

พรพิมล สังข์เพิ่ม : คุณสมบัติทางเคมีกายภาพและเพปไทด์ยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซินของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและหนังปลาควักบึกอูย (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)

อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล, 97 หน้า.

หนังปลานิลและหนังปลาควักบึกอูยคือผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อปลาซึ่งปกติแล้วนำไปผลิตเป็นอาหารสัตว์ที่มีมูลค่าต่ำ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ ศึกษาคุณสมบัติเคมีกายภาพของคอลลาเจนที่สกัดได้จากหนังปลานิล และหนังปลาควักบึกอูย รวมถึงผลิตเพปไทด์ที่มีความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซิน โดยโปรตีนส ผลิตผล (Yield) ของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาควักบึกอูยที่สกัดด้วยกรดมีค่าเท่ากับ 58.9% และ 48.0 % ต่อน้ำหนักหนังปลาแห้งตามลำดับ กรดอะมิโนหลักของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองชนิดคือ ไกลซีน โพรลีน และไลซีน ความสามารถในการละลายของคอลลาเจนจากหนังปลานิลและปลาควักบึกอูยมีค่าสูงสุดที่พีเอช 3 และความสามารถในการละลายลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อมีเกลืออยู่ในสารละลายมากกว่าหรือเท่ากับ 3% การสูญเสียสภาพธรรมชาติเมื่อวิเคราะห์ด้วย Differential scanning calorimetry (DSC) พบว่า อุณหภูมิในการเสียสภาพ (T_d) ของคอลลาเจนหนังปลานิลและหนังปลาควักบึกอูยในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 0.05 โมลาร์เท่ากับ 36.42 และ 35.15 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิในการสูญเสียสภาพของคอลลาเจนในน้ำปราศจากไอออนคือ 47.12 และ 38.27 องศาเซลเซียสตามลำดับ ผลจากวิเคราะห์รูปแบบเพปไทด์ (peptide mapping) แสดงให้เห็นว่าการจัดเรียงตัวของลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างของคอลลาเจนหนังปลานิลและปลาควักบึกอูยนั้นแตกต่างกัน รูปแบบของสเปกตรัม (spectra) จากฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด (Fourier transform-infrared spectroscopy) ของคอลลาเจนหนังปลานิลและปลาควักบึกอูยคล้ายคลึงกับคอลลาเจนจากหนังลูกวัว แสดงว่าโครงสร้างของคอลลาเจนจากหนังปลาทั้งสองชนิดเป็น คอลลาเจนชนิดที่ 1 (Type I) และคอลลาเจนจากปลาทั้งสองชนิดยังคงสภาพของโครงสร้างทุติภูมิ

จากการเปรียบเทียบไฮโดรไลเสทของคอลลาเจนหนังปลานิลและหนังปลาควักบึกอูยจากการย่อยด้วยเพปซิน อัลคาเลส ทริปซินและโปรตีเนสจาก *Vigibacillus* sp. SK 39 พบว่าไฮโดรไลเสทจากเพปซินมีความสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอนจิโอเทนซินได้สูงสุดที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysate) 30% ผลจากการแยกไฮโดรไลเสทด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง สามารถจำแนกได้สามส่วนคือส่วนที่มีขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ขนาดระหว่าง 5-30 กิโลดาลตัน และขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน ไฮโดรไลเสทที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดง

กิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซินสูงที่สุด และความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์แอนจิโอเทนซิน 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 9.01 ± 0.04 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน) ต่อมิลลิลิตร เมื่อนำส่วนที่ผ่านเยื่อกรองมาทำบริสุทธิ์ด้วยวิธีการแลกเปลี่ยนประจุ (Ion exchange chromatography) และการแยกตามขนาดโมเลกุล (Gel filtration) เปปไทด์หลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลสามารถยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซินได้ 72.06% ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม สมมูลไกลซีน ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-Tandem mass spectrometry ของเปปไทด์ที่มีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซินสูงสุดประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนและไกลซีนที่ปลายสายคาร์บอกซิลของเปปไทด์ (C-terminus) และกรดอะมิโนด้านปลายสายอะมิโน (N-terminus) ส่วนมากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นคาร์บอนสายตรง (Aliphatic amino acid)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคุณสมบัติทางเคมีกายภาพของหนังปลาจากปลานิลและปลาชุกชีก้อยไม่แตกต่างกัน และมีศักยภาพในการเป็นแหล่งคอลลาเจนทางเลือกแทนหนังโคและสุกร นอกจากนี้ไฮโดรไลสเสทจากหนังปลาชุกชีก้อยที่ได้จากเอนไซม์เพปซินแสดงกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์แอนจิโอเทนซิน ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีคุณสมบัติควบคุมความดันโลหิตสูง



PORNPIMOL SUNGPERM : 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
THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL,
Ph.D., 97 PP.

PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES/FISH COLLAGEN / ANGIOTENSIN I
CONVERTING ENZYME INHIBITORY PEPTIDE

Skins of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and hybrid catfish (*C. macrocephalus* × *C. gariepinus*) are byproducts of fish processing and are normally turned into low value fish meal. The objectives of this study were to investigate and compare the physico-chemical properties of collagen extracted from tilapia skin (TS) and hybrid catfish skin (HS). In addition, the study aimed to produce angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides using suitable proteinase. The yield of collagen from TS and HS by acid extraction was 58.9 and 48.0% of dried skin, respectively. Major amino acids of both collagens were glycine, proline and lysine. The maximum solubility of the collagens from TS and HS was at pH 3, whereas the solubility of both collagens rapidly decreased at $\geq 3\%$ NaCl. Differential scanning calorimetry (DSC) revealed that denaturation temperature (T_d) of TS and HS collagens in the presence of 0.05 M acetic acid was at 36.42 and 35.15°C, while those dissolved in deionized water (DI) were at 47.12 and 38.27°C, respectively. Based on peptide mapping, TS and HS collagen showed differences in amino acid sequences and collagen

conformation as compared to calf collagen. The Fourier transform- infrared (FT-IR) spectra of TS and HS collagen were similar to that of calf collagen, suggesting that a native conformation of TS and HS was classified as type I collagen. Their secondary structure remained.

TS and HS collagen hydrolysates were obtained using pepsin, Alcalase, trypsin and proteinase from *Vigibacillus* sp. SK 39. Pepsin produced peptides exhibiting the highest ACE inhibitory activity with a degree of hydrolysis (DH) of 30%. The hydrolysate 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 IC_{50} of 9.01 ± 0.04 μ g (glycine equivalent)/ml. The ultrafiltered fraction was further purified using ion exchange chromatography and gel filtration. The pooled fraction after gel filtration showed ACE inhibitory activity at 72.06% at 0.2 μ g 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 collagen from tilapia and hybrid catfish skin showed comparable physico-chemical characteristics and could provide potential alternative resources for collagen. In addition, ACE inhibitory peptides derived from HS collagen could be developed as a functional food with antihypertensive property.

School of Food Technology

Academic Year 2012

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____