

ธิดารัตน์ รูปเข้ม : ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินและการปรับระบบภูมิคุ้มกัน  
ของโปรตีนไฮโดรไลเซทผลิตโดยโปรตีนจาก *VIRGIBACILLUS*

*HALODENITRIFICANS* SK1-3-7 (ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME (ACE)  
INHIBITORY ACTIVITY AND IMMUNOMODULATING ACTIVITY OF PROTEIN  
HYDROLYSATES PRODUCED BY *VIRGIBACILLUS HALODENITRIFICANS*

SK1-3-7 PROTEINASES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ขงสวัสดิกุล,  
198 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือเพื่อผลิตและศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์  
ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน (เอซีอี) ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกล้ามเนื้อปลานิลย่อยโดย  
โปรตีนจาก *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 นอกจากนี้ศึกษาฤทธิ์การปรับระบบ  
ภูมิคุ้มกันของโปรตีนไฮโดรไลเซทจากแหล่งของโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งถูกย่อยโดยโปรตีนที่ผ่านการ  
ทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7

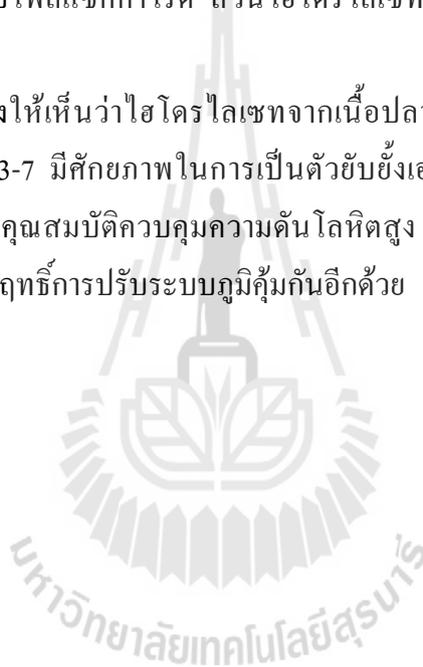
เมื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซทจากกล้ามเนื้อปลานิลโดยใช้เนื้อปลาสด เนื้อปลาสดล้างน้ำ  
และโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ที่ย่อยด้วยโปรตีนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 ที่เวลาการย่อย  
8 ชั่วโมง พบว่าไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลาสดที่ระดับการย่อยสลาย 48% แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอซีอี  
ได้สูงสุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไฮโดรไลเซทจากโปรตีนซาร์-  
โคพลาสมิกแสดงค่าระดับการย่อยสลายต่ำที่สุด โดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร  
ไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลาสดแสดงรูปแบบการยับยั้งแบบผสม โดยมีค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 0.041  
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าการย่อยด้วยระบบทางเดินอาหารที่ทดสอบในหลอดทดลองจะลด  
กิจกรรมการยับยั้งเอซีอีของไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลาสด แต่สามารถเพิ่มความสามารถการซึมผ่าน  
ชั้นของเซลล์ลำไส้เล็ก Caco-2 เปปไทด์ที่ซึมผ่านได้ถูกบ่งชี้ว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 3-4  
โมเลกุล และยังคงแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอซีอีได้เป็นอย่างดี และเปปไทด์ใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอซีอีได้สูง  
ที่สุดคือ MCS ซึ่งมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.29 ไมโครโมลาร์

การทำบริสุทธิ์เปปไทด์จากไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลานิลบดที่ผ่านการย่อย 8 ชั่วโมง ด้วย  
เทคนิคอัลตราฟิลเตรชัน การแลกเปลี่ยนประจุลบ การแลกเปลี่ยนประจุบวกและการแยกตามขนาด  
ตามลำดับ พบว่าเปปไทด์ที่มีฤทธิ์การยับยั้งเอซีอีได้สูงที่สุดมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อ  
มิลลิลิตร และแสดงรูปแบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibition) โดยมีค่าคงที่การ  
ยับยั้งเท่ากับ 0.18 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เปปไทด์ยังแสดงเสถียรภาพต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ  
สูงที่ 100 และ 121 องศาเซลเซียส และพีเอชในช่วง 2-10 และยังคงมีเสถียรภาพหลังจากผ่านการ  
ย่อยด้วยระบบทางเดินอาหารที่ทดสอบในหลอดทดลอง เปปไทด์ที่แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอซีอีได้สูง

ที่สุดประกอบด้วยกรดอะมิโนไม่มีซัลฟิว (เมทไทโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และฟีนิลอะลานีน) และมีกรดอะมิโนอาร์จินีนที่ปลายสายซี้ (C-terminus)

เมื่อย่อยเนื้อปลานิลสด เคซีน และโปรตีนถั่วพี (pea protein) ด้วยโปรตีนเนสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลานิลสดส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ผ่านการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  และ COX-2 เมื่อทดสอบด้วยเซลล์แมคโครฟาจทีเอชพี-1 (THP-1 macrophage) ในขณะที่ไฮโดรไลเซทจากเคซีนและโปรตีนถั่วพีแสดงฤทธิ์การต่อต้านการอักเสบโดยไฮโดรไลเซทจากเคซีนลดการตอบสนองของ IL-1 $\beta$  IL-6 IL-8 TNF- $\alpha$  และ COX-2 ในเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ ส่วนไฮโดรไลเซทจากโปรตีนถั่วพีลดการตอบสนองของ IL-6 และ TNF- $\alpha$

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซทจากเนื้อปลานิลสดที่เตรียมจากโปรตีนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 มีศักยภาพในการเป็นตัวช่วยยั้งเชื้อและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณสมบัติควบคุมความดันโลหิตสูง นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซทที่ผลิตโดยโปรตีนเนสนี้แสดงฤทธิ์การปรับระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย



TIDARAT TOOPCHAM : ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME  
(ACE) INHIBITORY ACTIVITY AND IMMUNOMODULATING  
ACTIVITY OF PROTEIN HYDROLYSATES PRODUCED BY  
*VIRGIBACILLUS HALODENITRIFICANS* SK1-3-7 PROTEINASES.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL,  
Ph.D., 198 PP.

PROTEIN HYDROLYSATE/*V. HALODENITRIFICAN* SK1-3-7/

ACE INHIBITORY ACTIVITY/IMMUNOMODULATORY ACTIVITY

The objectives of this study were to produce and characterize angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides derived from tilapia muscle hydrolyzed by *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases. In addition, immunomodulatory activity of protein hydrolysates from various protein sources hydrolyzed by partially-purified proteinase from *V. halodenitrificans* SK1-3-7 was investigated.

Tilapia muscle proteins, namely minced (M), washed mince (WM), and sarcoplasmic protein (SP), were hydrolyzed by *V. halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases and their ACE inhibitory activity were compared. At 8 h of hydrolysis, M hydrolysate with a degree of hydrolysis (DH) of 48% showed the highest ACE inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 0.54 mg/mL, while SP hydrolysate exhibited the lowest DH with an  $IC_{50}$  value of 1.15 mg/mL ( $p < 0.05$ ). The M hydrolysate showed a mixed-type inhibition characteristic with an inhibition constant ( $K_i$ ) of 0.041 mg/mL. Although *in vitro* gastrointestinal digestion reduced ACE inhibitory activity of the M hydrolysate, it enhanced permeability across Caco-2 cell monolayers. The permeated peptides were identified to contain 3-4 amino acid residues and showed

strong ACE inhibitory activity. The novel ACE inhibitory peptide with the highest inhibition was identified to be MCS with an  $IC_{50}$  value of 0.29  $\mu$ M.

Purification of tilapia mince hydrolysate at 8 h of hydrolysis was performed by ultrafiltration, anion exchange, cation exchange and size exclusion chromatography. The fraction with the most potent ACE inhibitory activity with an  $IC_{50}$  value of 0.15 mg/mL was obtained. The peptides showed uncompetitive inhibition characteristics with  $K_i$  of 0.18 mg/mL. The peptides also showed high thermal stability at 100 and 121°C and remained inhibitory activity over a wide pH range of 2-10 and *in vitro* gastrointestinal digestion. The presence of hydrophobic amino acids (Met, Ile, Leu, and Phe) in the peptide sequence with Arg residue at the C-terminus enabled high ACE inhibitory potency.

Tilapia mince, casein, and pea protein were hydrolyzed by partially-purified proteinases from *V. halodenitrificans* SK1-3-7 for 8 h. Tilapia mince hydrolysate (TMH) enhanced innate immunity through induction of IL-1 $\beta$  and COX-2 expression based on THP-1 macrophages. Anti-inflammatory activity was found in casein hydrolysate (CH) and pea protein hydrolysate (PPH). CH suppressed IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , and COX-2 responses on LPS-induced THP-1 macrophages. PPH reduced LPS-induced IL-6 and TNF- $\alpha$  responses.

This study revealed that tilapia mince hydrolysate prepared by *V. halodenitrificans* SK1-3-7 proteinases has the potential to be ACE inhibitor and could be developed as a functional food with antihypertensive property. In addition, protein hydrolysates produced by the proteinase exhibit an immunomodulatory activity.

School of Food Technology

Student's Signature \_\_\_\_\_

Academic Year 2015

Advisor's Signature \_\_\_\_\_