KHON KAEN AGR. J. 48 (5): 1396-1405 (2020)./doi:10.14456/kaj.2020.122.

การศึกษาเปรียบเทียบระดับเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (คาร์โนซีน) ในเนื้อสุกร ซีพี คูโรบูตะ และสุกรลูกผสมสามสาย ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Study on the comparison of antioxidant peptide (carnosine) level between CP–Kurobuta and Three Crossbred Pork (Large-White x Landrace x Duroc) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

จุฑามาศ คงกะพันธ์[1*] และ ถิรนันท์ ศรีกัญชัย[1]

Jutamart Kongkapan[1*] and Tiranun Srikanchai[1]

บทคัดย่อ: ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (คาร์โนซีน) ระหว่างเนื้อสุกร ซีพี คูโรบูตะ (CPK) และสุกรลูกผสมสามสาย (Large-White x Landrace x Duroc; LLD) ด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเพื่อประเมินคุณสมบัติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยวิธี Diphenyl-picryhydrazyl radical (DPPH) และ Metal Chelating activity ในการสกัดจากตัวอย่างเนื้อสุกร โดยเก็บตัวอย่างจากกล้ามเนื้อ Longissimus dorsi บริเวณซี่โครงซี่ที่ 10 และ 11 จำนวน 10 ตัวอย่างต่อสายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่า ระดับคาร์โนซีนในสุกรลูกผสมสามสาย LLD (7.76 ± 0.70 mg/g) สูงกว่าในสุกรสายพันธุ์ซีพี คูโรบูตะ (4.75 ± 0.25 mg/g) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธีการ DPPH และ metal chelating activity ในทั้งสองสายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างระดับคาร์โนซีนที่ตรวจพบในตัวอย่างกับระดับการแสดงออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากผลการศึกษาพบว่า ระดับคาร์โนซีนขึ้นอยู่กับพื้นฐานทางพันธุกรรม เช่นเดียวกับชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็นองค์ประกอบของกล้ามเนื้อ สิ่งที่น่าสนใจที่พบในสารสกัดจากตัวอย่างเนื้อสุกรคือ ไดเปปไทด์ที่มีโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับคาร์โนซีนตัวอื่น ที่มีความสามารถเสริมฤทธิ์การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้อยู่ในเนื้อสุกรด้วย

คำสำคัญ: คาร์โนซีน, สารต้านอนุมูลอิสระ, ซีพี คูโรบูตะ, Longissimus dorsi, HPLC

ABSTRACT: The purpose of this study were to compare antioxidant peptide level (carnosine) between CP-Kurobuta (CPK) pork and three Crossbred (Large-White x Landrace x Duroc; LLD) pork using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and to evaluate antioxidation activity by Diphenyl-picryhydrazyl radical (DPPH) and Metal Chelating activity in extracted pork sample. The

Received January 6, 2020
Accepted May 12, 2020

[1] สาขาการจัดการเทคโนโลยีฟาร์ม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ นนทบุรี 11120
[1]Department of Farm Technology of Management, Faculty of Agro-Industry, Panyapiwat Institute of Management, Nonthaburi, 11120
[*] Corresponding author: E – mail: jutamartkon@pim.ac.th, kongkapanj@gmail.com

samples were collected from Longissimus dorsi muscles between rib 10th and 11th (10 samples/ breed). The results show that carnosine content in LLD (7.76 ± 2.20 mg/g) was significantly higher than CPK (4.75 ± 0.80 mg/g) at ($p < 0.05$). There is no significant difference between two breeds in the ability of antioxidant activity as well as no correlation between carnosine content and the ability of antioxidant activity. The results suggest that carnosine level is based on a genetic background, including a type of muscle fiber containing in muscle. The interesting finding in CPK extracted pork is that there is some related dipeptide which has the similar biological role with carnosine especially synergistic effects on antioxidant ability.

Keywords: carnosine, antioxidant, CP Kurobuta, Longissimus dorsi, HPLC

บทนำ

สุกรซีพี คูโรบูตะ (CP-Kurobuta; CPK) คือ สุกรที่มีการพัฒนาทางสายพันธุ์ เกิดจากการคัดเลือกสุกรสายพันธุ์ Berkshire ร่วมกับมีการพัฒนาในระบบการเลี้ยงและการให้อาหาร เนื้อสุกรมีลักษณะโดดเด่นต่างจากเนื้อสุกรทั่วไป คือ มีความนุ่ม เนื้อมีไขมันสีขาวแทรกเป็นลายอยู่ในกล้ามเนื้อ หรือที่เรียกว่า ลายหินอ่อน (marbling) มากกว่าปกติ จากรายงานของ Srikanchai and Watcharananun (2017) พบว่าเมื่อนำมาอบโดยวิธี Oven เนื้อสุกรซีพี คูโรบูตะ มีกลิ่นซึ่งเป็นเอกลักษณ์เฉพาะ ได้แก่ กลิ่นน้ำผึ้ง กลิ่นชินนามอนด์ กลิ่นคาราเมล เป็นต้น

เนื้อเป็นแหล่งอาหารที่อุดมด้วยโปรตีนที่มีคุณค่าต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) โดยมีรายงานว่าเมื่อใช้สารนี้ในปริมาณที่เหมาะสม สามารถลดความดันโลหิต ต้านการอักเสบ และต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ (Ahhmed and Muguruma, 2010) หนึ่งในสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีบทบาทเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกาย ได้แก่ คาร์โนซีน (carnosine; β – alanyl – L – histidine) ซึ่งเป็น antioxidant peptide ที่สามารถพบได้ในเนื้อสุกร, เนื้อโค, สัตว์ปีก และปลาบางชนิด คาร์โนซีนพบมากในกล้ามเนื้อยึดกระดูกหรือกล้ามเนื้อลายของสุกร (skeletal muscle) (Hipkiss, 2009) คาร์โนซีนมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ในระบบกล้ามเนื้อ (pH-buffering), สามารถดักจับกลุ่มคาร์บอนิล (carbonyl scavenging) และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากคุณสมบัติดังกล่าว คาร์โนซีนจึงได้รับความสนใจในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ (natural antioxidant) ภายหลังได้มีการนำเปปไทด์ดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมกระบวนการ oxidation ในร่างกายมนุษย์ ได้แก่ คาร์โนซีนในรูปแบบอาหารเสริม

มีการศึกษาปริมาณคาร์โนซีนในเนื้อสัตว์อย่างต่อเนื่อง โดย Boldyrev et al. (2013) รายงานว่าระดับคาร์โนซีนมีความแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์สุกร Subramaniyan et al. (2016) พบว่าสุกรสายพันธุ์ Berkshire มีองค์ประกอบของสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงคาร์โนซีนสูงกว่าสุกรลูกผสมสามสายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) และจากการประเมินคุณลักษณะเนื้อในสุกรสายพันธุ์ Berkshire พบว่ามีคุณภาพดีกว่าสุกรลูกผสมสามสาย ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่า พื้นฐานทางพันธุกรรมของสุกรเป็นปัจจัยสำคัญ ที่ทำให้เกิดความแตกต่างของระดับคาร์โนซีนในเนื้อ (D' Astrous-Page et.al., 2017) ส่วนวิจัยการศึกษาระดับคาร์โนซีนในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ จากอวัยวะต่างๆ ของไก่ลูกผสมพื้นเมืองและไก่เนื้อ (Intarapichet and Maikhunthod, 2005; Manhiani et al., 2013; Jung et al., 2013; Kim et al., 2014; Jayasena et al., 2015) จากรายงานทั้งหมดนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับคาร์โนซีนในเนื้อมีความแตกต่างกัน ซึ่งเป็นอิทธิพลจากเพศ, สายพันธุ์ และชนิดของกล้ามเนื้อ อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานในสุกรที่มีการพัฒนาสายพันธุ์ขึ้นมาอย่างเช่น สุกรซีพี คูโรบูตะ ดังนั้นการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบระดับปริมาณคาร์โนซีนในเนื้อสุกรระหว่าง สุกรซีพี คูโรบูตะ และสุกรผสมสามสายด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง และรวมถึงศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของคาร์โนซีนที่ได้จากสุกรทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อเป็นองค์ความรู้และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการต่อยอดพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสุกร เพื่อเพิ่มมูลค่าต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.ตัวอย่างที่ทำการศึกษา

ตัวอย่างเนื้อสุกรจากโรงงานแปรรูปสุกร แปดริ้ว จังหวัดฉะเชิงเทรา โดยเก็บตัวอย่างบริเวณสันนอก (Longissimus dorsi) ตรงบริเวณซี่โครง ซี่ที่ 10 และ 11 จากสุกรช่วงอายุ 23-24 สัปดาห์ และมีน้ำหนัก 100-105 กิโลกรัมต่อตัว จาก 2 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ซีพี คูโรบูตะ (CP-Kurobuta; CPK) และสายพันธุ์ลูกผสมสามสาย (Large-White x Landrace x Duroc; LLD) ปริมาณ 500 กรัม (ต่อตัวอย่าง ต่อสายพันธุ์) จำนวน 10 ตัวอย่างต่อสายพันธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด 20 ตัวอย่าง จากนั้นบรรจุตัวอย่างลงในถุงพลาสติกซิบล๊อก และเก็บรักษาที่ภายใต้อุณหภูมิ –20 °C ก่อนทำการวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณคาร์โนซีนในเนื้อสุกรต่อไป

2.การเตรียมตัวอย่างหรือการสกัดตัวอย่างเพื่อให้บริสุทธิ์

วิธีการสกัดตัวอย่างได้ถูกดัดแปลงจากวิธีของ Namgung et al. (2010) โดยนำตัวอย่างชิ้นเนื้อสุกรมาปั่นให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่น จนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นทำการสุ่มตักตัวอย่างปริมาณ 1 กรัมผสมกับน้ำดีไอออนไนส์ที่อัตราส่วน 1:2 นำส่วนผสมของตัวอย่างเขย่าให้เข้ากันในเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้น นำส่วนผสมตัวอย่างเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วสูงที่ 11,000 g ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที ทำการตกตะกอนโปรตีนตัวอย่างด้วย Methanol (MeOH) เพื่อให้ตัวอย่างมีความบริสุทธิ์ โดยการนำส่วนใสด้านบนของตัวอย่าง (supernatant) ปริมาณ 300 µl แยกใส่ vial สีชา จากนั้นเติมเมทานอลปริมาณ 900 µl ผสมลงไปในตัวอย่าง และสามารถเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์ต่อไป ก่อนวิเคราะห์ด้วยการฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) จำเป็นต้องมีการเติมอนุพันธุ์ให้โครงสร้างเคมีในตัวอย่าง (derivatization) ด้วยการนำสารละลายตัวอย่างปริมาณ 20 µl ทำปฏิกิริยาร่วมกับ 100 µl ของสารละลาย Phthaldialdehyde (OPA) เป็นเวลา 2 นาที และเขย่าให้สารละลายเข้ากันด้วย vortex จากนั้นจึงจะฉีดเข้าเครื่อง HPLC ได้

3.การประเมินความสามารถต้านอนุมูลอิสระ

จากคุณสมบัติของคาร์โนซีนในการประเมินความสามารถดักจับอนุมูลอิสระและแย่งจับกับไอออนของโลหะ (Nur Alam et.al., 2012) ตามที่ได้กล่าวข้างต้น ดังนั้นในการศึกษาเพื่อประเมินความสามารถในการแสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของคาร์โนซีนในเนื้อสุกร ทั้งสุกรลูกผสม CPK และ LLD จะอาศัยวิธีการวิเคราะห์ด้วยกัน 2 วิธี คือ DPPH และ Metal Chelating activity แต่ละตัวอย่างจะทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำต่อวิธีการวิเคราะห์ (triplicate replication)

3.1 การวิเคราะห์ความสามารถต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการทำลายอนุมูลอิสระดีพีพีเอช (DPPH scavenging activity) ได้ดัดแปลงมาจาก Brand-Williams et al. (1995) และ Onuh et al.(2014) เติมสารละลายอนุมูลอิสระ DPPH$^{\bullet}$ ถูกทำละลายด้วย MeOH เพื่อปรับให้สารละลาย DPPH$^{\bullet}$ มีความเข้มข้นอยู่ที่ 25 ppm DPPH$^{\bullet}$ การทำปฏิกิริยาเริ่มต้นที่ สารสกัดจากตัวอย่างในเมทานอลปริมาณ 100 µl เติมลงไปใน 100 µl ของ 25 ppm DPPH$^{\bullet}$ ในถาดหลุม 96-well plate จากนั้นตั้งทิ้งไว้เพื่อทำปฏิกิริยาในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนการเกิดปฏิกิริยา (A_{br}) และหลังเกิดปฏิกิริยากับตัวอย่าง (A_{ar}) ที่ความยาวคลื่น 517 nm การคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ DPPH radical scavenging activity ได้จากสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ inhibitory of DPPH radical} = \left[(A_{br} - A_{ar})/A_{br}\right] \times 100$$

3.2 การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยความสามารถแย่งจับกับโลหะหนัก (Metal chelating activity) ของคาร์โนซีนที่สกัดจากเนื้อสุกรโดยวิธีการมีการดัดแปลงมาจาก Onuh et al. (2014) โดย 50 µl ของสารละลายตัวอย่างผสมกับ 50 µl ของ 2 mM $FeCl_2$ และ 1.85 ml ของน้ำกลั่น ทำปฏิกิริยาร่วมกันในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลาย 5 mM ของ Ferrozine ปริมาณ 100 µl ลงไปในหลอดผสมให้เข้ากันเป็นอย่างดี ส่วนผสมของตัวอย่างและ ferrozine ถูกตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดของเหลวย้ายจากหลอดทำปฏิกิริยาปริมาณ 200 µl ลงในถาดหลุม 96 well- plate สำหรับกลุ่มควบคุม (blank experiment) กระทำโดยเติมน้ำกลั่นแทนตัวอย่างลงไปปริมาณ 1 ml จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงของกลุ่มควบคุม และตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 562 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer และความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักของตัวอย่างถูกคำนวณในรูป (% metal chelating effect) ดัง

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 6: 1396-1405 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.122.

สมการด้านล่าง

Metal chelating effect (%) = [(Ab- As)/Ab] X 100

โดยที่ Ab แสดงถึง ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม (blank)

As แสดงถึง ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง (sample)

4.การวิเคราะห์เชิงปริมาณของคาร์โนซีนด้วย HPLC

การตั้งค่าการวิเคราะห์โดย HPLC ดัดแปลงจาก Namgung et al. (2010) โดยการวิเคราะห์แยกสารประกอบที่สนใจในตัวอย่างด้วยเครื่อง HPLC (Agilent, 1100 series HPLC Value system) ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ เฟสอยู่กับที่ (stationary phase) หรือ คอลัมน์ (column) ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะใช้คอลัมน์ชนิด C18 (Hypersil, ODS 4.5 mm x 250 mm, 5μm) และอีกหนึ่งเฟส คือ เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ซึ่งประกอบด้วย 2 เฟส ได้แก่ เฟส A คือ 5 mM acetic acid ที่ pH 4.37 และเฟส B คือ Acetonitrile (MeCN): MeOH : Tetrahydrofuran (THF) ที่อัตราส่วน 70 : 25 : 5 ตามลำดับ โดยปรับอัตราการไหลของของเหลวที่ 1 มิลลิลิตรต่อนาที อัตราการเคลื่อนที่ของ mobile phase ในรูปแบบคงที่ตลอดการวิเคราะห์ (Isocratic elution program) ปริมาณคาร์โนซีนถูกวิเคราะห์ภายใต้เครื่องตรวจวัดสัญญาณโหมด fluorescence detector โดยตั้งค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่นในช่วง excitation 310 nm และ emission 375 nm โดยใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ 30 นาทีต่อตัวอย่าง การวิเคราะห์เชิงปริมาณของคาร์โนซีนอาศัยวิธีการสร้างกราฟมาตรฐานด้วยการใช้สารมาตรฐานชนิดเดียวกันกับสารที่สนใจ (External calibration curve method) โดยการสร้างกราฟความสัมพันธ์ของระดับความเข้มข้นของสารมาตรฐานคาร์โนซีนในเชิงเส้นตรง (linear regression สามารถเตรียมได้โดยการใช้สารมาตรฐาน crystalline L-carnosine (ความบริสุทธิ์ที่ 99%) ร่วมกับน้ำกลั่นบริสุทธิ์สูง ในช่วงความเข้มข้น 50 ppm ถึง 6,000 ppm

5.การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ตัวอย่างเนื้อจากสุกรทุกตัวจากทั้งสองกลุ่มถูกวิเคราะห์ หาปริมาณคาร์โนซีน จำนวน 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง โดย แสดงข้อมูลในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย ± ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± SEM) จากนั้นจึงนำมาการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี student T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และการทดสอบหาสหสัมพันธ์ (correlation analysis) ระหว่างระดับคาร์โนซีนของแต่ละสายพันธุ์ต่อความสามารถการต้านอนุมูลอิสระ ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้โปรแกรมสำเร็จรูป IBM SPSS Statistics (version 20) ในการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การศึกษาระดับคาร์โนซีนในเนื้อสุกร

Table 1 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โนซีนในกล้ามเนื้อ สันนอกบริเวณซี่โครง ซี่ที่ 10 และ 11 ระหว่างสุกรสายพันธุ์ ซีพี คูโรบูตะ (CP-Kurobuta; CPK) และสุกรลูกผสมสามสาย (Large-White x Landrace x Duroc; LLD)

Table 1 Carnosine concentration (mg/g) in muscle of Longissimus dorsi at rib 10th and 11th detected in CP-Kurobuta (CPK) and Large-White x Landrace x Duroc (LLD)

Breeds	CPK (n=10)	LLD (n=10)
Carnosine concentration (mg/g)	4.75 ± 0.25	7.76 ± 0.70*

Statistical analysis using t-test at 95% confidence interval. * Values in rows differ significantly ($p<0.05$). Data are presented as means ± SEM.

จากการศึกษาพบว่า ระดับปริมาณของคาร์โนซีนในกล้ามเนื้อสันนอก ของสุกรลูกผสมสามสาย LLD (7.76 ± 0.70 mg/g) มีปริมาณคาร์โนซีนสูงกว่าในสุกรซีพี คูโรบูตะ (4.75 ± 0.25 mg/g) อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ($P<0.05$) ระดับความแตกต่างของคาร์โนซีนระหว่างทั้งสองกลุ่มน่าจะเป็นผลมาจากอิทธิพลของพันธุกรรม ที่ส่งผลต่อระดับคาร์โนซีนในเนื้อเยื่อ ดังที่ Magowan et al. (2011) ได้ให้ข้อเสนอแนะว่า สายพันธุ์สุกรมีอิทธิพลต่อคุณภาพเนื้อเป็นอย่างยิ่ง รวมถึงเพศ โภชนาการ ชนิดของกล้ามเนื้อ และการจัดการกระบวนการเชือดชำแหล่ะ ในอีกด้านหนึ่ง จากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบระดับคาร์โนซีนในกล้ามเนื้อสันนอก สุกรสายพันธุ์ Berkshire ที่สูงกว่าสุกรพันธุ์ผสม (Landrace x Yorkshire X Duroc; LYD) (Subramaniyan et al., 2016) ส่วน Straadt et al. (2014) พบว่า สุกรพันธุ์ผสม Duroc x Landrace x Yorkshire มีระดับคาร์โนซีนน้อยกว่าพันธุ์ผสม Black Footed Iberian X Duroc และพันธุ์ผสมระหว่าง Mangalitza X Duroc จากรายงานฉบับล่าสุดพบว่า คาร์โนซีนในกล้ามเนื้อ Longissimus dorsi สูงที่สุดในสุกรสายพันธุ์ดูร็อก (2.94 ± 0.05 mg/g) มากกว่าสายพันธุ์ยอร์กเชียร์ (2.84 ± 0.04 mg/g) และสายพันธุ์แลนด์เรซ (2.74 ± 0.02 mg/g) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (D'Astrous – Page et al., 2017)

จากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่าระดับคาร์โนซีนในเนื้อสุกรซีพี คูโรบูตะ ที่มีการพัฒนาจากสุกรสายพันธุ์เบิร์กเชียร์น้อยกว่าสุกรลูกผสมสามสาย มีความเป็นไปได้จากชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน จากรายงานพบว่า ในสุกรสายพันธุ์เบิร์กเชียร์มีองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ type I (red fiber) มากกว่าสายพันธุ์ผสมสามสาย (Landrace Yorkshire Duroc) ในขณะที่สุกรลูกผสมสามสายมีองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อ type II (white fiber) สูงกว่าสุกรสายพันธุ์เบิร์กเชียร์ (Ryu et al., 2008) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยที่ศึกษาในมนุษย์พบว่า fiber type II (white) หรือ กล้ามเนื้อกระตุกเร็ว (fast-twitch) มีระดับคาร์โนซีนมากกว่า 30 -100 % เมื่อเทียบกับไฟเบอร์ type I (red) หรือกล้ามเนื้อกระตุกช้า (slow-twitch) จากการวิเคราะห์ HPLC (Harris et al., 1998) นอกเหนือจากนี้ บริเวณตำแหน่งของกล้ามเนื้อที่นำมาวิเคราะห์ที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อต่างกัน สัดส่วนไขมันแทรกในกล้ามเนื้อที่แตกต่างกัน เนื่องจากการสังเคราะห์คาร์โนซีนสัมพันธ์กับสัดส่วนของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (Hipkiss et al., 2009; Manhiani et al., 2013) แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า คาร์โนซีนที่พบในกล้ามเนื้อสันนอก ของทั้งสองสายพันธุ์มีช่วงความเข้มข้นตั้งแต่ 327 ถึง 583 mg/ 100 g ในเนื้อสุกรซีพี คูโรบูตะ และ 531 ถึง 1,119 mg/ 100 g ในเนื้อสุกรลูกผสมสามสาย ซึ่งสูงกว่าในกล้ามเนื้อชนิดเดียวกันในสุกรต่างสายพันธุ์ ที่เคยรายงานก่อนหน้านี้ ซึ่งพบอยู่ที่ 324.24 ± 22.88 mg/ 100g (Mora et al., 2008) และ 313 mg/ 100 g (Hipkiss, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณความเข้มข้นของคาร์โนซีนที่พบในสุกรแต่ละตัวมีแปรปรวนค่อนข้างสูง สอดคล้องกับรายงานวิจัยอื่น ๆ ได้แก่ ในมนุษย์, อายุ, เพศ ชนิดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เป็นองค์ประกอบ (Dunnett et al., 1997, 1999; Mora et al., 2008; Baguet et al., 2012) ในอีกมุมหนึ่ง สิ่งที่น่าสนใจพบว่าในทุกๆ ตัวอย่างกล้ามเนื้อสันนอกหรือ Longissimus dorsi ของสุกรสายพันธุ์ ซีพี คูโรบูตะ เมื่อสังเกตโครมาโตรแกรมพบว่าพีคของคาร์โนซีนที่เราสนใจมีการซ้อนกัน และแบ่งพีคออกเป็น 2 ส่วน (**Figure 1**) ซึ่งพีคที่ลูกศรชี้นาทีที่ 15.125 คือ คาร์โนซีน ในขณะที่พีคที่มีลูกศรเส้นประสันนิษฐานว่า เกิดจากอนุพันธุ์ของคาร์โนซีนอีกชนิดหนึ่ง หรือที่เรียกว่า anserine ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นไดเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติสามารถละลายน้ำได้สูง ดังนั้น วิธีการวิเคราะห์ภายใต้เครื่อง HPLC ในคอลัมน์บางชนิดไม่สามารถแยกพีคของสารสองชนิดนี้ออกจากกันได้ (Mori et al., 2015) ในขณะที่ในตัวอย่างของเนื้อสุกรลูกผสมสามสายพบพีคลักษณะดังกล่าวเพียง 5 ตัวอย่างเท่านั้น (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จากรายงานวิจัยพบว่า ทั้งคาร์โนซีนและแอนเซอร์รีนเมื่ออยู่ในรูปของอาหารเสริม พบว่ามีผลช่วยชะลอการเกิดปัญหาทางด้านความทรงจำและการทำงานของสมองก่อนวัย (cognitive function ederly) (Szczesniak et al., 2014.) และจากรายงานฉบับล่าสุดพบว่า ในกลุ่มคนสูงวัยที่มีสุขภาพดีเมื่อได้รับสารเสริมของคาร์โนซีนและแอนเซอร์รีน ปริมาณ 1.0 กรัมของ แอนเซอร์รีน/ คาร์โนซีน (3:1) เป็นเวลา 3 เดือน สามารถลดการแสดงออกของ Inflammatory Chemokine CCL24 ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่ม

แก่นเกษตร 48 ฉบับที่ 6: 1396-1405 (2563)./doi:10.14456/kaj.2020.122.

คนสูงวัย ($p < 0.05$) ซึ่งอาจช่วยฟื้นฟูความทรงจำต้านหรือชะลอการเกิดภาวะ Alzheimer (Yoshinori et al., 2017) ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่าในเนื้อสุกรสายพันธุ์ซีพี คูโรบูตะ มีโอกาสพบไดเปปไทด์ทั้งสองชนิด ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ ไม่ได้ครอบคลุมวิเคราะห์ anserine เพื่อยืนยันลักษณะที่ปรากฏ เนื่องจากไม่มีสารมาตรฐานของสารชนิดนี้

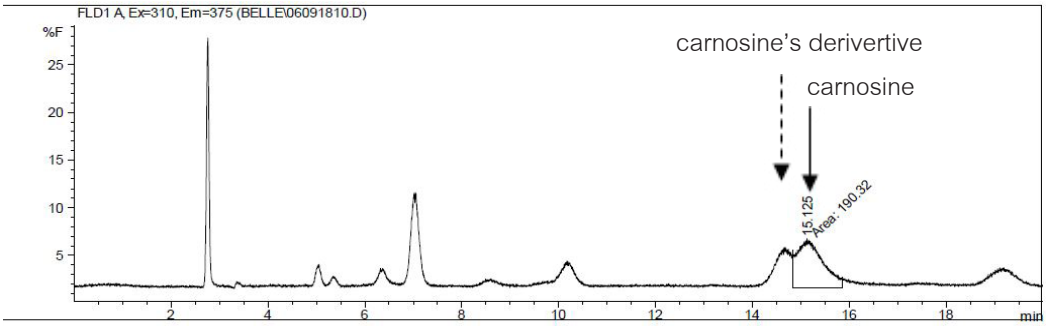

Figure 1 Chromatogram of carnosine extracted examined in Longissimus dorsi muscle of CP Kurobuta number 5

การวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากเนื้อสุกร ในสารสกัดคาร์โนซีนจากตัวอย่างเนื้อสุกร ถูกแสดงรูปของเปอร์เซ็นต์การยับยั้งจากการคำนวณ free radical scavenging activity และ Metal Chelating Activity พบว่าความสามารถในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในทั้งสองสายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) (**Table 2**) อย่างไรก็ตาม แนวโน้มในความสามารถในการแย่งจับโลหะหนักในเนื้อสุกร ซีพี คูโรบูตะ พบว่า สูงกว่าสุกรลูกผสมสามสายเล็กน้อย

Table 2 Evaluation of antioxidant activity using DPPH and Metal chelating activity in pork (10 samples per breed)

Breed	CP Kurobuta (CPK)	Three crossbred (LLD)
DPPH (%)	21.23 ± 2.99	21.29 ± 2.28
Metal Chelating Activity (%)	63.09 ± 6.24	56.59 ± 6.49

Statistical analysis using t-test at confidence interval 95% to compare mean of antioxidant activity percentage.
Data are expressed as mean ± SEM (n = 10).

ถึงแม้ว่าระดับคาร์โนซีนที่พบในกล้ามเนื้อสันนอกของสุกร ซีพี คูโรบูตะ จะน้อยกว่าในสุกรลูกผสมสามสาย แต่การแสดงออกของความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลมาจาก สารอนุพันธุ์ในตัวอย่างของ สุกรซีพี คูโรบูตะ ที่คาดว่าเป็น anserine สามารถแสดงความเป็นสารต้านอนุมูลอิสระได้เช่นเดียวกับ carnosine จากรายงานวิจัยพบว่า anserine ในกล้ามเนื้ออกไก่ สามารถออกฤทธิ์ใกล้เคียงกับ carnosine ดังนั้น anserine สามารถแสดงออกถึงการเสริมฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระร่วมกับ carnosine ในสารสกัดจากตัวอย่างเดียวกันหรือ synergistic effect (Boldyrev et al., 1988)

ระดับความเข้มข้นของคาร์โนซีนมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการทำลายอนุมูลอิสระ DPPH ในเชิงบวกเล็กน้อย ในขณะที่มีระดับคาร์โนซีนในเนื้อสันนอกมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความสามารถในการแย่งจับโลหะหนัก และพบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างระดับคาร์โนซีนที่พบในกล้ามเนื้อกับการแสดงออกของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระทั้งสองวิธีการ ($p > 0.05$) (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ความเป็นไปได้จากความแปรปรวนในกลุ่มตัวอย่างชนิดเดียวกันค่อนข้างสูง คือช่วงความผันแปรกว้างของเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง DPPH ในเนื้อสุกร CPK พบค่า เปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุดและสูงสุดที่ 14.39% และ 41.04% ตามลำดับ ส่วนเนื้อสุกร LLD พบค่าเปอร์เซ็นต์การดักจับอนุมูลอิสระต่ำที่สุดและสูงสุดที่ 14.77% และ 32.9% ตามลำดับ ในการทดสอบความสามารถดักจับโลหะหนักในเนื้อสุกร CPK พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การดักจับโลหะหนัก ต่ำที่สุดและสูงสุดที่ 35.42% และ 90.02% ตามลำดับ เช่นเดียวกับผลการทดสอบในสุกร LLD พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์การดักจับโลหะหนัก ต่ำที่สุดและสูงสุดที่ 30.47% และ 85.22% ความผันแปรของผลการวิเคราะห์สัมพันธ์กับตำแหน่งของตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ เช่นเดียวกับระดับคาร์โนซีนในกล้ามเนื้อ และรวมถึงสัดส่วนของไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อมีไขมันในตัวอย่างมาก ก่อให้เกิดความแปรปรวนของการวัดค่าความสามารถการแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระได้

สรุป

ผลการศึกษาเปรียบเทียบระดับเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (คาร์โนซีน) ระหว่างกล้ามเนื้อสันนอกของสุกรซีพี คูโรบูตะ (CPK) และสุกรลูกผสมสามสาย (LLD) พบว่า กล้ามเนื้อสันของสุกรลูกผสมสามสาย มีปริมาณคาร์โนซีนเป็นองค์ประกอบสูงกว่าเนื้อสุกรซีพี คูโรบูตะ (CP-Kurobuta; CPK) แต่เนื้อสุกรทั้งสองกลุ่มมีความสามารถการแสดงฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบเพิ่มเติม เช่น ระดับไดเปปไทด์ต่างๆ ที่สามารถแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเช่นเดียวกับคาร์โนซีนด้วย

ผลประโยชน์ทับซ้อน (conflict of interest)

งานวิจัยนี้ไม่มีผลประโยชน์ทับซ้อน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนการสนับสนุนจากสถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์ และการสนับสนุนทางห้องปฏิบัติการและให้คำปรึกษางานวิจัยโดย ผศ. ดร. กนิฐพร วังใน ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

เอกสารอ้างอิง

Ahhmed, A.M., and M. Muguruma. 2010. A review of meat protein hydrolysates and hypertention. Meat Sci. 86: 110 – 118.

Baguet, A., I. Everaert, E. Achten, M. Thomis, and W. Derave. 2012. The influence of sex, age and heritability on human skeletal muscle carnosine content. Amino Acids. 43: 13 – 20.

Brand – Williams, W., M.E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluation antioxidant activity. Lebensm. Wiss. U. Technol. 28: 25 – 30.

Boldyrev, A. A., A. M. Dupin, E. V. Pindel, and S. E. Severin. 1988. Antioxidative properties of histidine-containing dipeptides from skeletal muscles of vertebrates. Comp. Biochem. Physiol. B. 89: 245 – 250.

Boldyrev, A. A., G. Aldini, and W. Derave. 2013. Physiology and pathophysiology of carnosine. Physiol. Rev. 93: 1803 – 1845.

D'Astrous-Page, J., C. Gariepy, R. Blouin, S. Clicha, B. Sullivan, F. Fortin, and M.F. Palin. 2017. Carnosine content in the porcine *longissimus thoracis* muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression. Meat Sci. 124: 84 – 94.

Dunnett, M., and R. C. Harris. 1997. High-performance liquid chromatographic determination of imidazole dipeptides, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine in equine and camel muscles and individual fibres. J. Chromatogr B. 688: 47 – 55.

Harris, R.C, M. Dunnett, and P.L. Greenhaff. 1998. Carnosine and taurine contents in individual fibres of human vastus lateralis muscle. J. Sports Sci. 16: 639 – 643.

Hipkikss, A. R. 2009. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. Adv. Food Nutr. Res. 57: 87 – 154.

Intarapichet, K., and B. Maikhunthod. 2005. Genotype and gender differences in carnosine extracts and antioxidant activities of chicken breast and thigh meats. Meat Sci. 71: 634 – 642.

Jayasena, D. D., S. Jung, Y. S. Bae, H. B. Park, J.H. Lee, and C. Jo. 2015. Comparison of the amounts of endogenous bioactive compounds in raw and cooked meats from commercial broilers and indigenous chickens. J. Food Compos. Anal. 37: 20 – 24.

Jung, S., Y. S. Bae, H.J. Kim, D.D. Jayasena, J.H. Lee, H. B. Park, K.N. Heo, and C. Jo. 2013. Carnosine, anserine, creatine, and inosine 5′-monophosphate contents in breast and thigh meats from 5 lines of Korean native chicken. Poult. Sci. 92: 3275 – 3282.

Kim, S.K., D. Kwon, D.A. Kwon, I. K. Paik, and J.H. Auh. 2014. Optimizing carnosine containing extract preparation from chicken breast for anti-glycating agents. J. Food Sci An. 34: 127 – 132.

Magowan, E., B. Moss, A. Fearom, and E. Ball. 2011. Effect of Breed, Finish Weight and Sex on Pork Meat and Eating quality and Fatty Acid Profile. Agri-Food and Bioscience Institute, Belfast, UK.

Manhiani, P.S., J.K. Northcutt, L. Han, W.C. Bridges, and P.L. Dawsom. 2013. Antioxidant actvity of carnosine extraction from various poultry tissues. Poult. Sci. 92: 444 – 453.

Mora, L., M.A. Sentandreu, and F. Toldra. 2008. Carnosine content in the porcine longissimus thoracis muscle and its association with meat quality attributes and carnosine-related gene expression. Meat Sci. 79: 709 – 715.

Mori, M., D. Mizuno, K. Konoha-Mizuno, Y. Sadakane, and M. Kawahara, 2015. Quantitative analysis of carnosine and asserine in foods by performing high performance liquid chromatography. Biomed. Res. Trace Elem. 26: 147 – 152.

Namgung, N., D. H. Shin, S. W. Park, and I. K. Paik. 2010. Effects of supplementary blood meal on carnosine content in the breast meat and laying performance of old hens. Asian Austral J. Anim. 23: 946 – 951.

Nur Alam, M.D., N.J. Bristi, and M.D. Rafiquzzaman. 2012. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. Saudi Pharm. J. 21: 143 – 152.

Onuh, J.O., A.T. Girgih, R.E. Aluko, and M. Aliani. 2014. *In vitro* antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. Food Chem. 150: 366 – 373.

Ryu, Y.C., Y.M. Choi, S.H. Lee, H.G. Shin, J.H. Choe, J.M. Kim, K.C. Hong, and B.C. Kim. 2008. Comparing the histochemical characteristics and meat quality traits of different pig breeds. Meat Sci. 80: 363 – 369.

Szczesniak, D., S. Budzen, W. Kopeć, and J. Rymaszewska. 2014. Anserine and carnosine supplementation in the elderly: Effects on cognitive functioning and physical capacity. Arch Gerontol Geriat. 59: 485 – 90.

Srikanchai, T., and W. Watcharananun. 2017. Aroma active compounds differences of roasted pork from CP – KuroButa pig and Three Crossbred pig (Large – White X Landrace X Duroc). Panyapiwat Jl. 219 – 231.

Straadt, I. K., M. D. Aaslyng, and H.C. Bertram. 2014. An NMR-based metabolomics

study of pork from different cross-breeds and relation to sensory perception. Meat Sci. 96: 719 – 728.

Subramaniyan, S.A., Kang, D.R., Belal, S.A., Cho, E.S.R., Jung, J.H., Jung, Y.C., Choi, Y., and Shim, K.S. 2016. Meat quality and physicochemical trait assessments of Berkshire and Commercial 3-way crossbred pigs . Korean J. Food Sci . Anim. Res. 36: 641 – 649.

Yoshinori, K., T. Mamoru, I. Etsuko, M. Hiroshi, and H. Tatsuhiro. 2017. Anserine/Carnosine Supplementation Suppresses the Expression of the Inflammatory Chemokine CCL24 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elderly People. Nutrients. 9: 1 – 11.