

วาสนา วงศ์งาม : การผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซินจากเลือดไก่ (PRODUCTION OF ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY PEPTIDES DERIVED FROM CHICKEN BLOOD) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์ดิกุล, 119 หน้า.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อเพิ่มมูลค่าเลือดไก่โดยผลิตเพปไทด์ที่มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์เปลี่ยนรูปแองจิโอเทนซิน (angiotensin I-converting enzyme; ACE) ย่อยตัวอย่างเลือดไก่ส่วนต่างๆ ได้แก่ น้ำเลือด (whole blood; WB) พลาสมา (blood plasma; BP) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) โดยใช้เอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่อัลคาเลส (Alcalase) พาเพน (papain) เพปซิน (pepsin) เทอโมไลซิน (thermolysin) และเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียสายพันธุ์ *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 โปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือด (blood corpuscle hydrolysate, BCH) ย่อยด้วยอัลคาเลสที่ระดับการย่อย (degree of hydrolysis; DH) 14.53% แสดงค่าการยับยั้งเอนไซม์ ACE ที่ร้อยละ 61.8 (ความเข้มข้นเพปไทด์ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) จากวิธี response surface methodology (RSM) สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลสจากเม็ดเลือด คือที่อุณหภูมิ 51.1 องศาเซลเซียส ด้วยเอนไซม์อัลคาเลสร้อยละ 4 (E/S) ควบคุมค่า pH ที่ 9.6 ตลอดจนการย่อย 6 ชั่วโมง โดยได้ระดับการย่อยที่ร้อยละ 35.8 และยับยั้งเอนไซม์ ACE ร้อยละ 37.7 (ความเข้มข้นเพปไทด์ 0.2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) เพปไทด์ที่ผ่านกระบวนการอัลตราฟิวเดชั่น (ultrafiltration) ที่เยื่อกรองขนาด 1 กิโลดาลตัน (1-kDa permeate; BCH-III) แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเอนไซม์เพิ่มขึ้น 2.5 เท่าเมื่อเทียบกับโปรตีนไฮโดรไลสทั้งโปรตีนไฮโดรไลส BCH และ ส่วนที่ผ่านเยื่อกรอง BCH-III มีองค์ประกอบกรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน ไกลซีน อะลานีน วาลีน และลูซีนในปริมาณมาก หลังจากป้อนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลส BCH และ ส่วนที่ผ่านเยื่อกรอง BCH-III ที่ความเข้มข้น 600 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ให้กับหนูความดันสูง (spontaneously hypertensive rat; SHR) พบว่ามีผลลดความดันซิสโตลิก (systolic blood pressure; SBP) ประมาณ -43.0 มิลลิเมตรปรอท และลดความดันไดแอสโตลิก (diastolic blood pressure; DBP) ได้สูงสุดที่ปริมาณการป้อนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลส BCH-III ที่ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

แฟรคชัน G3 ที่ได้จากไฮโดรไลสส่วนที่ผ่านเยื่อกรอง 1 กิโลดาลตัน ที่ผ่านการแยกโครมาโตกราฟีตามขนาด (size exclusion chromatography) แสดงกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงสุดด้วยค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 66 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และเมื่อนำไปทำบริสุทธ์ต่อด้วยหลักการรีเวอร์สเฟสโครมาโตกราฟี (reverse-phase chromatography) พบว่ามี 2 พีคที่มีกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงสุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 14.0 และ 18.0 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำทั้ง 2 พีควิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนด้วย LC-MS/MS tandem mass spectrometry พบว่าเพปไทด์ VSKRLNGDA หลัง

ผ่านการย่อยอาหารแบบจำลองแสดงกิจกรรมยับยั้งเอนไซม์ ACE สูงสุดโดยมีค่า  $IC_{50}$  เท่ากับ 26.46 ไมโครโมลาร์ และเมื่อให้เพปไทด์ในปริมาณ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมหนู กับหนูความดันสูงสามารถลดค่าความดันซิสโตลิกลงได้ -32.0 มิลลิเมตรปรอท ภายในเวลา 12 ชั่วโมง และสามารถลดความดันไดแอสโตลิกได้สูงสุดที่ระดับความเข้มข้นเพปไทด์ในช่วง 12.5-50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

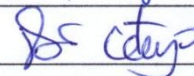
เมื่อศึกษาผลการป้อนตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสทที่ผ่านเยื่อกรองขนาด 1 กิโลดาลตัน BCH-III และเพปไทด์ VSKRLNGDA ให้กับหนูความดันสูงทั้งในระยะสั้น (1 สัปดาห์) และระยะยาว (4 สัปดาห์) พบว่า หนูกลุ่มที่ป้อน VSKRLNGDA ปริมาณ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม มีค่าความดันโลหิตลดลงสูงสุดเทียบเท่ากับหนูในกลุ่มที่ป้อนด้วยยาแคปโตพริล (captopril) ปริมาณ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังสัปดาห์ที่ 4 ผลของหนูในกลุ่มที่ป้อนเพปไทด์ VSKRLNGDA มีการแสดงออกของยีน (gene) เรนิน (renin) และ ตัวรับแองจิโอเทนซิน II ชนิดที่ I (angiotensin II type-1 receptor; AT-1) ลดลง และยีนอะดรีโนเซปเตอร์ชนิดเบต้า 3 (adrenoceptor  $\beta$ -3; AR- $\beta$ 3) และตัวรับเพอรอกซิโซมโปรลิเฟอเรเตอร์ที่ถูกกระตุ้นชนิดเดลต้า (peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ ; Ppar $\delta$ ) เพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์จากระดับ mRNA ของเนื้อเยื่อไตด้วยวิธี real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) ดังนั้น โปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือดไก่และเพปไทด์ VSKRLNGDA ไม่เพียงมีผลยับยั้งเอนไซม์ ACE แต่ยังเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนดังกล่าวด้วยเช่นกัน ไฮโดรไลเสทจากน้ำเลือดไก่มีศักยภาพที่สามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์อาหารสุขภาพที่มีคุณสมบัติการลดความดันสูงได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร  
ปีการศึกษา 2561

ลายมือชื่อนักศึกษา



ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา



WASANA WONGNGAM : PRODUCTION OF ANGIOTENSIN I-  
CONVERTING ENZYME (ACE) INHIBITORY PEPTIDES DERIVED  
FROM CHICKEN BLOOD. THESIS ADVISOR :  
ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 119 PP.

ANGIOTENSIN I-CONVERTING ENZYME (ACE)/ANTIHYPERTENSIVE  
PEPTIDE/CHICKEN BLOOD/SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (SHR)

The objective of this study was to increase the value of chicken blood by producing peptides with angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. Chicken blood fractions, namely whole blood (WB), blood plasma (BP) and blood corpuscles (BC), were hydrolyzed using various enzymes, including Alcalase, papain, pepsin, themolysin and *Virgibacillus* sp. SK1-3-7 protease. Blood corpuscles hydrolysate (BCH) derived from Alcalase showed the highest degree of hydrolysis (DH) of 14.53% and ACE inhibition of 61.8% at 0.5 mg/mL peptide. Based on the response surface methodology (RSM), the optimized condition of BCH was at 51.1°C, 4% E/S, and pH 9.6 for 6 h, resulting in 35.8% DH and 37.7% ACE inhibition at 0.2 mg/mL peptide. After ultrafiltration using 1-kDa molecular mass cut-off membrane, the permeate of BCH (BCH-III) showed an increase in ACE inhibition about 2.5 folds compared to BCH. Both BCH and its permeate were rich in F, G, A, V, I and L. Oral administration of BCH and BCH-permeate to the spontaneously hypertensive rats (SHR) at 600 and 200 mg/kg body weight, respectively, lowered systolic blood pressure (SBP) up to around -43.0 mmHg. The maximum reduction of diastolic blood pressure (DBP) was observed at doses of permeate BCH of 100 mg/kg.

The fraction G3 obtained from size exclusion chromatography of BCH-III possessed the highest ACE inhibition with  $IC_{50}$  of 66  $\mu\text{g/mL}$ . Further purification by reverse-phase chromatography resulted in 2 peaks exhibiting  $IC_{50}$  of 14.0 and 18.0  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The *de novo* peptide sequencing by LC-MS/MS revealed VSKRLNGDA with high  $IC_{50}$  of 26.46  $\mu\text{M}$  after gastrointestinal (GI) digestion and the peptide at 50 mg/kg showed reduction of SBP of -32.0 mmHg within 12 h. A maximum decrease in DBP was observed a dose ranging from 12.5 to 50 mg/kg.

The effect of short- (1 week) and long-term (4 weeks) intake of BCH, BCH-III and the VSKRLNGDA on blood pressure were investigated *in vivo*. The VSKRLNGDA at 50 mg/kg showed the greatest reduction in blood pressure similar to captopril (10 mg/kg). After the 4-week feeding trial, VSKRLNGDA resulted in down regulation of the renin and angiotensin II type-1 (AT-1) receptor genes, but up regulation of adrenoceptor  $\beta$ -3 (AR- $\beta$ 3) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  (Ppar $\delta$ ) genes as monitored by their mRNA levels in the kidney by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Therefore, BCH and the VSKRLNGDA not only inhibited ACE but also involved in expression of those genes, which would be responsible for their antihypertensive effect. Hydrolysates from chicken blood corpuscles could be developed as a functional food exerting antihypertensive properties.

School of Food Technology

Academic Year 2018

Student's Signature

Advisor's Signature