

ธิดารัตน์ รูปแถม :ฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซินและการปรับระบบภูมิคุ้มกัน
ของโปรตีนไฮโดรไลเซตผลิตโดยโปรตีนจาก *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.จิรวัฒน์ ขงสวัสดิกุล,
198 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือเพื่อผลิตและศึกษาคุณลักษณะของเปปไทด์ที่มีฤทธิ์
ยับยั้งเอนไซม์แองจิโอเทนซิน (เอซีอี) ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้ามเนื้อปลานิลย่อยโดย
โปรตีนจาก *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 นอกจากนี้ศึกษาฤทธิ์การปรับระบบ
ภูมิคุ้มกันของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากแหล่งของโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งถูกย่อยโดยโปรตีนที่ผ่านการ
ทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7

เมื่อเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้ามเนื้อปลานิลโดยใช้เนื้อปลาสด เนื้อปลาล้างน้ำ
และโปรตีนชาร์โคพลาสมิก ที่ย่อยด้วยโปรตีนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 ที่เวลาการย่อย
8 ชั่วโมง พบว่าไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาลดที่ระดับการย่อยสลาย 48% แสดงฤทธิ์การยับยั้งเอซีอี
ได้สูงสุดโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.54 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในขณะที่ไฮโดรไลเซตจากโปรตีนชาร์-
โคพลาสมิกแสดงค่าระดับการย่อยสลายต่ำที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
ไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาลดแสดงรูปแบบการยับยั้งแบบผสม โดยมีค่าคงที่การยับยั้งเท่ากับ 0.041
มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าการย่อยด้วยระบบทางเดินอาหารที่ทดสอบในหลอดทดลองจะลด
กิจกรรมการยับยั้งเอซีอีของไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาลด แต่สามารถเพิ่มความสามารถการซึมผ่าน
ชั้นของเซลล์ลำไส้เล็ก Caco-2 เปปไทด์ที่ซึมผ่านได้ถูกบ่งชี้ว่าประกอบด้วยกรดอะมิโน 3-4
โมเลกุล และยังคงแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอซีอีได้เป็นอย่างดี และเปปไทด์ใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอซีอีได้สูง
ที่สุดคือ MCS ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.29 ไมโครโมลาร์

การทำบริสุทธิ์เปปไทด์จากไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลาลดที่ผ่านการย่อย 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 (เมไทโอนีน ไอโซลิวซีน ลิวซีน และฟีนิลอะลานีน) และมีกรดอะมิโนอาร์จินีนที่ปลายสายซี (C-terminus)

เมื่อย่อยเนื้อปลานิลสด เคซีน และโปรตีนถั่วพี (pea protein) ด้วยโปรตีนที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลานิลสดส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ผ่านการเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน IL-1 β และ COX-2 เมื่อทดสอบด้วยเซลล์แมคโครฟาจทีเอชพี-1 (THP-1 macrophage) ในขณะที่ไฮโดรไลเซตจากเคซีนและโปรตีนถั่วพีแสดงฤทธิ์การต่อต้านการอักเสบโดยไฮโดรไลเซตจากเคซีนลดการตอบสนองของ IL-1 β IL-6 IL-8 TNF- α และ COX-2 ในเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยลิโปลิแซคคาไรด์ ส่วนไฮโดรไลเซตจากโปรตีนถั่วพีลดการตอบสนองของ IL-6 และ TNF- α

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไฮโดรไลเซตจากเนื้อปลานิลสดที่เตรียมจากโปรตีนจาก *V. halodenitrificans* SK1-3-7 มีศักยภาพในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อและสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่มีคุณสมบัติควบคุมความดันโลหิตสูง นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตที่ผลิตโดยโปรตีนสนี้แสดงฤทธิ์การปรับระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย



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 μ 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 β 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 β , IL-6, IL-8, TNF- α , and COX-2 responses on LPS-induced THP-1 macrophages. PPH reduced LPS-induced IL-6 and TNF- α 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

Academic Year 2015

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____