ชื่อเรื่อง : การศึกษาไบโอแอคทีฟเพปไทด์จากไฮโดรไลซีสโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเนส

ผู้วิจัย : รัชนี ไสยประจง สาขาวิชาการจัดการอุตสาหกรรมอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย

ผู้วิจัยร่วม : สุรพงษ์ พินิจกลาง

: กนก รัตนะกนกชัย

ปีที่แล้วเสร็จ : 2555 จำนวน 72 หน้า

คำสำคัญ : โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง, ไบโอแอคทีฟเพปไทด์, โปรติเนส

บทคัดย่อ

209211

วัตถุประสงค์งานวิจัยนี้เพื่อศึกษาลักษณะเฉพาะทางชีวเคมีและการไฮโดรไลซิสของโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเนสชนิดต่างๆ ทำการศึกษาการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยเอนไซม์โปรติเนสชนิดต่างๆ ได้แก่เอนไซม์ไฟเซน (ficain), เพปซิน (pepsin), ปาเปน (papain), ทริปซิน (trypsin) เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* และเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* และ ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการไฮโดร-ไลซิสมาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และนำเพปไทด์สายสั้นมาแยกด้วย Amicon Ultramembrane Centrifuge ที่มี molecular weight cut off 3 K เก็บส่วนที่ผ่าน Ultramembrane มาศึกษาน้ำหนักโมเลกุลด้วยเครื่อง Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) นำมาศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้ ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน และนำมาทดสอบสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* และ *Escherichia coli* โดยวิธี agar plate diffusion จากนั้นคัดเลือกเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากเอนไซม์ทริปซิน และเพปซินที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และนำไปแยกเพปไทด์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose^{TM} 12 นำโปรตีนที่ได้ในแต่ละแฟรกชั่นไปวิเคราะห์การยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ angiotensin I-converting (ACEi) และ วิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass Spectrometry(LC/MS)

จากผลการศึกษาเพปไทด์โดย SDS-PAGE พบว่าเมื่อใช้เวลาในการย่อยมากขึ้นจะมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และเมื่อนำเพปไทด์สายสั้นมาผ่าน Amicon Ultramembrane Centrifuge 3K พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์ที่วัดด้วยเครื่อง MALDI-TOF MS มีความหลากหลายของเพปไทด์ในน้ำหนักโมเลกุลตั้งแต่ 61.177-2,626.909 ดาลตัน ส่วนเพปไทด์ชนิดที่พบปริมาณมากที่สุดคือเพปไทด์สายสั้นจากเอนไซม์ไฟเซน, เอนไซม์เพปซิน, เอนไซม์ทริปซิน, เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* และเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* น้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 294.414 ดาลตัน, 172.237 ดาลตัน, 862.628 ดาลตัล, 2,636.909 ดาลตัน และ 294.414 ดาลตัน ตามลำดับ จากการศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในเพปไทด์สายสั้นที่ผ่าน 3 K พบว่าเพปไทด์จากเอนไซม์เพปซินจะให้การยับยั้งสารอนุมูลอิสระสูงสุดเท่ากับร้อยละ 84.36 และเพปไทด์จากเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ต่ำสุดเท่ากับร้อยละ 65.14 ส่วนค่า IC_{50} ของเอนไซม์ไฟเซน, เอนไซม์เพปซิน, เอนไซม์ทริปซิน, เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis*, เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* เท่ากับร้อยละ 1.95, 8.07, 1.40, 5.30 และ 8.06 ตามลำดับ ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียพบว่าเพปไทด์จากเอนไซม์ทริปซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Enterobacter aerogenes* โดยให้บริเวณยับยั้งเท่ากับ 16.5 มิลลิเมตร ในขณะที่เพปไทด์จากเอนไซม์ชนิดอื่นไม่สามารถยับยั้งได้เลย และเมื่อนำเพบไทด์สายสั้นที่ได้จากเพปซินและทริปซินไปวิเคราะห์องค์ประกอบของกรดอะมิโนพบว่าเพปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์เพปซินตัดโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองพบกรดอะมิโนทั้งหมด 9 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 298.10 มิลลิกริม/100 กรัม และพบ ฟีนิลอลานิน น้อยที่สุดเท่ากับ 68.65 มิลลิกริม/100 กรัม ในขณะที่เพปไทด์ที่ได้จากเอนไซม์ทริปซินจะพบกรดอะมิโนทั้งหมด 13 ชนิด โดยพบกรดอะมิโนชนิดกลูตามิกสูงที่สุดเท่ากับ 553.03 มิลลิกริม/100 กรัม และพบไทโรซิน น้อยที่สุดเท่ากับ 50.12 มิลลิกริม/100 กรัม และเมื่อนำไปแยกเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ทริปซินโดยวิธี FPLC พบว่าเพปไทด์มี 3 แฟรกชั่น คือ แฟรกชั่นที่ 8, 11 และ 18 และเมื่อนำแฟรกชั่นที่ 11 และ 18 ไปวิเคราะห์ ACEi พบว่ามีค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 80.69±0.53 และ 91.79±0.10 ตามลำดับ และจากการนำเพปไทด์แฟรกชั่นนี้ไปวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี LC/MS พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys และ Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys ตามลำดับ

* ผลงานวิจัยเรื่องนี้ได้รับทุนส่งเสริมการวิจัย สำหรับพนักงานประจำมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย

Title : Study on bioactive peptide from isolated soy protein hydrolysis by proteinase enzymes

Researcher : Ratchanee Saiprajong Department of Food Business Management
Faculty of Science and Technology
University of the Thai Chamber of Commerce

Co-researcher : Surapong Pinitglang, Khanok Ratanakhanokchai

Year of Accomplishment : 2012 No. of Pages : 72 Pages

Key words : soy protein isolate, bioactive peptide, proteinase

209211

Abstract

The purpose of this research was to study the biochemical characteristics and the hydrolysis of the soy protein isolated by useing enzyme proteases. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolated was studied by proteinases e.g. ficain, pepsin, papain, trypsin, protease from *Bacillus licheniformis* and protease from *Aspergillus oryzae* reaction incubation time on 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes at room temperature. Molecular weights of soy peptide were determined by Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and short peptides were separated by Amicon Centrifuge Ultramembrane with a molecular weight cut off 3 kDa. Soy peptides permeated of were determined molecular mass spectra by Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). Antioxidant activity of peptides were determined by DPPH method using ascorbic acid as a standard. Study on antibacterial activities were analyzed using *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli* by agar plate diffusion method. Short peptides from pepsin and trypsin hydrolysis was separated by Amicon Ultramembrane size 3K to analyze the composition of amino acids using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and used to separated peptides by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) with column type Superose™ 12. The proteins in each fragment were analyzed for angiotensin I-converting inhibitory activity (ACEi) and sequence analysis of the amino acid sequence by Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC / MS).

Study on molecular weight of peptides by SDS-PAGE the result showed that short peptide depend on increasing times and the short chain peptides permeated from Amicon Centrifuge Ultramembrane 3K were determined molecular weight by MALDI-TOF MS. Soy

peptide has a wide range of molecular weight peptides about 61.177 to 2626.909 kDa. The peptide from enzymatic hydrolysis of ficain, pepsin, trypsin, protease from *Bacillus licheniformis* and protease from *Aspergillus oryzae* have molecular weight 294.414, 172.237, 862.628, 2636.909 and 294.414 daltons, respectively. The result of studies on antioxidant activity of the 3 K peptides, short peptides from pepsin shown that to inhibit free radicals with 84.36% percent and peptides from protease from *Bacillus licheniformis* was 65.14%. The IC_{50} values of ficain, pepsin, trypsin, protease from *Bacillus licheniformis* and protease from *Aspergillus oryzae* were 1.95, 8.07, 1.40, 5.30 and 8.06, respectively. Peptide from trypsin hydrolysis can inhibit *Enterobacter aerogenes* by shown the inhibition zone was 16.5 mm, while the peptides from the other enzyme can not inhibit all of bacteria. Composition of the amino acids of soy peptide from enzymatic hydrolysis by pepsin found 9 amino acids, the most abundant amino acid was glutamic acid 298.10 mg / 100 g and the smallest was phenylalanine 68.65 mg/ 100 g. The amino acids from enzymatic hydrolysis by trypsin found 13 amino acids, the most abundant amino acid was glutamic acid 553.03 mg / 100 g, and the smallest was tyrosine 50.12 mg / 100 g. Three fractions, 8, 11, 18 of soy peptides from soy protein hydrolysis with trypsin were purified by using FPLC. Fraction 11 and 18 were analyzed for ACEi and amino acid sequence analysis. The result showed that ACEi of fraction 11 and 18 were 80.69 ± 0.53 and 91.79 ± 0.10% respectively. The amino acid sequence analysis of fractions 11 and 18 by LC/MS were Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys and Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys ,respectively.

* The research was financially supported by University of the Thai Chamber of Commerce