

ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากสารสกัดรกแพะ

อรอนงค์ รักสวนจิกร¹, สมปอง คล้ายหนองสรวง², จริญญา หาญวงวงศ์³, วัชร คุณกิตติ^{4*}

¹ นักศึกษาปริญญาโท สาขาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

² Ph.D., รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

³ Ph.D., ผู้ช่วยศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

⁴ Ph.D., รองศาสตราจารย์, อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

* ติดต่อผู้ประพันธ์: วัชร คุณกิตติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002, email: watkhu@kku.ac.th

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลสจากสารสกัดรกแพะ

อรอนงค์ รักสวนจิกร¹, สมปอง คล้ายหนองสรวง², จริญญา หาญวงวงศ์³, วัชร คุณกิตติ^{4*}

ว. เภสัชศาสตร์อีสาน 2559; 12(3) : 61-71

รับบทความ : 6 มิถุนายน 2559

ตอบรับ : 11 สิงหาคม 2559

รกแพะเป็นแหล่งของสารอาหารที่อุดมไปด้วยโปรตีนและกรดอะมิโน มีรายงานการศึกษาพบว่าสายโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กอาจช่วยให้สารสกัดที่ได้ออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้มากขึ้น **วัตถุประสงค์:** เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบที่ได้จากการย่อยรกแพะในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ **วิธีการทดลอง:** ศึกษากระบวนการย่อยเพื่อลดขนาดของรกแพะโดยใช้เอนไซม์ปาเปน ตรวจสอบคุณสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลสดังนี้ หาปริมาณโปรตีนรวมโดยวิธี Bradford protein assay ตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลสโดยวิธี Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine-SDS PAGE) และศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี Free radical scavenging (DPPH), Inhibition of linoleic acid oxidation, Ferric reducing power และศึกษาฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนสโดยวิธี Mushroom tyrosinase inhibition **ผลการทดลอง:** %Yield ของโปรตีนไฮโดรไลสจากรกแพะได้เท่ากับ $18.31 \pm 0.42\%$ และมีปริมาณโปรตีนรวมเทียบเท่ากับ Bovine serum albumin $30.04 \pm 1.19\%$ w/w โปรตีนเปปไทด์ส่วนใหญ่ที่พบจะมีขนาดของโมเลกุลประมาณ 30 kDa การหาประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันพบว่าที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 6.25 mg/ml สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้สูงกว่าสารมาตรฐานวิตามินซีที่ความเข้มข้น 0.156 mg/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับ Vitamin E acetate ที่ความเข้มข้น 83.5 mg/ml แต่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้น้อยกว่า Trolox ที่ความเข้มข้น 0.156 mg/ml โปรตีนไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 1.5 mg/ml สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} เทียบเท่ากับ Trolox 15.74 mM ซึ่งน้อยกว่าสารมาตรฐาน vitamin C ที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml และโปรตีนไฮโดรไลส 1 mg/ml สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 84.94% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติเมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน Butylated hydroxytoluene (BHT), Trolox ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และสารมาตรฐาน Glutathione (GSH) ที่ 1 mg/ml ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง mushroom tyrosinase enzyme ที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 41.67 mg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ได้ 59.11%, **สรุปผล:** โปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรกแพะมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้

คำสำคัญ: โปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลส, รกแพะ, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน, ฤทธิ์ในการต้านเอนไซม์ไทโรซิเนส

Bioactivities of Goat Placenta hydrolysates

Onanong Ruksounjik¹, Sompong Klaynongsruang², Chariya Hahnvajjanawong³, Watcharee Khunkitti^{4*}

¹ Graduate Student, Pharmaceutical Chemistry and Natural Products, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University

² Ph.D., Associate Professor, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

³ Ph.D., Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

⁴ Ph.D., Associate Professor, Department of Pharmaceutical technology, Faculty of Pharmacy, Khon Kaen University, KhonKaen 40002, Thailand

* Corresponding author: Watcharee Khunkitti, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002,

email: watkhu@kku.ac.th

Abstract

Bioactivities of Goat Placenta hydrolysates

Onanong Ruksounjik¹, Sompong Klaynongsruang², Chariya Hahnvajjanawong³, Watcharee Khunkitti^{4*}

IJPS, 2016; 12(3) : 61-71

Received : 6 June 2016

Accepted : 11 August 2016

Goat placenta is a rich source of proteins and amino acids. It has been reported that low molecular weights of short chain proteins and peptides possess various bioactivities. **Objectives:** To investigate bioactivities of proteins/peptide hydrolysates by papain enzyme. **Methods:** determine the characteristics of the goat placenta hydrolysates, including total protein by Bradford protein assay, molecular weight by Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine-SDS PAGE), the antioxidant activities by DPPH radical scavenging, Linoleic acid peroxidation and Ferric Reducing Power assays as well as anti-tyrosinase activity. **Results:** the percentage yield of the hydrolysates obtained from goat placenta was $18.31 \pm 0.42\%$. The total protein equivalent to bovine serum albumin was $30.04 \pm 1.19\%$ w/w. The goat hydrolysates mainly contained protein at about 30 kDa and peptide at about 8-24 kDa. Antioxidant activities of the hydrolysates were as follows; Free radical scavenging ability of the hydrolysates at a concentration of 6.25 mg/ml was significantly greater than that of vitamin C (0.156 mg/ml) and was not significantly different from vitamin E acetate (83.5 mg/ml) but less than that of Trolox (0.156 mg/ml). Ferric Reducing Power activity of the hydrolysates at 1.5 mg/ml was equivalent to 15.74 mM Trolox which was less than 0.3 mg/ml of vitamin C. Lipid peroxidation inhibition of the hydrolysates at 1 mg/ml was 84.94% which was not significantly different from that of BHT, Trolox at 0.1 mg/ml and GSH at 1 mg/ml. The hydrolysates at 41.67 mg/ml inhibited 59.11% of mushroom tyrosinase activity. **Conclusion:** goat placenta proteins/peptide hydrolysates possessed antioxidant activities and anti-tyrosinase activity.

Keywords : protein/peptide hydrolysates; goat placenta; Antioxidant activity; Anti-tyrosinase activity

บทนำ

เมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นเซลล์ผิวหนังของคนเราจะมีการสร้างเส้นใยคอลลาเจน เส้นใยอีลาสติน และกรดไฮยาลูโรนิกได้ลดลงส่งผลให้ผิวหนังบอบบาง หย่อนคล้อย สูญเสียความยืดหยุ่น และเกิดริ้วรอยเหี่ยวย่นขึ้นบนผิวหนังซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า กระบวนการแก่ชราของผิวหนังนอกจากนี้ ความแก่ชราของผิวหนังยังมีสาเหตุมาจากเซลล์ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระโดยเฉพาะอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหรือที่เรียกว่า Reactive oxygen species (ROS) ซึ่งได้แก่ hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), superoxide anion (O_2^-), singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), lipid peroxy radical ($\text{LOO}\cdot$) และ nitric oxide radical ($\text{NO}\cdot$) โดยอนุมูลอิสระเหล่านี้อาจจะได้รับมาจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่นรังสียูวี คิวบูรี สารเคมี สารสังเคราะห์ต่างๆ และร่างกายสามารถสร้างอนุมูลอิสระนี้ขึ้นมาเองได้ เช่น เกิดจากกระบวนการสันดาปอาหารเพื่อสร้างพลังงาน รวมถึงความเครียดต่างๆก็มีผลกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้ (Masaki, 2010) โดยธรรมชาติแล้วร่างกายของคนเราจะสร้างสารต้านอนุมูลอิสระขึ้นมาเพื่อทำลายอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันในส่วนต่างๆของร่างกายได้เอง ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น กลูตาไธโอน แคตาเลส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส แต่บางครั้งสารต้านอนุมูลอิสระที่สังเคราะห์ขึ้นมาอาจจะไม่เพียงพอต่อการกำจัดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงจำเป็นที่จะต้องได้รับสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอก เช่นสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้รับจากการรับประทานเข้าไป เช่น สารประกอบฟีนอลิกที่มักพบเป็นองค์ประกอบหลักในพืช vitamin C และ vitamin E ในปัจจุบันมีการนำโปรตีนที่ได้จากแหล่งธรรมชาติมาใช้ประโยชน์มากมาย เช่น ใช้รักษาในทางการแพทย์ เป็นอาหารเสริมบำรุงร่างกาย ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตเครื่องสำอาง แปรรูปเป็นอาหาร รวมถึงอุตสาหกรรมอื่นๆ อีกมากมาย (Langmaier *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2010) เป็นที่น่าสนใจว่า ในรกแพะมีเส้นใยคอลลาเจนที่มีความยืดหยุ่นและแข็งแรงสูงเป็นส่วนประกอบที่สำคัญเมื่อนำมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ย่อยโปรตีน ให้ได้โปรตีน/เปปไทด์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงและพบว่าทำให้มีฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive peptide) โดยเฉพาะการต้านอนุมูลอิสระ ที่เป็นสาเหตุหลักของการเกิดริ้วรอยบนผิวหนังได้ แต่เนื่องจากมีผลการศึกษาและนำรกแพะมาใช้ประโยชน์น้อย งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีนไฮโดรไลเซสที่ได้จากรกแพะ เพื่อใช้เป็นองค์ความรู้ต่อยอดพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการศึกษามีดังนี้ 2,2-azobis-(2-methylpropionamidine)-dihydrochloride (ABAP) (Aldrich, Germany), 2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil (DPPH) (Fluka, Germany), Ethanol (Merck, Germany), Potassium chloride (KCl) (บริษัทเอกตรงเคมีภัณฑ์, ไทย), Ammonium thiocyanate (Aldrich, Germany), Ferrous chloride (Aldrich, Germany), Potassium ferricyanide (Aldrich, Germany), Trichloroacetic acid (Aldrich, Germany), Ferric chloride (Aldrich, Germany), Mushroom tyrosinase (Aldrich, USA), L-tyrosine (Fluka, Germany), papain enzyme (Aldrich, Switzerland)

การเตรียมโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลเซส

นำรกแพะสดที่สดหนัก 1000 กรัม มาย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน ในอัตราส่วนรกต่อเอนไซม์ 1:10 โดยน้ำหนักปรับปริมาตรด้วยน้ำ (DW) ให้ได้ 3 ลิตรคนผสมที่อุณหภูมิ 55 °C ที่ความเร็ว 80 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 ชม. หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปอบที่ 80 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) เก็บตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซสที่แห้งแล้วไปหา % yield โดยทำ 3 ซ้ำในแต่ละตัวอย่าง คำนวณหา % Yield จากสูตร (1)

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{น้ำหนักแห้งของสารสกัด} \times 100}{\text{น้ำหนักรกแห้ง}} \quad (1)$$

การวิเคราะห์หา %Degree of hydrolysis (Frister *et al.*, 1988)

ใส่ OPA reagent ปริมาณ 3 ml ในหลอดที่เป็น blank ใส่ DW50 μl ส่วนในหลอดที่เป็นตัวอย่างให้เจือจางตัวอย่างใน DW (1:10) แล้วค่อยใส่ลงไปหลอดทดลองที่เตรียมไว้ 50 μl ผสมให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาทีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 nm จากนั้นนำผลที่ได้มาคำนวณหา %Degree of hydrolysis (%DH) ดังสมการ (2)

$$\% \text{ DH} = \frac{h_{\text{total}} - (h_{\text{sample}} - h_{\text{blank}}) \times 100}{h_{\text{total}}} \quad (2)$$

h_{total} = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ย่อยแบบ complete hydrolysate

h_{sample} = ค่าดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ย่อยด้วย
เอนไซม์ปาเปนที่เวลาต่างๆ

h_{blank} = ค่าดูดกลืนแสงของ DW

การหาปริมาณโปรตีนรวมในตัวอย่างรกโดยวิธี **Bradford protein assay** (Bradford, 1976)

เตรียม Bovine Serum Albumin (BSA) ที่ความเข้มข้นของโปรตีนระหว่าง 0-500 $\mu\text{g/ml}$ สารละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลส และ DW (Blank) เติมตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 50 μl และ Bradford dye reagent ปริมาตร 150 μl ลงใน 96 well plate จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงของ BSA แต่ละความเข้มข้น มาสร้างกราฟมาตรฐาน (BSA standrad curve) จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง

การตรวจสอบคุณสมบัติและขนาดของโปรตีน hydrolysates ที่สกัดได้จากรกแพะโดยวิธี **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine-SDS PAGE) method** (Tricine-SDS-PAGE, 2006)

วัดปริมาณโปรตีนจากตัวอย่าง ด้วยวิธี Bradford protein assay เพื่อหาปริมาณโปรตีนรวมในตัวอย่างรกแพะไฮโดรไลส จากนั้นเตรียมตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 20 μg ใน 10 μl แล้วใส่ 2X solubilizing buffer (SSB) 10 μl ลงในตัวอย่างโปรตีนที่เตรียมไว้ ผสมให้เข้ากันนำตัวอย่างที่เตรียมไว้ไปต้มในน้ำ 100 $^{\circ}\text{C}$ นาน 5 นาทีแล้วโหลดโปรตีนทั้งหมดลงไปใน 15% gel Tricine-SDS-PAGE โดยเปรียบเทียบกับ marker จากนั้น Run ที่ 90 V (run จน dye ตกขอบ gel ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง) ย้อมโปรตีนด้วย Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) staining solution ทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงล้างสีออกด้วย destaining solution ทิ้งไว้ค้างคืนแล้วบันทึกผลการทดลอง

การหาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

DPPH (Free radical scavenging) methods

(Veerapan, 2011)

เจือจางสารละลายตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลสจากรกแพะใน 96 well plate ในส่วนของสารมาตรฐานจะใช้ Vitamin C, Trolox, Vitamin E acetate แล้วเติมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-1-picrylhydrazil) เข้มข้น 0.4 mM ที่ละลายใน

ethanol ปริมาตร 50 μl ลงในทุกหลุม ยกเว้นหลุมที่ใช้เป็น blank ให้เติม DW 50 μl แทน ส่วนในหลุมควบคุมจะใส่ DPPH 50 μl ผสมกับ DW 50 μl จากนั้นผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วเก็บในที่มืด 25 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 nm นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหา %Antioxidant Index (%AI) จากสมการ (3)

$$\%AI = \frac{\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (3)$$

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

$\text{Abs}_{\text{sample}}$ คือ ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนไฮโดรไลส

หรือสารมาตรฐาน

$\text{Abs}_{\text{blank}}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีน

ไฮโดรไลสที่ไม่ได้เติมสารละลาย DPPH

Lipid Peroxidation Inhibition Assay Method

(Ajibola *et al.*, 2011; Veerapan, 2011)

เตรียม Linoleic acid 50 $\mu\text{l/ml}$ ใน 80% ethanol ปริมาตร 50 μl โดยเตรียมในที่มืด จากนั้นเติมสารมาตรฐาน (GSH 10 mg/ml ละลายใน DW ส่วน Trolox และ BHT ละลายใน 80% ethanol) ปริมาตร 50 μl สำหรับตัวอย่างจะใส่โปรตีนไฮโดรไลสจากรกแพะที่ความเข้มข้น 50 mg/ml และ 5 mg/ml ปริมาตร 50 μl ในหลอดควบคุมจะใส่ 80% ethanol ปริมาตร 50 μl และในหลอดที่เป็น blank จะใส่ DW ปริมาตร 50 μl ลงไป จากนั้นเติม 0.07 M 2,2-azobis-(2-methylpropionamidine)-dihydrochloride (ABAP) 10 μl ทิ้งไว้ 10 นาที จึงใส่ 20% acetic acid 150 μl ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 5 นาทีนำไปบ่มที่ 70 $^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ โดยเติม 75% ethanol 160 μl ลงใน 96 well plate ใส่ตัวอย่างที่บ่มแล้ว 20 μl ลงใน 96 well plate ที่เตรียมไว้ จากนั้นใส่ 15 % ammonium thiocyanate 10 μl ใส่ 10 mM Ferrous chloride 10 μl ผสมให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้ 3 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 500 nm คำนวณหา %Lipid peroxidation inhibition ดังสมการ (4)

%Lipid peroxidation inhibition =

$$\frac{\text{Abs}_{\text{control}} - (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}})}{\text{Abs}_{\text{control}}} \times 100 \quad (4)$$

$\text{Abs}_{\text{control}}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

Abs_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนไฮโดรไลเซส หรือสารมาตรฐาน

Abs_{blank} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ blank

Ferric Reducing Power Assay method

(Wong *et al.*, 2006)

เตรียมสารมาตรฐาน Trolox ที่ความเข้มข้น 0-300 mM Vitamin C ที่ 8 mg/ml และ GSH ที่ความเข้มข้น 25 mg/ml ใน phosphate buffer pH 6.8 และ BHT 25 mg/ml ใน ethanol ส่วนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเซสเตรียม 30 mg/ml และ 15 mg/ml ใน phosphate buffer pH 6.8 ทำการวิเคราะห์โดยเติมสารมาตรฐานและโปรตีนที่เตรียมไว้มา 250 μ l ส่วนของ blank จะใส่ phosphate buffer pH 6.8 250 μ l ผสมกับสารละลาย 1% w/v potassium ferricyanide ที่ละลายใน DW ปริมาตร 250 μ l แล้วบ่มที่ 50 °C นาน 20 นาที จึงใส่ 10% w/v Trichloroacetic acid ที่ละลายในน้ำ ปริมาตร 250 μ l ทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา จากนั้นนำมาปั่นที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วดูดส่วน supernatant 30 μ l ใส่ใน 96 well plate ที่มี DW 160 μ l และใส่ 0.1% w/v Ferric chloride ที่ละลายในน้ำ 10 μ l ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 700 nm นำค่าการดูดกลืนแสงของ trolox แต่ละความเข้มข้น มาสร้างกราฟมาตรฐาน (Trolox standard curve) จากนั้นคำนวณประสิทธิภาพในการเป็นตัวรีดิวซ์ของโปรตีนที่เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง mushroom tyrosinase enzyme (Khunkitti *et al.*, 2012)

เตรียมสารมาตรฐาน Vitamin C, GSH, arbutin และ kojic acid ที่ความเข้มข้น 1.2 mg/ml และสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ ทำการวิเคราะห์โดยปิเปตสารมาตรฐานและสารที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 40 μ l ลงผสมกับ phosphate buffer pH 6.8 ปริมาตร 120 μ l ลงใน 96 well plate เติม L-tyrosine 1.25 g/ml ปริมาตร 40 μ l ลงผสมให้เข้ากันในหลุมที่เป็น กลุ่มควบคุม จะใส่ DW 40 μ l จากนั้นเติม mushroom tyrosinase enzyme 500 U/ml ปริมาตร 40 μ l ลงไป ยกเว้นหลุมที่ใช้เป็น blank จะมีตัวอย่าง และ DW ปริมาตร 40 μ l แทน จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่ 25 °C นาน 15 นาที ในที่มืด ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ 475 nm นำค่าที่ได้มาคำนวณหา %Inhibition จากสมการ (5)

%Tyrosinase inhibition =

$$\frac{Abs_{control} - (Abs_{sample} - Abs_{blank})}{Abs_{control}} \times 100 \quad (5)$$

$Abs_{control}$ คือ ค่าดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

Abs_{sample} คือ ค่าดูดกลืนแสงของโปรตีนไฮโดรไลเซส หรือสารมาตรฐาน

Abs_{blank} คือ ค่าดูดกลืนแสงของ blank

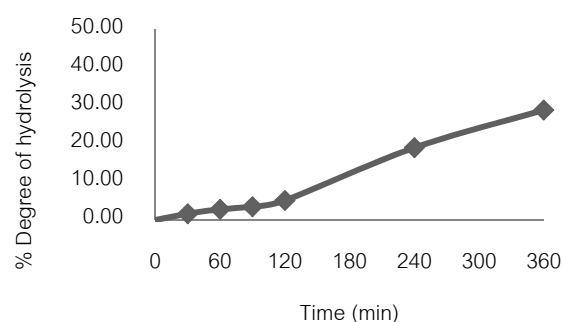
ผลการวิจัย

การหา % Yield ของสารสกัดรกแพะและการหาปริมาณโปรตีนรวมในตัวอย่าง

จากผลการทดลองการหา %Yield ของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลเซสจากรกแพะพบว่าให้ %Yield เท่ากับ $18.31 \pm 0.42\%$ (กรัมโปรตีนไฮโดรไลเซสต่อน้ำหนักรกแห้ง 100 g) และเมื่อนำโปรตีนไฮโดรไลเซสจากรกแพะมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวมโดยใช้โปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลเซสจากรกแพะที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Lyophilization) ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml เมื่อนำมาวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนรวม พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมเทียบกับ Bovine serum albumin $30.04 \pm 1.19\%$ w/w

การวิเคราะห์หา %Degree of hydrolysis(%DH)

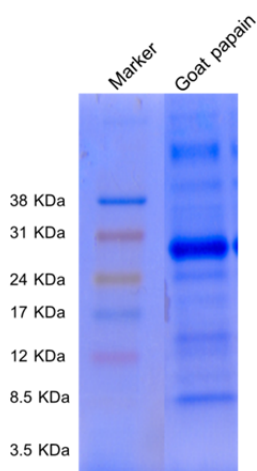
ผลการวิเคราะห์หา %Degree of hydrolysis เมื่อเพิ่มเวลาในการไฮโดรไลซิส %DH ที่ได้ยิ่งเพิ่มมากขึ้นตาม โดยพบว่าที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 240 และ 360 นาที มี %DH เท่ากับ $0 \pm 0.35\%$, $1.62 \pm 0.59\%$, $2.82 \pm 0.39\%$, $3.46 \pm 0.31\%$, $5.12 \pm 0.33\%$, $18.95 \pm 0.14\%$ และ $28.83 \pm 2.93\%$ ตามลำดับ



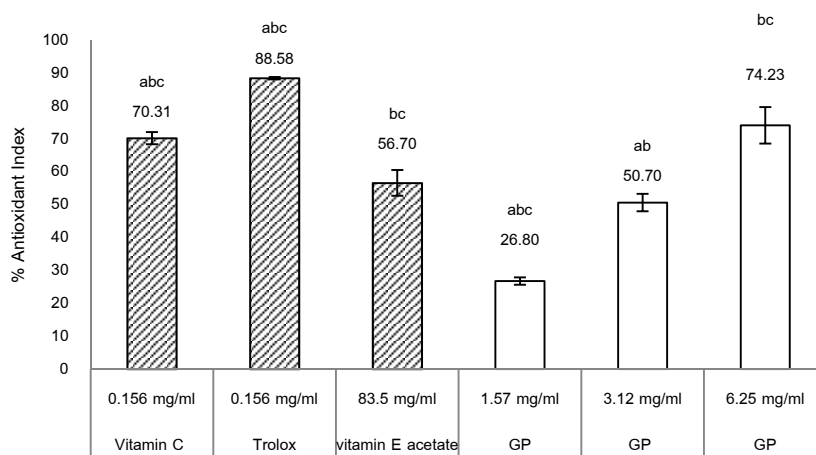
รูปที่ 1 %Degree of hydrolysis ของรกแพะเมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน

การตรวจสอบคุณสมบัติและขนาดของโปรตีนไฮโดรไลส ที่สกัดได้จากรกแพะโดยวิธี Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine- SDS PAGE)

การตรวจสอบคุณสมบัติและขนาดของโปรตีนไฮโดรไลส
ที่สกัดได้จากรกแพะ โดยวิธี Tricine-Sodium Dodecyl
Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Tricine-SDS
PAGE) ดังรูปที่ 2 พบว่าการมีแถบแบนของโปรตีนหลายขนาด
ด้วยกัน แต่เปปไทด์ส่วนใหญ่ที่พบจะมีขนาดของโมเลกุล
ประมาณ 30 kDa รองลงมาคือ ขนาดโมเลกุลที่มากกว่า 38
kDa และอยู่ในช่วง 8-24 kDa ตามลำดับ



รูปที่ 2 ขนาดโมเลกุลของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรก
แพะที่ผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ปาเปน และ
แยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยวิธี Tricine-SDS PAGE



รูปที่ 3 Free radical scavenging activity ของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรกแพะ
(Goat placenta hydrolysates หรือ GP) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน
หมายเหตุ a,b,c หมายถึง สัญลักษณ์ที่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อทดสอบด้วย One-Way ANOVA test และทำ multiple comparisons ด้วย Tukey test

การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ

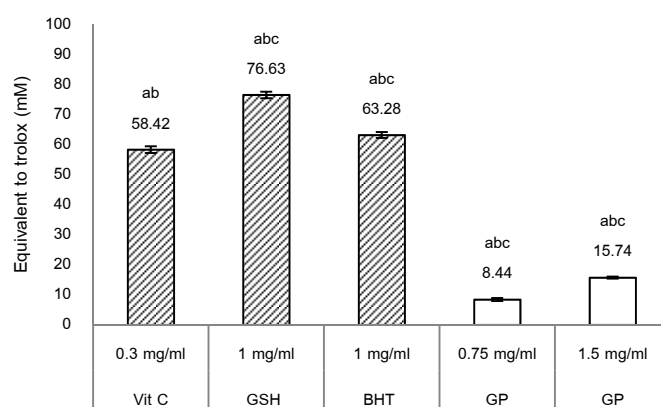
DPPH (Free radical scavenging)

จากรูปที่ 3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสในการจับกับอนุมูลอิสระ DPPH• พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส ประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันก็เพิ่มขึ้นตาม (dose-dependent) โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 1.57 mg/ml, 3.12 mg/ml และ 6.25 mg/ml สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้และมีค่า %antioxidant index ที่ 26.80%, 50.70% และ 74.23% ตามลำดับ แต่เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน แล้วพบว่าโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสทุกความเข้มข้น มีประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน Trolox อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ความเข้มข้นสูงสุด (6.25 mg/ml) นั้นพบว่าประสิทธิภาพในการต้านออกซิเดชันมีค่าใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Vitamin C ที่ความเข้มข้น 0.156 mg/ml ส่วนที่ความเข้มข้น 3.12 mg/ml สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน Vitamin E acetate ที่ความเข้มข้น 83.5 mg/ml ซึ่งค่า %antioxidant index ที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$)

Ferric Reducing Power Assay

ประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก Fe^{3+} โดยวิธี Reducing power assay เทียบกับกราฟมาตรฐานของ Trolox ดังรูปที่ 4 พบว่าโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 0.75 mg/ml และ 1.5 mg/ml สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox 8.44 mM และ 15.74 mM ตามลำดับ ซึ่งโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสสามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้น้อยกว่าสารมาตรฐาน Vitamin C ที่

ความเข้มข้น 0.3 mg/ml, BHT และ GSH ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน Trolox 58.42 mM, 63.28 mM และ 76.63 mM ตามลำดับ แต่เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการรีดิวซ์ไอออนเหล็ก Fe^{3+} ระหว่างสารมาตรฐาน พบว่า GSH สามารถรีดิวซ์ Fe^{3+} ได้สูงกว่า Vitamin C และ BHT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 4 ประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรกแพะ (GP)

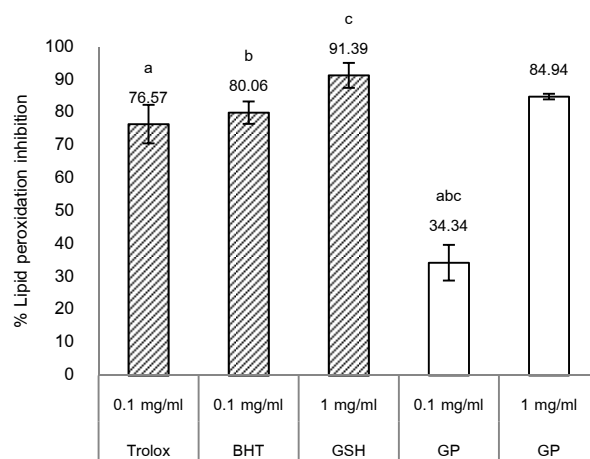
ในการเป็นตัวรีดิวซ์ (reducing agent) เทียบเท่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน Trolox

หมายเหตุ a,b,c หมายถึง สัญลักษณ์ที่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อทดสอบด้วย One-Way ANOVA test และทำ multiple comparisons ด้วย Tukey test

Lipid Peroxidation Inhibition Assay

ประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสในการยับยั้งการเกิด Lipid peroxidation ขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด โดยที่ความเข้มข้นของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลส 1 mg/ml และ 0.1 mg/ml สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 84.94% และ 34.34% ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ความเข้มข้น 1 mg/ml พบว่าสามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน BHT, Trolox ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml และสารมาตรฐาน GSH ที่ 1 mg/ml ซึ่งสารมาตรฐาน BHT, Trolox และ GSH สามารถยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้ 76.57%, 80.06% และ 91.39% ตามลำดับ



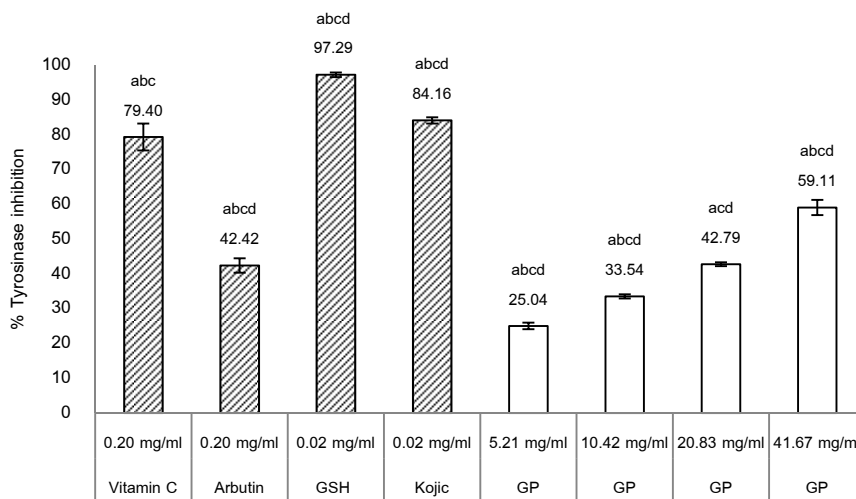
รูปที่ 5 ประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรกแพะ (GP) ในการต้านการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิก โดยวิธี Lipid peroxidation inhibition

หมายเหตุ a,b,c หมายถึง สัญลักษณ์ที่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย One-Way ANOVA test และทำ multiple comparisons ด้วย Tukey test

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งประสิทธิภาพของ mushroom tyrosinase enzyme

จากผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีนไฮโดรไลสในการยับยั้งเอนไซม์ mushroom tyrosinase ดังรูปที่ 6 พบว่ายังเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลสก็ยิ่งเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ mushroom tyrosinase ได้มากขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 41.67 mg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ mushroom tyrosinase ได้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน arbutin ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ tyrosinase ได้

42.42±2.07% แต่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ mushroom tyrosinase ได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน GSH, kojic acid ที่ความเข้มข้น 0.02 mg/ml และ Vitamin C, ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ mushroom tyrosinase ได้ 97.29±0.67%, 84.16±0.91% และ 79.40±3.87% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลส 20.83 mg/ml สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ mushroom tyrosinase ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเทียบกับสารมาตรฐาน arbutin ที่ความเข้มข้น 0.2 mg/ml



รูปที่ 6 ประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสจากรกแพะ (GP) ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Mushroom tyrosinase โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

หมายเหตุ a,b,c,d หมายถึง สัญลักษณ์ที่เหมือนกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อทดสอบด้วย One-Way ANOVA test และทำ multiple comparisons ด้วย Tukey test

อภิปรายผลการทดลอง

กระบวนการไฮโดรไลส เป็นการย่อยโปรตีน/เปปไทด์ให้มีขนาดเล็กลง ในการศึกษาในครั้งนี้ใช้เอนไซม์ปาเปนในการย่อย ซึ่งสายเปปไทด์ที่เกิดขึ้นโดยการย่อยแบบสุ่มนี้ เมื่อเพิ่มเวลาในการย่อย %DH ยิ่งเพิ่มขึ้นตาม และเมื่อนำโปรตีน/เปปไทด์มาตรวจสอบคุณสมบัติและขนาดของเส้นเปปไทด์พบว่าสายเปปไทด์ที่ได้มีขนาดตั้งแต่ 8-38 kDa เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าเปปไทด์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมันได้ดี ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Teng *et al.*, (2011) ที่พบว่าเปปไทด์ที่สกัดได้จากรกแพะที่มีขนาด

เปปไทด์ประมาณ 3-10 kDa มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระยับยั้งการเกิดออกซิเดชันของไขมัน และรีดิวซ์โลหะหนักได้ดีเมื่อเทียบกับ ascorbic acid ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการเตรียมไฮโดรไลสแตกต่างกัน

จากผลการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยรกแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน พบว่า มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ Lipid peroxidation ได้ดี ซึ่งน่าจะเกิดจากสายโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่จัดอยู่ในกลุ่ม Basic amino acid เช่น Lysine Arginine และ Histidine ซึ่งมีประจุ

เป็นบวก จะสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดี เพราะตรงตำแหน่งหมู่ข้างของกรดอะมิโนมีความสามารถในการให้โปรตอนหรืออิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระ จึงทำให้โมเลกุลดังกล่าวกลับมายู่ในสภาวะเสถียรไม่เป็นอนุมูลอิสระอีก ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการรายงานของ Sarmadi & Ismail, (2010)

นอกจากนี้การศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยรกแพะในการต้านการออกซิเดชันของกรดไขมันไลโนเลอิก พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันที่ดีซึ่งน่าจะเกิดจากสายเปปไทด์ที่ได้จากการย่อยรกแพะแบบสุ่มที่เกิดขึ้นนั้นมีกรดอะมิโนชนิดไฮโดรโฟบิกเช่น phenylalanine, valine, Isoleucine, alanine และ leucine ซึ่งกรดอะมิโนเหล่านี้จะช่วยในการเคลื่อนที่และการแทรกตัวของสายเปปไทด์เข้าไปยังโมเลกุลของลิพิดบนผิวเมมเบรนต่างๆของเซลล์ที่เกิดอนุมูลอิสระได้ดี รวมทั้งในสายเปปไทด์มีกรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติความเป็นประจุบวก (positive charge) ซึ่งสามารถให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลของอนุมูลอิสระตรงบริเวณที่เปปไทด์แทรกเข้าไป และทำให้เกิดการป้องกันการถูกทำลายผนังเซลล์จากอนุมูลอิสระได้ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับผลจากการศึกษาของ Kim *et al.*, (2007) และ Mendis *et al.*, (2005)

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่ได้จากการย่อยรกแพะในการรีดิวซ์โลหะ Fe^{3+} พบว่าสามารถรีดิวซ์โลหะ Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} ได้นั้นน่าจะเกิดจากสายเปปไทด์ที่ได้มีกรดอะมิโนจัดอยู่ในกลุ่ม Basic amino acid หรือกลุ่มอะมิโนที่มีประจุเป็นบวกเช่น Lysine Arginine และ Histidine และ Acidic amino acid หรือกลุ่มอะมิโนที่มีประจุลบเช่น Aspartate และ Glutamate ซึ่งกรดอะมิโนทั้งสองกลุ่มนี้มีหมู่อะมิโน ($-NH_2$) และหมู่คาร์บอกซิลิก ($-COOH$) ที่สามารถแตกตัวให้อิเล็กตรอนหรือไฮโดรเจนอะตอมแก่โลหะ Fe^{3+} เกิดเป็นคอมเพล็กซ์ระหว่างอะตอมของโลหะกับสายเปปไทด์ ซึ่งผลที่ตามมาคือไอออนของ Fe^{3+} ไม่สามารถไปออกซิไดซ์ $ROOH$ ให้เกิดเป็น $RO\cdot$ (alkoxyl radical) จึงเป็นการหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งสอดคล้องกับผลศึกษาของ Saiga *et al.*, (2003)

กลไกการสร้างเม็ดสีเมลานินในชั้นผิวหนังที่เป็นสาเหตุของสีผิวที่หมองคล้ำ จุดด่างดำ คือเริ่มจากเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte) เปลี่ยนสารตั้งต้นแอลไทโรซีน (L-tyrosine) โดยถูกเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนให้เป็นแอลโดปา (L-DOPA) จากนั้นแอลโดปาจะถูกเอนไซม์ไทโรซิเนสเปลี่ยนไปเป็นแอลโด

ปาควิโนน (L-DOPAquinone) จากแอลโดปาควิโนนจะเปลี่ยนไปเป็นโดปาโครม (DOPAchrome) และเมลานิน (Melanine) โดยเมลานินที่สร้างขึ้นมาจะถูกบรรจุในแคปซูลที่เรียกว่า เมลาโนโซมซึ่งจากกระบวนการสร้างเม็ดสีเมลานินดังกล่าวมานี้ถ้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ก็จะลดการสร้างเม็ดสีเมลานิน ทำให้สีผิวไม่หมองคล้ำจากผลการทดลองการศึกษาประสิทธิภาพของโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสในการยับยั้งเอนไซม์ mushroom tyrosinase พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเปปไทด์ประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสจะสูงขึ้นด้วย โดยผลดังกล่าวน่าจะเกิดจากการที่โปรตีนไปจับกับ Cu^{2+} ที่อยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ไทโรซิเนส ส่งผลให้โครงสร้างบริเวณแอคทีฟไซต์ของเอนไซม์ไทโรซิเนสเสียไป ทำให้ลดการสร้างเม็ดสีเมลานินลง ผิวหนังดูขาวขึ้นซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Nakchum & Kim, (2016) ; Schurink *et al.*, (2007) และ Zhuang *et al.*, (2009) อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาพบว่ามีโปรตีน/เปปไทด์ไฮโดรไลสที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสได้น้อย ต้องใช้ในความเข้มข้นที่สูงทั้งนี้ น่าจะเกิดจากสารสกัดมีความสามารถในการจับกับ Cu^{2+} ได้น้อย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นตัวรีดิวซ์ที่ต่ำ ดังนั้นจึงน่าจะทำให้ผิวขาวขึ้นได้น้อย

สรุป

โปรตีน/เปปไทด์ที่ได้จากการไฮโดรไลสขี้รกแพะด้วยเอนไซม์ปาเปน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 8-38 kDa มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ด้านการเกิดออกซิเดชันของไขมัน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไทโรซิเนสได้ อย่างไรก็ตาม สารสกัดโปรตีน/เปปไทด์ที่ได้มีกลิ่นค่อนข้างแรง และยังไม่ได้มีการศึกษาความคงตัว ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาคูณสมบัติทางเคมีด้วย รวมถึงศึกษาความคงตัวทางชีวภาพ ตลอดจนการศึกษาค่าผลของสารสกัดต่อความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนัง ก่อนนำมาพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการที่ได้รับเงินทุนสนับสนุนจากสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (สวก) จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

References

- Ajibola, C. F., Fashakin, J. B., Fagbemi, T. N., & Aluko, R. E. (2011). Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*Sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(10), 6685–6702.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248–254.
- Frister, H., Meisel, H., & Schlimme, E. (1988). OPA method modified by use of N,N-dimethyl-2-mercaptoethylammonium chloride as thiol component. *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 330(7), 631–633. <http://doi.org/10.1007/BF00473782>
- Khunkitti, W., Veerapan, P., & Hahnvanawong, C. (2012). In vitro bioactivities of clove buds oil (*Eugenia caryophyllata*) and its effect on dermal fibroblast. *Int J Pharm PharmSci*, 4(Suppl 3), 556–560.
- Kim, S.-Y., Je, J.-Y., & Kim, S.-K. (2007). Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(1), 31–38.
- Langmaier, F., Mladek, M., Kolomaznik, K., & Sukop, S. (2001). Collagenous hydrolysates from untraditional sources of proteins. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(4), 193–199.
- Liu, C., Peng, D., Yang, J., Li, Y., & Li, J. (2010). Anti-oxidative and anti-aging activities of collagen hydrolysate. In *III International Conference On Biomedical Engineering And Informatics (BMEI)* (pp. 1981–84). Retrieved from http://ieeexplore.ieee.org/xpls/abs_all.jsp?arnumber=5639440
- Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, 58(2), 85–90. <http://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.03.003>
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.-G., & Kim, S.-K. (2005). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166–2178.
- Nakchum, L., & Kim, S. M. (2016). Preparation of squid skin collagen hydrolysate as an antihyaluronidase, antityrosinase, and antioxidant agent. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 46(2), 123–130. <http://doi.org/10.1080/10826068.2014.995808>
- Saiga, A., Tanabe, S., & Nishimura, T. (2003). Antioxidant Activity of Peptides Obtained from Porcine Myofibrillar Proteins by Protease Treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3661–3667. <http://doi.org/10.1021/jf021156g>
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949–1956.
- Schurink, M., van Berkel, W. J. H., Wichers, H. J., & Boeriu, C. G. (2007). Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. *Peptides*, 28(3), 485–495. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2006.11.023>
- Teng, D., Fang, Y., Song, X., & Gao, Y. (2011). Optimization of enzymatic hydrolysis parameters for antioxidant capacity of peptide from goat placenta. *Food and Bioprocess Processing*, 89(3), 202–208.
- Tricine-SDS-PAGE : Article : Nature Protocols. (2006). *Nat. Protocols*, 1(1), 16–22. <http://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Veerapan, P. (2011). In Vitro Antioxidant Activities of Essential Oils. *IJPS*, 7(3), 30–38.

- Wong, S. P., Leong, L. P., & Koh, J. H. W. (2006).
Antioxidant activities of aqueous extracts of
selected plants. *Food Chemistry*, 99(4), 775–783.
- Zhuang, Y., Zhao, X., & Li, B. (2009). Optimization of
antioxidant activity by response surface
methodology in hydrolysates of jellyfish
(*Rhopilema esculentum*) umbrella collagen. *Journal
of Zhejiang University SCIENCE B*, 10(8), 572–
579. <http://doi.org/10.1631/jzus.B0920081>