ชมภูนุช วิริยะพันธ์ : การผลิตและการศึกษาลักษณะเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันจากวัสดุเหลือทิ้งจากซูริมิโดยใช้เอนไซม์ (PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDES DERIVED FROM ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SURIMI WASTES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 205 หน้า.

ในกระบวนการผลิตซูริมิมีวัสดุเหลือทิ้งที่เป็นของแข็งจำนวนมาก การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นแนวทางหนึ่งในการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าของวัสดุเหลือทิ้งเหล่านี้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากวัสดุเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมิจากปลาทรายแดง รวมถึงก้าง กระดูก และ เศษหนัง และวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการกำจัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยใช้โปรติเนสแหล่งใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 และโปรติเนสทางการค้า คือ เพปซิน ทริปซิน และ อัลคาเลส โปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูกและเศษหนังที่ผ่านการย่อยโดยเพปซินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงที่สุด จากการทดสอบด้วยอนุมูลอิสระ 2, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็กเฟอริค และความสามารถในการยับยั้งการฟอกสีของเบต้าแคโรทีน โปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูก และเศษหนังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากของเหลือทิ้งจากกระบวนการกำจัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ($p<0.05$) อย่างไรก็ตาม โปรตีนไฮโดรไลเสทจากวัตถุดิบทั้งสองแหล่ง สามารถป้องกันเซลล์ HepG2 จากออกซิเดชันที่เหนี่ยวนำโดยเทอร์-บิวทิลไฮโดรเพอร์ออกไซด์ (*tert*-butyl hydroperoxide: TBHP) ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$)

แยกโปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูก และเศษหนังที่ผ่านการย่อยโดยโปรติเนส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) และแยกตามขนาด (size exclusion chromatography) หลังจากแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีตามขนาดได้เพปไทด์ 3 ส่วน คือ B1 B2 และ B3 โดยเพปไทด์ B3 มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS และมีสมบัติรีดิวซ์เหล็กสูงสุด ในขณะที่ส่วน B2 และ B3 มีความสามารถเด่นในการจับกับเหล็กและอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ ส่วนเพปไทด์ในส่วน B1 และ เพปไทด์สังเคราะห์ (FLGSFLYEYSR) ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเพปไทด์จากส่วน B3 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HepG2

แยกโปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูก และเศษหนังที่ผ่านการย่อยโดยโปรติเนสจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33 ด้วยเทคนิคอัลตราฟิลเตชันได้ 4 ส่วน คือ FBSH-I (>30

kDa) FBSH-II (5-30 kDa) FBSH-III (1-5 kDa) และ FBSH-IV (<1 kDa) FBSH-III มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงสุดโดยตรวจสอบด้วยอนุมูลอิสระทางเคมีและชีวภาพ ความเข้มข้นของเพปไทด์ FBSH-III ในช่วง 25 ถึง 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถป้องกันเซลล์ตายจากการเหนี่ยวนำความเป็นพิษโดย TBHP และสามารถยับยั้งการซึมออกของเอนไซม์ แลคเตต ดีไฮโดรจีเนส (Lactate dehydrogenase: LDH) และยับยั้งการผลิตอนุมูลอิสระในเซลล์ Caco-2 นอกจากนี้ FBSH-III ยังคงแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลหลังจากผ่านการให้ความร้อน (40-121 องศาเซลเซียส) ความเป็นกรดด่าง (pH 2.0-10.0) และหลังการย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารแบบจำลอง ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าก้าง กระดูก และเศษหนังมีศักยภาพเป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และอาจใช้เป็นผลิตภัณฑ์โภชนเภสัชได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

CHOMPOONUCH WIRIYAPHAN : PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF ANTIOXIDANT PEPTIDES DERIVED FROM ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SURIMI WASTES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWADIGUL, Ph.D., 205 PP.

SURIMI WASTES/THREADFIN BREAM/*VIRGIBACILLUS* SP. SK33/PEPTIDES/ PROTEIN HYDROLYSATE/ANTIOXIDANT ACTIVITY/CYTOPROTECTIVE EFFECT

A large amount of solid waste is generated in surimi production. Production of protein hydrolysate with antioxidant properties is one approach to fully utilize and increase the value of this waste. The objectives of this study were to produce protein hydrolysates with antioxidant properties from threadfin bream surimi waste, including frame, bone and skin (FBS) and refiner discharge (RD) using proteinases from a novel source, *Virgibacillus*sp. SK33, and commercial proteinases: pepsin, trypsin and Alcalase. Pepsin-hydrolyzed FBS showed the highest antioxidant activity based on 2, 2'-azinobis (3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) radical scavenging, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and inhibition of β-carotene bleaching assays. FBS hydrolysates showed higher antioxidant activity based on chemical assays than their RD counterparts. However, FBS and RD hydrolysates protected HepG2 cells against *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP)-induced oxidative damage to a similar extent.

FBS protein hydrolysates prepared from *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase was further 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 ABTS scavenging activity and FRAP value, while metal chelation and hydroxyl radical scavenging ability were distinctive in fractions 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 (H_2O_2).

FBS hydrolysate prepared from *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase was fractionated using ultrafiltration membranes into four fractions, namely FBSH-I (>30 kDa), FBSH-II (5-30 kDa), FBSH-III (1-5 kDa), and FBSH-IV (<1 kDa). FBSH-III showed the highest antioxidant activity based on chemical and biological assays. At 25-200 µg/ml, FBSH-III showed a protective effect against TBHP-induced cytotoxicity Caco-2 cells. It also inhibited lactate dehydrogenase (LDH) leakage and intracellular reactive species (ROS) production in Caco-2 cells. Furthermore, this fraction retained antioxidant activity after various thermal (40-121 °C) and pH treatments (pH 2.0-10.0) as well as *in vitro* simulated gastrointestinal (GI) digestion. This study suggests that FBS could be a potential source for antioxidant peptides production and therefore could be developed as a promising nutraceutical product.

School of Food Technology Student's Signature _____

Academic Year 2013 Advisor's Signature _____