หัวข้อดุษฎีนิพนธ์	เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเจลาตินไฮโดรไลเสตของหนังปลานิล	
ผู้เขียน	นายสดับพงศ์ จุ่นพิจารณ์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผศ. ดร. หทัยชนก เนียมทรัพย์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	ศ. ดร. สัญชัย จตุรสิทธา	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	รศ. ดร. นวลศรี รักอริยะธรรม	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ดร. นัทธี สุรีย์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

ความต้องการปลานิล (*Oreochromis niloticus)* ในทุกรูปแบบกำลังเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในตลาดโลก ประเทศไทยเป็นหนึ่งในผู้ผลิตปลานิลส่งออกรายหลักในภูมิภาคเอเชียร่วมกับประเทศจีน ฟิลิปปินส์และไต้หวัน ซึ่งความต้องการปลานิลที่มากขึ้นนี้ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตปลานิลเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ทำให้มีผลพลอยได้จากกระบวนการแปรรูปปลานิลมากขึ้นและเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาทางสิ่งแวดล้อมอย่างมาก หนังปลาซึ่งเป็นส่วนหนึ่งในผลพลอยได้ที่ได้จากกระบวนการนี้ยังคงเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนอยู่ในปริมาณมากและเป็นแหล่งสำคัญของคอลลาเจนและเจลาตินอีกด้วย เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพสามารถผลิตได้จากเจลาตินของหนังปลานิลโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งเพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้โดยทั่วไปแล้วจะเป็นเพปไทด์สายสั้น ๆ ที่ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนประมาณ 2-20 ตัว และแสดงผลที่เป็นประโยชน์ในบริเวณเป้าหมายหลังจากมีการดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย

เจลาตินสามารถสกัดได้จากหนังปลานิลโดยใช้น้ำร้อน และเมื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่าง ๆ ได้แก่ บรอมีเลน ปาเปน ทริปซิน ฟลาเวอร์ไซม์ อัลคาเลส และนิวเทรส เป็นเวลา 4 ชั่วโมงจะได้เพปไทด์ที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งมีความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านความดันโลหิตสูงที่ดีพบในส่วนของไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10,000 ดัลตัน และมีเพียงไฮโดรไลเสตจากการย่อยด้วยทริปซินและฟลาเวอร์ไซม์เท่านั้นที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับที่ดี ด้วยเหตุนี้ไฮโดรไลเสตทั้งสองจึงถูกทำให้บริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิลเตรชัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Copyright© by Chulalongkorn University
All rights reserved

และโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุตามลำดับ หลังขั้นตอนเจลฟิลเตรชันพบว่าส่วน B ของทริปซิน (TB) และส่วน D ของฟลาเวอร์ไซม์ไฮโดรไลเสต (FD) มีปริมาณผลผลิตที่มากที่สุดและแสดงฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านความดันโลหิตสูงได้ดีที่สุด แต่เมื่อทำบริสุทธิ์ต่อไปด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุพบว่าส่วนที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ดังกล่าวมีฤทธิ์ทางชีวภาพในระดับที่คงเดิมหรือลดลงจากเดิม ดังนั้นจึงนำส่วน TB และ FD ไปหาลำดับกรดอะมิโนด้วยเทคนิค MALDI-TOF/TOF แมสสเปกโตรเมตรี พบเพปไทด์ที่เข้ากันกับฐานข้อมูล 2 เพปไทด์จากส่วน TB โดยมีลำดับกรดอะมิโนเป็น GPEGPAGAR และ GETGPAGPAGAAGPAGPR ผลการวิเคราะห์ทางคอมพิวเตอร์แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่มีขนาดสั้นกว่าอาจจะมีรูปร่างที่เหมาะสมกว่าเพปไทด์สายยาวเพียงเล็กน้อยในการจับกับแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ติงเอนไซม์ (ACE) แต่อย่างไรก็ตามในแง่ของความแข็งแรงในการจับกับเอนไซม์ ACE ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งยืนยันได้จากผลการทดลองด้วยเพปไทด์สังเคราะห์ทั้งสองซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของ ACE ได้ใกล้เคียงกัน ดังนั้นเพปไทด์ดังกล่าวทั้งสองจึงเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจสำหรับการพัฒนาสารต้านอนุมูลอิสระและสารยับยั้งความดันโลหิตสูงที่ได้จากแหล่งธรรมชาติต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Dissertation Title	Bioactive Peptides from Gelatin Hydrolysates of Nile Tilapia Skin	
Author	Mr. Sadabpong Choonpicharn	
Degree	Doctor of Philosophy (Biotechnology)	
Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Hataichanoke Niamsup	Advisor
	Prof. Dr. Sanchai Jaturasitha	Co-advisor
	Assoc. Prof. Dr. Nuansri Rakariyatham	Co-advisor
	Dr. Nuttee Suree	Co-advisor

ABSTRACT

In the global market, the demand for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in all forms is increasing rapidly. Thailand is one of the main tilapia producers in Asia, along with China, the Philippines and Taiwan. With the increasing demand of tilapia, the more processing industries increase, the more by-products are produced, which cause more environmental problems. Fish skin, one type of wastes generated from Nile tilapia processing, is still a good source of collagen and gelatin and still contains a significant amount of protein-rich materials. After being hydrolyzed with protease enzymes, bioactive peptides can be obtained from Nile tilapia skin gelatin. These bioactive peptides are generally short peptides (2-20 amino acids) and exert beneficial effects at target sites in the body after absorption.

Gelatin was extracted from Nile tilapia skin by hot water extraction and hydrolyzed by proteases, including bromelain, papain, trypsin, flavourzyme, alcalase

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

and neutrase, for 4 hrs to obtain the bioactive peptides. The significant capability as an antioxidant agent and antihypertensive agent was noticed in the low molecular weight hydrolysate fraction (<10 kDa). Among all hydrolysate, the great antioxidant and antihypertensive competencies were noticed in both trypsin and flavourzyme hydrolysates. For this reason, these two hydrolysates were selected for further purification by gel filtration and ion exchange chromatography. After gel filtration chromatography, fraction B and fraction D from trypsin (TB) and flavourzyme hydrolysate (FD), respectively, exhibited the best antioxidant and antihypertensive activities together with good production yield, and thus were subsequently purified by ion exchange chromatography. However, all fractionates exhibited the same level or lower level of bioactivities than the gel filtration fractions. Therefore, TB and FD fractions were directly subjected to MALDI-TOF/TOF MS/MS. No significant peptide sequences were matched with the FD fractions, while, 2 peptide sequences were identified from the TB fraction; GPEGPAGAR (MW 810.87 Da) and GETGPAGPAGAAGPAGPR (MW 1490.61 Da). Docking analysis suggested that the shape of the shorter peptide may be slightly more proper to fit into the binding cleft of the angiotensin-I-converting enzyme (ACE). However, the calculated binding affinity values showed no significant difference between the two peptides. In good agreement with the *in silico* data, results from the *in vitro* ACE inhibitory test with the synthetic peptides showed equal inhibitory activity. Both peptides are thus interesting novel candidates suitable for further development as antihypertensive and antioxidant agents from the natural source.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved