บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของเลือดไก่โดยผลิตเพปไทด์ที่มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจากเลือด (whole blood; B) พลาสมา (plasma; P) และเม็ดเลือด (blood corpuscle; BC) โดยศึกษาชนิดของเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ อัลคาเลส (Alcalase) พาเพน (papain) เพปซิน (pepsin) และเทอร์โมไลซิน (thermolysin) ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือดและเม็ดเลือดย่อยด้วยอัลคาเลสมีค่าสูงสุดที่ร้อยละ 13.3-14.5 พลาสมามีค่าระดับการย่อยเพียงร้อยละ 1.6-3.3 โปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซินแสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ สูงที่สุดที่ 0.954 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ ความสามารถในการรีดิวซ์เหล็ก (ferric reducing power) ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเม็ดเลือดย่อยด้วยอัลคาเลสมีค่าสูงสุดที่ 55.9 ไมโครโมลลาร์โทรลอกซ์ ส่วนโปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมามีความสามารถในการจับกับโลหะสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือดและเม็ดเลือดโดยไม่ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ และความสามารถในการจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเลือด พลาสมา และเม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซินมีค่าสูงสุดในระดับร้อยละ 28.4-29.4

เมื่อศึกษาระยะเวลาในการย่อยพลาสมาและเม็ดเลือดด้วยเพปซินหรือเทอร์โมไลซิน พบว่าที่ 4 ชั่วโมง ความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ ของไฮโดรไลเสทเม็ดเลือดและพลาสมาย่อยด้วยเพปซินมีกิจกรรมสูงในช่วง 1.02-1.14 มิลลิโมลลาร์โทรลอกซ์ ปริมาณแอลฟาอะมิโนของโปรตีนไฮโดรไลเสทเตรียมจากเพปซินหลังการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (*in vitro* gastrointestinal digestion) เพิ่มขึ้น 2.4 เท่า และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ มีค่าสูงสุด และเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสทจากพลาสมาย่อยด้วยเพปซิน เม็ดเลือดย่อยด้วยเพปซิน และเม็ดเลือดย่อยด้วยเทอร์โมไลซินหลังระบบย่อยอาหารจำลองปริมาณกรดอะมิโนกลุ่มไฮโดรโฟบิกในระดับร้อยละ 61.7, 70.5 และ 58.9 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับก่อนระบบย่อยอาหารจำลอง

พลาสมาไฮโดรไลเสทย่อยด้วยเอนไซม์เพปซินที่ผ่านการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลองมีคะแนนความสามารถต้านอนุมูลอิสระสูงในช่วง 8.5-9.0 ได้แก่ YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW และISRDWRGV พลาสมาไฮโดรไลเสทจากเพปซินและเทอร์โมไลซินที่ผ่านการย่อยโดยระบบย่อยอาหารจำลองแสดงฤทธิ์ปกป้อง HepG2 ตามระดับความเข้มข้น โดยไฮโดรไลเซทจากเพปซินที่ย่อยโดยระบบย่อยอาหารจำลองแสดงฤทธิ์ปกป้องเซลล์จาก tert-butyl hydroperoxide สูงสุดที่ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยังลดการเกิดอนุมูลอิสระในระดับร้อยละ 71 เมื่อวิเคราะห์ด้วย dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)

การแยกเพปไทด์ด้วย Superdex Peptide 10/300 GL จากไฮโดรไลเสทพลาสมาย่อยด้วยเพปซิน พบว่าได้เพปไทด์ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 15.26

มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร โดยเพปไทด์มีขนาดโมเลกุลประมาณ 1100.48 ดาลตัน และมีปริมาณผลผลิตร้อยละ 82.3 และเมื่อทำบริสุทธิ์ต่อด้วย Reverse-phase chromatography พบว่าได้เพปไทด์ที่มีความสามารถในการจับอนุมูลอิสระ $ABTS^{\circ+}$ โดยมีค่า EC_{50} เท่ากับ 2.31 มิลลิกรัมลิวซีนสมมูลต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสทประมาณ 3 เท่า และมีปริมาณผลผลิตร้อยละ 40 ดังนั้นพลาสมาไฮโดรไลเสทสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมสุขภาพที่มีศักยภาพในการต้านอนุมูลอิสระ และเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยคาดว่ายังคงแสดงฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

Objective of this study was to increase utilization of chicken blood by producing antioxidant peptides from various fractions of chicken blood, namely whole blood (B), plasma (P), and blood corpuscle (BC), using different enzymes, including Alcalase, papain, pepsin, and thermolysin. Degree of hydrolysis values of B and BC, hydrolyzed by Alcalase were highest of 13.3-14.5%. Degree of hydrolysis of P was relatively low of 1.6-3.3%. Pepsin-hydrolyzed plasma (PHP) exhibited the highest $ABTS^{\circ+}$ radical scavenging activity at 0.954 mM Trolox, while ferric reducing power of BC-hydrolyzed by Alcalase was highest at 55.9 μM Trolox. Plasma hydrolysates exhibited higher metal chelating ability than did other samples, regardless of proteases used. Hydroxyl radical scavenging activity of B, P, and BC, hydrolyzed by pepsin was highest in the range of 28.4-29.4%.

When hydrolysis time of P and BC by pepsin and thermolysin was studied, it was found that 4-h of hydrolysis of these substrates by pepsin resulted in the highest ABTS radical scavenging activity at 1.02-1.14 mM Trolox. The α-amino content of digesta of hydrolysates prepared from pepsin increased 2.4 times with the highest $ABTS^{\circ+}$ radical scavenging activity. Amino acid analysis revealed that digesta of PHP, pepsin-hydrolyzed BC (PHBC) and thermolysin-hydrolyzed BC (THBC) showed hydrophobic amino acids of 61.7, 70.5, and 58.9%, respectively, which were higher than their respective parent hydrolysates.

Digesta of PHP exhibited high antioxidant scores of 8.5-9.0 and their peptides were identified to be YPKAPFS, VWGLASDL, MGTAPMW and ISRDWRGV. Digesta of PHP and thermolysin-hydrolyzed plasma (THP) showed cytoprotective properties in a dose-dependent manner, and 100 μg/ml of PHP digesta exhibited the highest protection of HepG2 cells against tert-butyl hydroperoxide (TBHP) and the greatest inhibition of intracellular reactive oxygen species of approximately 71% based on dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay.

Peptide separation of PHP by Superdex Peptide 10/300 GL resulted in peptides with ABTS scavenging activity with EC_{50} value of 15.26 mg Leu/ml with estimated molecular weight of 1,100.48 Da with 82.3% yield. Further purification by reverse-phase chromatography increased ABTS radical scavenging activity to EC_{50} of 2.31 mg Leu/ml,

which was about 3 times higher than the original hydrolysate with peptide yield of 40%. Thus, blood plasma hydrolysate could be developed to functional food products with high antioxidant activity. In addition, peptides obtained from gastrointestinal digestion of blood hydrolysate would likely to exhibit free radical scavenging activity.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี