหลือง	เปปไทด์ที่ประกอบไปด้วยฮิสติดีน	เปปไทด์สังเคราะห์ (LLPHH) ที่ได้ข้อมูลมาจากการย่อยโปรตีนถั่วเหลืองด้วยโปรติเอสเอส	มีความสามารถในการจับกับโลหะ และดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล	Chen et al. (1998)
กลูเตนจากข้าวโพด	FPLEMMPF	แอลคาเลส	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของpyrogallol	Zheng et al. (2006)
โปรตีนเหลือทิ้งจากสาหร่าย (Algae protein waste)	VECYGPNRPQF	เพปซิน	ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิลเปอร์ออกไซด์ และ DPPH, ป้องกันเซลล์ และสามารถป้องกันผลจากการที่ DNA ถูกทำลาย	Sheih et al, (2009a)
โปรตีนจากมันฝรั่ง	FGER, FDRR and FGERR	เอนไซม์ผสม (Pancreatin และ Amano-P)	ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของกรดลินอเลอิก, ยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันใน erythrocyte membrane	Kudo et al. (2009)
โปรตีนจากเอนโดสเปิร์มของข้าว (Rice endosperm protein)	FRDEHKK and KHDRGDEF	นิวเทรส	ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ดักจับอนุมูลไฮดรอกซิล เปอร์ออกไซด์ และ DPPH และ ป้องกันเซลล์ MRC-5 กับ RAW264.7 เสียหายจาก TBHP และ ป้องกันเซลล์โดนทำลาย	Zhang et al. (2010)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาคุณสมบัติในการเสริมคุณภาพเจลของซาร์โคพลาสมีก โปรตีนจากปลาเศรษฐกิจ
2. ศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งโปรตีนเอสของซาร์โคพลาสมีกจากปลา
3. ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท (protein hydrolysate) จากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิ และ/หรือ อุตสาหกรรมแปรรูปปลา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin Converting Enzyme (ACE) และคุณสมบัติยับยั้งการเกิดออกซิเดชัน

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของโครงการวิจัยคือมุ่งเก็บเกี่ยวซาร์โคพลาสมีก โปรตีน และใช้ประโยชน์วัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิและ/หรือ อุตสาหกรรมแปรรูปปลาให้เกิดประโยชน์และมูลค่าเพิ่ม โดยมุ่งเน้นเก็บเกี่ยวซาร์โคพลาสมีก โปรตีนเพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเกิดเจล และคุณสมบัติในการยับยั้งโปรตีนเอส และนำมาใช้ปรับปรุงคุณภาพของเจลซูริมิ ซึ่งเป็นซูริมิที่มีความสามารถในการเกิดเจลต่ำ นอกจากนี้มุ่งการผลิตเพปไทด์จากวัสดุเหลือทิ้ง เพื่อให้ได้เพปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้ง ACE และเป็นสารต้านออกซิเดชัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

โครงการวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมซูริมิและอุตสาหกรรมอาหารประมง ทำให้เกิดแนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง (น้ำล้างซูริมิ เศษก้าง กระดูก หนัง) ให้เกิดประโยชน์สูงสุดในรูปของสารเพิ่มคุณภาพเจลซึ่งปัจจุบันต้องนำเข้าจากต่างประเทศ หรือเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE และต้านออกซิเดชันในระดับเซลล์ซึ่งมีศักยภาพที่จะพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพต่อไป การใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้ง เป็นแนวทางหนึ่งของการใช้วัตถุดิบประมงให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการแข่งขันของอุตสาหกรรมประมง หน่วยงานของรัฐที่จะได้ประโยชน์คือ กรมประมงและนักวิจัยที่ศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์ประมง องค์ความรู้ที่เกิดจากงานวิจัยในเรื่องที่เกี่ยวข้องกับสารยับยั้งโปรตีนเอสจากซาร์โคพลาสมีก โปรตีนและการผลิตเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง ACE และต้านออกซิเดชันในระดับเซลล์จะสามารถเผยแพร่ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลอง

2.1 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลา

2.1.1 ความสามารถของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดต่อการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์

2.1.1.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด

ขนส่งปลาใน (*Cyprinus carpio*) จากตลาดย่าโม อ.เมือง จ.นครราชสีมามายังห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยบรรจุใส่กล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง ทำความสะอาดและตัดหัว ควักไส้ ขอดเกล็ด บดเนื้อปลา จากนั้นนำเนื้อปลาบดที่ได้มาปั่นผสมด้วยน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนเนื้อปลาบดต่อน้ำ 1 ต่อ 3 กวนต่อเนื่องเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนของเหลวที่ได้มากรองผ่านผ้าขาวบาง 3 ชั้น จากนั้นนำของเหลวที่ได้ไปเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืนเพื่อให้ไขมันกลายเป็นไขลอยตัวอยู่ด้านบน ตัวอย่างที่ได้นี้คือโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด (crude sarcoplasmic protein) สำหรับซุริมิปลาทรายแดง (*Nemipterus spp.*) ซึ่งจากโรงงานอันดามันซุริมิ และขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แบ่งบรรจุใส่ถุงพลาสติกถุงละ 1 กิโลกรัม ปิดผนึกสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.1.1.2 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

วิเคราะห์ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลาโดยใช้โปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดเปรียบเทียบกับสารยับยั้งทางการค้าได้แก่โปรตีนไข่ขาว (egg white power) โปรตีนเวย์ (whey protein concentrate) โปรตีนถั่วเหลือง (soy protein isolate) ตามวิธีของ Piyadhamviboon and Yongsawatdigul (2010) บ่มสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยสารยับยั้งปริมาตร 200 ไมโครลิตร โดยควบคุมปริมาณโปรตีนของสารยับยั้งทั้งสี่ชนิดให้เท่ากัน สารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (pH 8) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร เอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเคซีนเข้มข้น 1% บ่มสารผสมต่อที่อุณหภูมิทั้งสองเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เข้มข้น 50% (ที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 400 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที สำหรับตัวอย่างควบคุมเตรียมตัวอย่างเหมือนข้างต้นแต่เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ก่อนสารละลายเคซีน โดยไม่บ่ม วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในสารละลายส่วนใสด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีนเป็นมาตรฐาน

2.1.1.3 ผลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดต่อการเกิดเจลของซูริมิจากปลาทรายแดง

เตรียมเจลโดยผสมซูริมิกับเกลือ โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 2% ของน้ำหนักทั้งหมด แคลเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3 และ 0.5% ซาร์โคพลาสมิกโปรตีนที่ความเข้มข้น 0.18% และปรับความชื้นให้เป็น 80% บรรจุเจลในไมโครเพลท จากนั้นบ่มตัวอย่างที่สภาวะต่างๆ คือ (1) บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (2) บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที (3) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (4) ตัวอย่างที่ไม่มีการบ่มจะนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาให้แช่ตัวอย่างในน้ำผสมน้ำแข็งทันที เก็บตัวอย่างข้ามคืนที่ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลด้วยเครื่อง Texture Analyzer และใช้หัววัด cylindrical probe ขนาด 2 มิลลิเมตร โดยตั้งค่าอัตราการเคลื่อนที่ของหัววัดที่ 1 มิลลิเมตรต่อวินาที บันทึกค่าแรง ณ จุดแตกหัก (breaking force) และระยะทาง ณ จุดแตกหัก (deformation)

เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกที่แช่เย็นเข้มข้น 5% (w/v) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลงในซูริมิเจล (2 กรัม) บดผสมและปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในสารละลายส่วนใสด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) โดยใช้ไทโรซีนเป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงค่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองในหน่วยไมโครโมลของไทโรซีนต่อกรัมตัวอย่าง

2.1.2 การทำบริสุทธิ์และสมบัติชีวเคมีของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

2.1.2.1 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

เตรียมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกตามข้อ 2.1.1.1 แต่นำเนื้อปลาบดมาปั่นผสมในสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) ที่ 4 องศาเซลเซียส แทนการใช้ น้ำกลั่น จากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมได้มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำไปแช่ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในในสารละลายส่วนใสเก็บตะกอนโปรตีนช่วงของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 50-70% โดยควบคุมอุณหภูมิระหว่างดำเนินการให้อยู่ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนตะกอนโดยนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงต่อที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ละลายส่วนตะกอนด้วยสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) จากนั้นกำจัดเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธี dialysis โดยใช้ dialysis tubing ที่มีค่า molecular weight cut-off เท่ากับ 10 kDa ละลายในสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาแยกต่อด้วยวิธีการแยกโดยการแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) โดยใช้ DEAE-Sephacel เป็นตัวกลาง ทำคอลัมน์ให้

สมมูลด้วยสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) จากนั้นโปรตีนที่จับกับเรซิน DEAE-Sephacel ถูกชะออกโดยการเพิ่มความเข้มข้นของไอออนในอัตราคงที่เชิงเส้นตรงโดยใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0-1 โมลาร์ ในสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของสารละลายในแต่ละหลอดทดลองและเลือกสารละลายในหลอดทดลองที่แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงไปทำเข้มข้นต่อโดยใช้ ultrafiltration membrane ที่มีค่า molecular weight cut-off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน จากนั้นนำสารละลายที่ผ่านการทำเข้มข้นแล้วมากำจัดเกลือโซเดียมคลอไรด์ออกโดยใช้วิธี dialysis ตามที่ระบุไว้ข้างบน นำตัวอย่างมาแยกต่อด้วยวิธีการจับจำเพาะ (affinity chromatography) โดยใช้ concanavalin A (Con A) เป็นลิแกนด์ เพื่อจับโกลโคโปรตีน ปรับคอสมันท์ให้สมมูลด้วยสารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) และโปรตีนถูกชะออกด้วย methyl- α -D-glycopyranoside เข้มข้น 0-0.5 โมลาร์ ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ Tris-HCl, pH 7.5 นำสารละลายในหลอดทดลองที่แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงไปทำเข้มข้นต่อโดยใช้ ultrafiltration membrane ที่มีค่า molecular weight cut-off เท่ากับ 10 กิโลดาลตัน นำตัวอย่างที่ผ่านการทำเข้มข้นแล้วไปแยกโปรตีนต่อโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดโมเลกุลด้วยวิธีเจลฟิวเทรชัน (gel filtration) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry โดยใช้ BSA (Bovine serum Albumin) เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงค่าปริมาณโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2.1.2.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

วิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งเอนไซม์โดยดัดแปลงจาก Garcia-Carreno, Dimes, and Haard (1993) นำสารละลายโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของแต่ละวิธีมาผสมกับ treatment buffer (Tris-HCl เข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.8, SDS เข้มข้น 4%, กลีเซอรอลเข้มข้น 20%) ด้วยอัตราส่วน 1:1 เตรียมเจล acrylamide เข้มข้น 10% โดยมีเคซีนเข้มข้น 0.12% (w/v) เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย ใช้กระแสไฟฟ้า 120 โวลต์ เพื่อแยกโปรตีน ควบคุมอุณหภูมิให้เย็นตลอดการแยกโดยวางอุปกรณ์แยกในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 0.4 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงไปในเจล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ย้อมสีเจลด้วย Coomassie blue (Coomassie brilliant blue R-250 เข้มข้น 0.1%, เมธานอลเข้มข้น 40% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10%) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างสีออกด้วยสารผสมของเอทานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10% สารยับยั้งที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจะปรากฏเป็นแถบสีน้ำเงิน

2.1.2.3 การศึกษากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

วิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยดัดแปลงจาก Barrett and Kirschke (1981) และ Ishida, Sugiyama, Sato, and Nagayama (1995) บ่มสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (pH 8) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร

เอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.01 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร สารยับยั้งเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC เข้มข้น 10 μ M ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มสารผสมต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารผสมเมธานอล-บิวทานอล-น้ำกลั่น (methanol:n-butanol: deionized water) ในอัตราส่วน 35:30:35 (v/v/v) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร วัดค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence intensity) ด้วยเครื่อง spectrofluorophotometer ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation) 380 นาโนเมตร และความยาวคลื่นของการคายพลังงาน (emission) 460 นาโนเมตร

2.1.2.4 การระบุชนิดของโปรตีน

นำสารละลายโปรตีนที่ได้หลังจากการทำบริสุทธิ์มาผสมกับ treatment buffer (Tris-HCl เข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.8, SDS เข้มข้น 4%, glycerol เข้มข้น 20%, β -mercaptoethanol เข้มข้น 10% ใน bromophenol blue เข้มข้น 0.1%) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือด 3 นาที ถ่ายตัวอย่างลงในเจล acrylamide เข้มข้น 10% ทำการแยกโปรตีนโดยใช้ความต่างศักย์ที่ 120 โวลต์ ย้อมสีเจลด้วย Coomassie brilliant blue G-250 จากนั้นตัดแถบโปรตีนทั้งสองแถบ (44 และ 50 กิโลดาลตัน) แล้วล้างด้วยสารละลายผสมระหว่าง ammonium bicarbonate:acetonitrile ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นของ ammonium bicarbonate 100 มิลลิโมลาร์ เติมเอทานอลและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาถ่ายเอทานอลออก แล้วเติมสารละลาย ammonium bicarbonate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี dithiothreitol (DTT) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นดูดของเหลว ammonium bicarbonate และ DTT ออก เติมสารละลาย ammonium bicarbonate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี iodoacetamide เข้มข้น 55 มิลลิโมลาร์ ตั้งทิ้งไว้ในที่มีดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นดูดสารละลายผสมออกไปและล้างเจลด้วย ammonium bicarbonate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ จำนวน 2 ครั้ง เติม acetonitrile เข้มข้น 100% เขย่าที่อุณหภูมิห้อง ถ่ายขึ้น acetonitrile ออก เติมเอนไซม์ทริปซินที่มี ammonium bicarbonate เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สกัดเปปไทด์ที่ได้หลังจากย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินโดยการสกัดสองครั้ง โดยครั้งแรกเติมสารละลาย acetonitrile เข้มข้น 50% ที่มี TFA เข้มข้น 0.1% เก็บเปปไทด์ที่สกัดได้ จากนั้นสกัดครั้งที่สองด้วยสารละลาย acetonitrile เข้มข้น 80% ที่มี TFA เข้มข้น 0.1% เก็บตัวอย่างที่ได้แล้วรวมกับตัวอย่างที่สกัดได้ในครั้งแรก ทำตัวอย่างให้แห้งและเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสเพื่อรอนำไปวิเคราะห์ด้วย LC/MS/MS โดยใช้ electrospray ionization ในการทำให้เกิดไอออน (ion source) และใช้ quadrupole-time-of-flight mass spectrometer เป็นส่วนของการวิเคราะห์มวลสาร เพื่อทำการวิเคราะห์การแตกตัวของเปปไทด์ นำผล LC/MS/MS มาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้ ฐานข้อมูลจาก NCBI

2.1.2.5 วิเคราะห์สมบัติไกลโคโปรตีนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ทดสอบความเป็นไกลโคโปรตีนทำตามวิธีของบริษัท New England Biolabs โดยการเติม glycoprotein denaturing buffer (0.5% SDS, DTT เข้มข้น 40 มิลลิโมลาร์) ลงไปในสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 10% Nonidet P-40, 10x reaction beffer (Sodium Phosphate เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์, pH 7.5) และเอนไซม์ Peptide -N-Glycosidase F (PNGase F) บ่มสารละลายผสมนี้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำตัวอย่างมาแยกด้วยเจล acrylamide เข้มข้น 10% และย้อมสีโปรตีนด้วยซิลเวอร์

2.1.2.6 ความจำเพาะของสารยับยั้งโปรตีนเอส

ทดสอบความสามารถของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน เทอร์โมไลซิน ปาเปน และเปปซินโดยใช้เอโซเคซีน (azocasein) เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน เทอร์โมไลซินและปาเปน และใช้ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์เปปซิน บ่มสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยสารยับยั้งที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร สำหรับเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน เทอร์โมไลซิน และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ DTT เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ใน Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 7.5) สำหรับเอนไซม์ปาเปน และสารละลายบัฟเฟอร์ไกลซีนไฮโดรคลอไรด์ (glycine-HCl) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (pH 2.0) สำหรับเอนไซม์เปปซิน บ่มทุกอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้น เอโซเคซีนหรือ ฮีโมโกลบินเข้มข้น 1% ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง พอครบเวลาเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 50% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการใช้เอโซเคซีนเป็นสารตั้งต้นมา 1000 ไมโครลิตร จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ความเข้มข้น 10 นอร์มอล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ใช้ฮีโมโกลบินเป็นสารตั้งต้นไปวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ด้วยวิธี Lowry โดยใช้ไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

2.1.2.7 ความคงตัวต่อความร้อน

บ่มสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ทดสอบกิจกรรมคงเหลือด้วย เอนไซม์ทริปซินและสารตั้งต้น Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสตามข้อ

2.1.2.4

2.1.2.8 ความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองของสารยับยั้งทริปซิน แอลฟา-1

เติมสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 1 มิลลิกรัม โปรตีน/100 กรัมของน้ำหนักรวมทั้งหมด ลงไปในซูริมิจากปลาตาหวาน (2 กรัม) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate) เข้มข้น 5% ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นบดผสมและบ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000xg ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายส่วนใสด้วยวิธี Lowry โดยใช้ Bovine serum Albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน แสดงค่าปริมาณโปรตีนในหน่วยมิลลิกรัม/มิลลิลิตร และวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยใช้เจล acrylamide เข้มข้น 10% ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยนำสารละลายโปรตีนผสมกับ treatment buffer (Tris-HCl เข้มข้น 12.5 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 6.8, SDS เข้มข้น 4%, glycerol เข้มข้น 20%, β-mercaptoethanol เข้มข้น 10% และ bromophenol blue เข้มข้น 0.1%) ด้วยอัตราส่วน 1:1 ต้มในน้ำเดือด 3 นาที แยกโปรตีนด้วยค่าความต่างศักย์ 120 โวลต์ ย้อมสีด้วย Coomassie brilliant blue R-250 และล้างสีออกด้วยสารผสมระหว่างเอธานอลเข้มข้น 25% และกรดอะซิติกเข้มข้น 10%

2.2 สมบัติการยับยั้งกิจกรรม ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเซต

2.2.1 การเตรียมคอลลาเจนไฮโดรไลเซตจากหนังปลา

นำคอลลาเจนที่สกัดจากหนังปลานิลและหนังปลาคอกบึกอู๋ มาย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า 3 ชนิด คือ ทริปซิน เพปซิน และ อัลคาเลส และเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK39 โดยเตรียมสารละลายคอลลาเจนจากปลานิลและปลาคอกบึกอู๋ที่ความเข้มข้น 2.75 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvain เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด สำหรับเอนไซม์อัลคาเลสและทริปซินย่อยที่ pH 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์เพปซินย่อยที่ pH 2 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK39 คุณสมบัติการย่อยที่ pH 6 อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยกำหนดปริมาณเอนไซม์ทุกชนิดเท่ากับ 36 มิลลิยูนิต (1 ยูนิต หมายถึงปริมาณเอนไซม์ที่สามารถย่อยคอลลาเจนได้ผลผลิตหน่วยมิลลิโมล (สมมูลไกลซีน)/นาฬิกา) ควบคุมอุณหภูมิโดยใช้อ่างน้ำร้อนแบบเขย่า (Memmert model WNB22, Schwabach, Germany) เก็บตัวอย่างที่ได้จากการย่อยทุก 1, 2, 3, 4 และ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปให้ความร้อนในน้ำเดือด 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ปรับ pH ของไฮโดรไลเซตให้มีค่าเท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์

นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนบนเพื่อนำไปวิเคราะห์หาคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ต่อไป

คอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาคึกบึนที่ได้ออกมาจากการย่อยด้วยเปปซิน แสดงสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาคึกบึนที่ได้ออกมาจากการย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินเพื่อศึกษาต่อไป ศึกษาผลของ degree of hydrolysis (DH) ที่มีต่อความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลสที่ระดับการย่อยต่างๆกันที่ 1, 2, 3, 4, 6, และ 8 ชั่วโมง

นำคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาคึกบึนที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE (Angiotensin I converting enzyme) ที่ย่อยด้วยเอนไซม์เปปซินมาแยกขนาดด้วยกระบวนการอัลตราฟิวเดชั่น (Ultrafiltration) โดยใช้เครื่องอัลตราฟิวเดชั่น (Pall corporation, City, state, USA) ที่มีขนาดเยื่อกรองต่างกัน 2 ขนาด เริ่มต้นจากการนำสารละลายไฮโดรไลสดังกล่าวผ่านเยื่อกรองที่มีขนาด 30 กิโลดาลตัน เก็บส่วนที่ค้างอยู่ (Retentate) เรียกว่าส่วนที่มีขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ส่วนที่ผ่านเยื่อกรองนำไปผ่านเยื่อกรองที่มีขนาด 5 กิโลดาลตัน จากนั้นเก็บส่วนที่ค้างอยู่ซึ่งจัดเป็นไฮโดรไลสที่มีขนาด 5-30 กิโลดาลตัน สำหรับส่วนที่ผ่านเยื่อกรองเรียกว่าส่วนที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน เก็บไฮโดรไลสแต่ละส่วนที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษา

2.2.2 การวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE

วิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE ตามวิธีของ Cushman and Cheung (1971) โดยการเติมคอลลาเจนไฮโดรไลสจำนวน 25 ไมโครลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์ ACE ที่เข้มข้น 25 mU จำนวน 50 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร นำไปให้ความร้อนที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารตั้งต้นจำนวน 150 ไมโครลิตร (ส่วนประกอบของสารตั้งต้น คือ HHL เข้มข้น 8.3 มิลลิโมลาร์ ในสารละลายบอเรนัทฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 500 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8.3) และนำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ จำนวน 250 ไมโครลิตร จากนั้นสกัดกรดฮิปพูริก (hippuric acid) โดยเติมสารละลายเอทิลอะซิเตต (ethyl acetate) จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $800 \times g$ เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายชั้นบนซึ่งมีกรดฮิปพูริก ละลายอยู่ในใสในหลอดทดลองและนำไปประเหยโดยใช้กระบะทราย ควบคุมความร้อนของทรายที่ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำกลั่นจำนวน 1 มิลลิลิตร เพื่อละลายกรดฮิปพูริกและกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ปริมาณกรดฮิปพูริกด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้ photodiode array detector (DAD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). ฉีดตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร เข้าคอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB-C18 column (4.6×150 mm,

Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) จากนั้นชะโดยใช้สารละลาย mobile phase (A) ซึ่งประกอบไปด้วย 0.05% TFA ในน้ำ และ (B) 0.05% TFA ในอะซิโตนไตรล์ด้วยอัตรา 0.5 มิลลิลิตร/นาที่ ช่วงของการแยกทำโดยการเพิ่มสัดส่วนของ mobile phase B ที่ 20–60% ที่ช่วงเวลา 13 นาทีแรก จากนั้นคงความเข้มข้นของ mobile phase B ที่ 60% เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเปลี่ยนความเข้มข้นของ mobile phase B เป็น 20 % เป็นเวลา 2 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 228 นาโนเมตร ตัวอย่างที่ใช้เป็น Blank เตรียมโดยการเติมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกก่อนที่จะเติมเอนไซม์ ACE ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ (%) คำนวณได้จากสมการด้านล่าง

$$\% \text{ การยับยั้งเอนไซม์ ACE} = \left[\frac{(C_0 - C_B) - (I_0 - I_B)}{(C_0 - C_B)} \right] \times 100$$

เมื่อ C_0 คือปริมาณกรดฮิพฟูริกของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมคอลลาเจนและนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส, 60 นาที (control), C_B คือปริมาณ กรดฮิพฟูริกของตัวอย่างที่ไม่ได้เติมคอลลาเจนและไม่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส, 60 นาที, I_0 คือปริมาณกรดฮิพฟูริกของตัวอย่างที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลสและนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส, 60 นาที และ I_B คือปริมาณกรดฮิพฟูริกของของตัวอย่างที่เติมคอลลาเจนไฮโดรไลสและไม่บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส, 60 นาที IC_{50} คือ ความเข้มข้นของไฮโดรไลสที่จำเป็นต้องใช้เพื่อยับยั้งการทำงานของ ACE ลง 50%

2.2.3 การทำบริสุทธิ์คอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาตุ๊กบักอูย

คอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาตุ๊กบักอูย ที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงที่สุด ดังนั้นจึงนำมาทำบริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC, AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden) คอลลาเจนไฮโดรไลสที่ผ่านการระเหิดแห้งนำมาละลายในโซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และนำมาแยกด้วยคอลัมน์ carboxymethyl (CM)-Sephacel cation exchange column โดยเริ่มต้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 4.0) และชะด้วย linear gradient ของโซเดียมคลอไรด์ (0-1.0 โมลาร์) โดยใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่ 1.0 มิลลิลิตร/นาที ติดตามปริมาณเพปไทด์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 นาโนเมตร และเก็บส่วนที่แยกได้ทุก 1 มิลลิลิตร จากนั้นรวม fraction ที่แสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ที่สูงที่สุด และนำไปประเหิดแห้งและละลายอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เพื่อนำมาแยกด้วยคอลัมน์ Superdex peptide 10/300 GL column (10 mm×300 mm, Amersham Biosciences Co., Uppsala, Sweden) โดยเริ่มต้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยน้ำกลั่นและชะด้วยอัตราคงที่ที่ 0.3 มิลลิลิตร/นาที ติดตามค่าการดูดกลืนแสงของแต่ละ fraction ที่ 215 นาโนเมตร จากนั้นรวม fraction ที่แสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ที่

สูงที่สุดนำไปทำการระเหิดแห้ง และละลายอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นแล้วนำมาแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 30 prep grade column (2.6×100 cm) โดยเริ่มต้นปรับคอลัมน์ให้สมดุลด้วยน้ำกลั่น และชะด้วยน้ำกลั่นที่อัตราการที่ 0.3 มิลลิลิตร/นาที จากนั้นรวม fraction ที่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงที่สุดเพื่อนำไปวิเคราะห์หาลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS

2.2.4 LC-MS/MS

หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี-แมสสเปกโตรเมตรี-แมสสเปกโตรเมตรี (LC-MS/MS) แยกเพปไทด์ด้วยนาโนคอลัมน์ (Acclaim PepMap 100 C18, 3 mm, 100A, 75 mm id×150 mm) จากนั้นชะเพปไทด์ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของอะซิโตนไตรลล์เข้มข้น 80% ในกรดฟอร์มิกเข้มข้น 0.1% (0-70%) วิเคราะห์ลำดับเพปไทด์โดยใช้ซอฟต์แวร์ PepNovo (<http://proteomics.ucsd.edu/LiveSearch/>)

2.3 เพปไทด์ต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิ

2.3.1 การผลิตโปรตีนเนสจาก *Virgibacillus* sp. SK33

เตรียมกล้าเชื้อ (Inoculum) โดยเจียโคโลนีเดี่ยวลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Y-broth (5% NaCl, 1% yeast extract, 0.3% trisodium citrate, 0.2% KCl and 2.5% MgSO₄·7H₂O, pH 7.0) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.300 ซึ่งมีเชื้อประมาณ 10⁷ CFU/มิลลิลิตร จากนั้นเปิดกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปร ซึ่งเติมกากยีสต์จากโรงงานผลิตเบียร์เป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกในสัดส่วนเท่ากับ yeast extract ปริมาตร 450 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 วัน นำ extracellular proteinase ที่ผลิตได้ไปทำแห้งด้วยวิธีการระเหิดแห้ง เก็บเอนไซม์ที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

2.3.2 การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเซสและคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างของเหลือทิ้งซึ่งประกอบด้วยก้าง กระดูกและเศษหนัง และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจากปลาทรายแดง จากโรงงานซูริมิในจังหวัดสมุทรสาคร มาอบแห้งในตู้อบแบบถาดที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นบดละเอียดและผ่านเครื่องร่อน และสกัดไขมันโดยผสมตัวอย่างแห้งกับ Isopropanol ในอัตราส่วน 1:3 ที่ 40 องศาเซลเซียส สกัดซ้ำ 3 รอบๆ ละ 20 นาที จากนั้นทิ้งตัวอย่างที่สกัดไขมันออก ทิ้งไว้ในตู้ดูดควันข้ามคืนเพื่อกำจัด Isopropanol ซึ่งตัวอย่างแห้งที่ผ่านการสกัดไขมันออกแล้ว 10 กรัม เติมฟอสเฟตบัพเฟอร์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร และเติมโปรตีนเนสที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 และโปรตีนเนสทางการค้าคือ เพปซิน ทริปซิน และ อัลคาเลส จากนั้นย่อยตัวอย่างที่สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 65

องศาเซลเซียส และ pH 8.0 37 องศาเซลเซียส และ pH 2.0 37 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 และ 60 องศาเซลเซียส และ pH 8.0 ตามลำดับ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปให้ความร้อนในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 ×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาริเคราะห์ปริมาณเพปไทด์โดยวิธี TNBS โดยใช้ลูซีนเป็นสารมาตรฐาน วัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางเคมีโดยทดสอบความสามารถในการจับกับอนุมูลอนุมูลอิสระ

ABTS (2, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) radical scavenging activity assay) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก (Ferric reducing antioxidant power) ความสามารถในการยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีน (Inhibition of β -carotene bleaching assay) และคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถป้องกันเซลล์ HepG2 จากออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยเทอร์-บิวทิลไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (*tert*-butyl hydroperoxide: TBHP) โดยพบว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระจุก และ เศษหนังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลสจากของเหลือทิ้งจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อย่างไรก็ตาม โปรตีนไฮโดรไลสจากวัตถุดิบทั้งสองแหล่งสามารถป้องกันเซลล์ HepG2 จากออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดย TBHP โปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระจุก และ เศษหนังที่ย่อยด้วยเพปซินมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงสุด ตามด้วย *Virgibacillus* sp. SK33 ทริปซินและอัลคาเลส ตามลำดับ ดังนั้นจากการทดลองนี้จึงเลือกของเหลือทิ้งจากก้าง กระจุก และ เศษหนัง เพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลส และเพื่อเป็นการใช้ประโยชน์ของเอนไซม์จากแหล่งใหม่ จึงเลือกโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและนำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระจุก และ เศษหนังที่ย่อยด้วยเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 ไปทำบริสุทธิ์โดยเทคนิค Anion exchange chromatography โดยใช้คอลัมน์ DEAE-Sephacel และ Size exclusion chromatography

2.3.3 การทำบริสุทธิ์บางส่วนโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระจุกและเศษหนัง

2.3.3.1 การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Anion exchange chromatography

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระจุก และ เศษหนังที่ย่อยด้วยเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 เวลา 8 ชั่วโมง มาทำบริสุทธิ์โดยเทคนิค Anion exchange chromatography ด้วยเครื่อง FPLC นิดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ DEAE-Sephacel (2.6 เซนติเมตร×5 เซนติเมตร, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) ชะเพปไทด์ที่ไม่เกาะกับคอลัมน์ (Unbound fraction) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl (pH 8.0) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และชะเพปไทด์ที่เกาะกับคอลัมน์ (Bound fraction) ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ในบัฟเฟอร์เดิมจาก 0 เป็น 1 โมลาร์ เก็บตัวอย่าง (Fraction) ละ 5 มิลลิลิตร วัดปริมาณเพปไทด์ด้วยวิธี Lowry โดยใช้ Tyrosine เป็นสารมาตรฐานและวัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้าน

อนุมูลอิสระด้วยวิธีวัดความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS (ABTS radical scavenging activity assay) และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก (Ferric reducing antioxidant power) ที่เพปไทด์เข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม (tyrosine equivalent)/มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างที่มีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดเพื่อทำปฏิกิริยาในขั้นตอนต่อไป

2.3.3.2 การทำปฏิกิริยาโดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography ซึ่งมีค่าความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุดไปทำปฏิกิริยาต่อด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography นิดตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ Superdex 30 prep grade (150 CV) ละอองน้ำกึ่งไอออน (Deionized water) เก็บตัวอย่าง (Fraction) ละ 3 มิลลิลิตร วัดปริมาณเพปไทด์ด้วยวิธี Lowry โดยใช้ Tyrosine เป็นสารมาตรฐานและวัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางเคมีด้วยวัดความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก ความสามารถในการจับกับโลหะ (Metal chelating assay) และความสามารถในการจับกับอนุมูล ไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical scavenging assay) ที่เพปไทด์เข้มข้น 0.05 มิลลิกรัม (tyrosine equivalent)/มิลลิลิตร และคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพโดยทดสอบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระในระบบเซลล์ (Cellular radical scavenging assay)

2.3.4 การวัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางเคมี

2.3.4.1 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ ABTS

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Anion exchange และ Size exclusion chromatography มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเปิดตัวอย่างเพปไทด์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และสารละลาย ABTS เข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 1980 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ทั้งไว้ในที่มี 5 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

2.3.4.2 ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอร์ริก

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำปฏิกิริยาด้วยเทคนิค Anion exchange และ Size exclusion chromatography มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถในการรีดิวซ์เฟอร์ริกไอออนเป็นเฟอร์รัสไอออน โดยเปิดตัวอย่างเพปไทด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และสารละลาย FRAP 1000 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย 2, 4, 6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในกรดไฮโดรคลอริก 40 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร และ อะซิเตตบัฟเฟอร์ เข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร pH 3.6 ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0, 0.025, 0.05, 0.075, 0.125, 0.2 และ 0.25 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่าง แสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

2.3.4.3 ความสามารถในการจับกับโลหะ

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถในการจับกับโลหะเพอร์สไดออกไซด์ ปิเปตตัวอย่างเพปไทด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 2000 ไมโครลิตร FeCl_2 เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ ferrozine เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 562 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐาน EDTA ที่ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1.0 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่าง แสดงในหน่วยความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)

2.3.4.4 ความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิล

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระวัดความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิล โดยปิเปตตัวอย่างเพปไทด์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 500 ไมโครลิตร โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร, 2-deoxyribose เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร, FeSO_4 -EDTA เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เข้มข้น 2.8% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร และกรดไทโอบาร์บิทูริก (thiobarbituric acid) เข้มข้น 1.0% ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที จากนั้นแช่ในน้ำแข็ง และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร (A_{520}) เทียบความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของตัวอย่างแสดงในหน่วยเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง ดังสมการ Control ใช้น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนเพปไทด์

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(1 - A_{520} \text{ of sample})}{A_{520} \text{ of control}} \times 100$$

A_{520} of control

2.3.5 คุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพ

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography และ เพปไทด์สังเคราะห์ มาวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ โดยใช้เซลล์มะเร็งตับ (HepG2 cell) ซึ่งทดสอบโดยการบ่มตัวอย่างเพปไทด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography และเพปไทด์สังเคราะห์ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร กับ HepG2 cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle Media: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสาร 2', 7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเมื่อ DCFH-DA ผ่านเข้าไปในเซลล์แล้วจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์เอสเทอเรสที่อยู่ภายในเซลล์กลายเป็น DCFH ซึ่งเป็นสารไม่เรืองแสง แต่ถ้าภายในเซลล์มีอนุมูลอิสระ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 0.3 มิลลิโมลาร์ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ DCFH จะถูกออกซิไดซ์เป็น DCF ซึ่งสามารถเรืองแสงได้ (Fluorescence) ถ้าเพปไทด์ที่ทำการทดสอบมีความสามารถในการจับกับอนุมูลอิสระก็จะทำให้การเรืองแสงของ DCF ลดลงซึ่งวัดโดยใช้เครื่อง Spectramax Gemini EM fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength) 485 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายแสง (Emission wavelength) 530 นาโนเมตร ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ของตัวอย่างแสดงในหน่วยความเข้มข้นของการเรืองแสงสัมพัทธ์ (% Relative fluorescence intensity) เทียบกับตัวอย่างที่เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ไม่ได้เติมเพปไทด์

2.3.6 การหาลำดับกรดอะมิโนด้วยวิธี LC-MS/MS

หาลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระดุก และเศษหนังปลาทรายแดงที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography โดยใช้เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟีแมสสเปกโตรเมทรี-แมสสเปกโตรเมทรี (LC-MS/MS) เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 2.2.4

2.3.7 การสังเคราะห์เพปไทด์

เนื่องจากเพปไทด์ B3 ที่ได้มาจากการแยกโดยเทคนิค size exclusion chromatography มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงในหลายกลไกและมีปริมาณผลผลิตสูง ดังนั้นจึงสังเคราะห์เพปไทด์ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเพปไทด์ของ fraction B3 ที่ได้จากเทคนิค LC-MS/MS ด้วยวิธี solid phase peptide synthesis โดยเพปไทด์สังเคราะห์ได้แก่ VELLVPK LGTGTDL และ NTFLFFK ซึ่งทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้คอลัมน์ Amethyst C18-H (4.6×250 mm) เพปไทด์สังเคราะห์ AGNQVLNLQADLPK และ FLGSFLYEYSR ทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Crest ODS (4.6 × 250 mm) และ SinoChrom ODS-BP (4.6 × 250 mm) ตามลำดับ วิเคราะห์มวลโมเลกุลของเพปไทด์สังเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/ESI จากนั้นทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์แต่ละชิ้นที่ความเข้มข้น 5

มิลลิกรัม/มิลลิลิตร โดยวัดความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS และทดสอบการเสริมฤทธิ์ของ
เพปไทด์แต่ละชิ้นในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยการผสมเพปไทด์สังเคราะห์แต่ละชิ้น โดยให้มี
ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

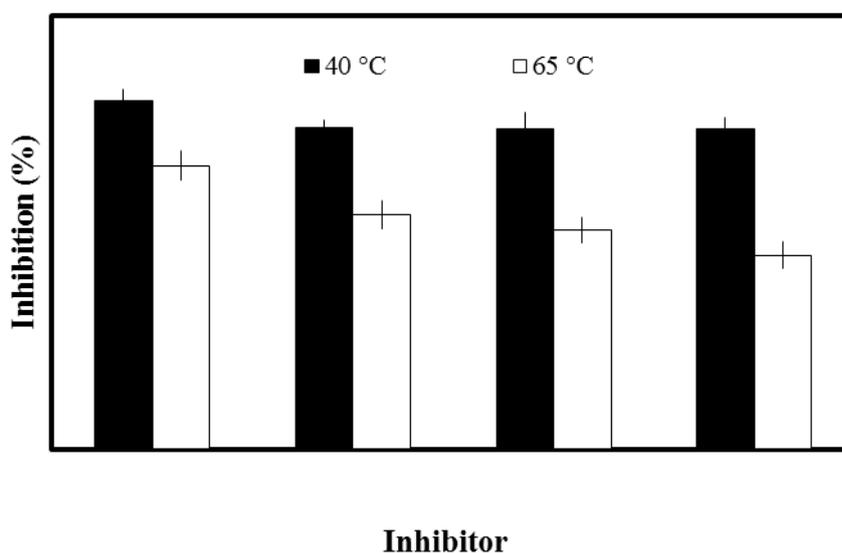
บทที่ 3
ผลการวิจัย

3.1. สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนจากปลา

3.1.1 คุณสมบัติโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด

3.1.1.1 ผลต่อการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทางการค้าได้แก่ โปรตีนไข่ขาว โปรตีนเวย์และโปรตีนถั่วเหลือง กับสารยับยั้งจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด พบว่าโปรตีนไข่ขาวมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินสูงสุดที่สภาวะการบ่มที่ 40 และ 65 องศาเซลเซียส ($p < 0.05$) (รูปที่ 3.1) ความสามารถในการยับยั้งของโปรตีนเวย์และโปรตีนถั่วเหลืองไม่แตกต่างจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากปลาใน ($p < 0.05$) โปรตีนไข่ขาว โปรตีนเวย์ โปรตีนถั่วเหลือง และโปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีระดับการยับยั้งเท่ากับ 94.2, 90.5, 88.8 และ 88.6% ตามลำดับที่ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสพบว่ามีระดับการยับยั้งเท่ากับ 78.5, 65.1, 60.8 และ 53.7% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสมีระดับการยับยั้งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งอาจบ่งชี้ได้ว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสสารยับยั้งบางส่วนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติส่งผลให้ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ลดลง จากผลดังกล่าวยืนยันได้ว่าโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดจากปลาไม่มีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเป็นองค์ประกอบ

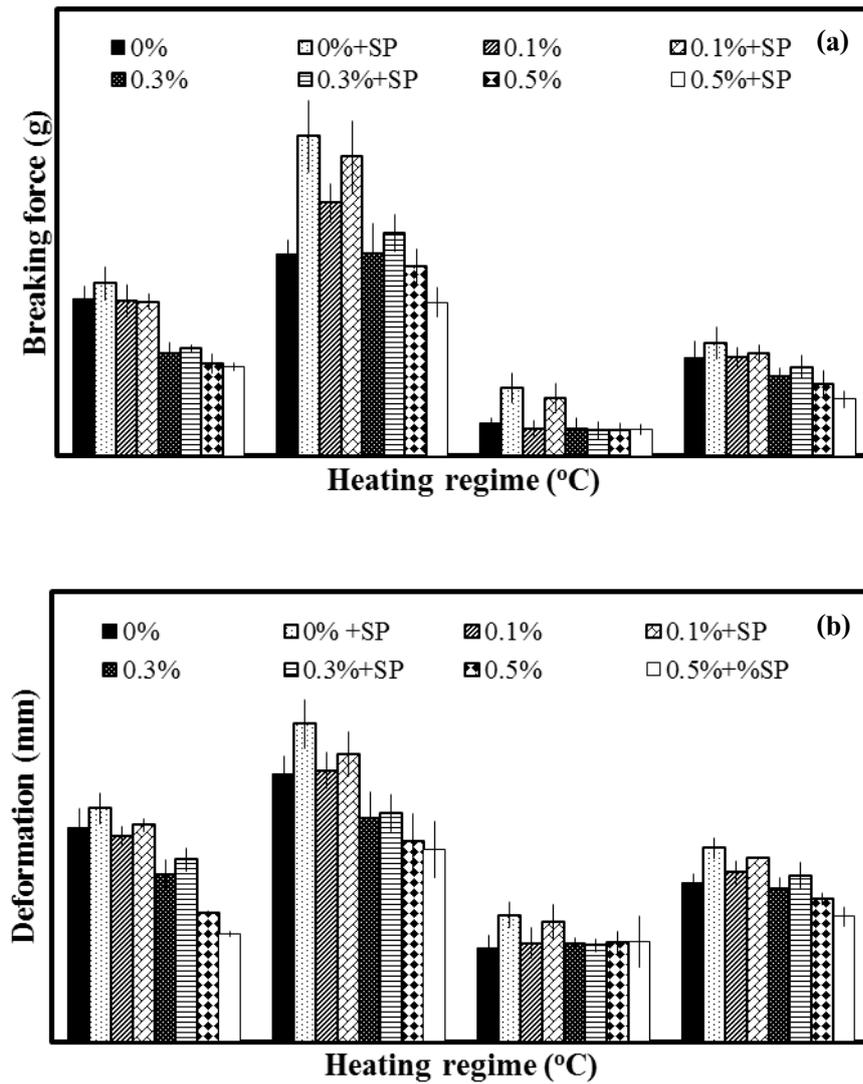


รูปที่ 3.1 ความสามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน วิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียส
EW: egg white power (โปรตีนไข่ขาว), WPC: whey protein concentrate (โปรตีนเวย์), SPI: soy protein isolate (โปรตีนถั่วเหลือง), SP: crude sarcoplasmic protein (โปรตีนซาร์โคพลาสมิก)

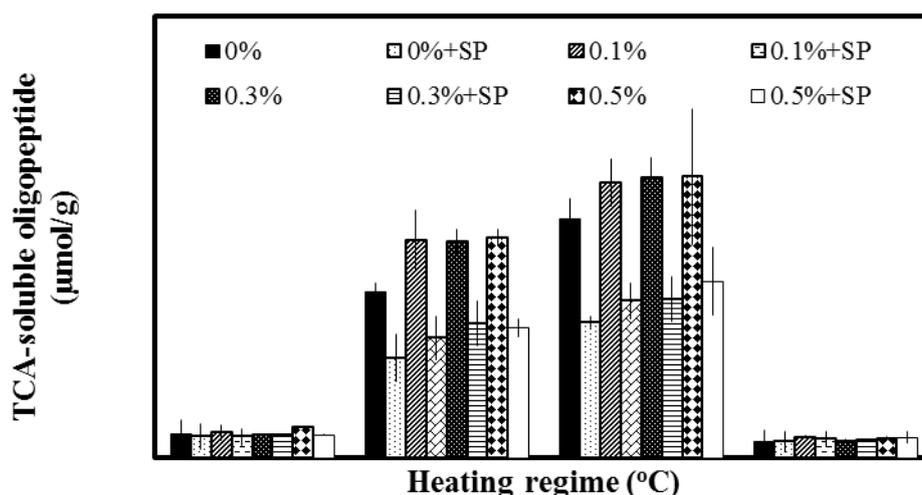
3.1.1.2 ผลต่อการเกิดเจลของซูริมิจากปลาทรายแดง

อุณหภูมิในการบ่มและโปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีผลต่อค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหัก การบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสส่งผลให้ได้ค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น ($p < 0.05$; รูปที่ 3.2a,b) เนื่องจากที่อุณหภูมินี้จะเกิดเซตติง (setting) ซึ่งโดยทั่วไปปลาที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนจะเกิดการปรากฏการณ์นี้ที่อุณหภูมิสูง และที่อุณหภูมินี้ยังเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส โดยเอนไซม์นี้จะทำให้เกิดการเชื่อมโยงของสายโปรตีนมากขึ้นส่งผลให้ค่าแรงของเจลเพิ่มมากขึ้นด้วย สำหรับการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสพบว่าค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักต่ำที่สุดทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่สภาวะนี้เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส ในเจลที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและในสภาวะที่ไม่ได้บ่ม (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส) พบว่ามีค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักสูงกว่าการบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสแต่ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องมาจากที่สภาวะนี้ไม่ได้ส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสและเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส

เมื่อเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกพบว่าค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักมีค่าสูงกว่าเจลในสภาวะที่ไม่เติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ซึ่งเหตุการณ์นี้พบที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบการเชื่อมสายของซูริมิจากปลาทรายแดงโดยวัดค่าโอลิโกเพปไทด์ พบว่าในตัวอย่างที่ไม่เติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ระดับการย่อยของเอนไซม์โปรตีนเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสและเอนไซม์โปรตีนเนสยังคงแสดงกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.3) แต่เมื่อเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกส่งผลให้ค่าโอลิโกเพปไทด์ลดลงทั้งการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งบ่งชี้ว่าการเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกช่วยให้ค่าเนื้อสัมผัสของซูริมิเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเนสในซูริมิของปลาทรายแดง ดังนั้นเพื่อที่จะทราบชนิดของโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จึงทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิก



รูปที่ 3.2 ผลของโพรตีนชาร์โคพลาสติกิกสัดจากปลาในและอุณหภูมิในการบ่มต่อค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ จุดแตกหักของเจลจากซูริมิปลาทรายแดงที่ความเข้มข้นของแคลเซียม 0, 0.1, 0.3 และ 0.5%; SP: ตัวอย่างที่เติมโพรตีนชาร์โคพลาสติกิกสัด 0.18%



รูปที่ 3.3 ผลของการเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกและอูณหภูมิในการต้มที่ระดับต่างๆต่อการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดง เมื่อเติมแคลเซียมคลอไรด์ในระดับ 0, 0.1, 0.3 และ 0.5%, SP: ตัวอย่างที่เติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัด 0.18%

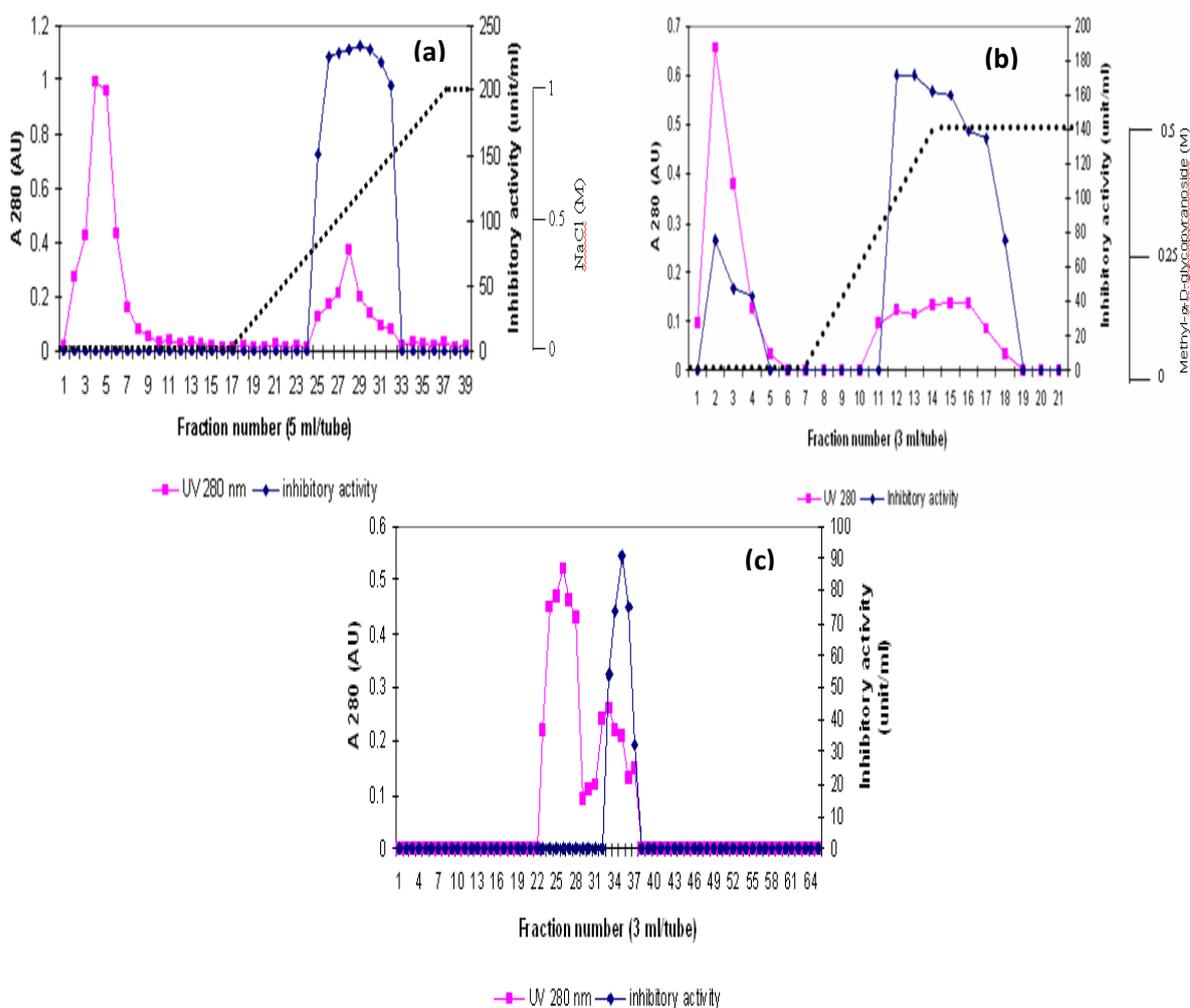
3.1.2 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก crude โปรตีนซาร์โคพลาสมิก

3.1.2.1 การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากปลาในได้แสดงในตารางที่ 3.1 หลังจากการให้ความร้อนและตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าค่าความบริสุทธิ์ (purification fold) เพิ่มขึ้น 7 เท่า จากนั้นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินถูกแยกต่อด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุลบ โปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งสามารถจับยึดกับสารตัวกลาง ในขณะที่โปรตีนที่มีประจุเหมือนกับสารตัวกลางซึ่งเป็นโปรตีนที่ไม่มีความสามารถในการเป็นสารยับยั้งถูกกำจัดออกในปริมาณมาก (รูปที่ 3.4a) ส่งผลให้ค่าความบริสุทธิ์เพิ่มเป็น 23 เท่า จากนั้นใช้วิธีการจับแบบจำเพาะ โดยมี concanavalin A เป็นลิแกนด์ สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสามารถจับกับลิแกนด์ได้ (รูปที่ 3.4b) ดังนั้นสารยับยั้งนี้เป็นไกลโคโปรตีน จากนั้นแยกต่อด้วยวิธีการแยกตามขนาดโมเลกุล (รูปที่ 3.4c) หลังจากการทำบริสุทธิ์ โปรตีนที่ได้มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 129 เท่า และปริมาณผลผลิตเท่ากับ 2.8%

ตารางที่ 3.1 การทำบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกของปลาไน

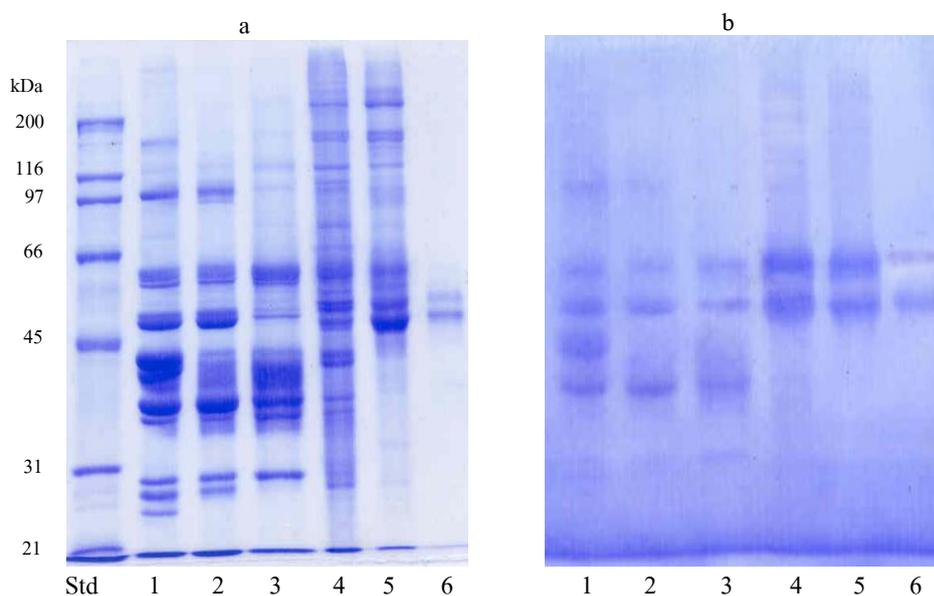
Step	Total protein (mg)	Total activity (unit)	Specific activity (unit/mg)	Purity (fold)	Yield (%)
Crude extract	2056.41	1380.21	0.67	1	100
Heat treatment	916.85	1037.26	1.13	1.69	75.15
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	182.36	858.29	4.71	7.01	62.19
DEAE-Sephacel	10.37	159.25	15.36	22.89	11.54
Con A-Sepharose	1.29	92.69	72.08	107.39	6.72
Sephacryl S-300	0.45	39.03	86.73	129.23	2.83



รูปที่ 3.4 โครมาโตแกรมการทำบริสุทธิ์ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกปลาไน การแยกด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุลบ (a), การจับจำเพาะด้วยลิแกนด์ concanavalin A (b) และการแยกตามขนาดโมเลกุล (c)

3.1.2.2 ขนาดโมเลกุล

โปรตีนชาร์โคพลาสติกประกอบด้วยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบอยู่หลายชนิดโดยมีขนาดโมเลกุลตั้งแต่ 23 ถึง 150 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.5a, เลขที่ 1) หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแยกตามขนาดแล้ว พบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลประมาณ 44 และ 50 กิโลดาลตัน (รูปที่ 3.5a, เลขที่ 6) จากการทดสอบการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินโดยใช้เทคนิค inhibitory activity staining พบว่าแถบโปรตีนทั้งสองยังคงปรากฏบนแผ่นเจลภายหลังการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทริปซิน (รูปที่ 3.5b, เลขที่ 6) ดังนั้นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 44 (Inhibitor I) และ 50 (Inhibitor II) กิโลดาลตันที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน



รูปที่ 3.5 รูปแบบโปรตีนชาร์โคพลาสติกจากปลาในภายใต้สภาวะนอนรีดิวิซิง (a) การตรวจสอบการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะนอนรีดิวิซิง (b) Std: standard molecular weight, 1: โปรตีนชาร์โคพลาสติก, 2: โปรตีนที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส, 3: โปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงความเข้มข้น 50-70%, 4: โปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยการแลกเปลี่ยนประจุลบ, 5: โปรตีนที่ผ่านการแยกด้วยวิธีการจับจำเพาะ, 6: โปรตีนที่ผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุล

3.1.2.3 การระบุชนิดของโปรตีน

โปรตีนทั้งสองแถบที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ถูกตัดและย่อยให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ โดยเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์จะตัดตรงตำแหน่งกรดอะมิโนที่จำเพาะต่อเอนไซม์ของโปรตีนแต่ละชนิด นำมาวิเคราะห์ต่อกด้วย LC/MS/MS เพื่อหาลำดับกรดอะมิโนที่มีอยู่ในโปรตีนชนิด

นั้นๆ แล้วนำข้อมูลของลำดับกรดอะมิโนที่ได้มาเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีน จากการศึกษาพบว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุล 44 กิโลดาลตัน (Inhibitor I) และ 50 กิโลดาลตัน (Inhibitor II) มีลำดับกรดอะมิโนใกล้เคียงกับโปรตีนยับยั้งทริปซินชนิดแอลฟา-1 (alpha-1-antitrypsin) (ตารางที่ 3.2)

ตารางที่ 3.2 ผลการระบุชนิดของโปรตีนโดย LC-MS/MS

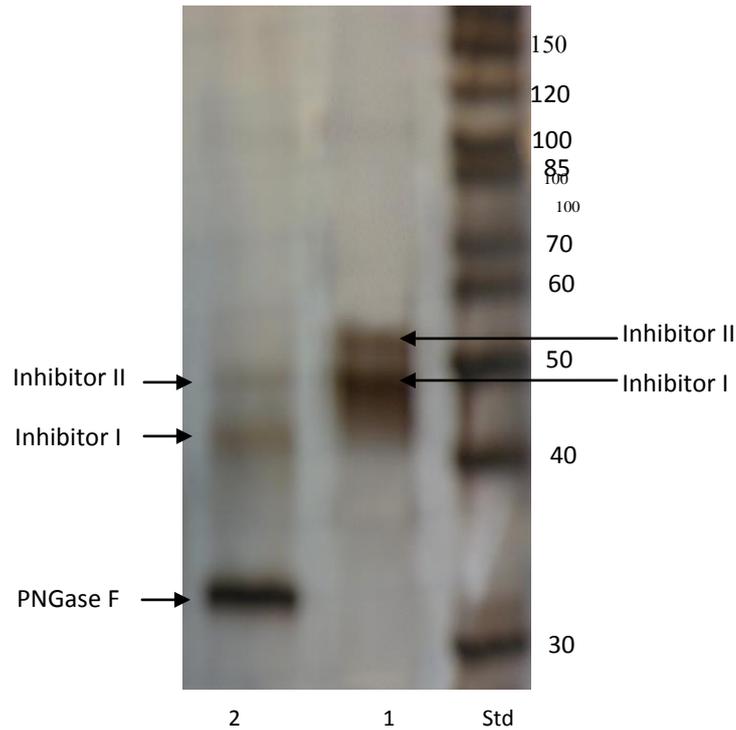
Sample	Accession number	Protein	Species	Mascot score
Inhibitor I (44 kDa)	gi 416561	Alpha-1-antitrypsin homolog	<i>Cyprinus carpio</i> (common carp)	143
Inhibitor II (50 kDa)	gi 416561	Alpha-1-antitrypsin homolog	<i>Cyprinus carpio</i> (common carp)	399

3.1.2.4 การพิสูจน์ความเป็นไกลโคโปรตีน

ระหว่างการทำวิสุทธิพบว่าโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสามารถจับกับลิแกนด์ concanavalin A ได้ดี ดังนั้นโปรตีนชนิดนี้อาจเป็นไกลโคโปรตีน เพื่อทดสอบสมมติฐานนี้จึงได้ใช้เอนไซม์ PNGase F เพื่อที่จะตัดพันธะระหว่างโปรตีนและน้ำตาลที่ตำแหน่ง N-linked จากรูปที่ 3.6 จะเห็นได้ว่าโปรตีนทั้งสองมีขนาดโมเลกุลลดลงหลังจากการเติมเอนไซม์ PNGase F โดย Inhibitor I มีขนาดโมเลกุลลดลงจาก 44 กิโลดาลตันเป็น 36 กิโลดาลตันขณะที่ Inhibitor II มีขนาดโมเลกุลลดลงจาก 50 กิโลดาลตันเป็น 45 กิโลดาลตัน จากผลนี้จึงยืนยันได้ว่า Inhibitor I และ II เป็นไกลโคโปรตีน

3.1.2.5 ผลของสารยับยั้งวิสุทธิต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์

สารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1ที่ทำวิสุทธิได้มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้สูงสุด (ตารางที่ 3.3) และสามารถยับยั้งเอนไซม์โคโมทริปซินและปาเปนได้เล็กน้อย อย่างไรก็ตามสารยับยั้งนี้ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์เทอร์โมไลซินและเปปซิน จากผลนี้พอจะสรุปได้ว่า สารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากโปรตีนซาร์โคพลาสมิกของปลาไนมีความจำเพาะสูงต่อเอนไซม์ทริปซิน



รูปที่ 3.6 รูปแบบโปรตีนในสภาวะก่อนและหลังเติมเอนไซม์ PNGase F Std: standard molecular weight, 1: โปรตีนในสภาวะก่อนเติมเอนไซม์ PNGase F, 2: โปรตีนในสภาวะหลังเติมเอนไซม์ PNGase F

3.1.2.6 เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไน

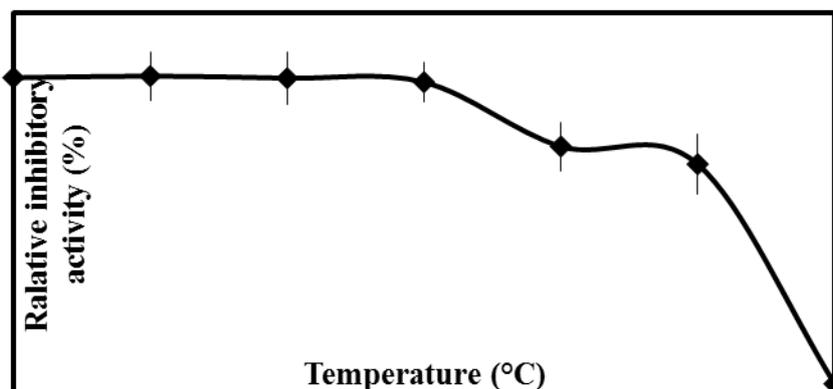
กิจกรรมการยับยั้งของโปรตีนแอลฟา-1 ไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.7) จากนั้นเริ่มลดลงที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งสูงถึง 80% อย่างไรก็ตาม กิจกรรมการยับยั้งลดลงอย่างมากที่อุณหภูมิสูงกว่า 80 องศาเซลเซียสและไม่พบการยับยั้งเอนไซม์ที่อุณหภูมิประมาณ 90 องศาเซลเซียส ดังนั้นสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไน มีแนวโน้มที่จะยับยั้งโปรตีนในกระบวนการผลิตเซตติงของซูริมิซึ่งใช้อุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียสสำหรับซูริมิที่ผลิตจากปลาเขตศูนย์สูตร (tropical surimi)

3.1.2.7 ความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายตัวเองในซูริมิปลาตาหวาน

เมื่อพิจารณารูปแบบโปรตีนของซูริมิปลาตาหวานที่บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสในกรณีที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งทริปซินแบบแอลฟา-1 พบว่ามีไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain) มีการย่อยสลายตัวเองสูง (รูปที่ 3.8) ทั้งนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของโปรตีนโทโปรมัยโอซิน (Tropomyosin) ลดลงด้วยเช่นกันที่อุณหภูมินี้ ในขณะที่แถบไมโอซินสายหนักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสลดลงแต่น้อยกว่าตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส จากผลนี้สรุปได้ว่าการย่อยสลายตัวเองของปลาตาหวานโดยโปรตีนเสถียรที่อุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส

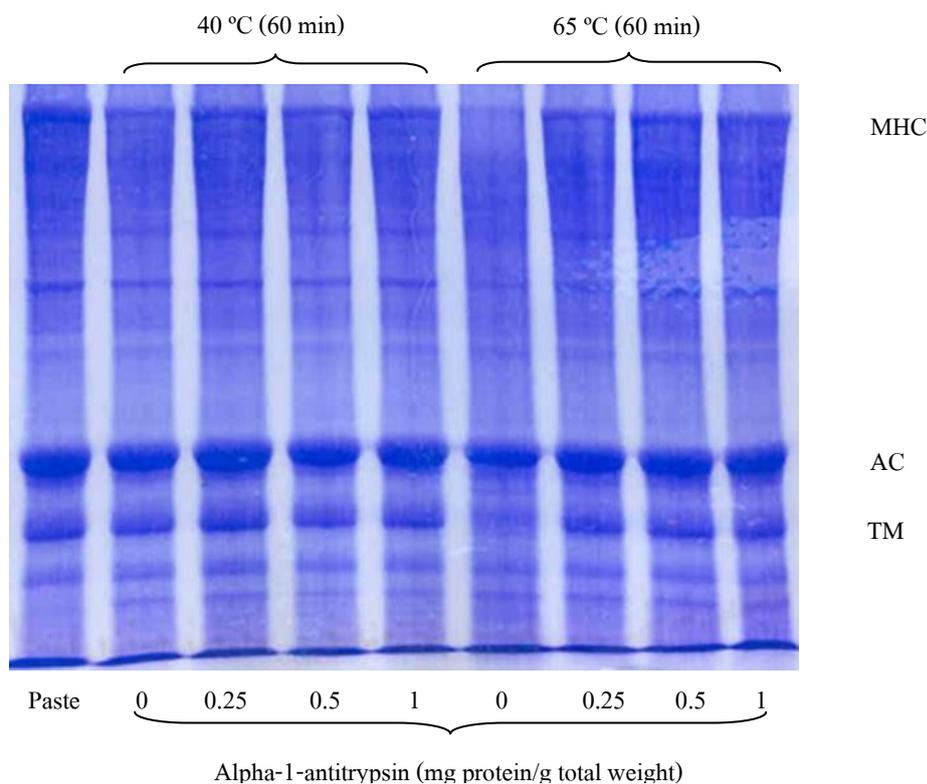
ตารางที่ 3.3 ผลการยับยั้งโปรตีนชนิดต่างๆ โดยสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไน

Proteinase	Inhibition (%)
Serine proteinase	
Trypsin	100 ± 1.89
α-Chymotrypsin	20.71 ± 1.52
Metallo proteinase	
Thermolysin	0
Cysteine proteinase	
Papain	26.98 ± 1.32
Aspartic proteinase	
Pepsin	0



รูปที่ 3.7 เสถียรภาพต่ออุณหภูมิของโปรตีนยับยั้งทริปซินแอลฟา-1

การเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักและโทรโปมัยโอซินลดลงในตัวอย่างที่เติมสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไน ทั้งสองอุณหภูมิการบ่ม ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะในการให้ความร้อนที่ค่อนข้างสูงแก่ซูริมิ แต่ก็ยังคงพบว่าสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 สามารถขัดขวางการย่อยสลายตัวเองโดยโปรตีนของซูริมิปลาตาหวานได้ดี ซึ่งอาจเป็นเพราะสารยับยั้งสามารถทนความร้อนได้ (รูปที่ 3.8) ความหนาแน่นของโปรตีนเหล่านี้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งบริสุทธิ์ จากผลนี้อาจกล่าวได้ว่าสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 จากปลาไนมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสจากซูริมิปลาตาหวานได้ดี



รูปที่ 3.8 รูปแบบโปรตีนของซูริมิปลาตาหวานบ่มที่อุณหภูมิ 40 (เลนที่ 2-5) และ 65 (เลนที่ 6-9) องศาเซลเซียส ที่การเติมสารยับยั้งทริปซินแอลฟา-1 บริสุทธิ์จากปลาไนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ MHC: มัยโอซินสายหนัก, AC: แอคติน, TM: โทโรโปมัยโอซิน

3.2. สมบัติการยับยั้งเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

3.2.1 ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสท

การศึกษานี้ทำโดยใช้เอนไซม์ 4 ชนิด คือ อัลคาเลส เปปซิน ทริปซินและเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK39 ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยใช้ที่ความเข้มข้น 36 mU เท่ากัน ใช้คอลลาเจนเป็นสารตั้งต้นและความเข้มข้นของคอลลาเจนที่ใช้ในปฏิกิริยาเท่ากับ 2.75 มิลลิกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร พบว่า ไฮโดรไลเสทจาก เปปซิน ทั้งคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากปลานิลและปลาฉูก แสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ได้สูง

เปปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE ที่มีรายงานโดยส่วนมากแล้วมักประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เช่น proline, phenylalanine และ tyrosine ตำแหน่งที่สามจากปลายสายด้านคาร์บอกซิล (Cheung et al., 1980) เปปซินมีความสามารถในการ

ตัดพันธะเพปไทด์ระหว่างกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก และ อะโรมาติก เช่น phenylalanine, tryptophan and tyrosine (Nelson and Cox, 2000)

ตารางที่ 3.4 ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ของเพปไทด์คอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาคูกบักอูย

Enzyme	TS collagen		HS collagen	
	ACE inhibition (%)	DH (%)	ACE inhibition (%)	DH (%)
<i>Virgibacillus</i> sp. SK39	41.65 ± 0.80 ^b	28.25	14.67 ± 1.24 ^a	28.33
Pepsin	93.25 ± 0.50 ^b	31.03	92.57 ± 0.17 ^b	32.19
Trypsin	46.62 ± 5.28 ^c	5.16	50.53 ± 0.65 ^d	7.55
Alcalase	87.43 ± 0.54 ^f	31.18	79.94 ± 0.76 ^e	24.43

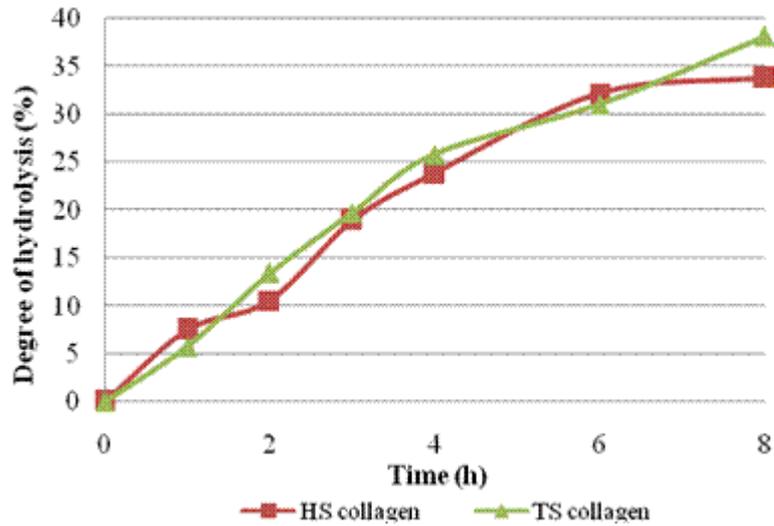
Different letters indicate significant differences among mean ($p < 0.05$). Values are expressed as mean ± S.D. (n = 4).

ดังนั้นเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยโดยเพปซินจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอะโรมาติกหรือไฮโดรโฟบิกที่ปลายสายด้วยคาร์บอกซิล จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเพปซินสามารถผลิตเพปไทด์ที่มีความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงกว่าเอนไซม์อื่นๆ Lee et al. (2009) รายงานว่าไฮโดรไลเซสที่ได้จากก้างปลาหน้าโดยใช้เอนไซม์เพปซิน แสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ 5 เอนไซม์อื่นๆที่ใช้คือ Alcalase, α -chymotrypsin, papain, Neutrase และ trypsin ไฮโดรไลเซสจากก้างปลาคอดโดยใช้เอนไซม์ papain แสดงความสามารถสูงสุดในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE มากกว่าเพปไทด์ที่เตรียมจาก chymotrypsin, trypsin, pepsin และ pronase E (Jeon et al., 1999) โดยปกติแล้วความสามารถในการย่อยขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารตั้งต้นและชนิดของเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเพปซินสามารถผลิตเพปไทด์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE สูงที่สุด จึงเลือกตัวอย่างนี้เพื่อศึกษาต่อไป

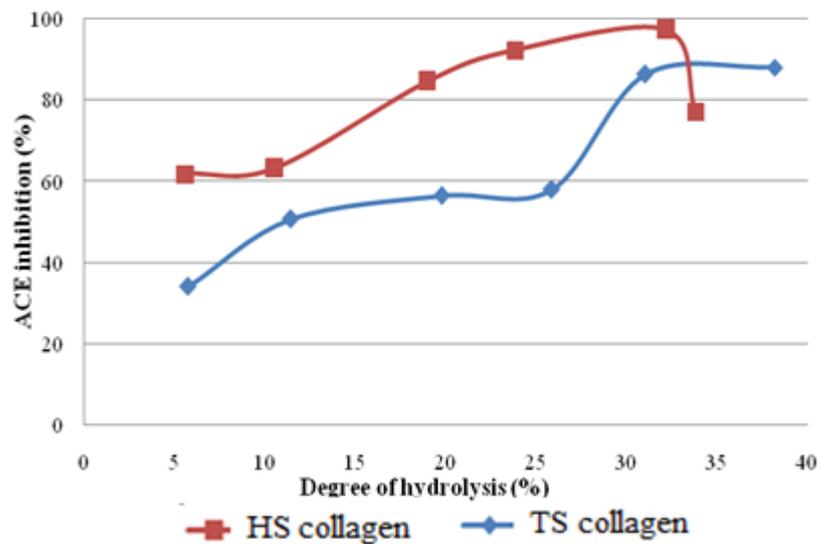
3.2.2 ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนที่ย่อยด้วยเพปซิน

ระดับการย่อย (Degree of hydrolysis; DH) มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อย (รูปที่ 3.9) และอัตราการเพิ่มขึ้นค่อยๆลดลงหลังจาก 4 ชั่วโมง คอลลาเจนไฮโดรไลเซสจากหนังปลาคูกบักอูยแสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE มากกว่าไฮโดรไลเซสจากหนังปลานิลที่ทุกระดับของการย่อย ($p < 0.05$, รูปที่ 3.10) ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE เพิ่มสูงขึ้นเมื่อ DH เพิ่มขึ้น ทั้งไฮโดรไลเซสจากหนังปลานิล

และหนังปลาคูบิกอูย และความสามารถในการยับยั้ง ACE ไม่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อ % DH มีค่าประมาณ 30%



รูปที่ 3.9 ระดับการย่อยคอลลาเจนจากหนังปลานิล (TS collagen) และปลาคูบิกอูย (HS collagen) โดยเพปซินที่ระยะเวลาบ่มต่างๆ



รูปที่ 3.10 ความสามารถในการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาคูบิกอูยที่ย่อยโดยเพปซินที่ระดับการย่อยต่างๆ

ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลา
 ดุกบึกอุยที่ระดับการย่อย 33% มีค่าน้อยกว่าที่ระดับการย่อย 30% ($p < 0.05$) ส่วนความสามารถในการ
 ยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลานิลที่ระดับการย่อย 38% และ
 30% มีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการยับยั้ง ACE ไม่ได้ขึ้นกับ
 ระดับการย่อยแต่เพียงอย่างเดียว ความจำเพาะของกรดอะมิโนในสายเปปไทด์อาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อ
 กิจกรรมการยับยั้ง ACE เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโน proline, phenylalanine และ tyrosine ที่ปลายด้าน
 คาร์บอกซิล จะสามารถจับกับเอนไซม์ ACE ได้ดี คอลลาเจนจากหนังปลาดุกบึกอุยมี proline มากกว่า
 คอลลาเจนจากหนังปลานิล (Sungperm, 2012) ดังนั้น ไฮโดรไลสจากหนังปลาดุกบึกอุยจึงมีโอกาส
 ที่จะ มี proline ที่ปลายสายคาร์บอกซิลมากกว่า จึงอาจจับกับเอนไซม์ ACE ได้มากกว่า ไฮโดรไลส
 จากหนังปลาดุกบึกอุยจึงถูกเลือกเพื่อการทดลองขั้นต่อไป

3.2.3 การทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่ยับยั้ง ACE

3.2.3.1 อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration)

คอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาดุกบึกอุยผ่านการแยกด้วย
 วิธีการอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้แผ่นเยื่อกรองที่มีขนาด 30 กิโลดาลตัน และตามด้วยแผ่นเยื่อกรอง
 ขนาด 10 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เก็บตัวอย่างเปปไทด์สามส่วนคือ ส่วนที่ผ่านการแยกด้วยแผ่นเยื่อ
 กรองทั้งสองขนาด เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE

ตารางที่ 3.5 ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลสจาก หนังปลาดุกบึกอุยที่ผ่านการแยกขนาดด้วยอัลตราฟิลเตรชัน

MW (Dalton)	Inhibition (%)
Crude hydrolysate	92.57 ± 0.17 ^a
> 30 kDa	54.50 ± 1.45 ^c
5-30 kDa	57.11 ± 1.45 ^{bc}
<5 kDa	61.41 ± 1.40 ^b

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean ± S.D. (n = 4).

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถของเปปไทด์ที่ผ่านการแยกขนาดด้วยอัลตราฟิลเตรชันกับ
 crude peptide พบว่า crude peptide มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของ ACE มากกว่า ทั้งนี้อาจ
 เนื่องมาจากการการทำงานเสริมกันของเปปไทด์ที่มีอยู่ในระบบทั้งหมด หลังจากแยกด้วยอัลตรา-
 ฟิลเตรชันความสามารถของคอลลาเจนไฮโดรไลสจากหนังปลาดุกบึกอุยขึ้นอยู่กับขนาดของ

โมเลกุลที่ต่างกัน ไฮโดรไลเซสที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดงความสามารถสูงสุดในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE ($p < 0.05$, ตารางที่ 3.5) มีการรายงานว่า bioactive peptides ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3-20 ตัว และเปปไทด์ที่มีสายสั้นมักมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ได้ดี (Philanto, 2000)

ได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE กับขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ พบว่าเปปไทด์ขนาดเล็กมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ได้ดีกว่าเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ เพราะเปปไทด์ที่มีสายยาวจะกีดขวางการเข้าจับกับบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ (Gómez-Ruiz Ramos and Recio, 2007) เปปไทด์ขนาดเล็กแสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงกว่าเปปไทด์ขนาดใหญ่และมีแนวโน้มในการดูดซึมเข้าสู่ลำไส้เล็กได้ง่ายอีกด้วย จากการศึกษาพบว่าค่า IC_{50} ของเปปไทด์ขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน จากคอลลาเจนหนังปลาฉลามมีค่าเท่ากับ 9.01 ± 0.04 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าเปปไทด์คอลลาเจนจากหนังปลาฉลามที่ได้จากการย่อยด้วยเปปซินแสดงความสามารถในการยับยั้ง ACE ที่สูง คอลลาเจนไฮโดรไลเซสจากแหล่งต่างๆ ที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ได้แก่ ไฮโดรไลเซสจากก้างปลาคอดและเนื้อปลาซาร์ดีนที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 3 กิโลดาลตัน แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 83 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และ 80 ไมโครกรัมโปรตีน/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Matsu et al., 1993; Jeon et al., 1999) ส่วนไฮโดรไลเซสจากหอยเชลล์ หอยนางรม กระดุกปลาคอด และหนังปลาคอด แสดงค่า IC_{50} ที่สูงกว่า 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร (He et al., 2007)

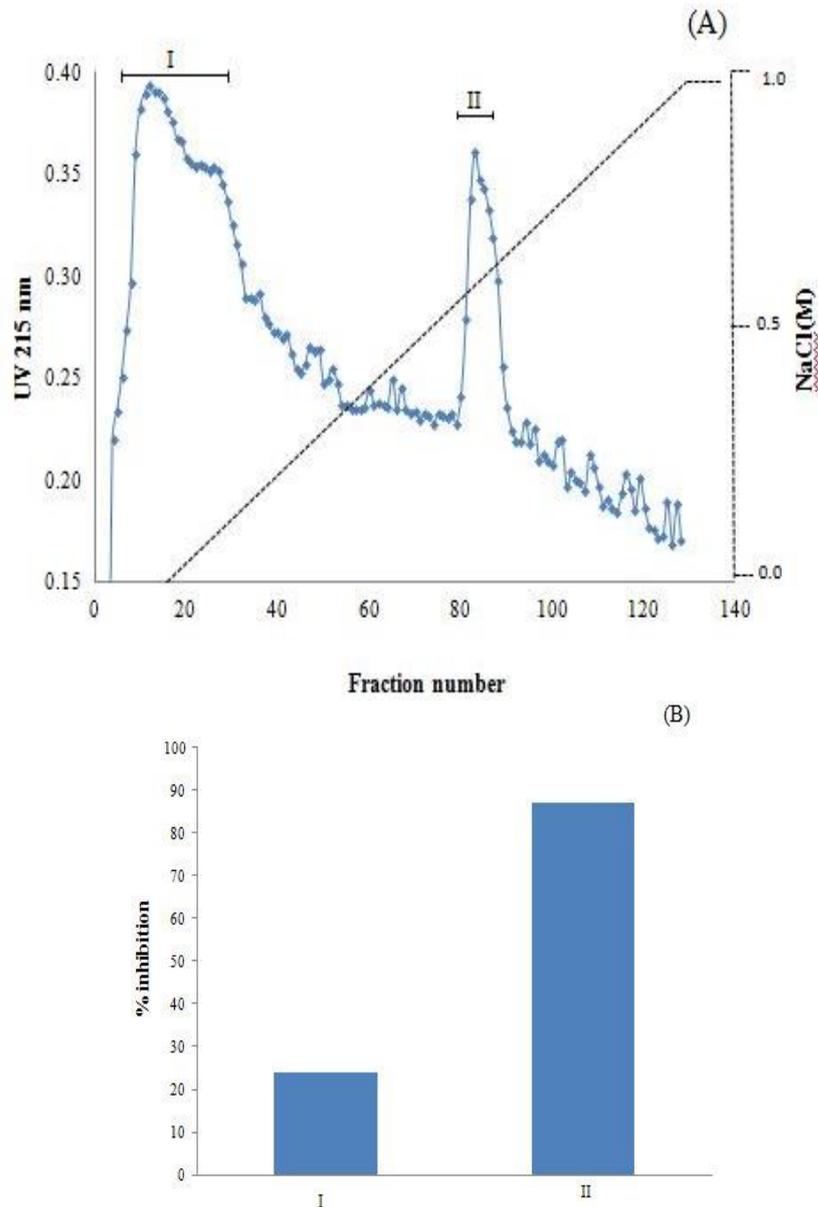
3.2.3.2 การทำบริสุทธิ์เปปไทด์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE

เนื่องจากคอลลาเจนไฮโดรไลเซสจากหนังปลาฉลามที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์สูงที่สุด จึงถูกเลือกเพื่อทำบริสุทธิ์ โดยผ่านคอลัมน์ Carboxymethyl (CM)-Sepharose cation exchange จากผลการทำบริสุทธิ์พบว่าคอลัมน์สามารถแยกเปปไทด์ออกมาได้เป็น 2 พีค (peak) คือส่วนที่ไม่จับกับคอลัมน์ (Unbound fraction) ซึ่งกำหนดให้เป็น I และส่วนที่จับกับคอลัมน์ (Bound fraction) ซึ่งกำหนดให้เป็น II ซึ่ง fraction II นี้ ถูกชะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือเท่ากับ 0.6-1.0 โมลาร์ และแสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงกว่า fraction I โดยมีค่าการยับยั้งสูงถึง 86.98% ที่ปริมาณเปปไทด์ในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.5 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร (รูปที่ 3.11 (B))

เนื่องจาก Fraction II มีความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงสุด จึงนำมาทำบริสุทธิ์ต่อโดยการใช้เทคนิคการคัดแยกตามขนาด โดยใช้คอลัมน์ Superdex 30 prep grade ซึ่งสามารถแยกเปปไทด์ออกมาเป็นสองส่วนคือ G-I และ G-II (รูปที่ 3.12(a)) และเมื่อวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ACE พบว่า fraction G-I มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรม ACE สูงกว่า G-II

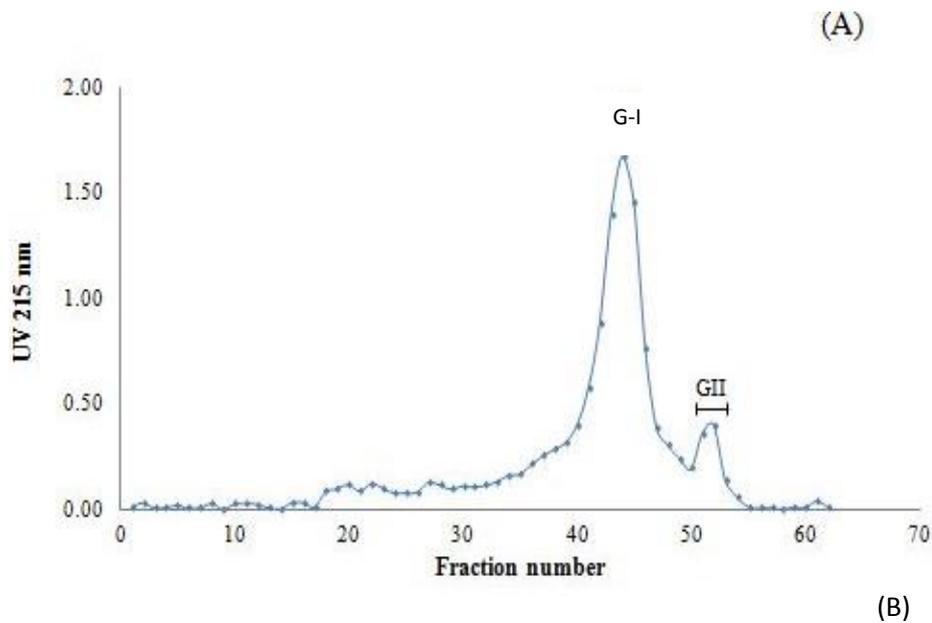
โดยมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 70.34% ที่ความเข้มข้นเพปไทด์เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร

เนื่องจากเพปไทด์ในส่วน G-I มีความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงกว่า G-II จึงเลือกมาเพื่อทำบริสุทธิ์ในลำดับถัดมา Superdex peptide 10/300 GL และท้ายที่สุดได้เพปไทด์ที่ออกมา ดังรูปที่ 3.13 ซึ่ง fraction ดังกล่าวนี้แสดงการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ ACE ที่ 72.06% ที่ความเข้มข้นของเพปไทด์เท่ากับ 0.2 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร

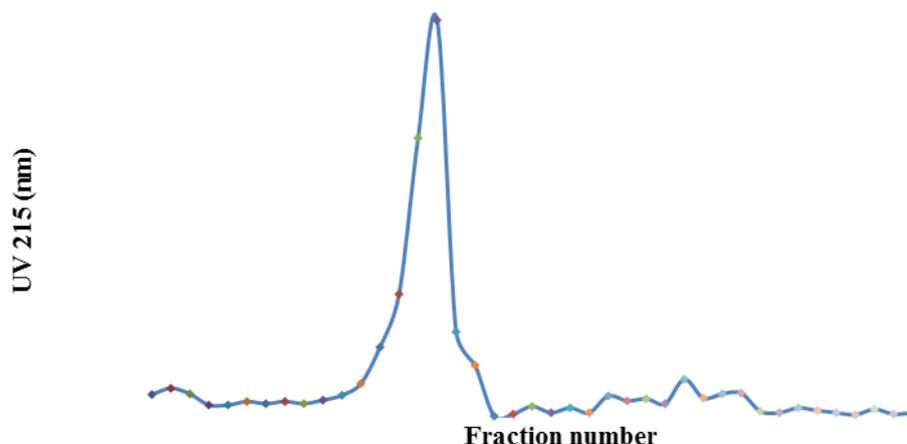


รูปที่ 3.11 การแยกเพปไทด์ยับยั้ง ACE ที่มีขนาดต่ำกว่า 5 กิโลดาลตัน โดย carboxymethyl (CM)-Sepharose cation exchange column (A). เพปไทด์ที่จับกับคอลัมน์ จะโดยความเข้มข้นของสารละลายเกลือตั้งแต่ (0-1.0 โมลาร์) ในสารละลายบัฟเฟอร์โซเดียมอะซิเตต 10 มิลลิ-

โมลาร์ (pH 4.0) ด้วยอัตราการชะเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร/นาที เก็บสารละลายทุกๆ 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำเฟสไปไทด์ fraction I และ II ไปวิเคราะห์หาความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE โดยใช้ความเข้มข้นของเฟสไปไทด์ 0.5 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร (B)



รูปที่ 3.12 รูปแบบการแยกของเฟสไปไทด์ fraction II โดยการแยกผ่านคอลัมน์ Superdex 30 prep grade (A) โดยการชะด้วยน้ำกลั่นที่อัตราการชะเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร/นาที ติดตามปริมาณเฟสไปไทด์ของแต่ละส่วนที่แยกออกมาโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 215 นาโนเมตร และเก็บสารละลายที่ความถี่ทุกๆ 0.5 มิลลิลิตร ความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ACE แสดงดังกราฟ B ที่ระบุเป็น I และ II คือตัวอย่าง G-I และ G-II ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของเฟสไปไทด์ 0.2 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน)/มิลลิลิตร (B)



รูปที่ 3.13 รูปแบบการแยกของเปปไทด์โดยใช้คอลัมน์ Superdex peptide 10/300 GL. ซึ่งชะด้วยน้ำกลั่นที่อัตราการชะเท่ากับ 0.3 มิลลิลิตร/นาที และติดตามปริมาณเปปไทด์ที่ 215 นาโนเมตร

นำเปปไทด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์มาวิเคราะห์ลำดับของกรดอะมิโนโดยเทคนิค LC/MS-MS ซึ่งสามารถแยกเปปไทด์ออกมาได้ทั้งหมด 18 ชิ้นส่วน ดังแสดงในตารางที่ 3.6 กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบในเปปไทด์คือ leucine (Leu), arginine (Arg), phenylalanine (Phe) และ asparagine (Asn) โดยกรดอะมิโนที่พบในปริมาณมากที่สุดคือ Leu ที่ปลายสายด้านคาร์บอกซิล (C-terminal) ส่วนมากแล้วเป็นกรดอะมิโน Arg ในขณะที่ปลายด้านอะมิโน (N-terminal) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนสายตรง กิจกรรมทางชีวภาพของเปปไทด์ขึ้นอยู่กับลำดับของกรดอะมิโน Cheng et al. (1980) ได้รายงานว่าปลายด้านคาร์บอกซิลของเปปไทด์มีกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวงและปลายด้านอะมิโนมีกิ่งกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นกิ่ง (branch chain) อะมิโนสามารถยับยั้ง ACE แบบแย่งจับแบบแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) Ondetti and Cushman, (1977) ได้เสนอแบบจำลองการจับกันระหว่างสารตั้งต้นหรือสารยับยั้ง ACE ที่บริเวณเร่งของ ACE โดยแบ่งเป็นบริเวณเร่งย่อย (subsites) เป็น 3 ตำแหน่ง คือ S_1 (antepenultimate), S_1' (penultimate) และ S_2' (ultimate) ซึ่งบริเวณเร่งย่อยทั้ง 3 ตำแหน่งจะจับกับกรดอะมิโนชนิดที่แตกต่างกัน โดยสามารถจับกับเปปไทด์สายสั้นที่มี Pro และ Val อยู่ที่ตำแหน่งปลายด้านคาร์บอกซิลได้เป็นอย่างดี ทำให้เปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนในตำแหน่งดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของ ACE (Zhao et al., 2007)

ตารางที่ 3.6 ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่ยับยั้ง ACE จากการวิเคราะห์แบบ *denovo* peptide sequencing

Sequence no.	PepNovo score	Molecular weight (Da)	Amino acid sequence
1	60.708	1018.626	Leu-Met-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
2	37.147	921.638	Glu-Asn-Leu-Ser-Phe-Arg-Arg
3	98.852	903.664	Glu-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
4	86.536	790.576	Glu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
5	48.014	905.657	Pro-Gln-Leu-Leu-Pro-Pro-Leu-Lys
6	43.09	791.66	Asp-Lys-Leu-Leu-Phe-Arg
7	86.861	905.671	Met-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
8	50.755	1017.667	Glu-Asn-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
9	43.813	904.795	Asn-Glu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
10	65.303	2919.462	Asn-Leu-Met-Ala-Gly-Thr-Gln-Gly-Ser-Tyr-Lys
11	64.83	2151.592	Leu-Gln-Val-Gln-Glu-Leu-Gln-Pro-Leu-Lys
12	93.703	1017.864	Leu-Asn-Glu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
13	7.102	812.443	Glu-Leu-Leu-Asn-Pro-Val-Lys
14	62.685	923.765	Met-Asn-Leu-Asn-Glu-Phe-Arg
15	66.785	790.412	Glu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
16	70.635	904.757	Leu-Leu-Leu-Glu-Asn-Phe-Arg
17	35.069	905.667	Met-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg
18	65.145	1016.926	Met-Pro-Leu-Leu-Leu-Leu-Phe-Arg

Nakagomi et al., (2000) รายงานว่าเปปไทด์ที่แยกได้จากอัลบูมินในเลือดของมนุษย์และในน้ำเลือดจะมีกรดอะมิโน arginine ที่ปลายด้านคาร์บอกซิล (Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg และ Tyr-Leu-Tyr-Glu-Ile-Ala-Arg-Arg) สามารถแสดงกิจกรรมในการยับยั้ง ACE ที่สูง ประจุบวกของกลุ่ม guanidine หรือหมู่แอลฟาอะมิโนอาจมีผลต่อความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ คอลลาเจนไฮโดรไลเตสจากหนังของปลา skate มีกรดอะมิโน arginine ที่ปลายด้านคาร์บอกซิล (Gln-Leu-Gly-Phe-Leu-Gly-Pro-Arg) สามารถแสดงกิจกรรมการยับยั้ง ACE ที่สูง โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 148 ไมโครโมลาร์ (Lee et al., 2011) มีการศึกษาลำดับกรดอะมิโนจากอัลบูมินในเลือดของมนุษย์ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน โดยลำดับกรดอะมิโนที่ได้คือ Ala-Trp และ Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-

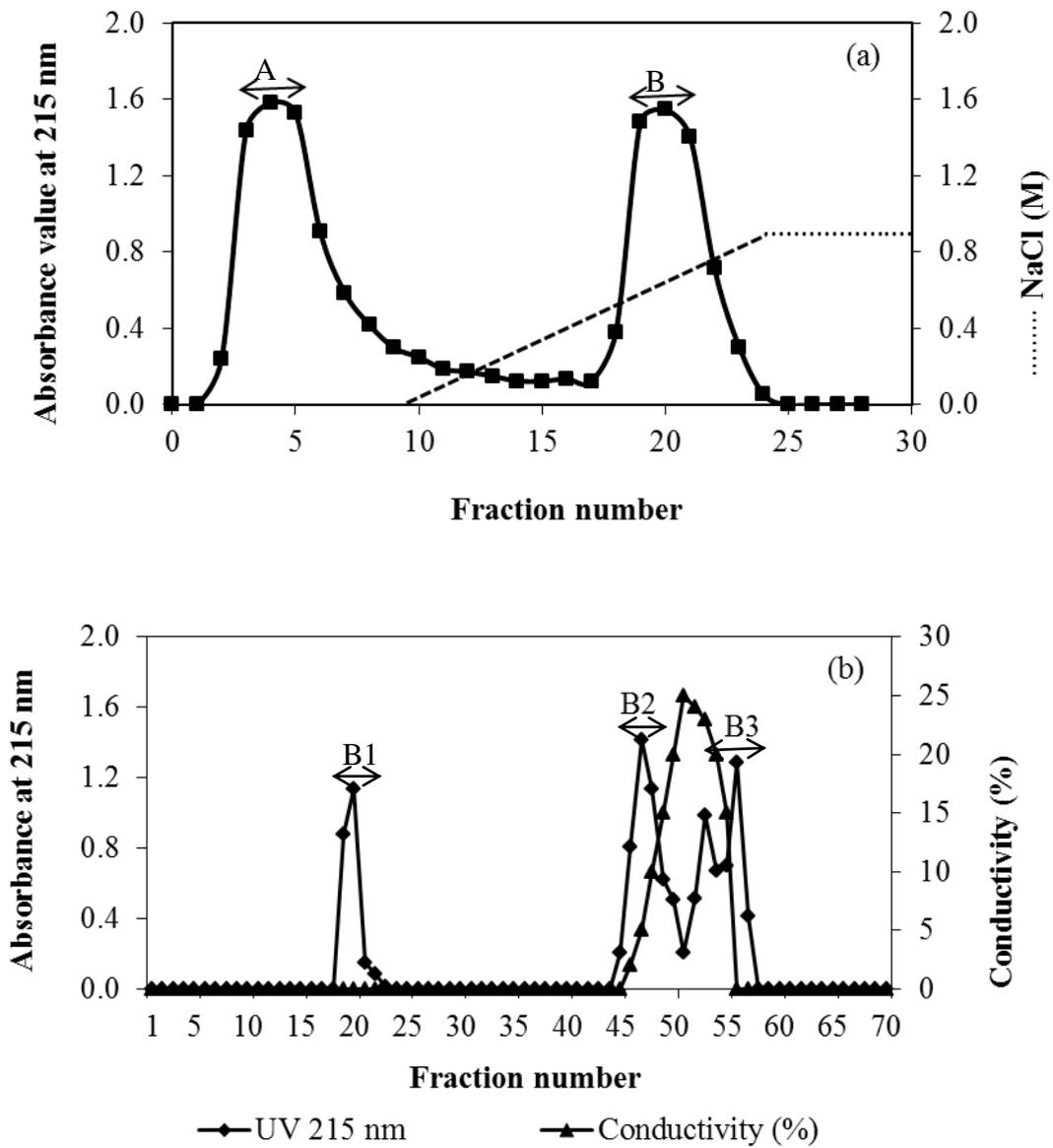
Arg เปปไทด์ Ala-Trp เป็นสารยับยั้งที่จะเข้าจับแบบแข่งขัน ในขณะที่ Ala-Phe-Lys-Ala-Trp-Ala-Val-Ala-Arg จะเป็นสารยับยั้งที่เข้าจับแบบไม่แข่งขัน (noncompetitive inhibitor) กับ ACE (Tauzin et. al., 2002; Fujita et al., 2000; Nakagomi. et al., 2000; Nakagomi et al., 1998; Cheng et al., 1980)

3.3 เปปไทด์ต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิ

3.3.1 ศึกษาลักษณะเปปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากโรงงานซูริมิโดยใช้เอนไซม์

3.3.1.1 การทำบริสุทธิ์ไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูกและเศษหนังและคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูกและเศษหนังปลาทรายแดง ที่ผ่านการย่อยด้วยโปรตีนเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 นาน 8 ชั่วโมง มาทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ DEAE-Sephacel พบว่า สามารถแยกเปปไทด์ได้ 2 กลุ่ม คือ เปปไทด์ที่ไม่เกาะกับคอลัมน์ (fraction A) และเปปไทด์ที่เกาะกับคอลัมน์ (fraction B) (รูปที่ 3.14a) และวัดคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ โดยทดสอบความสามารถในการจับอนุมูล ABTS และความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริก โดยพบว่า fraction B มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS (0.617 ± 0.008 มิลลิโมลาร์ Trolox) และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับเหล็กเฟอริก (0.329 ± 0.002 ไมโครโมลาร์ Trolox) สูงกว่า fraction A (ตารางที่ 3.7) ดังนั้นจึงเก็บตัวอย่างจาก fraction B ไปทำบริสุทธิ์ต่อด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography พบว่า สามารถแยกเปปไทด์ตามขนาดได้ 3 กลุ่ม คือ fraction B1, B2 และ B3 (รูปที่ 3.14b) ซึ่ง fraction B3 มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS (0.487 ± 0.061 มิลลิโมลาร์ Trolox) และให้อิเล็กตรอนกับเหล็กเฟอริก (113.398 ± 7.051 ไมโครโมลาร์ Trolox) สูงที่สุด ในขณะที่ fraction B2 มีความสามารถในการจับกับเหล็กเฟอริก (0.687 ± 0.032 มิลลิโมลาร์ EDTA) และอนุมูลไฮดร็อกซิล ($77.2 \pm 0.8\%$) สูงที่สุด (ตารางที่ 3.8) เนื่องจาก fraction B3 ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน (Y) ซึ่งมีความสามารถในการให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ ส่วน fraction B2 ประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนกลูตามิก (E) ซึ่งมีความสามารถในการจับกับโลหะ (ตารางที่ 3.9)



รูปที่ 3.14 การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Anion exchange chromatography (a) ของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ผลิตจากโครงกระดูก ก้างและหนังปลาทรายแดง ที่ย่อยด้วยโปรตีนจาก *Virgibacillus* sp. SK33 นาน 8 ชั่วโมง และ การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค Size exclusion chromatography (b) ของตัวอย่างหลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Anion exchange chromatography

ตารางที่ 3.7 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระและผลผลิตของโปรตีนไฮโดรไลสจากกระดูก ก้าง และเศษหนังปลาทรายแดงและตัวอย่างหลังแยกด้วย คอลัมน์ DEAE-Sephacel

ตัวอย่าง	ความสามารถในการจับกับ	ความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับ	ผลผลิต (%)
	อนุมูล ABTS (mM Trolox)	เหล็กเฟอร์ริก (μM Trolox)	
โปรตีนไฮโดรไลส	0.214 \pm 0.002 ^a	14.993 \pm 0.324 ^b	100
เพปไทด์ที่ไม่เกาะกับคอลัมน์ (Fraction A)	0.329 \pm 0.002 ^b	5.926 \pm 0.06 ^a	30
เพปไทด์ที่เกาะกับคอลัมน์ (Fraction B)	0.617 \pm 0.008 ^c	37.447 \pm 4.377 ^c	31

Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm S.D.

ตารางที่ 3.8 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลสจากกระดูก ก้าง และเศษหนังปลาทรายแดงที่ผ่านการแยกด้วยคอลัมน์ Superdex 30 prep size exclusion และผลผลิตที่ได้

๔

ตัวอย่าง	ความสามารถในการจับกับ	ความสามารถในการให้	ความสามารถในการจับกับ	ความสามารถในการจับกับ	ผลผลิต (%)
	อนุมูล	อิเล็กตรอนกับเหล็กเฟอร์ริก	เหล็กเฟอร์รัส	อนุมูลไฮดรอกซิล (%)	
	ABTS (mM Trolox)	(μM Trolox)	(mM EDTA)		
เพปไทด์ B1	0.090 \pm 0.006 ^a	9.255 \pm 0.113 ^a	0.185 \pm 0.007 ^a	0 ^a	6
เพปไทด์ B2	0.154 \pm 0.004 ^a	7.536 \pm 1.897 ^a	0.687 \pm 0.032 ^c	77.2 \pm 0.8 ^c	13
เพปไทด์ B3	0.487 \pm 0.061 ^b	113.398 \pm 7.051 ^b	0.307 \pm 0.051 ^b	55.3 \pm 5.2 ^b	50

ผลผลิตเทียบกับปริมาณเพปไทด์ก่อนฉีดเข้าคอลัมน์ Superdex 30 prep size exclusion; Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$). Values are expressed as mean \pm S.D.

3.3.1.2 ลำดับกรดอะมิโนวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

นำตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากก้าง กระดูกและเศษหนังปลาทรายแดงที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography ไปหาลำดับกรดอะมิโนโดยเทคนิค Tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อที่จะอธิบาย mode of action ของเพปไทด์ ซึ่งพบว่า กรดอะมิโนลูซีน (L) ไลซีน (K) และอาร์จินีน (R) เป็นองค์ประกอบหลักของทั้ง 3 fractions กรดอะมิโนกลูตามิก (E) เป็นกรดอะมิโนที่เด่นใน fractions B1 และ B2 กรดอะมิโนไทโรซีน (Y) และ ทริปโตเฟน (W) พบในทั้ง fractions B1 และ B2 ในขณะที่ fraction B3 ประกอบด้วยกรดอะมิโนกลูตามิก (E) ต่ำ แต่มีปริมาณกรดอะมิโนไทโรซีน (Y) สูงกว่า fractions B1 และ B2 (ตารางที่ 3.9) ซึ่งกรดอะมิโนทริปโตเฟน (W) และไทโรซีน (Y) มีความสามารถให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูลอิสระได้ (Hernández-Ledesma, Davalos, Bartolome, and Amigo, 2005) กรดอะมิโนอาร์จินีน (D) กลูตามิก (E) และไลซีน (K) มีความสามารถในการจับกับโลหะได้ (Saiga et al., 2003)

3.3.1.3 สมบัติเพปไทด์สังเคราะห์จาก fraction B3

เนื่องจาก fraction B3 มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและมีปริมาณผลผลิตสูงสุด ดังนั้นจึงสังเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนของ fraction B3 และทดสอบคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระโดยวัดความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS โดยพบว่า มีเพียงเพปไทด์ P4 (FLGSFLYEYSR) ที่มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อผสมเพปไทด์แต่ละชิ้นที่ความเข้มข้นของเพปไทด์สุดท้าย 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเพปไทด์แต่ละชิ้นไม่มีการเสริมฤทธิ์กัน (ตารางที่ 3.10) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์ P4 (FLGSFLYEYSR) เนื่องจากกรดอะมิโนไทโรซีน (Y) ในลำดับเพปไทด์ ซึ่งสามารถให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนกับอนุมูล ABTS ได้ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเพปไทด์ FLGSFLYEYSR เป็นเพปไทด์สำคัญซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระใน fraction B3

ตารางที่ 3.9 ลำดับกรดอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลสที่ผ่านการแยกด้วยเทคนิค Size exclusion chromatography จากการศึกษาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS/MS

Fraction	No.	Amino acid sequence	Fraction	No.	Amino acid sequence	Fraction	No.	Amino acid sequence
B1	1	LDDEFDLSLH	B2	1	ALGDQRTFFLNSMVLEEHC	B3	1	VELLVPK
	2	VEDEFDLSLH		2	LAGDQRTFFLNSMVLEEHC		2	AGNQVLNLQADLPK
	3	FSLDDEFDLSLH		3	LEDEEHPGSAELT		3	LGTGTDL
	4	LDEESTLAGAHE		4	ELEELAQGPVYQA		4	FLGSFLYEYSR
	5	VEEESTLAGAHE		5	PTRRYITLFLVFLKRLLLGLFRLLLFYAYKGMF		5	NTFLFFK
	6	HELFAASRTLFLNRLDDLGH		6	AVLWCQRGFLEEDELKLF			
	7	LRFSLHCLR		7	ELELEEELEAQLW			
	8	FGLEFHCLKLF		8	GNMNMKELW			
	9	GFLEFCHLKL		9	LEELEEELEGWL			
	10	LQLVEEWHKNWVF		10	LEELEEELEGLW			
	11	ASLEEAEGTLEHEAKLLR		11	NCAQMEKLW			
	12	TLDDVLQTRDALCPHQ		12	WNDDMTRLW			
	13	TGANPDLTEQLWTGKSLELHE		13	ASLEEAELLDQFFCLQL			
	14	ELFNLGEAEDLGGRYLA		14	GLLDELFCGLGEEEEELKLF			
	15	FSGDQLEDYTTTTV		15	LGLDELFCGLGEEEEELKLF			
	16	FSGDQLEDYVAWF		16	VALDELFCGLGEEEEELKLF			
	17	KTRWNEDELYALQKK		17	FGLEEEELFLK			
	18	LEQVWYLFNQSRYLE		18	ALGDQRTFFLNSMVLEEHC			
	19	LYNQDLAEPRCFTM		19	LAGDQRTFFLNSMVLEEHC			
	20	LEDSLRTDELYAQ		20	LEDEEHPGSAELT			
	21	LTRSDLEDELYAQLK		21	ELEELAQGPVYQA			
	22	NPELEELSFLYAQ						
	23	NPELEELSFLYAAG						
	24	NPYVMEFNLDKYFE						
	25	PNYVMEFNLDQLYY						
	26	QVQQELYQWRFELEMLRQGMV						
	27	SALEEAEGTLVGLFRYQEL						
	28	TLNQDLAEPRCFTM						
	29	TLRDSLEDELYAQ						
	30	EELRALEEELEAWQL						
	31	ERDLLDRWLFLEVWMELE						
	32	EELARLEEELEAWQL						
	33	GVDNLVFEWMDLLE						
	34	LEELEEELEALWQ						
	35	RWNWRELRFLFEEVWMLE						
	36	AERAAFLEEELEKMR						
	37	FSGDQLEDLAGMFF						
	38	GAEQLDMTTSDLELPPGT						
	39	KLEDMLQLEAEGGCKLE						
	40	LVEEELDVGAQKLMF						
	41	ARLEEELEEELEACKPV						
	42	ELEEELEAKPVC						
	43	LEELEEELEAKCPVE						

ตาราง 3.10 ความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS (mM Trolox) ของเปปไทด์สังเคราะห์แต่ละชิ้น และเปปไทด์ผสมที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จากส่วน B3 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

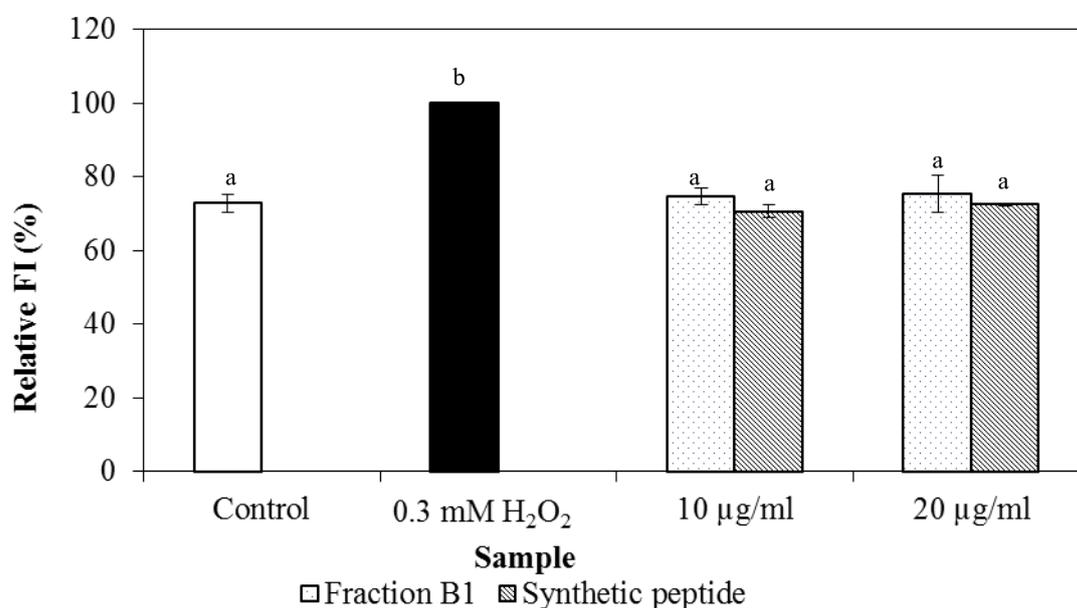
Peptide	ABTS radical scavenging activity (mM Trolox)
P1	0 ^a
P1+P2	0 ^a
P1+P3	0.015±0.015 ^a
P1+P2+P3	0.005±0.000 ^a
P1+P2+P4	2.140±0.024 ^c
P1+P2+P3+P4	1.962±0.021 ^b
P2	0 ^a
P2+P3	0 ^a
P2+P4	2.287±0.029 ^d
P2+P3+P4	2.146±0.005 ^c
P3	0 ^a
P3+P4	2.281±0.011 ^d
P1+P4	2.290±0.003 ^d
P1+P3+P4	2.125±0.019 ^c
P4	2.448±0.003 ^c
P5	0 ^a

หมายเหตุ P1 คือ VELLVPK P2 คือ AGNQVLNLQADLPK P3 คือ LGTGTDL P4 คือ FLGSFLYEYSR และ P5 คือ NTFLFFK; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.3.1.4 สมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพ

เนื่องจาก fraction B2 และ B3 มีการปนเปื้อนของเกลือโซเดียมคลอไรด์ จาก anion exchange chromatography อยู่ในปริมาณมาก ซึ่งเกลืออาจจะมึผลรบกวนต่อการศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระทางชีวภาพ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือก fraction B1 และเปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จาก fraction B3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์ จากการทดลองพบว่าเมื่อเติมเฉพาะ

ไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ลงในเซลล์ HepG2 ทำให้ DCF fluorescence intensity เพิ่มขึ้นประมาณ 1.2 เท่า เทียบกับตัวอย่างเซลล์ HepG2 ที่ไม่เติมไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ (control) เมื่อเติม fraction B1 และเปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการเติมไฮโดรเจนไฮดรอกไซด์ พบว่าค่า DCF fluorescence intensity ลดลง อย่างไรก็ตาม ค่า DCF fluorescence intensity ไม่มีความแตกต่างระหว่างตัวอย่าง fraction B1 และเปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ความเข้มข้น 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรจากการทดลองนี้บ่งชี้ว่า ตัวอย่าง fraction B1 และ เปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จากส่วน B3 มีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HepG2



รูปที่ 3.15 ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HepG2 ของตัวอย่าง fraction B1 และเปปไทด์สังเคราะห์ FLGSFLYEYSR ที่ความเข้มข้นของเปปไทด์ 10 และ 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$)

บทที่ 4
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปและข้อเสนอแนะ

วัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมอาหารทะเลได้แก่ น้ำล้างจากกระบวนการผลิตซูริมี ก้าง และ เศษกระดูก รวมถึงหนังปลาจากปลาน้ำจืด เป็นแหล่งของโปรตีนและเปปไทด์ที่มีประโยชน์ โดยน้ำล้างเนื้อปลาไนมีโปรตีนสเตลฟา-1 ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้สูง เป็นไกลโคโปรตีนที่มีขนาด 44 และ 50 กิโลดาลตัน มีความสามารถยับยั้งการเสื่อมสลายโดยโปรตีนของเจลของซูริมีปลาตาหวาน ดังนั้นจึงอาจใช้เป็นสารยับยั้งโปรตีนเอสในซูริมีเพื่อปรับปรุงคุณสมบัติของเจลได้ นอกจากนี้คอลลาเจนไฮโดรไลเสทของหนังปลานิลและปลาคุกกี้ก็ยังมีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ Angiotensin converting enzyme (ACE) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดความดันโลหิตสูง โดยคอลลาเจนไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากเอนไซม์เพปซินมีความสามารถในการยับยั้ง ACE สูงสุด โดยไฮโดรไลเสทของคอลลาเจนจากปลาคุกกี้ก็แสดงความสามารถในการยับยั้งสูงกว่าปลานิล กิจกรรมการยับยั้ง ACE ของคอลลาเจนไฮโดรไลเสทจากปลาคุกกี้ที่ข่อยด้วยเพปซินเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ 4 ชั่วโมงแรกของการข่อย เปปไทด์ที่ผ่านเยื่อกรองขนาด 5 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้ง ACE ได้สูงสุด โดยมีค่าการยับยั้ง (IC_{50}) 9.01 ± 0.04 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซิน)/มิลลิลิตร และเมื่อนำมาผ่านการทำบริสุทธิ์และหาลำดับกรดอะมิโนพบว่า กรดอะมิโนส่วนใหญ่ที่พบในเปปไทด์คือ Leu, Arg, Phe และ Asn บริเวณปลายสายด้านคาร์บอกซิล (C-terminal) ส่วนมากเป็นกรดอะมิโน Arg ในขณะที่ปลายสายด้านอะมิโน (N-terminal) ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนสายตรง แสดงถึงแนวโน้มของการใช้เป็นอาหารเสริมสุขภาพที่ช่วยควบคุมความดันโลหิต

สำหรับเปปไทด์จาก กระดูก ก้างและเศษหนังปลาทรายแดงที่ผ่านการข่อยด้วยเอนไซม์จาก *Virgibacillus* sp. SK33 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน fraction B3 มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS และความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับเหล็กเฟอริกสูงที่สุด ในขณะที่ fraction B2 มีความสามารถในการจับกับเหล็กเฟอรัสและอนุมูลไฮดรอกซิลสูงที่สุด ถึงแม้ fraction B1 จะมีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งทดสอบด้วยวิธีทางเคมีต่ำ แต่ fraction B1 และ เปปไทด์สังเคราะห์ (FLGSFLYEYSR) ที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเปปไทด์จาก fraction B3 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HepG2 ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ก้าง กระดูก และเศษหนังมีศักยภาพเป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิตเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และอาจใช้เป็นผลิตภัณฑ์โภชนเภสัช (Nutraceutical) ได้

บรรณานุกรม

- จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล. (2546). การทำบริสุทธิ์และคุณลักษณะทางชีวเคมีของทรานสกลูทามิเนสจากปลาไน. รายงานการวิจัย ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ.
- Aranishi, F. (1999). Purification and Characterization of α 1-proteinase inhibitor from carp (*Cyprinus carpio*) serum. **Marine Biotechnology**. 1: 33–43.
- Atkinson, A. B. and Rovertson, J. (1979). Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. **Lancet**. 2: 836-839.
- Bamdad, F., Wu, J., and Chen, L. (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. **Journal of Cereal Science**. 54: 20-28.
- Barbosa-Filho, J. M., Valeska, K. M., and Rabelo, L. A. (2006). Natural products inhibitors of the angiotensin converting enzyme (ACE): A review between 1980–2000. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16: 421–446.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., and Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. **Process Biochemistry**. 45: 18-24.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., and Guillochon, D. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinellaaurita*) by-products proteins. **Food Chemistry**. 118: 559-565.
- Brew K. (2003). Structural of human ACE gives new insights into inhibitor bining and design. Trends in Pharmacological Sciences. 24: 391-394.
- Busconi, L., Fob, E. J., Martone, C., Trucco, R. E., and Sgnchez, J. J. (1984). Identification of two alkaline proteases and a trypsin inhibitor from muscle of white croaker (*Micropogon opercularis*). **FEBS Letters**. 176: 211-214.
- Byun, H. G., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J. K., and Kim, S. K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. **Process Biochemistry**. 44: 842-846.
- Cao, M. J., Osatomi, K., Matsuda, R., Ohkubo, M., Hara, K., and Ishihara, T. (2000). Purification of a novel serine proteinase inhibitor from the skeletal muscle of white croaker

- (*Argyrosomus argentatus*). **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 272: 485-489.
- Carrell, R. W., Jeppsson, J. O., Laurell, C. B., Brennan, S. O., Owen, M. C., Vaughan L., and Boswell, D. R. (1982). Structure and variation of human alpha 1-antitrypsin. **Nature**. 298: 329-334.
- Chang, Y. S., Weng, J. W., Li, C. C., and Huang, F. L. (1998). Identification of cystatin as a component of carp chorion. **Molecular Reproduction and Development**. 51: 430-435.
- Chen, H. M., Muramoto, K., and Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -Conglycinin. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 43: 574-578.
- Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., and 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.
- Chen, N., Yang, H., Sun, Y., Niu, J. and Liu, S. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from walnut (*Juglans regia* L.) protein hydrolysates. **Peptides**. 38: 344-349.
- Cheung, H. S., Wang, F. L., Ondetti. M. A., Sabo. E. F., and Cushman D. W. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. **The Journal of Biological Chemistry**. 255: 401-407.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., and Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs? **Peptides**. 29: 1062-1071.
- Chuang, W. H., Liu, P. C., and Lee, K. K. (2008). Purification and characterization of an alpha-2 macroglobulin protease inhibitor from plasma of the grouper *Epinephelus coioides*. **Aquaculture**. 284: 239-245.
- Cushman, D. W. and Cheung, H. S. (1971). Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. **Biochemical Pharmacology**. 20: 1637-1648.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., and Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. **Food Chemistry**. 109: 144-148.

- Di Bernardini, R., Rai, D. K., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., and Mullen, A. M. (2011). Isolation, purification and characterization of antioxidant peptidic fractions from a bovine liver sarcoplasmic protein thermolysin hydrolyzate. **Peptides**. 32: 388-400.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., and Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). **Food Chemistry**. 107: 1485-1493.
- Doucet, D., Otter, D. E., Gauthier, S. F., and 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.
- Ellis, A. E. (1987). Inhibition of the *Aeromonas salmonicida* extracellular proteases by α_2 -macroglobulin in the serum of rainbow trout. **Microbial Pathogenesis**. 3: 167-177.
- Eriksson, U., Danilczyk, U., and Penninger, J. M. (2002). Just the beginning: Novel functions for Angiotensin-converting enzymes. **Current Biology**. 12: 745-752.
- FAO, Global Production Statistics, Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2013). [Online]. Available: <http://www.fao.org/fishery/species/2957/en>
- FitzGerald, R. J., Murray, B. A., and Walsh, D. J. (2004). The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. **American Society for Nutritional Sciences**. 134: 980-988.
- Freedman, S. J. (1991). The role of alpha 2-macroglobulin in furunculosis: a comparison of rainbow trout and brook trout. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. 98: 549-553.
- Funkenstein, B., Rebhan, Y., Dyman, A., and Radaelli, G., (2005). Alpha2-macroglobulin in the marine fish *Sparus aurata*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**. 141: 440-449.
- Gómez-Ruiz, J. Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., and Recio, I. (2008). Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **European Food Research and Technology**. 227: 1061-1067.
- Guenneuges, P. (2004). Surimi market world resource-supply and demand. Presented at the 4th surimi industry forum. April 11-15, 2004, Astoria, OR.

- Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., and Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna *Thunnus albacores* wastes using Alcalase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 11: 1051-1059.
- Guzdek, A., Potempa, J., Dubin, A., and Travis, J. (1990). Comparative properties of human alpha-1-proteinase inhibitor glycosylation variants. **FEBS Letters**. 272: 125-127.
- Hara, K., and Ishihara, T. (1987). Purification and characterization of serine proteinase inhibitor from carp *Cyprinus carpio* ordinary muscle. **Agricultural Biology and Chemistry**. 51: 153-159.
- Hernández-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B., and Amigo, L. (2005). Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from α -lactalbumin and β -lactoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 588-593.
- Hogan, S., Zhang, L., Li, J., Wang, H., and Zhou, K. (2009). Development of antioxidant rich peptides from milk protein by microbial proteases and analysis of their effects on lipid peroxidation in cooked beef. **Food Chemistry**. 117: 438-443.
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., and Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: A novel alternative to drugs. **Peptides**. 29: 1062-1071.
- Hsu, K. C. (2010). Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. **Food Chemistry**. 122: 42-48.
- Huang, C. J., Chen, C. C., Chen, H. J., Huang, F. L., and Chang, G. D. (1995). A protease inhibitor of the serpin family is a major protein in carp perimeningeal fluid: I. Protein purification and characterization. **Journal of Neuroendocrinology**. 64: 1715-1720.
- Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. **Food Chemistry**. 121: 178-184.
- Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., and Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. **Food Research International**. 42: 1266-1272.
- Je, J. Y., Park, P. J., and Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. **Food Research International**. 38: 45-50.

- Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., and Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. **Process Biochemistry**. 42: 840-846.
- Je, J. Y., Qian, Z. J., Lee, S. H., Byun, H. G., and Kim, S. K. (2008). Purification and antioxidant properties of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. **Journal of Medicinal Food**. 11: 629-637.
- Jeon, Y. J., Byun, H. G., and Kim, S. K. (1999). Improvement of functional properties of codframe protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. **Process Biochemistry**. 35: 471-478.
- Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., and Kim, S. K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. **European Food Research and Technology**. 219: 20-26.
- Jung, W. K., Rajapakse, N., and Kim, S.K. (2005). Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. **European Food Research and Technology**. 220: 535-539.
- Imayasu, S., Kawato, A., Saito, Y., and Nakamura, K.W. (1994). Structure and activity of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from sake and sake lees. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**. 10: 1767-1771.
- Kang, K. T., Kim, H. J., Kim, J. S., Park, C. H., and Park, J. W. (2009). Fractionation and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of gelatin hydrolysates from by-products of Alaska pollock surimi. **Fisheries and Aquatic Sciences**. 12: 79-85.
- Khantaphant, S. and Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**. 151: 410-419.
- Kim, S. Y., Je, J. Y., and Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. **Journal of Nutritional Biochemistry**. 18: 31-38.
- Kim, S. K., Kim, Y. T., Byun, H. G., Nam, K. S., Joo, D. S., and Shahidi, F. (2001). Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 1984-1989.
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K. D., and Shahidi, F. (2008). Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from

- Alcalase and Flavourzyme. **International Journal of Food Science and Technology**. 43: 1019-1026.
- Kong, B. H. and Xiong, Y. L. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 6059-6068.
- Kovács, G., Peti-Peterdi, J., Rosivall, L., and Darwin Bell, P. (2002). Angiotensin II directly stimulates macula densa Na-2Cl-K cotransport via apical AT1 receptors. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**. 282: 301-306.
- Kudo, K., Onodera, S., Takeda, Y., Benkeblia, N., and Shiomi, N. (2009). Antioxidative activities of some peptides isolated from hydrolyzed potato protein extract. **Journal of Functional Foods**. 1: 170-176.
- Lee, S. H., Qian, Z. J., and Kim, S. K. (2009). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. **Food Chemistry**. 118: 96-102.
- Lee, J. K., Jeon, J. K., and Byun, H. G. (2011). Effect of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide purified from skate skin hydrolysate. **Food Chemistry**. 125: 495-499.
- Li, C. M., Zhong, Z. H., Wan, Q. H., Zhao, H., Gu, H. F., and Xiong, S. B. (2008). Preparation and thermal stability of collagen from scales of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). **European Food Research and Technology**. 227: 1467-1473.
- Li, D. K., Lin, H., and Kim, S. M. (2008). Purification and characterization of a cysteine protease inhibitor from chum salmon (*Oncorhynchus keta*) plasma. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 106-111.
- Li, F. L. and Lu, C. P. (2006). Purification and characterization of α_2 -macroglobulin from grass carp *Ctenopharyngodon idellus*: Cloning a segment of the corresponding gene. **Fish & Shellfish Immunology**. 20: 474-481.
- Liaset, B., Julshamn, K., and Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with ProtamexTM. **Process Biochemistry**. 38: 1747-1759.
- Lin, L. and Li, B. F. (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: 2290-2295.

- Lin, T. M., Park, J. W., and Morrissey, M. T. (1995). Recovered protein and reconditioned water from surimi processing waste. **Journal of Food Science**. 50: 4-9.
- Liu, Q., Kong, B., Jiang, L., Cui, X., and Liu, J. (2009). Free radical scavenging activity of porcine plasma protein hydrolysates determined by electron spin resonance spectrometer. **LWT - Food Science and Technology**. 42: 956-962.
- Liu, J. H., Tian, Y. G., Wang, Y., Nie, S. P., Xie, M. Y., and Zhu, S. (2011). Characterization and in vitro antioxidation of papain hydrolysate from black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson) muscle and its fractions. **Food Research International**. 44: 133-138.
- Mak, M., Mak, P., Olczak, M., Szalewicz, A., Glogowski, J., Dubin, A., Watorek, W., and Ciereszko, A. (2004). Isolation, characterization, and cDNA sequencing of alpha-1-antiproteinase-like protein from rainbow trout seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1671: 93-105.
- Mallikarjun Gouda, K. G., Gowda, L. R., Rao, A. G. A. and Prakash, V. (2006). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from glycinin, the 11S globulin of soybean (*Glycine max*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 4568-4573.
- Martone, C. B., Busconi, L., Folco, E., and Sa´nchez, J. J. (1991). Detection of a trypsin-like serine protease and its endogenous inhibitor in hake skeletal muscle. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 289: 1-5.
- Matsu, T., Matsufuji, H., Seki, E., Osajima, K., Nakashima, M., and Osajima, Y. (1993). Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by *Bacillus licheniformis* alkaline protease hydrolysates derived from sadine muscle. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**. 57: 922-925.
- Meisel, H. (2005). Biochemical properties of peptides encrypted in bovine proteins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. 12: 1905-1919.
- Meisel, H., Goepfert, A., and Gunther, S. (1997). ACE-inhibitory activities in milk products. **Milchwiss**. 52: 307-311.
- Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh A., and Chamani J. (2012). A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *The Journal of Functional Foods*. 4: 278-286.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., and Kim, S. K. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. **Life Sciences**. 77: 2166-2178.

- Mickowska, B. (2009). Purification and characterization of alpha (1)-proteinase inhibitor and antithrombin III: major serpins of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and carp (*Cyprinus carpio*) blood plasma. **Fish Physiology and Biochemistry**. 35: 231-240.
- Morioka, K. and Shimizu, Y. (1990). Contribution of sarcoplasmic proteins to gel formation of fish meat. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 56: 929-933.
- Morioka, K. and Shimizu, Y. (1993). Relationship between the heat-gelling property and composition of fish sarcoplasmic proteins. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 56: 929-933.
- Morrissey, M. T., Lin, J., and Ismond, A. (2005). Waste management and by-product utilization. In J. W. Park, **Surimi and surimi seafood** (pp. 281-316). Florida: CRC Press.
- Motoi, H. and Kodama, T. (2003). Isolation and characterization of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides from wheat gliadin hydrolysate. **Food/Nahrung**. 47: 354-358.
- Moure, A., Domínguez, H., and Parajó, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. **Process Biochemistry**. 41: 447-456.
- Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., FitzGerald, R. J., Donnelly, W. J., and Dalton, J. P. (1994). Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42: 2973-2981.
- Nagashima, Y., Takeda, M., Ohta, I., Shimakura, K., and Shiomi, K. (2004). Purification and properties of proteinaceous trypsin inhibitors in the skin mucus of pufferfish *Takifugu pardalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 138:103-110.
- Nakamura, S., Ogawa, M., and Nakai, S. 1998. Effects of polymannosylation of recombinant cystatin C in yeast on its stability and activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46: 2882-2887.
- Nakamura, S., Takasaki, H., Kobayashi, K., and Kato, A. (1993). Hyperglycosylation of hen egg white lysozyme in yeast. **Journal of Biological Chemistry**. 268: 12706-12712.
- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2000). Amino acids, peptides and proteins. D. L. Nelson and M. M. Cox (Eds.) **Lehninger principles of Biochemistry**, Worth Publishers, New York (2000), pp. 115-120.

- Ngo, D. H., Qian, Z. J., Ryu, B., Park, J. W., and 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.
- Nurhayati, T., Rusyadi, S., Suwandi, R., and Nugraha, R. (2013). Purification and characterization of a cathepsin inhibitor from catfish (*Pangasius* sp.) of Indonesian water. **International Food Research Journal**. 20: 941-946.
- Park, P. J., Jung, W. K., Nam, K. S., Shahidi, F., and Kim, S. K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 78: 651-656.
- Patterson, S. D. (1991). Mammalian alpha 1-antitrypsins: comparative biochemistry and genetics of the major plasma serpin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 100: 439-454.
- Peña-Ramos, E. A. and Xiong, Y. (2001). Antioxidative activity of whey protein hydrolysates in a liposomal system. **Journal of dairy science**. 84:2577-2583.
- Piyadhamviboon, P., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 90: 291-298.
- Qian, Z. J., Jung, W.K., Byun, H. G., and Kim, S. K. (2008a). Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. **Bioresource Technology**. 99: 3365-3371.
- Qian, Z. L., Jung, W. K., and Kim, S. K. (2008b). Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresource Technology**. 99: 1690-1698.
- Okazaki, E., Kanna, K., and Suzuki, T. (1986). Effect of sarcoplasmic protein on rheological properties of fish meat gel formed by retort heating. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 52: 1821-1827.
- Ondetti, M. A., Rubin, B., and Cushman, D. W. (1977). Design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme: new class of orally active antihypertensive agents. **Science**. 196: 441-444.
- Osca, A. C. (2005). Novel mechanism of action of ACE and its inhibitors. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. 289: 1798-1797.

- Philanto, L. (2000). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ace-inhibitory. **Trends in Food Science and Technology**. 11: 347-356.
- Raghavan, S., Kristinsson, H. G., and Leeuwenburgh, C. (2008). Radical Scavenging and Reducing Ability of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Protein Hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 56: 10359-10367.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., and Kim, S. K. (2005a). 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.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., and Kim, S. K. (2005b). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. **Food Research International**. 38: 175-182.
- Ranathunga, S., Rajapakse, N., and 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.
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., and Cui, C. (2008). Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. **Food Chemistry**. 108: 727-736.
- Robyt, J. F. and B. J. White (1987). **Biochemical Techniques Theory and Practics**. Brooks/Cole Publishing Co., CA., USA., pp: 120.
- Rival, S. G., Boeriu, C. G., and Wichers, H. J. (2001). Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 49: 295-302.
- Saiga, A., Okumura, T., Makihara, T., Katsuda, S., Morimatsu, F., and Nishimura, T. (2006). Action mechanism of an angiotensin I-converting inhibitory peptide derived from chicken breast muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54: 942-945.
- Saiga, A., Iwai, K., Hayakawa, T., Takahata, Y., Kitamura, S., Nishimura, T., and Morimatsu, F. (2008) Angiotensin I-converitng enzyme –inhibitory peptides obtained from chicken collagen hydrolysate. **Agricultural Food Chemistry**. 56: 9568-9591.
- Saiga, A., Tanabe, S., and Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51: 3661–3667.

- Sakanaka, S. and Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. **Food Chemistry**. 95: 243-249.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., and Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. **Food Chemistry**. 86: 99-103.
- Sangorrín, M. P., Folco, E. J., Martone, C. M., and Sánchez, J. J. (2001). Purification and characterization of a proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 33: 691-699.
- Samaranayaka, A. G. P., Kitts, D. D., and Li-Chan, E. C. Y. (2010). Antioxidative and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory potential of a Pacific Hake (*Merluccius productus*) fish protein hydrolysate subjected to simulated gastrointestinal digestion and Caco-2 Cell permeation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 58: 1535-1542.
- Samaranayaka, A. G. P., and Li-Chan, E. C. Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. **Journal of Functional Foods**. 3: 229-254.
- Sampath Kumar, N. S., Nazeer, R. A., and Jaiganesh, R. (2011). Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. **Peptides**. 32: 1496-1501.
- Sarmadi, B. H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**. 31: 1949-1956.
- Savoie, L. Gauthier, S. F. Marin, J., and Pouliot, Y. (2005). *In vitro* determination of the release kinetics of peptides and free amino acids during the digestion of food proteins. **Journal of AOAC International**. 88: 935-948.
- Sheih, I. C., Wu, T. K., and Fang, T. J. (2009a). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. **Bioresource Technology**. 100: 3419-3425.
- Sica, M. D. and Domenic, A. (2003). Combination angiotensin-converting enzyme inhibitor and angiotensin receptor blocker therapy: its role in clinical practice. **Journal of Clinical Hypertension**. 5: 414-420.

- Simpson, B. K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In N. M., Haard, and B. K. Simpson, (Eds.), **Seafood enzymes: Utilization and influence on postharvest seafood quality**, (pp. 531–540), New York, Marcel Dekker.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Process Biochemistry**. 43:185-192.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chemistry**. 119: 573-579.
- Siriangkanakun, S. and Yongsawatdigul, J. (2012). Trypsin inhibitory activity and gel-enhancing effect of sarcoplasmic proteins from common carp. **The Journal of Food Science**. 77: C1124-C1130.
- Starkey, P. M. and Barrett, A. J. (1982). Evolution of α_2 -macroglobulin. The structure of a protein homologous with human α_2 -macroglobulin from plaice (*Pleuronectes platessa* L.) plasma. **Biochemical Journal**. 205: 105-115.
- Sturrock, E. D., Natesh, R., Van Rooyen, J. M., and Acharya, K. R. (2004). Structure of Angiotensin I-converting enzyme. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 61: 2677-2686.
- Sun, L. C., Zhou, L. G., Du, C. H., Cai, Q. F., Hara, K., Su, W. J., and Cao, M. J. (2009). Glucose-6-phosphate isomerase is an endogenous inhibitor to myofibril-bound serine proteinase of crucian carp (*Carassius auratus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 57: 5549-5555.
- Sungperm, P. 2012. **Physico-chemical properties and angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides of collagen prepared from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) and hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *C. gariepinus*) skin**. M. S. Thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.
- Swaan, P. W., Stehouwer, M. C. and Tukker, J. J. (1995). Molecular mechanism for the relative binding affinity to the intestinal peptide carrier. Comparison of three ACE inhibitors: enalapril, enalaprilat, and lisinopril. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1236: 31-38
- Tang, C. H., Peng, J., Zhen, D. W., and Chen, Z. (2009). Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) protein hydrolysates. **Food Chemistry**. 115: 672-678.

- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of proteinhydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. **Journal of Food Biochemistry**. 31: 266-287.
- Tironi, V. A. and Anón, M. C. (2010). Amaranth proteins as a source of antioxidant peptides: Effect of proteolysis. **Food Research International**. 43: 315-322.
- Toyohara, H., Makinodan, Y., Tanaka, K., and Ikeda, S. (1983). Detection of calpastatin and a trypsin inhibitor in carp muscle. **Agricultural Biology and Chemistry**. 47:1151-1154.
- Tsai, Y. J., Chang, G. D., Huang, C. J., Chang, Y. S., Huang, F. L. (1996). Purification and molecular cloning of carp ovarian cystatin. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. 113: 573-580.
- Ustadi, Kim, K. Y., and Kim, S. M. (2005). Comparative study on the protease inhibitors from fish eggs. **Journal of Ocean University of China**. 4: 198-204.
- van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. A., and Voragen, A.G. J. (2002). Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and-stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 2938-2946.
- Vermeirssen, V., Van Camp, J., and Verstraete, W. (2005). Fractionation of angiotensin I converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein in vitro gastrointestinal digests. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 85: 399-405.
- Wang, B., Li, L., Chi, C. F., Ma, J. H., Luo, H. Y. and Xu, Y. f. (2013). Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. **Food Chemistry**. 138: 1713-1719.
- Wojtczak, M., Całka, J., Glogowski, J., and Cierieszko, A. (2007). Isolation and characterization of alpha1-proteinase inhibitor from common carp (*Cyprinus carpio*) seminal plasma. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**. 148: 264-276.
- Worratao, A. and Yongsawatdigul, J. (2003). Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. **Journal of Food Biochemistry**. 27: 35-51.
- Wu, H. C., Chen, H. M., and 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, J. and Ding, X. (2002). Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. **Food Research International**. 35: 367–375.
- Yamada, Y., Sakamoto, S. I., and Seki, N. (1985). Two calpain inhibiting proteins (calpastatin) in carp skeletal muscle. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries**. 51: 1021-1028.
- Yamashita, M. and Konagaya, S. (1991). Cysteine protease inhibitor in egg of chum salmon. **Journal of Biochemistry**. 110: 762-766.
- Ylonen, A., Rinne, A., Herttuainen, J., Bogwald, J., Jarvinen, M., and Kalkkinen, N. (1999). Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) skin contains a novel kininogen and another cysteine proteinase inhibitor. **European Journal of Biochemistry**. 266: 1066-1072.
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., and Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**. 120: 810-816.
- Zhang, Y., Duan, X., and Zhuang, Y. (2012). Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. **Peptides**. 38: 13-21.
- Zhang, J. H., Zhang, H., Wang, L., Guo, X. N., Wang, X. G., and Yao, H. Y. (2010). Isolation and identification of antioxidative peptides from rice endosperm protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and MALDI-TOF/TOF MS/MS. **Food Chemistry**. 119: 226-234.
- Zhao, X. and Hou, Y. (2009). Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index of hydrolysates. **African Journal of Biotechnology**. 8: 3314-3319.
- Zheng, X. Q., Li, L. T., Liu, X. L., Wang, X. J., Lin, J., and Li, D. (2006). Production of hydrolysate with antioxidative activity by enzymatic hydrolysis of extruded corn gluten. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 73: 763-770.
- Zhou, D. Y., Zhu, B. W., Qiao, L., Wu, H. T., Li, D. M., Yang, J. F., and Murata, Y. (2012). *In vitro* antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (*Haliotis discushannai* Ino) viscera. **Food and Bioproducts Processing**. 90: 148-154.

Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. **Process Biochemistry**. 41: 1296-1302.

ประวัตินักวิจัย

- ชื่อ (ภาษาไทย) นาย จิรวัดน์ นามสกุล ยงสวัสดิกุล
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3101200691826
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-224-387
E-mail: jirawat@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับ	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
	ปริญญา					
2532	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์ บัณฑิต) เกียรติ นิยมนันดับ 2	เทคโนโลยี อาหาร	เทคโนโลยี อาหาร	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ปริญญาโท	M.S. (Master of Science)	Food Science	Food processing	University of Wisconsin-Madison	สหรัฐอเมริกา
2539	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	Food Science and Technology	Seafood chemistry	Oregon State University	สหรัฐอเมริกา

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
-Food proteins, Food enzymes
- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ
ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น
 - ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -
 - หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. Factors affecting histamine in fish sauce fermentation
2. Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species
3. Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation
4. Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) muscle proteins
5. Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)
6. Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)
7. Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi
8. Process development of fishball and fish sausage from freshwater fish species
9. Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products
10. Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases
11. Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF
12. Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.

7.2 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. 2013. Isolation and identification of antioxidtive peptides from hydrolysate of threadfin bream surimi processing byproduct. J. Functional Food. In press.
- Lapsongphon, N, Cadwallader, K.R., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2013. Characterization of protein hydrolysis and odor-active compounds of fish sauce inoculated with *Virgibacillus* sp. SK37 under reduced salt content. J. Agric. Food Chem. DOI: 10.1021/jf4014923
- Lapsongphon, N. and Yongsawatdigul, J. 2013. Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. Food Chem. 992-999.
- Lapsongphon, N., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. 2013. Spent Brewery Yeast Sludge as a Single Nitrogen Source for Fibrinolytic Enzyme Production of *Virgibacillus* sp. SK37. Food Science and Biotechnology. Food Sci. Biotechnol. 22(1): 71-78.
- Montriwong, A, Kaewphuak, S., Rodtong, S., Roytrakul S., Yongsawatdigul, J. 2012. Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochem. 47: 2379–2387
- Siriangkanakun, S. and Yongsawatdigul, J. 2012. Trypsin inhibitory activity and gel-enhancing effect of sarcoplasmic proteins from common carp. J. Food Sci. 77(10): 1124-1130

- Hemung, B, Benjakul, S., Yongsawatdigul, J. 2013. pH-dependent characteristics of gel-like emulsion stabilized by threadfin bream sarcoplasmic proteins. *Food Hydrocolloids* 30: 315-322.
- Sinsuwan, J. Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2012. Hydrolytic activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a starter culture of fish sauce fermentation, and its cell-bound proteinases. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 28: 2651-2659.
- Yongsawatdigul, J., Pivisan, S., Wongngam, W., Benjakul, S. 2012. Gelation characteristics of mince and washed mince from small scale mud carp and common carp. *Journal Aquatic Food Product Technology*. DOI:10.1080/10498850.2012.664251.
- Wiriyapan, A., Chitsomboon, B., Yongsawatdigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chem.*, 132, 104–111.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Choi, Y.J., Hua, Y., Yongsawatdigul, J. 2011. The use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. *J. Agric. Food Chem.* 59(15): 8401-08.
- Piyadhamviboon, P., Wongngam, W., Benjakul, S., Yongsawatdigul, J. 2011. Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates Prepared from Threadfin bream (*Nemipterus* spp.) Surimi By-products. *J. Aquat. Food Prod.* In press.
- Phrommao, E., Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Yamabhai M. 2011. A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37. *BMC Biotechnology*, 11:65.
- Sinsuwan, S, Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2011. Evidence of cell-associated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. *J. Food Sci.* 76:C413-419.
- Phrommao, E., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J., 2011. Identification of novel halotolerant bacillopeptidase-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. *J. Appl. Micro.* 1:191-201.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology* 141: 186–194.

- Tadpitchayangkoon, P., Park, J., Mayer, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Structural Changes and Dynamic Rheological Properties of Sarcoplasmic Proteins Subjected to pH-Shift Method. *J. Agric. Food Chem.* 58:4241-4249.
- Tadpitchayangkoon, P. Park, J.W., and Yongsawatdigul, J. 2010. Physicochemical and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. *Food Chem.* 121: 1046-1052.
- Yongsawatdigul, J. and Hemung, B. 2010. Structural changes and functional properties of threadfin bream sarcoplasmic proteins subjected to pH-shifting treatments and lyophilization. *J. Food Sci.* 75(3): C251-257.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2010. Purification and Characterization of a Salt-Activated and Organic Solvent-Stable Heterotrimer Proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 Isolated from Thai Fish Sauce. *J. Agric. Food Chem.* 58: 248-256.
- Piyadhamviboon, P., Yongsawatdigul, J. 2010. Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). *J. Sci Food Agric.* 90(2): 291-298.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2010. A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. *Food Chem.* 119:573-579.
- Tadpitchayangkoon, P. and Yongsawatdigul, J. 2009. Comparative study of washing treatments and alkali extraction on gelation characteristics of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) muscle protein. *J. Food Sci.* 74(3): C284-C291.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2009. Identification of glutaminyl sites on β -lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chem.* 115: 149-154.
- Piyadhamviboon, P. and Yongsawatdigul, J. 2009. Protein cross-linking ability of sarcoplasmic proteins extracted from threadfin bream. *LWT-Food Science and Technology.* 42(1): 37-43.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2008. Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminyl sites of peptides derived from threadfin bream myosin. *J. Agric. Food Chem.* 56(16): 7510-7516.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. 2008 Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. *Food Chem.* 111(2): 439-446.

- Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2008. Characterization of Ca^{2+} -activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. LWT-Food Sci Tech. 41: 2166-2174.
- Hemung, B and Yongsawatdigul, J. 2008 Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver. J. Food Biochem. 32:182-200.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2008. Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. Process Biochem. 43:185-192.
- Park, J.D., Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., Park, J.W. 2008. Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs. J. Food Sci. 73:C191-197.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Raksakulthai, N. 2007. Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. J. Food Sci. 72: M382-M390.
- Panpipat, V, Yongsawatdigul, J. 2008. Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish emulsion sausage. LWT-Food Sci Tech. 41:483-492.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. 2007. NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation J. Food Sci. 72:C264-C269.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. 2007. Gel enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. J. Sci Food Agric. 87:2810-2816.
- Yongsawatdigul, J., Sinsuwan, S. 2007. Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. Food Hydrocolloids. 21: 359-367.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2007. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. 101: 82-89.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2006. Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) during fish sauce fermentation. J Sci Food Agric. 86(12): 1970-1976.
- Yongsawatdigul, J., Piyadhamviboon, P., Singchan, K. 2006. Gel-forming ability of small scale mud carp unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities. Eur. Food Res. Technol. 223(6): 769-774.

- Sirighan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2006. Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Chem. 98(4): 678-684.
- Young, K., Yongsawatdigul, J., Park, J., Thawornchinsombat, S. 2005. Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. 29: 517-532.
- Hemung, B. and Yongsawatdigul, J. 2005. Ca²⁺ affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. Food Sci. 70:C455-460.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. 2005. Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. J. Sci Food Agric. 85(9): 1453-1460.
- Worratao, A. and Yongsawatdigul, J. 2005. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Chem. 93:651-658.
- Rodtong, S., Nawong, S, Yongsawatdigul, J. 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol. 22(5):475-482.
- Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2004. Effect of alkaline and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish proteins. J. Food Sci. 69(7):C499-505.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). J. Food Sci. 69(4):FCT312-319.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chem. 87: 447-455.
- Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chem. 83(3): 406-416.
- Worratao, A and Yongsawatdigul, J. 2003. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. J. Food Biochem. 27: 35-51.
- Yongsawatdigul, J., Worratao, A., and Park, J. 2002. Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. J. Food Sci. 67(9): 3258-3263.
- Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2002. Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. J. Food Sci. 67(3): 985-990.