ฟู เทียน : การแยก การระบุชนิด และกลไกการออกฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านเชื้อแบคทีเรียจากโปรตีนไฮโดรไลเสทของพลาสมาเลือดไก่ (ISOLATION, IDENTIFICATION, AND MODE OF ACTION OF NOVEL ANTIBACTERIAL PEPTIDES FROM CHICKEN PLASMA HYDROLYSATES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 120 หน้า.

เพปไทด์ต้านแบคทีเรีย/การทำให้บริสุทธิ์/กลไกการออกฤทธิ์/การจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

เลือดไก่เป็นผลิตผลพลอยได้จากโรงเชือด ซึ่งมีการใช้ประโยชน์อย่างจำกัดและก่อให้เกิดปัญหาสิ่งแวดล้อม การนำเลือดไก่มาผ่านกระบวนการที่เหมาะสมจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการรักษาสิ่งแวดล้อมและมูลค่าทางเศรษฐกิจ วิกฤตการดื้อยาต้านแบคทีเรียหลายขนานที่ทวีความรุนแรงมากขึ้นและความเสี่ยงต่อสุขภาพจากสารกันบูดในอาหารนำไปสู่การหาแนวทางใหม่ในการควบคุมเชื้อแบคทีเรีย เพปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs) ได้รับความสนใจอย่างต่อเนื่องเนื่องจากคุณสมบัติของเพปไทด์ที่มีเป้าหมายในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และองค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น ดีเอ็นเอ เอนไซม์ หรือโปรตีน ดังนั้นทำให้โอกาสที่เชื้อแบคทีเรียจะดื้อต่อเพปไทด์เกิดขึ้นน้อยมาก ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือแยกและระบุเพปไทด์ต้านจุลชีพจากไฮโดรไลเสทพลาสมาเลือดไก่

เพปไทด์ต้านแบคทีเรียชนิดใหม่ 2 ท่อนที่แยกได้จากไฮโดรไลเสทพลาสมาเลือดไก่จากการย่อยด้วยอัลคาเลส มีลำดับกรดอะมิโนคือ VSDH และ CCCPKAF มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Bacillus cereus* DMST 5040 ได้ดี โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ที่หลากหลาย จากการวิเคราะห์การติดสีย้อมโพรพิเดียมไอโอไดด์พบว่าเพปไทด์ CCCPKAF มีฤทธิ์ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และจากการทดสอบด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปีพบว่าเพปไทด์ VSDH มีผลต่อองค์ประกอบภายในเซลล์ ได้แก่ โปรตีนและกรดนิวคลีอิก เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการจำลองการจับกันระหว่างโมเลกุล (molecular docking) พบว่าเพปไทด์ VSDH มีความเจาะจงต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ นอกจากนี้ ยังพบว่าเพปไทด์ VSDH มีความสามารถในการจับโลหะ ส่งผลให้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

เพปไทด์ EADE ซึ่งเป็นเพปไทด์ประจุลบชนิดใหม่ที่แยกได้จากไฮโดรไลเสทพลาสมาเลือดไก่จากการย่อยด้วยเพปซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ เพปไทด์ EADE ยับยั้งแบคทีเรียโดยการจับกับแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยพบการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของ EADE กับ Ca^{2+} จากการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี (NMR) และการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุล

เพปไทด์ต้านจุลชีพ CP-1 (KPKVLLHA) ถูกแยกได้จากไฮโดรไลเสทพลาสมาเลือดไก่ที่ย่อยด้วยเพปซินด้วยเครื่องแฟลชโครมาโทกราฟฟี ด้วยคอลัมน์ C-18 พบว่าเพปไทด์ CP-1สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella Typhimurium* TISTR 292 ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ ผลการวิเคราะห์การติดสีย้อม โพรพิเดียมไอโอไดด์ด้วยกล้องคอนโฟคอน พบว่าเพปไทด์ CP-1ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ฉีกขาด และจากผลการวิเคราะห์โดยใช้เทคนิคการจำลองพลวัตเชิงโมเลกุลพบว่าเพปไทด์ CP-1มีเป้าหมายในการทำลายดีเอ็นเอด้วย นอกจากนี้ ยังพบการเสริมฤทธิ์กันของเพปไทด์ CP-1ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์กับเพปไทด์ประจุลบ EADE ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ จากการทดสอบการวัดฟลูออเรสเซนต์ของสาร 1-*N*-ฟีนิลแนพธิลเอมีนพบว่า EADE เพิ่มการซึมผ่านของเยื่อหุ้มชั้นนอก ซึ่งอาจเกิดจาก EADE เข้าไปจับกับ Mg^{2+} หรือ Ca^{2+} ทำให้ CP-1 ซึมผ่านเยื่อหุ้มชั้นนอกไปที่เป้าหมายภายในเซลล์ได้ดียิ่งขึ้น ดังนั้นการใช้เพปไทด์ CP-1 ร่วมกับ EADE สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา Fu Tian

ปีการศึกษา 2564 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

FU TIAN : ISOLATION, IDENTIFICATION, AND MODE OF ACTION OF NOVEL ANTIBACTERIAL PEPTIDES FROM CHICKEN PLASMA HYDROLYSATES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 120 PP.

ANTIBACTERIAL PEPTIDES/PURIFICTION/MECHANISMS/MOLECULAR DYNAMICS SIMULATION

Chicken blood is a byproduct from a slaughterhouse with limited utilization and causing environmental problems. Appropriate treatment of chicken blood is of great benefit to both environmental protection and economic value. The increasingly severe problem associated with multiple drug-resistant bacteria and the potential health risks from synthetic food preservatives have led to a demand for new strategies for microbial control. Antimicrobial peptides (AMPs) have recently attracted much attention as they act on multiple targets on membrane and intracellular components, such as DNA, enzymes, or protein. Thus, mutations conferring AMP resistance are less likely to occur. The objectives of this study were to isolate and identify AMPs from chicken blood plasma hydrolysates, and to elucidate their mechanisms of antibacterial action.

Two novel antibacterial peptides isolated from Alcalase-hydrolyzed chicken plasma hydrolysate were identified to be VSDH and CCCPKAF. They showed good antibacterial ability toward *Bacillus cereus* DMST 5040 with varied mechanisms. The CCCPKAF induced bacterial cell membrane disruption as evidenced by propidium iodide (PI) uptake. The VSDH targeted intracellular components, including proteins and nucleic acids as revealed by Synchrotron-based Fourier Transform Infrared (SR-FTIR). Molecular docking analysis revealed that VSDH showed good bonding affinity to various enzymes involved in DNA synthesis. Moreover, VSDH showed metal chelation ability, which could partly contribute to its antibacterial ability.

One novel anionic AMP, EADE, was also isolated from chicken blood plasma hydrolyzed by pepsin. EADE inhibited the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 with minimal inhibitory concentration (MIC) of 0.5 mM. EADE inhibited growth by chelating trace elements that are required for bacterial growth. the results of NMR

and molecular dynamics (MD) simulation indicated that EADE formed stable complex with Ca^{2+}.

A novel cationic AMP, namely CP-1 (KPKVLLHA), was successfully isolated using C18-AQ flash chromatography from pepsin-hydrolyzed chicken plasma hydrolysate. CP-1 inhibited the growth of *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 with MIC of 2 mM. Confocal laser scanning microscopy combined with PI showed cell membrane damage induced by CP-1. DNA was likely to be the second target of CP-1 as revealed by MD simulation. When combined with 0.5 mM EADE, MIC of CP-1 decreased to 1 mM, showing synergistic effect with anionic peptide. EADE possibly chelated Mg^{2+} or Ca^{2+}, which increased permeability of outer membrane as shown by 1-*N*-phenylnapthylamine (NPN). This ultimately allowed more influx of CP-1 to penetrate bacterial outer membrane to greater extent. Thus, CP-1 combined with EADE showed potential in controlling *S.* Typhimurium TISTR 292

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Food Technology
Academic Year 2021

Student's Signature Fu Tian
Advisor's Signature