บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมง โดยศึกษาการใช้ประโยชน์โปรตีนจากน้ำล้างเนื้อปลา การผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยสลายเอนจิโอเทนซิน (Angiotensin converting enzyme, ACE) และโปรตีนไฮโดรไลเสทที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากวัสดุเหลือทิ้งของกระบวนการผลิตซูริมิรวมถึงก้าง กระดูก และ เศษหนัง และวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการกำจัดเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยใช้โปรติเนสแหล่งใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. และโปรติเนสทางการค้าคือ เพปซิน ทริปซิน และ อัลคาเลส จากการศึกษาพบว่าโปรตีนที่เก็บเกี่ยวได้จากน้ำล้างเนื้อปลาไนมีคุณสมบัติยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและสามารถเพิ่มค่าเจลของซูริมิปลาทรายแดงเมื่อเติมในระดับ 0.18% และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ก่อนการให้ความร้อน และยังสามารถลดการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อเนื่องจากโปรติเนส จากการทำบริสุทธิ์พบว่ามีสารยับยั้งโปรติเนสแอลฟา-1 ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน มีขนาดโมเลกุล 40 และ 55 กิโลดาลตัน โดยสารยับยั้งบริสุทธิ์มีความจำเพาะต่อทริปซินและสามารถลดการย่อยสลายของมัยโอซินสายหลักของซูริมิปลาตาหวานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

โปรตีนไฮโดรไลเสทจากก้าง กระดูก และเศษหนังที่ผ่านการย่อยโดยโปรติเนส จากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK33แสดงคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจึงนำมาแยกส่วนด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ(anion exchange chromatography) และแยกตามขนาด (size exclusion chromatography) หลังจากแยกด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีตามขนาดได้เพปไทด์ 3 ส่วนคือ B1 B2 และ B3โดยเพปไทด์ B3 มีความสามารถในการจับกับอนุมูล ABTS และมีคุณสมบัติรีดิวซ์เหล็กสูงสุด ในขณะที่ส่วน B2 และ B3 มีความสามารถเด่นในการจับกับเหล็กและอนุมูลไฮดรอกซิล นอกจากนี้ ส่วนเพปไทด์ในส่วน B1 และ เพปไทด์สังเคราะห์ (FLGSFLYEYSR) ที่ได้มาจากการวิเคราะห์ลำดับเพปไทด์จากส่วน B3 มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ HepG2

การเปรียบเทียบไฮโดรไลเสทของคอลลาเจนหนังปลานิลและหนังปลาดุกบิ๊กอุยจากการย่อยด้วยเพปซิน อัลคาเลส ทริปซินและโปรตีเนสจาก *Vigibacillus* sp. SK39 พบว่าไฮโดรไลเสทจากเพปซินมีความสามารถยับยั้งกิจกรรมของ ACE ได้สูงสุดที่ระดับการย่อย (Degree of hydrolysate) 30% ผลจากการแยกไฮโดรไลเสทด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง สามารถจำแนกได้สามส่วนคือ ส่วนที่มีขนาดมากกว่า 30 กิโลดาลตัน ขนาดระหว่าง 5-30 กิโลดาลตัน และ ขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน ไฮโดรไลเสทที่มีขนาดน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมยับยั้ง ACE สูงที่สุด และความเข้มข้นที่ยับยั้งกิจกรรมของ ACE 50% (IC_{50}) มีค่าเท่ากับ 9.01±0.04 ไมโครกรัม (สมมูลไกลซีน) ต่อมิลลิลิตร เพปไทด์หลังผ่านการแยกตามขนาดโมเลกุลสามารถยับยั้งกิจกรรมของ ACE ได้ 72.06% ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 ไมโครกรัม สมมูลไกลซีน ผลการวิเคราะห์ด้วย LC-Tandem mass spectrometry

ของเพปไทด์ที่มีกิจกรรมยับยั้ง ACE สูงสุดประกอบด้วยกรดอะมิโนอาร์จินีนและไกลซีนที่ปลายสายคาร์บอกซิลของเพปไทด์ (C-terminus) และกรดอะมิโนด้านปลายสายอะมิโน (N-terminus) ส่วนมากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีโซ่ข้างเป็นคาร์บอนสายตรง (Aliphatic amino acid)

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวัสดุเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมประมงสามารถนำกลับมาใช้ประโยชน์ได้โดยอาศัยเทคโนโลยีการเก็บเกี่ยวและเอนไซม์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ผลิตสารยับยั้งโปรติเนส หรือเพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งกิจกรรมของ ACE และสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเสริมหรือผลิตภัณฑ์โภชนเภสัชได้ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Objectives of this study were to various approaches to fully utilize byproducts from fishery industry with emphasis on wash water of fish mince, collagen hydrolysates with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, and protein hydrolysates with antioxidant properties from surimi wastes, including frame, bone and skin (FBS) and refiner discharge (RD) using proteinases from a novel source, *Virgibacillus* sp. and commercial proteinases: pepsin, trypsin and Alcalase. It was found that crude sarcoplasmic proteins obtained from common carp mice wash water showed inhibitory activity toward trypsin and increased textural properties of threadfin bream surimi, particularly those set at 40°C, when added at 0.18%. In addition, it reduced proteolysis caused by endogenous proteinases of threadfin bream surimi. Based on protein purification scheme, the protein exhibiting inhibitory activity was identified to be the carp α-1 proteinase inhibitor, which was glycoprotein with molecular weight of 40 and 55 kDa. The purified inhibitor exhibited inhibitory activity toward trypsin and reduced proteolysis of myosin heavy chain of bigeye snapper surimi.

FBS protein hydrolysates prepared from *Virgibacillus* sp. SK33 proteinase showed higher antioxidant than RD and was, therefore, fractionated using anion exchange and size exclusion chromatography (SEC). Three fractions, mamely, B1, B2 and B3, were obtained after SEC. Fraction B3 exhibited the highest antioxidant activity base on 2,2'-azinobis (3-wthyl-benzothiazoline-6-sulfonate (ABTS) scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) value, while metal chelation and hydroxyl radical scavenging ability were distinctive in fraction 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).

Collagen hydrolysates from skin of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and hybrid catfish (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) were obtained using pepsin, Alcalase, trypsin and proteinase from *Virgibacillus* sp. SK39. Pepsin produced peptides exhibiting the highest ACE inhibitrory activity with a degree of hydrolysis (DH) of 30%. The hydrolysate of hybrid catfish skin 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 μg (glycine equivalent)/ml. The pooled fraction after gel filtration showed ACE inhibitory activity at 72.06% at 0.2 μg 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 contrined aliphatic amino acids.

This study revealed that byproducts from fishery industry could be fully utilized using proper recovery and enzyme technology to obtain proteinase inhibitor or bioactive peptides with ACE inhibitory and antioxidant activity, which could be developed to be functional ingredients or nutraceutical products.