มนัสวี ขันธสม : การผลิตเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินจากหนังปลาสวายโมง (PRODUCTION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY PEPTIDES DERIVED FROM THAI PANGA SKIN) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 120 หน้า.

หนังปลาสวายโมงจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเนื้อปลาสวายโมงแล่แช่แข็งซึ่งปกติถูกทิ้งหรือแปรรูปเป็นอาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำ การผลิตเปปไทด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินเป็นแนวทางหนึ่งในการนำหนังปลาสวายโมงมาใช้ประโยชน์อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับหนังปลาสวายโมง การนำหนังปลามาใช้เป็นสารตั้งต้นยังไม่มีการศึกษามากนัก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินของโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผลิตจากหนังปลาสวายโมงในรูปแบบต่าง ๆ 3 รูปแบบ ได้แก่ หนังปลาที่ผ่านการกำจัดไขมัน หนังปลาที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายด่างและกรด และเจลาติน โดยถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด 6 ชนิด ได้แก่ แอลคาเลส เพปซิน ทริปซิน โปรตาเมกซ์ และโปรติเอสจากเชื้อ *Virgibacillus halodenitrificans* SK 1-3-7 วัดระดับการย่อยสลายและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินที่ 12 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าชนิดของโปรติเอส และรูปแบบของสารตั้งต้นมีอิทธิพลต่อระดับการย่อยสลายและการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินของโปรตีนไฮโดรไลเสท (P<0.05) ค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินจำเพาะสูงที่สุด คือ ร้อยละ 4.9 ต่อไมโครกรัมไกลซีนสมมูล ในตัวอย่างหนังปลาที่แช่ด้วยสารละลายด่างและกรดที่ย่อยด้วยเพปซิน ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการย่อยสลาย และค่ากิจกรรมการยับยั้งมีค่าสูงที่สุดเมื่อย่อยเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวใกล้เคียงกับที่ย่อยเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (P>0.05) โปรตีนไฮโดรไลเสทที่ย่อยด้วยเพปซินเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจึงถูกนำมาแยกด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน โดยใช้เยื่อกรองขนาด 30 5 และ 1 กิโลดาลตันตามลำดับ โปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีขนาดเล็กกว่าเยื่อกรองขนาด 1 กิโลดาลตันแสดงค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินสูงที่สุด คือ ร้อยละ 49.8 ที่ความเข้มข้นเปปไทด์ 25 ไมโครกรัมสมมูลไกลซีนต่อมิลลิลิตร และเมื่อนำส่วนดังกล่าวมาแยกต่อด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบและแบบแยกตามขนาด ตามลำดับ เปปไทด์หลังจากทำบริสุทธิ์บางส่วนแสดงค่าการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินคิดเป็นร้อยละ 53.8 ที่ความเข้มข้นเปปไทด์ 25 ไมโครกรัมสมมูลไกลซีนต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเปปไทด์ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินร้อยละ 50 (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 19 ไมโครกรัมสมมูลไกลซีนต่อ

มิลลิลิตร ผลการวิเคราะห์ LC-MS/MS พบว่าตัวอย่างหลังจากการแยกด้วยโครมาโทกราฟฟี่ตามขนาดประกอบด้วยเปปไทด์ที่มีกรดอะมิโนชนิดที่ไม่มีขั้ว (ลิวซีนและวาลีน) กรดอะมิโนชนิดที่มีวงแหวน (ทริปโตแฟน และไทโรซีน) หรืออาร์จินีน ที่ตำแหน่งสุดท้ายของสายเปปไทด์ เปปไทด์เหล่านี้มีขนาดมวลโมเลกุลอยู่ระหว่าง 0.7-1.5 กิโลดาลตัน การยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินลดลงร้อยละ 30 หลังผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง ผลการทดลองบ่งชี้ว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีสมบัติการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินสามารถผลิตได้จากหนังปลาสวายโมงที่ผ่านการแช่ด้วยสารละลายด่างและกรด และย่อยด้วยเพปซิน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

MANATSAWEE KHUNTASOM : PRODUCTION OF ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY PEPTIDES DERIVED FROM THAI PANGA SKIN. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 120 PP.

THAI PANGA SKIN/ANGIOTENSIN CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDE/PROTEIN HYDROLYSATE

Thai Panga (*Pangasius hypopthalmus* × *P. bocourti*) (*Pangasius hypopthalmus* × *P. bocourti*) skin is a by-product of the frozen fillet industry which is normally discarded or converted into low-value animal feed. The production of ACE inhibitory peptides may be an efficient utilization that can increase the value of Thai Panga skin. The use of whole skin as a substrate has not yet been fully investigated. The objective of this study was to compare the ACE inhibitory activity of protein hydrolysate produced from different forms of Thai Panga skin. Three forms of Thai Panga skin, namely defatted, alkaline-acid pretreated and gelatin, were used as a substrate for hydrolysis by 6 proteases including Alcalase, pepsin, trypsin, papain, Protamex, and protease from *Virgibacillus halodenitrificans* SK 1-3-7. The degree of hydrolysis (DH) and ACE inhibitory activity at 12 h were measured. It was shown that the type of protease applied and substrate influenced DH and ACE inhibition ($P<0.05$). The highest specific ACE inhibitory activity of 4.9%/μg Gly equivalent (eq.) was obtained from the pepsin-hydrolyzed alkaline-acid pretreated skin. ACE inhibitory activity increased with hydrolysis time and showed the highest ACE inhibition at 12 h. However, it was comparable to that obtained at 2-h hydrolysis. The hydrolysate of pepsin at 2 h was subjected to sequential ultrafiltration membrane fractionation using

30-kDa, 5-kDa and 1-kDa molecular weight cut-off, respectively. Permeate obtained from the 1-kDa membrane showed the highest ACE inhibition of 49.8% at 25 µg Gly eq./mL. This active fraction was further fractionated using anion exchange chromatography and size-exclusion chromatography, respectively. The partially purified peptides showed ACE inhibitory activity of 53.8% at 25 µg Gly eq./mL with an IC_{50} of 19 µg Gly eq./mL. LC-MS/MS analysis revealed that potent fraction from size-exclusion chromatography contained peptides with hydrophobic (Leu or Val), aromatic (Trp or Tyr) residues or Arg at the ultimate position of peptides. The peptides exhibited molecular mass between 0.7 and 1.5 kDa. The ACE inhibitory activity of the partially-purified peptides decreased approximately 30% after *in vitro* simulated pepsin-pancreatin digestion. The results suggested that hydrolysate possessing ACE inhibitory activity can be produced using alkaline-acid pretreated Thai Panga skin hydrolyzed by pepsin.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2014 Advisor's Signature_____