ภาคผนวก ก

ก.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Acetic acid(Carlo Erba)
2. Acrylamide(Phamacia Biotechnology)
3. Agar (Difco Laboratories)
4. Ammonium persulfate (Carlo Erba)
5. Ammonium sulfate (Carlo Erba)
6. Bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.,)
7. Bromphenol Blue(Sigma Chemical Co.,)
8. Casein (Sigma Chemical Co.,)
9. Coomassie Brilliant Blue G-250(GE HealthCare, USA)
10. Dialysis bag (Spectrum Laboratories)
11. Dimethylsulfoxide(Merck KGaA)
12. Ethylenediaminetetraacetic acid (Fluka Chemical)
13. Ethanol (Merck KGaA)
14. Folin-Ciocalteu's reagent (Sigma Chemical Co.,)
15. Glycine (Sigma Chemical Co.,)
16. Hydrochloric acid (Merck KGaA)
17. 2-Mercaptoethanol (Sigma Chemical Co.,)
18. Methanol (Merck KGaA)
19. N, N'-Methylene-bis acrylamide (Phamacia Biotechnology)
20. Potassium sodium tartrate(Carlo Erba)
21. Sodium carbonate (Merck KGaA)
22. Sodium chloride (Merck KGaA)
23. Sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co.,)
24. Sodium hydrogen carbonate (Merck KGaA)
25. Sodium hydrogen phosphate (Merck KgaA)
26. Sodium hydroxide (Carlo Erba)
27. Sodium phosphate (Carlo Erba)

28. N,N,N',N'-tetramethyethylenediamine (TEMED)(Phamacia Biotechnology)

29. Trichloroacetic acid (Carlo Erba)

30. Tris (hydroxymethyl)-aminomethane (Merck KGaA)

ก.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. เครื่องวัดการดูดกลืนคลื่นแสง (UV-visible spectrophotometer, Shimadzu Model UV-160A, Japan)
2. เครื่องปั่นแยกด้วยแรงเหวี่ยง (Sorvall Super T21, Dupont, USA)
3. อ่างน้ำร้อนพร้อมเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
4. เครื่องตรวจวัดค่า pH (pH meter, Hanna instruments, Singapore)
5. Vortex mixer (Vortex-genie 2, Scientific Industries Inc., USA)
6. Stirrer (Stuart Scientific)
7. เครื่องชั่ง (2 และ 4 ตำแหน่ง, Sartorius, Germany)
8. sterile membrane filters 0.45 ไมครอน (Whatman)
9. vacuum pump (Thomas medical equipment)
10. อุปกรณ์และเครื่องมือพื้นฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ เช่น เครื่องแก้ว หลอดทดลอง กระบอกตวง บีกเกอร์ เป็นต้น

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี และวิธีการทดสอบ

ข.1 การเตรียมสารเคมี

1. 0.1M Sodium acetate buffer pH 6.5

Sodium acetate 13.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย 0.1M Acetic acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2. 0.2M Potassiumchloride-Hydrochloride acid (KCl-HCl) buffer pH 2

Potassiumchloride 0.75 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 0.2M HCl แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 200 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. 0.1M Tris(hydroxylmethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 121.14 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1ลิตร นำมาประมาณ 700 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย 0.1M Hydrochloric acid แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

4. Fixing Solution

ผสม ethanol ปริมาตร 400 มิลลิลิตร และ acetic acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5. Staining Solution

ผสม PhastGel™ Blue R-350 1 เม็ด กับน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 400 มิลลิลิตร ด้วย Destaining Solution และให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (อย่างต่อเนื่อง)ทำการกรองก่อนใช้

6. Destaining Solution

ผสม ethanol ปริมาตร 250 มิลลิลิตร และ acetic acid ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

7. Preserving Solution

ผสม Glycerol ปริมาตร 25 มิลลิลิตร กับน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร ด้วย Destaining Solution

8. 2x SDS Sample buffer

ผสม 0.5M Tris-HCl pH6.8 ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร, 10%(w/v) SDS, glycerol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร, bromophenol blue 2 มิลลิกรัม และ DTT 310 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

9. 1x Amersham ECL Gel Running Buffer

เตรียม buffer 1x โดยเติมน้ำกลั่นเจือจาง 1:10 ของ 10x Amersham ECL Gel Running Buffer

ข.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Biuret

1. การเตรียมกราฟมาตรฐานของโปรตีน

นำสารละลาย Biuret ปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง 5ชุด ชุดละ 2 หลอด

↓

เติมสารละลาย BSA 200 400 600 800 และ 1,000 ไมโครลิตร

↓

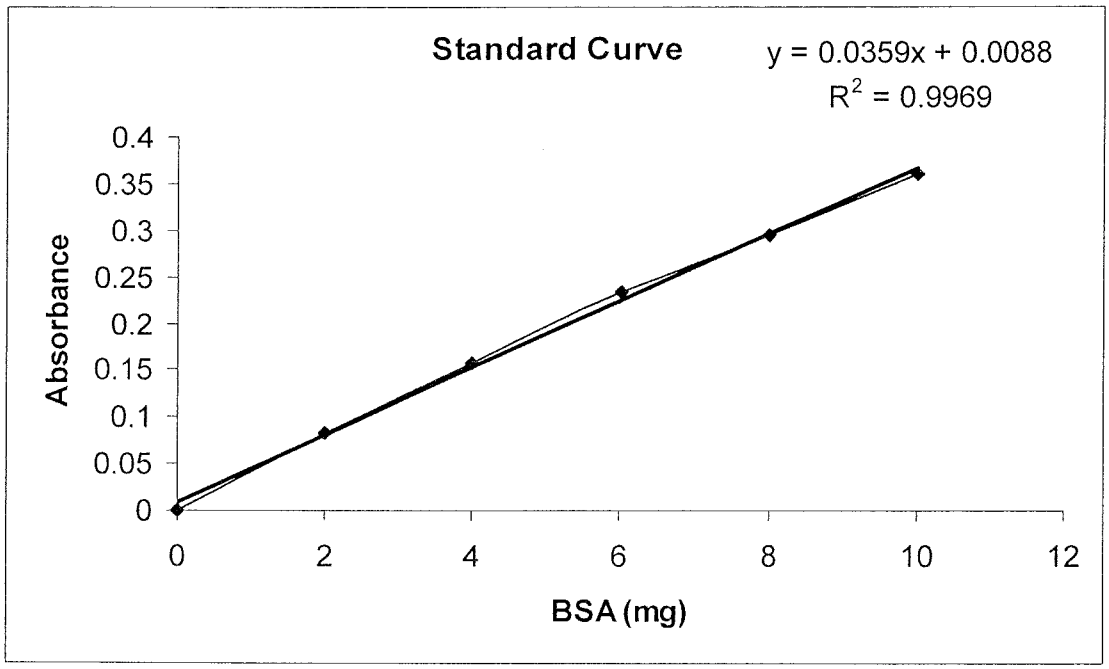
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น ให้มีปริมาตรเท่ากันหมด ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

↓

วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร

นำค่าที่ได้มาเขียนกราฟโปรตีนมาตรฐาน

สารเคมี (ml.)	Blank	หลอดที่ 1	หลอดที่ 2	หลอดที่ 3	หลอดที่ 4	หลอดที่ 5
Biuret	3	3	3	3	3	3
H_2O	3.7	3.5	3.3	3.1	2.9	2.7
BSA	-	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
Total	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของโปรตีน

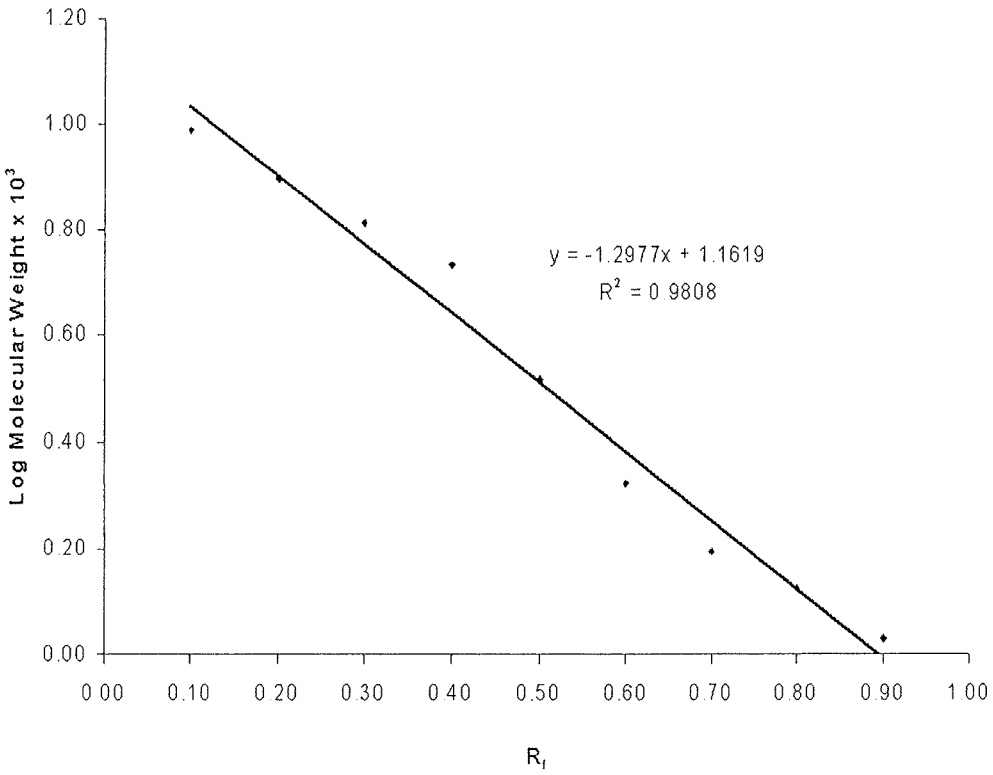
ข.3 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์หาน้ำหนักโมเลกุลของพอลิเพปไทด์สายเดี่ยว โดยอาศัยหลักว่าสารตัวอย่าง อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH เป็นด่างและประกอบด้วย sodium dodecyl sulfate (SDS) ซึ่งเป็น anionic detergent ที่มีประจุลบที่สามารถแยกพอลิเพปไทด์ ที่อยู่รวมกันออกเป็นสายเดี่ยวมีโครงสร้างเป็น แท่งและทุกสายมีประจุลบจึงเคลื่อนที่เข้าหา ขั้วบวก SDS จับพอลิเพปไทด์คงที่ด้วยอัตราส่วน 1.4 กรัม SDS /กรัมโปรตีน โดยมี β-mercaptoethanol เป็น reducing agent ในสารตัวอย่างด้วยเพื่อใช้ทำลายพันธะ disulfide ในโปรตีน อัตราการเคลื่อนที่ของพอลิเพปไทด์จะเร็วหรือช้าขึ้นกับขนาดหรือน้ำหนักโมเลกุล ผลของการแยกโปรตีน สามารถมองเห็น band พอลิเพปไทด์เมื่อย้อมสีด้วย Coomassie blue และ หาน้ำหนัก โมเลกุลของพอลิเพปไทด์แต่ละสายของสารตัวอย่างได้โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์ ระหว่าง log ของน้ำหนักโมเลกุล กับอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และเมื่อทราบ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าของพอลิเพปไทด์ตัวอย่างก็สามารถคำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลได้เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

1. **กราฟมาตรฐานโปรตีนขนาดต่างๆ สำหรับ** SDS-PAGE

การตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE สามารถคำนวณได้จากค่า R_f ซึ่งคำนวณจากการวัดระยะทางจากแถบโปรตีนที่เคลื่อนที่จากหลุมด้านบนลงสู่เจลด้านล่างต่อระยะทาง

ที่ marker dye เคลื่อนที่ (แสดงดังสูตรข้างล่าง) จากนั้นจึงเขียนกราฟระหว่างค่า R_f กับค่า Log Molecular weight เพื่อคำนวณหาขนาดโมเลกุลของแถบโปรตีนที่ปรากฏขึ้น



รูปที่ ข.2 ค่า R_f ของโปรตีนมาตรฐาน

ข.4 การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสโดยการดึงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae*

นำเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulfate ที่ร้อยละ 80 (100 มิลลิลิตร ใช้เกลือ ammonium sulfate 52.3 กรัม) โดยใช้เกลือ ammonium sulfate 26.15 กรัม(บดละเอียด) ผสมด้วยเครื่อง Magnetic stirrer (หล่อเย็นตลอดเวลา) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และทำการ Dialysis ด้วย 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 จน 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 คงที่ไม่เลี่ยนแปลงที่ pH 8 แล้วจึงเก็บเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ที่ได้ในขวดสีชารอวิเคราะห์ต่อไป

2. **การเตรียมเอนไซม์โปรติเอสจาก** *Bacillus licheniformis*

นำเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ทำการตกตะกอนด้วยเกลือ ammonium sulfate ที่ร้อยละ 80 (100 มิลลิลิตร ใช้เกลือ ammonium sulfate 52.3 กรัม) โดยใช้เกลือ ammonium sulfate 26.15 กรัม(บดละเอียด) ผสมด้วยเครื่อง Magnetic stirrer (หล่อเย็นตลอดเวลา) ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วย 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และทำการ Dialysis ด้วย 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 จน 0.1M Tris(hydroxylmethyl)aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 คงที่ไม่เลี่ยนแปลงที่ pH 8 แล้วจึงเก็บเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ที่ได้ในขวดสีชารอวิเคราะห์ต่อไป

ภาคผนวก ค

ค.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soy broth

ชั่ง Tryptic soy broth 6 กรัม เติมน้ำกลั่นลงไปปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร นำมาต้มให้เดือดและละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ดูดใส่หลอดแก้วหลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่ความดัน 15 ปอนด์ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ** Mueller Hinton Plate

ผสม Mueller 7.6 กรัม, น้ำ 200 มิลลิลิตร และ Agar 1 กรัม ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทใส่ Plate ที่ฆ่าเชื้อแล้วตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง

3. **การเตรียม** 0.5 McFarland standard

เตรียมจาก 1% Sulfuric acid 99.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 1.175% Barium chloride 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่หลอดผาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่ง 0.5 0.5 McFarland standard มีปริมาณเชื้อ 1.5×108 CFU/ml

การวัดความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ โดยวิธี DPPH ที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร

ง.1 การเตรียมสารมาตรฐาน

1. 0.1M Vitamin C (Stock)

ชั่ง Vitamin C 1.76 กรัม ละลายในน้ำกลั่นประมาณ 80 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บเป็น Stock ในขวดสีชา

ตารางที่ ง.1 การเตรียม Vitamin C ที่ความเข้มข้น 600, 500, 400, 300, 200, 100, 50 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น Vitamin C (µM)	0.1M Vitamin C (µl)	น้ำกลั่น (µl)
600	1,800	1,200
500	1,500	1,500
400	1,200	1,800
300	900	2,100
200	600	2,400
100	300	2,700
50	300	5,700

หมายเหตุ Vitamin C ที่ความเข้มข้น 50 µM เตรียมเป็น Stock สำหรับการเตรียม Vitamin C ที่ความเข้มข้น 25, 12,5 และ 6.25 µM

ตารางที่ ง.2 การเตรียม Vitamin C ที่ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

ความเข้มข้น Vitamin C (µM)	50µM Vitamin C (µl)	น้ำกลั่น (µl)
25	1,500	1,500
12.5	750	2,250
6.25	375	2,625

2. 10mM DPPH

2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl 0.1165 กรัม ละลายใน Absolute ethanol 25 มิลลิลิตร (เตรียมในที่มืด) เก็บเป็น Stock ในขวดสีชา

ตารางที่ ง.3 การเตรียมกราฟมาตรฐาน Vitamin C

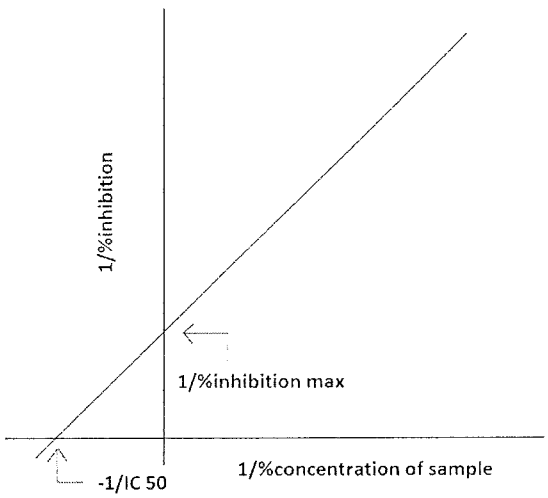
สารเคมี	Blank (µl)	A_C(Control) (µl)	A_S(Sample) (µl)
Absolute ethanol	1000	-	-
น้ำกลั่น	1000	1000	-
DPPH	-	1000	1000
Vitamin C	-	-	1000
Total	2000	2000	2000

วิธีคำนวณ

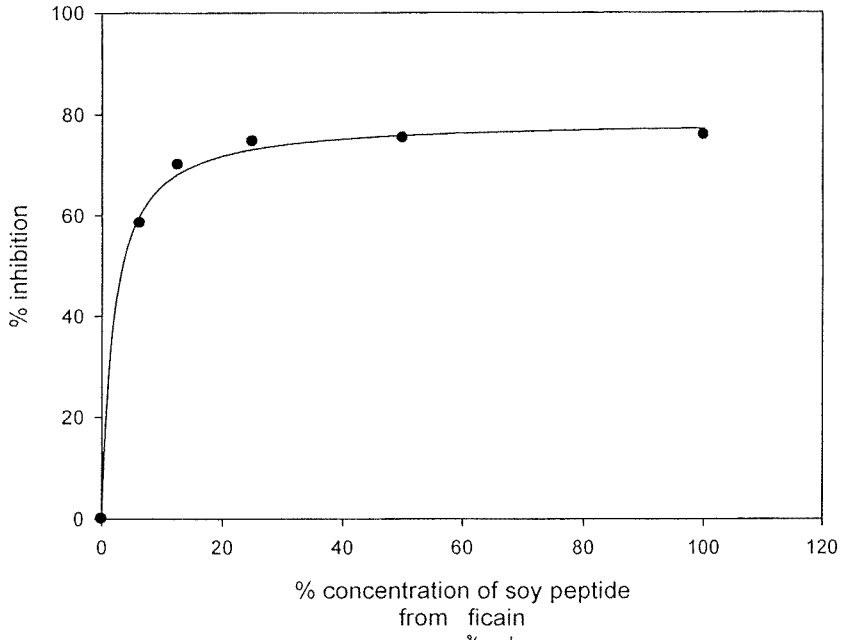
$$\% \text{ DPPH inhibition} = \frac{(A_c - A_s)\times 100}{A_c}$$

เมื่อ A_c คือ absorbance of control

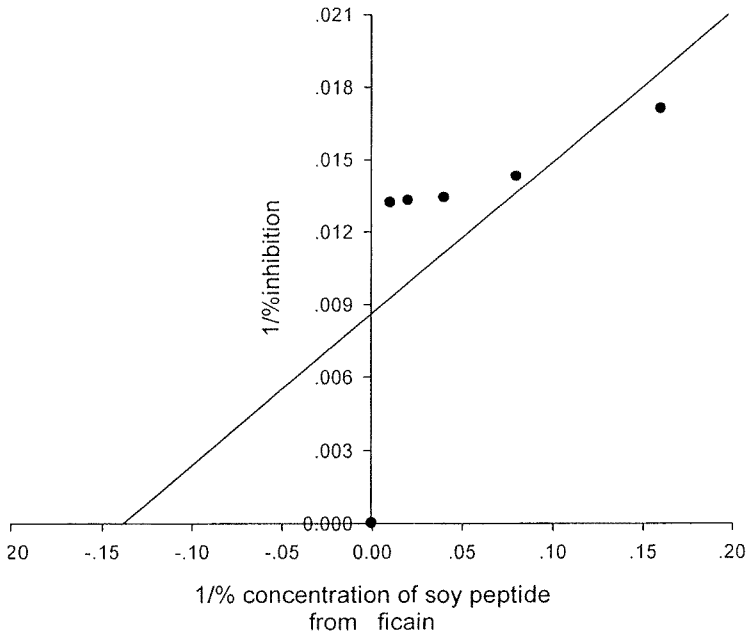
A_s คือ absorbance of sample



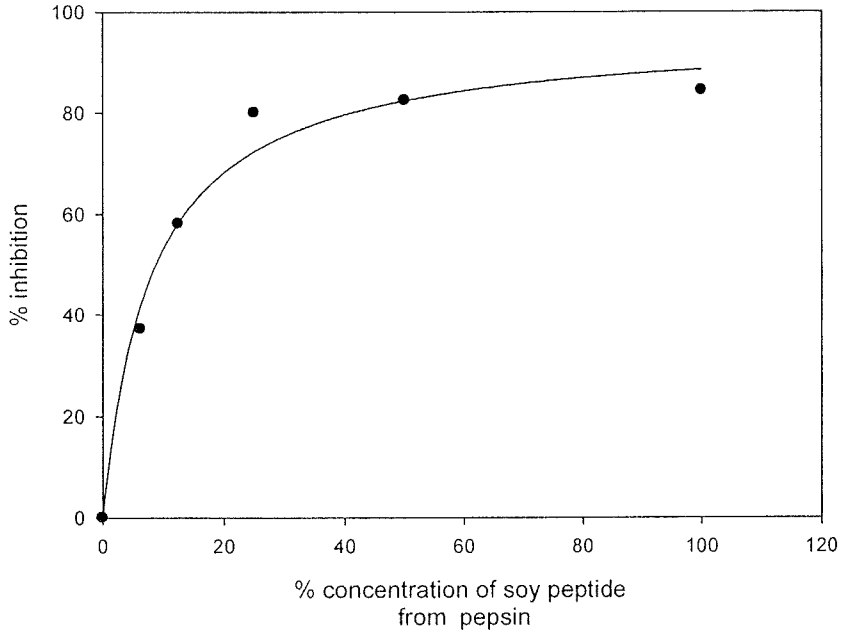
รูปที่ ง.1 กราฟแสดงการคำนวณค่า IC_{50} และค่า % Inhibition max ของตัวอย่าง



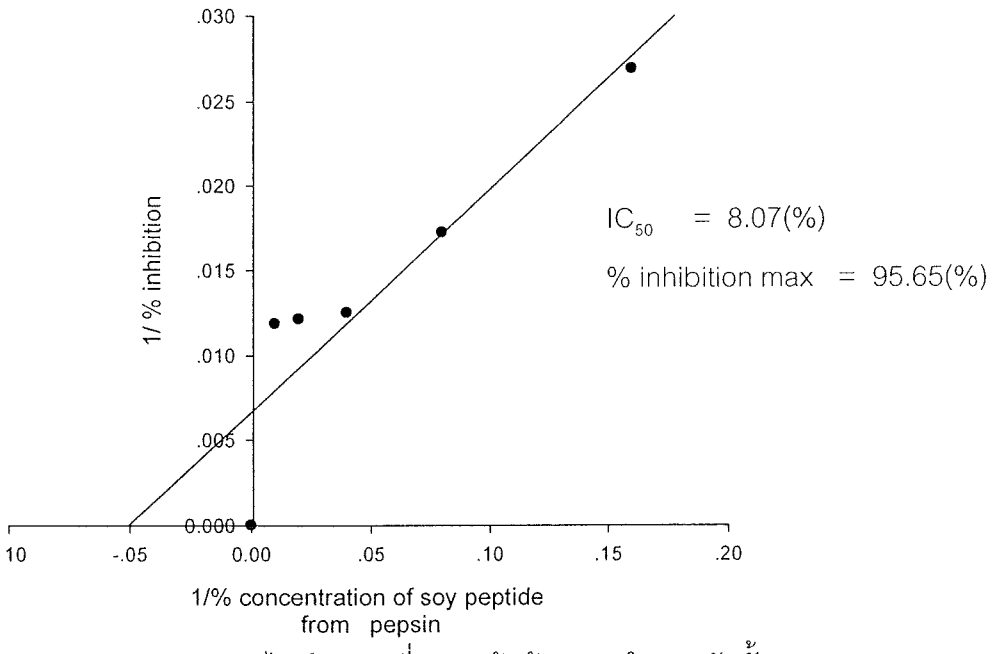
รูปที่ ง.2 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ไฟเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH



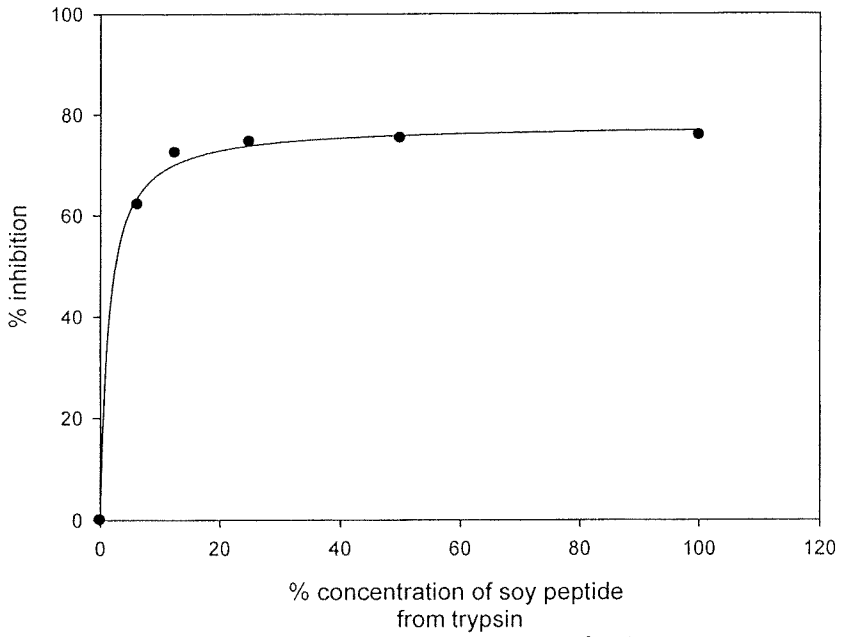
รูปที่ ง.3 IC_{50} ของ soy peptide จากเอนไซม์ไฟเซนที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้ง DPPH



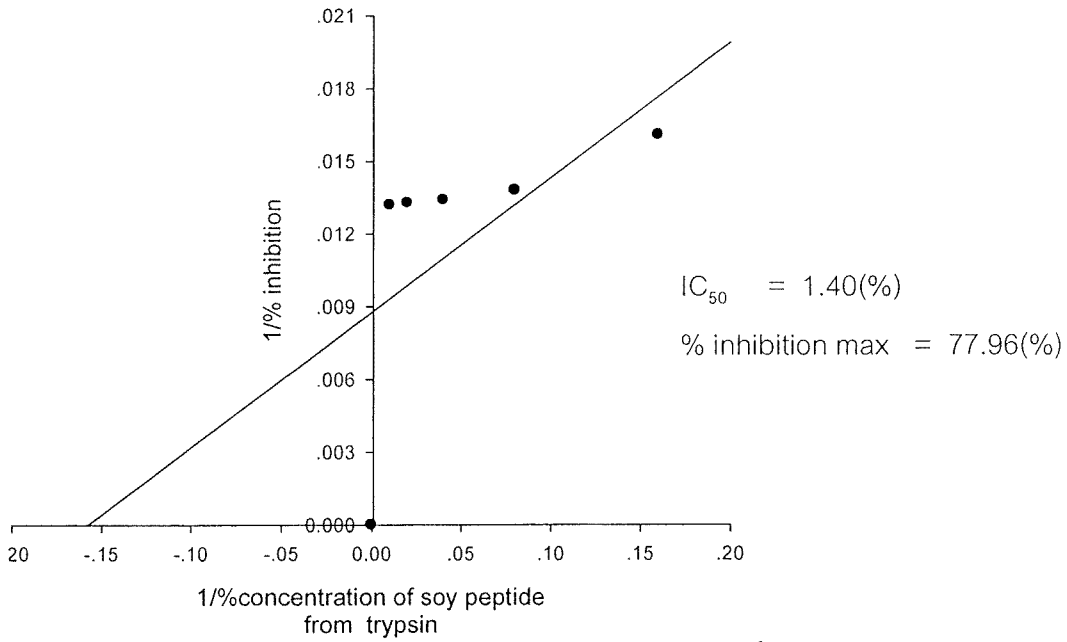
รูปที่ ง.4 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์เพปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH



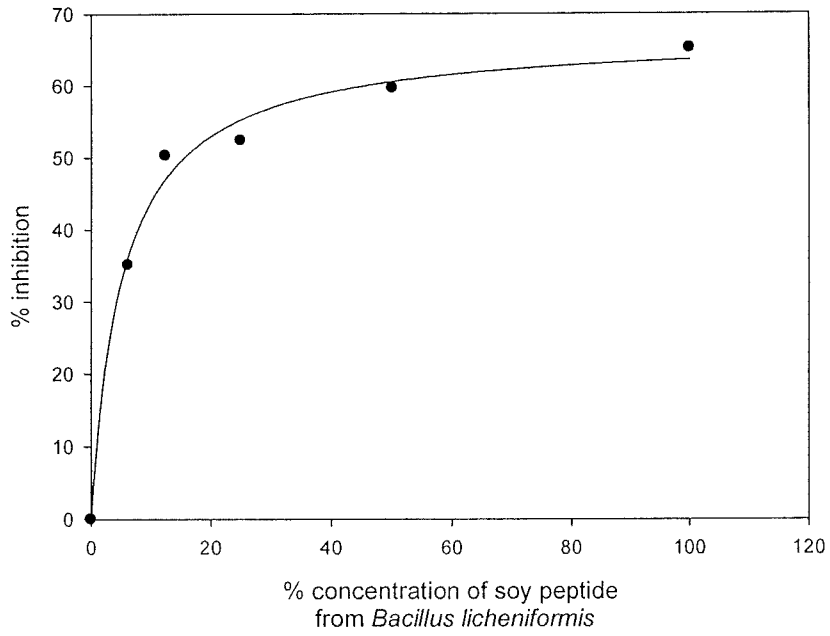
รูปที่ ง.5 IC_{50} ของ soy peptide จากเอนไซม์เพปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้ง DPPH



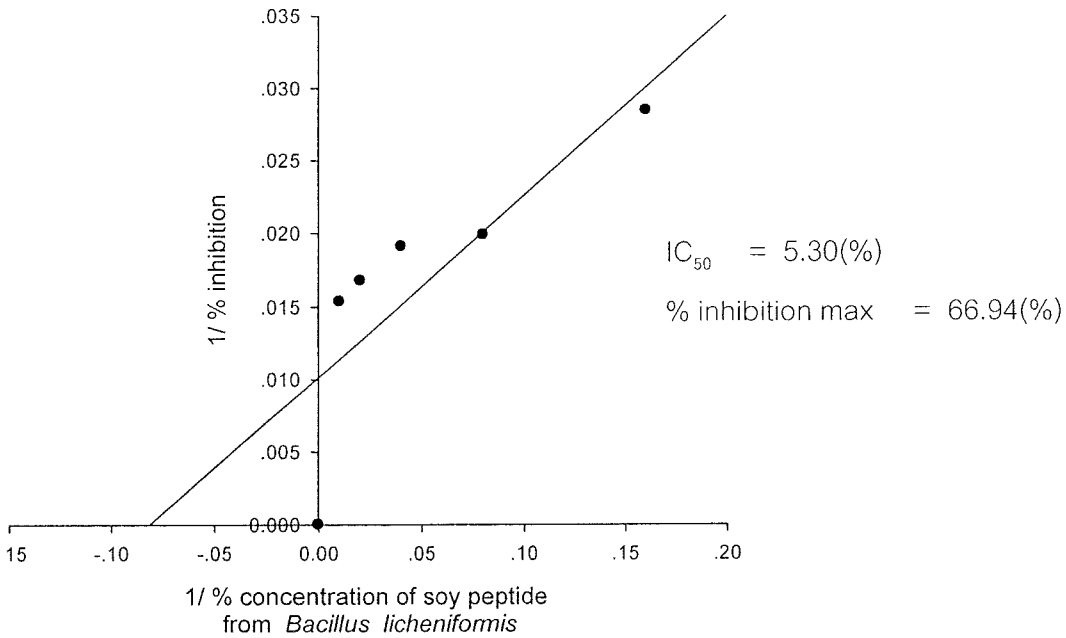
รูปที่ ง.6 กราฟร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH



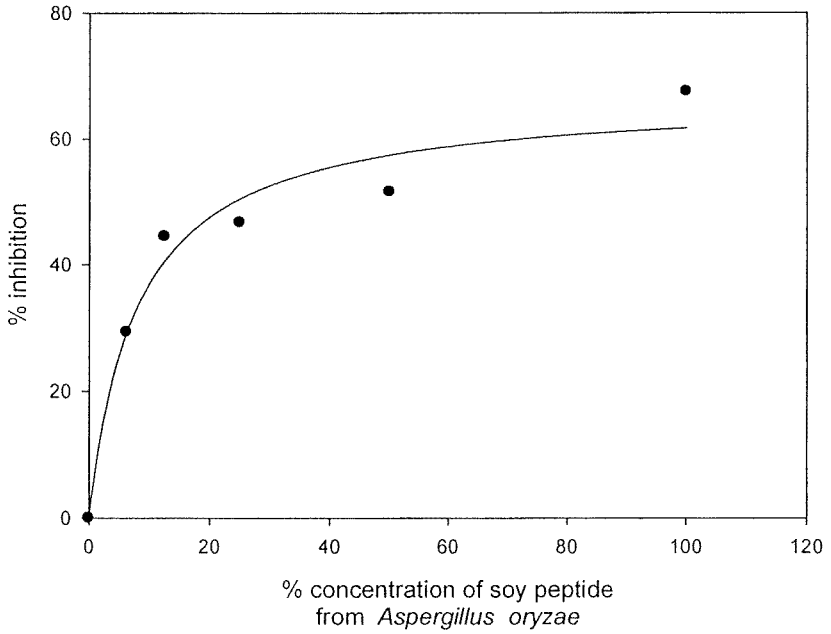
รูปที่ ง.7 IC_{50} ของ soy peptide จากเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้ง DPPH



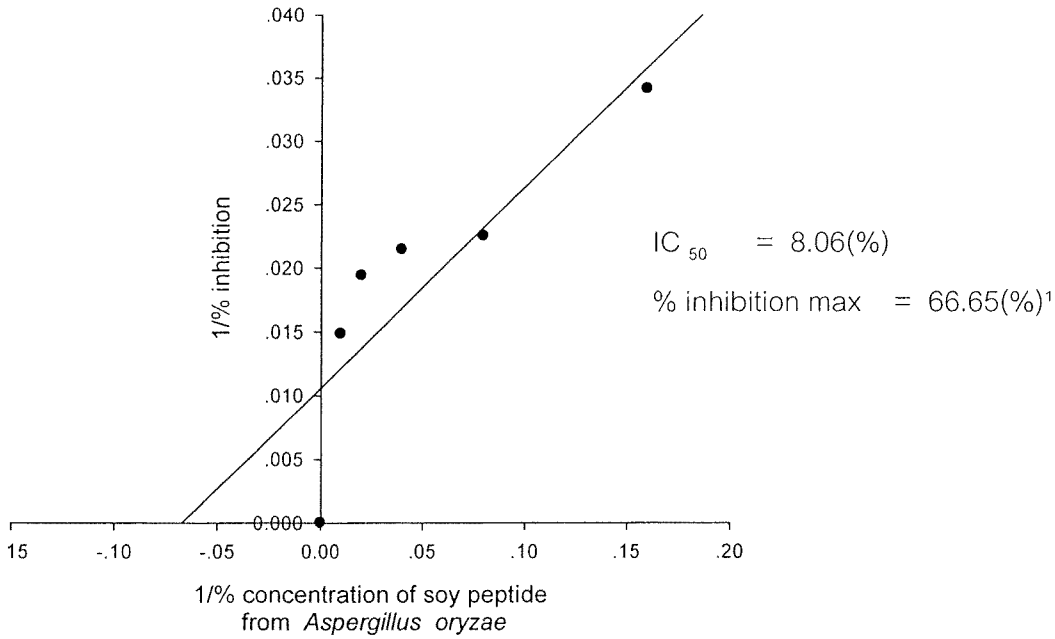
รูปที่ ง.8 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH



รูปที่ ง.9 IC_{50} ของ soy peptide จากเอนไซม์โปรติเอสจาก *Bacillus licheniformis* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้ง DPPH



รูปที่ ง.10 ร้อยละการต้านอนุมูลอิสระของเพปไทด์สายสั้นที่ได้จากการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง โดยใช้เอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี DPPH



รูปที่ ง.11 IC_{50} ของ soy peptide จากเอนไซม์โปรติเอสจาก *Aspergillus oryzae* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้ง DPPH

ภาคผนวก จ

งานวิจัยที่นำเสนอผลงานวิจัย

1. รัชนี ไสยประจง และ สุรพงษ์ พินิจกลาง "การยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme ของเพปไทด์ที่แยกได้จากการใช้เอนไซม์ทริปซินไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง" เรื่องเต็มงานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 6 ในระหว่างวันที่ 26-27 กรกฎาคม 2555 ซึ่งจะตีพิมพ์ในวารสารชื่อวิทยาศาสตร์เกษตร ฉบับพิเศษ ในปี 2555

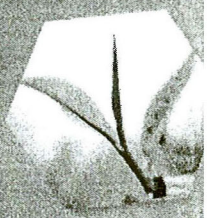
2. Surapong Pinitglang, Ratchanee Saiprajong, Souwanee Ieowsakulrat and Bongkoch Apitanaruk. "Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolated" The proceeding of Food Innovation Asia Conference 2012/14 June 2012

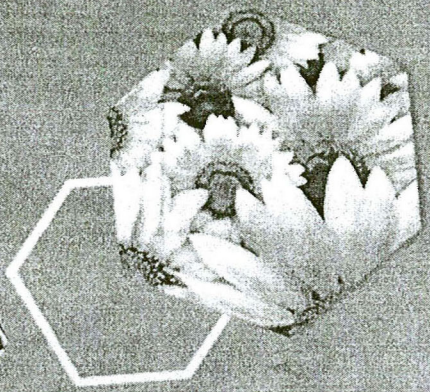
3. Surapong Pinitglang, and Ratchanee Saiprajong "Antihypertensive, antioxidant and antimicrobial properties of bioactive peptides from soy protein isolate hydrolysed with an aspartic, cysteine and serine proteinases" The proceeding of The 24th Annual meeting of the society for biotechnology International Conference on Green biotechnology: Renewable energy and Global Care 29-30 November 2012.

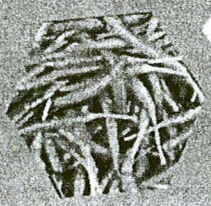
กำหนดการประชุมและบทคัดย่อ

การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย พืชเขตร้อนและกึ่งร้อน ครั้งที่ 6

www.crdc.kmutt.ac.th

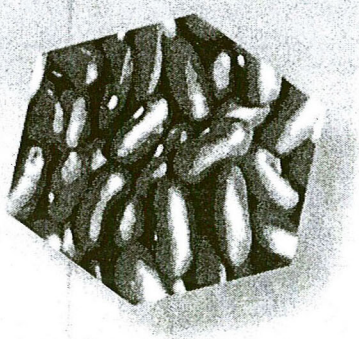






วันที่ 26 - 27 กรกฎาคม 2555 ณ หอประชุมกฤษณรัตน์ อาคารเรียนรวมการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ กรุงเทพมหา



สวทช NSTDA

โครงการส่งเสริมการวิจัย
ในอุดมศึกษาและการพัฒนา
มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ

โครงการจัดตั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาพืชเขตร้อนและกึ่งร้อน

คณะทรัพยากรชีวภาพและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

การยับยั้ง Angiotensin I-Converting Enzyme ของเพปไทด์ที่แยกได้จากการใช้เอนไซม์ทริปซินไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

Novel Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory Peptides Isolated from Trypsin Hydrolysate of Soy Protein Isolate

รัชนี ไสยประจง[1] และ สุรพงษ์ พินิจกลาง[1]

Saiprajong, R[1] and Pinitglang, S[1]

Abstract

The purpose of this research was to determine the novel angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory peptides isolated from trypsin hydrolysate of soy protein. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolated was prepared by pipette 1.0 ml trypsin solution into a substrate 1.0 ml incubate for 3 hr at room temperature and then centrifuged at 5,000 rpm for 45 minutes at 4°C to separate soy peptides 3 kDa using Amicon centrifuge Ultramembrane molecular weight cut off 3 kDa. MALDI-TOF MS spectra analysis showed an intense peak at m/z-862.628. The penetrated hydrolysate of molecular weight cut-off 3 kDa ultramembrane showed angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi) with the value of 92.65±0.54 %. Two kinds of novel ACE inhibitory peptides fractions number 11 and 18 were isolated from the hydrolysate by Fast Protein liquid chromatography (FPLC) using Superose™ 12 as a column. These peptides were identified by amino acid composition analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS), as Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys and Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys with the ACEi values of 80.69±0.53 % and 91.79±0.10%, respectively.

Keywords : Soy protein isolate, Angiotensin I-converting enzyme, trypsin

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการยับยั้ง angiotensin I-converting enzyme (ACE) ด้วยเพปไทด์ที่แยกจากการใช้เอนไซม์ทริปซินไฮโดรไลซ์โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ทำการทดลองโดยนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมา ไฮโดรไลซิสด้วยเอนไซม์ทริปซิน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเพปไทด์ที่ได้ไปปั่นแยก โดยใช้ Amicon centrifuge ultramembrane ที่มี molecular weight cut off 3 กิโลดาลตัน ที่ความเร็วรอบ 5,000 ต่อนาที เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเพปไทด์ที่ได้ไปวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF mass spectrometry จากการวิเคราะห์ mass spectra พบว่าเพปไทด์มีน้ำหนักโมเลกุลที่ตำแหน่ง m/z 862.628 และเมื่อนำไปวิเคราะห์ angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi) พบว่ามีค่าเท่ากับร้อยละ 92.65±0.54 และเมื่อนำเพปไทด์ที่ผ่าน ultramembrane ที่มี molecular weight cut off 3 กิโลดาลตัน ไปแยกเพปไทด์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ซนิด Superose™ 12 พบว่าเพปไทด์มี 3 แฟรกชัน คือ แฟรกชันที่ 8 11 และ 18 และเมื่อนำแฟรกชั่นที่ 11 และ 18 ไปวิเคราะห์ ACEi พบว่ามีค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 80.69±0.53 และ 91.79±0.10 ตามลำดับ และจากการนำเพปไทด์ทั้งสองแฟรกชันนี้ไปวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass spectrometry พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys และ Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys

คำสำคัญ : โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง, Angiotensin I-converting enzyme, ทริปซิน

บทนำ

Soy protein isolate เป็นโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง ซึ่งเป็นแหล่งรวมของกรดอะมิโนที่มีความเข้มข้นสูงสุด (The Highest Concentration Amino Acids) ซึ่งจะช่วยผู้ที่เสริมสร้างกล้ามเนื้อ (The Body Builder) ให้ยังคงได้รับโปรตีนคุณภาพสูงในระหว่างการควบคุมอาหาร (Diet Phase) และยังเป็นแหล่งโปรตีนสำคัญที่ร่างกายจำเป็นจะต้องใช้ ในระหว่างการออกกำลังกายอีกด้วย และนอกจากนี้ soy protein isolate ยังจะไปเพิ่มการผลิตไธรอยด์ฮอร์โมน ชื่อไธรอกซิน ที่ต่อมไธรอยด์ ซึ่งจะทำให้ร่างกายมีอัตราการเผาผลาญสารอาหารเพิ่มมากขึ้น ทำให้ไขมันที่สะสมอยู่ในร่างกายมีปริมาณลดลง soy protein isolate จะให้ Branched Chain Amino Acids (BCAA) ประมาณร้อยละ 17 โดย BCAA จะเป็นตัวไปกระตุ้นให้มีการ

[1]สาขาวิชาการจัดการธุรกิจอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหอการค้าไทย 126/1 ถนนวิภาวดีรังสิต ดินแดง กรุงเทพมหานคร 10400

[1]Department of Food Business Management, School of Science and Technology, University of the Thai Chamber of Commerce, Bangkok,10400

หลั่งฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต (Growth Hormone) จากต่อมใต้สมอง (Pituitary Gland) ซึ่งจะทำให้ร่างกายสามารถสร้างกล้ามเนื้อ (Skeleton Muscle) ได้อย่างรวดเร็ว โดยที่ฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโต จะไปกระตุ้นกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์กล้ามเนื้อที่มีการใช้งาน ทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้น ในการผลิตเพปไทด์สายสั้นจากถั่วเหลือง จะใช้โปรตีนจากถั่วเหลืองที่ขจัดแป้ง ไขมัน และอื่นๆ ออกก่อน ให้เหลือแต่โปรตีน จากนั้นนำมาย่อยด้วยด้วยเอนไซม์ในกลุ่มโปรติเอส ได้แก่ ทริปซิน เพปซิน ไคโมทริปซิน โบรมิเลน คาร์บอกซีเพปติเดส และอะมิโนเพปติเดส ซึ่งร้อยละการไฮโดรไลซิสจะอยู่ในช่วง 1 -39 ขึ้นอยู่กับเอนไซม์และภาวะที่ใช้ เพปไทด์ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง จะเป็นเพปไทด์ที่กรดอะมิโนมีสมบัติและหน้าที่ที่ดีขึ้น (Barca และคณะ, 2008) เช่น มีสมบัติต้านอนุมูลอิสระ(Park และคณะ, 2010) angiotensin I-converting enzyme inhibitory (Fan และคณะ, 2009) นอกจากนี้เพปไทด์จากโปรตีนถั่วเหลืองสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาไบโอแอคทีฟเพปไทด์จากไฮโดรไลซีสโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน และนำผลการทดลองที่ได้มาศึกษาและพัฒนาการผลิตเพปไทด์สายสั้นต่อไป

วิธีการทดลอง

การเตรียมสารละลายโปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง

โปรตีนสกัดจากถั่วเหลือง 100 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อแล้ว 1 ลิตร คนด้วย Magnetic stirrer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เก็บส่วนใสไว้ทำการทดลองต่อไป

การย่อยโปรตีนสกัดถั่วเหลืองด้วยเอนไซม์ทริปซิน

ทำการผสมเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนหมู (1,900 units/mg solid) จำนวน 1000 มิลลิกรัมกับ0.1 M Tris (hydroxylmethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร นำมาปริมาตร 400 ไมโครลิตร เติมลงในโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองที่มีปริมาตรอยู่ 2.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที จากนั้นนำไปทำ SDS-PAGE โดยใช้ Amersham ECL Gel Box และ Amersham ECL Gel 10% ใช้กระแสไฟฟ้ากระแสตรง 160 โวลล์ ระยะเวลา 50 นาทีเพื่อคัดเลือกภาวะที่เหมาะสมในการย่อย

การคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดย Amicon Ultramembrane ขนาด 3K

นำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองปริมาตร 20 มิลลิลิตรมาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ทริปซิน 3000 มิลลิกรัม กับ 0.1M Tris(hydroxylmethyl) aminomethane-Hydrochloric acid buffer pH 8 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าผสมเป็นเวลา 90 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ Amicon Ultramembrane ขนาด 3K เก็บส่วนที่ผ่าน Amicon Ultramembrane ขนาด 3K ในขวดสีชารอวิเคราะห์ต่อไป

การแยกเพปไทด์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

นำเพปไทด์ที่ผ่านการคัดแยกเพปไทด์สายสั้นโดย Amicon Ultramembrane ขนาด 3K มาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose^{TM} 12 จากนั้นนำเพปไทด์ที่แยกได้ไปวิเคราะห์โปรตีนโดย เครื่อง Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) และวิเคราะห์ angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity (ACEi) โดยใช้ ACE Kit (Dojindo, Japan)

การวิเคราะห์ Mass Spectra เพปไทด์โปรตีนสกัดถั่วเหลืองโดยวิธี MALDI-TOF Mass Spectrometry

การวิเคราะห์ Mass spectra เพปไทด์โปรตีนสกัดถั่วเหลืองใช้วิธี Matrix-Assisted Lased Desorption/Ionization-Time of Fight Mass Spectrometry (MALDI-TOF Mass spectrometer) บริษัท Bruker Daltonics (Bremen, Germany) รุ่น Autoflex II โดยใช้ไนโตรเจนเลเซอร์ ที่ความยาวคลื่น 337 นาโนเมตร สารตัวอย่างผสมกับสารละลาย matrix (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) และใช้สารตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร ในการวิเคราะห์และใช้กระแสไฟฟ้า 20 kV ผลการทดลอง Mass spectra ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ ซอฟท์แวร์ Flex Analysis บริษัท Bruker Daltonics

ผลการทดลอง

เมื่อนำโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่เวลาต่างๆ กัน พบว่า เพปไทด์ที่ได้มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 29- 42 kDa และ 10.5 kDa แสดงว่าเอนไซม์ทริปซินมีความสามารถในการย่อยโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองโดยเวลาที่ใช้

ในการย่อยโปรตีนส่งผลให้โปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองมีขนาดเล็กลง ส่วนเวลาที่เหมาะสมคือ 30 นาที เป็นเวลาที่ย่อยโปรตีนได้มากที่สุดและใช้เวลาน้อยที่สุด (Figure 1)

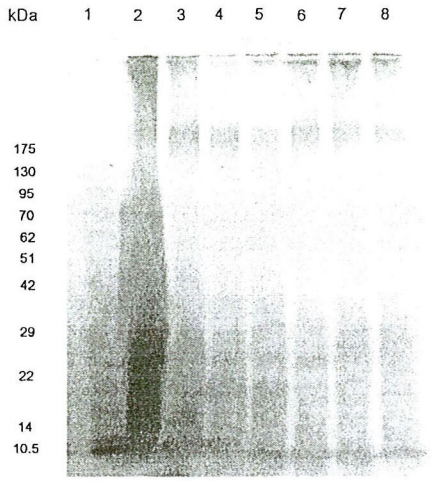


Figure 1 Trypsin catalysed hydrolysis of soy isolated protein solution 2.5 ml, SDS-PAGE analysis was performed after incubation 0 minute (Lane 2), 30 minutes (Lane 3), 60 minutes (Lane 4), 90 minutes (Lane 5), 120 minutes (Lane 6), 150 minutes(Lane7), 180 minutes and standard protein markers (Lane 1).

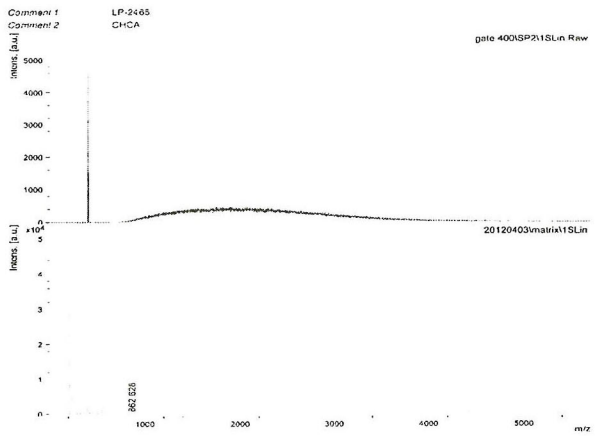


Figure 2 MALDI-TOF MS spectra of trypsin catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

เมื่อนำเพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินไปแยกขนาดโมเลกุลที่ต้องการโดยใช้ Amicon Ultramembrane ขนาด 3K และนำเพปไทด์ที่ผ่าน Amicon นำไปวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลโดยวิธี MALDI-TOF MS พบว่า intense peak ของเพปไทด์เท่ากับ 862.628 m/z (Figure 2) ซึ่งมีความใกล้เคียงกับขนาดของโมเลกุลที่วิเคราะห์โดยวิธี SDS-PAGE คือ 10.5 kDa ซึ่งเป็นขนาดโมเลกุลที่เล็กที่สุดที่วิธี SDS-PAGE จะสามารถตรวจสอบได้จากนั้นนำเพปไทด์ที่ผ่าน Amicon ไปแยกให้บริสุทธิ์โดยใช้เครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) พบว่าได้พีคโปรตีน 3 พีค (Figure 3)

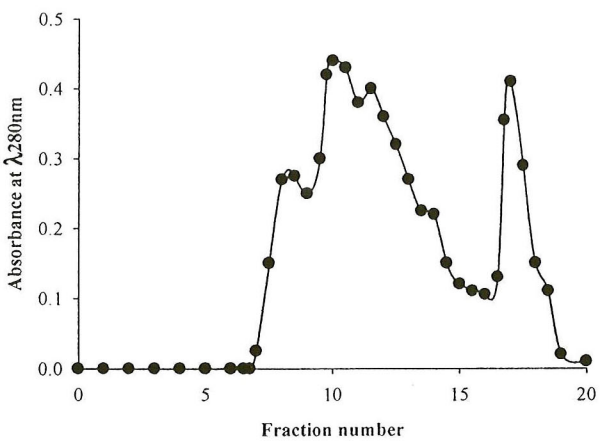


Figure 3 FPLC elution profile of soy peptide on gel filtration chromatography using column Superose^{TM} 12 was eluted with distilled water. The protein concentration was determined by measuring at absorbance 280 nm.

Table 1 Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activities of soy peptide.

Sample	Protein (mg/ml)	ACEi(%)
Peptide concentrate with Ultramembrane filtration 3 K	112.4	92.65±0.54
Fraction 11	0.37±0.00	80.69±0.53
Fraction 18	0.15±0.02	91.79±0.10

เมื่อนำเพปไทด์พีคที่ 11 และ 18 ที่ผ่าน FPLC มาวิเคราะห์การยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting พบว่าเพปไทด์ที่ได้จากสารสกัดถั่วเหลืองมีสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ angiotensin I-converting ได้ร้อยละ 80-91 ในขณะที่เพปไทด์ที่ผ่าน 3 K ให้ค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 92.65 (Table 1) โดยการยับยั้งเอนไซม์ angiotensin I-converting เป็นผลให้เกิดการหยุดการเปลี่ยน angiotensin I ไปเป็น angiotensin II ในขณะเดียวกัน ACEi ก็มีผลลดการสลายตัวของ bradykinin สรุปแล้ว ACEi มีผลทำให้ความดันโลหิตต่ำ(Vermeirssen และคณะ, 2002; Ching และคณะ 2011)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย ปีการศึกษา 2554

สรุปผลการทดลอง

การนำโปรตีนจากสารสกัดมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน พบว่าโปรตีนสกัดจากถั่วเหลืองถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรติเอสได้สูงสุดร้อยละ 28 มีน้ำหนักโมเลกุลหลักที่ 10.5 kDa เมื่อทดสอบโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุลได้ต่ำสุดจึงได้นำเพปไทด์มาวิเคราะห์ต่อด้วย MALDI-TOF Mass Spectrometry พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของเพปไทด์อยู่ที่ 862.628 ดาลตัน นำเพปไทด์ไปแยกโดยวิธี Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) ด้วยคอลัมน์ชนิด Superose™ 12 พบว่าเพปไทด์มี 3 แฟรกชัน คือ แฟรกชันที่ 8 11 และ 18 และเมื่อแฟรกชั่นที่ 11 และ 18 ไปวิเคราะห์ ACEi พบว่ามีค่า ACEi เท่ากับร้อยละ 80.69±0.53 และ 91.79±0.10 ตามลำดับ และจากการนำเพปไทด์ทั้งสองแฟรกชันนี้ไปวิเคราะห์ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโนโดยวิธี Liquid Chromatography-Mass spectrometry พบว่ามีลำดับกรดอะมิโนดังนี้ Gly-Gly-Asp-Ile-Thr-Leu-Leu-Lys และ Thr-Asn-Ala-Glu-Asn-Glu-Phe-Val-Thr-Ile-Lys-Lys

เอกสารอ้างอิง

de la Barca, A.M.C., Ruiz-Salazar, R.A., and Jara-Marini, M.E., 2000, Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties, Journal of Food Science 65(2):246-253.

Ching, L.C., Abdullah, N., and Shuib, A.S., 2011, Characterization of antihypertensive peptides from *Pleurotus cystidiosus* O.K. miller (abalone mushroom), The Proceeding of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP7), 2011.

Fan, J., Hu, X., Tan, S., Zhang, Y., Tatsumi, E., and Li, L., 2009, Isolation and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide derived from *douchi*, a traditional Chinese fermented soybean food. Journal of Science of Food and Agriculture, 89(4):603-608.

Park, S.Y., Lee, J.S., Baek, H.H., and Lee, H.G., 2010, Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate, Journal of Food Biochemistry, 34 (s1):120-32.

Vermeirssen, V., Camp, J.V., and Verstraete, W., 2008, Assay of Angiotensin I-converting enzyme-inhibiting activity based on the detection of 3-hydroxybutyrate with water-soluble tetrazolium salt, Analytical Sciences, 24:1057-1060.

BOOK OF ABSTRACTS

FOOD INNOVATION ASIA CONFERENCE 2012

"Green and Sustainable Food Technology for All"

14-15 June 2012
BITEC, Bangkok
THAILAND

Organised by :

FoSTAT FIESTA

Support by :

B·E·S บี·อี·เอส

NSTDA

AOAC THAILAND

Sponsors by :

all Givaudan DSM NIA

MIGHTY Nutrition Sci PROPAK ASIA 2012

symrise always inspiring more... ARDA

www.fostat.org
www.facebook.com/fostat.fanpage

Applications of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolated

[1]*Surapong Pinitglang**, [1]*Ratchanee Saiprajong*, [1]*Souwanee Ieowsakulrat and* [1]*Bongkoch Apitanaruk*

[1]Department of Food Science and Technology, School of Science and Technology, University of the Thai Chamber of Commerce, Bangkok, Thailand

*Corresponding author: surapong_pin@utcc.ac.th

Abstract

Enzymatic hydrolysis of soy protein isolated can enhance or reduce its functional properties and improve its nutritious value. Soy protein isolated hydrolysates were primarily used as functional food ingredients, flavor and nutritious enhancers, protein substitute, and clinical products. The main problem of peptides analysis for enzymatic hydrolysis of soy protein isolated was production of a varieties molecular weight of soy peptides. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) has been shown to be a powerful tool in the analysis of several peptides. The purpose of this research was to investigate the effect of ficain, trypsin, pepsin, serine proteases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis*, on enzymatic hydrolysis of soy protein isolated. Molecular mass spectra of soy peptides were determined by MALDI- TOF MS. Soy protein isolated substrate was prepared by dissolve 100 g. in 200 ml distilled water. Proteases solutions were prepared by dissolve 100 mg of proteinases weighted accurately in 0.1 M sodium acetate or Tris-HCl buffer, pH optimum. Enzymatic hydrolysis of soy protein isolated was prepared by pipette 1.0 ml protease solution into a substrate 1.0 ml incubate for 3 hr at room temperature and then centrifuged at 5,000 rpm for 45 minutes at 4°C to separate soy peptides 3 kDa using Amicon centrifuge Ultramembrane molecular weight cut off 3 kDa (molecular with *Mr* > 3,000 dalton will not pass through). Soy peptide sample was prepared for MALDI -TOF MS analysis by using freeze-drying.The range of molecular mass spectra profiles of soy peptides were comparable to ficain, pepsin, trypsin, proteases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis* by enzymatic hydrolysis of soy protein isolated as 294.414-2370.791, 61.177-2214.472, 862.628, 289.915-2534.950 and 294.414-2636.909, respectively. The molecular mass spectra of amino acid and soy peptides present in 3 kDa peptide solutions were observed to be in the range of 61.177-2,636.909 dalton. MALDI-TOF MS analysis showed an intense peak at m/z-294.414, 172.237, 862.628, 294.414 and 2,636.909 for ficain, pepsin, trypsin, proteases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis* by enzymatic hydrolysis of soy protein isolated that was markedly increased after a 3-hr incubation, respectively.

Keywords: Soy peptide, Soy protein isolated, Protease, MALDI-TOF MS

Introduction

Soy proteins are important protein source for human being and livestock. Soy protein hydrolysates were used as functional food, flavour and nutritious enhancers, protein substitute. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilization

Sun (2011) showed that conditions for hydrolysis were usually mild, whereas recently high pressure treatment attracted more interest. Degree of hydrolysis was usually between 1% and 39%. Enzymatic hydrolysis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties (Barca and others 2008) has shown that after enzymatic hydrolysate was incubated with chymotrypsin at 37°C. Optimum hydrolysis conditions were 12 h and 50°C. Modified hydrolysateds have a potential for use in soluble high nutrition product. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate (Park and others 2010) has shown that the amino acid composition of the final potent antioxidant peptide, hydrophobic amino acids were most abundant amino acids and among them phenylalanine was especially abundant. *Douchi*, a traditional fermented soybean food, has recently attracted to its superior physiological activity. From the results of study (Fan and others 2009) has shown that angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide derived from the most potent douche was isolate and characterized. Kim and others (2008) showed that defatted soy protein was hydrolyzed with thermoase and hydrophobic peptides were extracted with ethanol. This peptide fraction significantly affected cell cycle progression by arresting P388D1 at G2/M phases. Modern research in food science and nutrition is moving from classical methodology to advanced analytical mass spectrometry techniques play a crucial role. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) is valuable tool for the analysis of peptides and proteins. Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI-TOF MS (Dave and others 2011) has shown that sample cleanup to remove buffers and impurities can greatly improve the quality of the results. Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and MALDI-TOF MS (Vorm and Roepstorff 1994) has shown that the sensitivity of the technique is in the femtomole to low-picromole range. Separation of a protein mixture by size-exclusion chromatography was combined with MALDI-TOF MS. Identification of proteins in the collected fraction was performed both as intact proteins by MALDI_TOF MS and using peptide mass fingerprinting after their digestion with trypsin (Salplachta and others 2004). Study of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptide isolated from alcalase hydrolysate of mung bean protein (Li and others 2006) has shown that these peptides were identified by amino acid composition analysis and MALDI-TOF MS. In the present study we provide various enzymatic hydrolysates of soy protein isolated for identification of soy peptides molecular mass spectra by a rapid method MALDI-TOF MS.

Materials and Methods

Preparation of soy protein isolated substrate

Substrate was prepared by directly dissolving 100 g of soy protein isolated sample in 200 mL of distilled water. The suspension was mixed using magnetic stirrer for 1 hr at room temperature and then centrifuged at 5,000 rpm for 45 minutes at 4°C. The supernatant fraction was collected and store at 4°C until use. The total protein content was determined by the Lowry method using BSA as standard.

Enzymatic Hydrolysis

Ficain, pepsin, trypsin , serine proteinases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae* were prepared by dissolve 1.0 g in 5.0 mL enzyme optimum pH buffer. This mixture solution were prepared fresh daily. The mixing solution was prepared by pipette 1.0 ml enzyme solution into 1 mL soy protein isolated solution, and place in room temperature for 30, 60, 120, 150, 180 minutes. After exactly incubation time place the test tube in the water bath at 95°C, for 5 minutes, allow to fully coagulate the precipitated protein. Peptide solutions were separated and concentrated in Amicon centrifuge Ultramembrane molecular weight cut off 3 kDa. The penetrate fraction was collected and store at 4°C prior to analysis by MALDI-TOF MS.

SDS-PAGE analysis

Aliquots of 25 µL of diluted soy peptides were mixed with 15 µL of Laemmli buffer and heated in boiling water for 5 minutes. The mixture was then loaded in a 1.5 mm thick GE Healthcare Life Science, Amersham ECL™ 10% Gel. The cathodic and anodic compartments were filled with Tris-glycine buffer, pH 8.3, containing 0.1 % SDS. The electrophoretic run was performed by setting a voltage of 160 V until the dye front reached the bottom of the gel. Gel was stained in colloidal Coomassie brilliant blue R-350 and destained in mixing solution of 250 mL ethanol and 80 mL acetic acid and soak the destained gel in preserving solution 250 mL of (87%v/v) glycerol with water for 30 minutes.

MALDI-TOF MS analysis

Sample soy peptides were prepared by freeze-dried to determine a molecular mass by MALDI-TOF MS (Ultra-FLEX II) Bruker at a linear-positive mode. The sample was analyzed using a Bruker Daltonics flexAnalysis. A 500 μg sample was dissolved in a low molecular weight peptide (lower than 3 kDa) matrix, HCCA containing 30% acetronitile : 70% water with 0.1% trifluoroacetic acid for 20 μL. The sample solution was diluted for 100-time with the same matrix before injection with an injection volume of 1 μL. Ions were generated by nitrogen laser emitting at 337 nm. The mass spectrometry was calibrated from m/z 100-5,000.

Results

The results of ficain catalysed hydrolysis of soy protein isolated were shown electrophoresis patterns in Figure 1. The MALDI-TOF spectra of the soy protein isolated following digestion with ficain, pepsin, trypsin, serine proteinases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae* are shown in Figure 2-6, respectively.

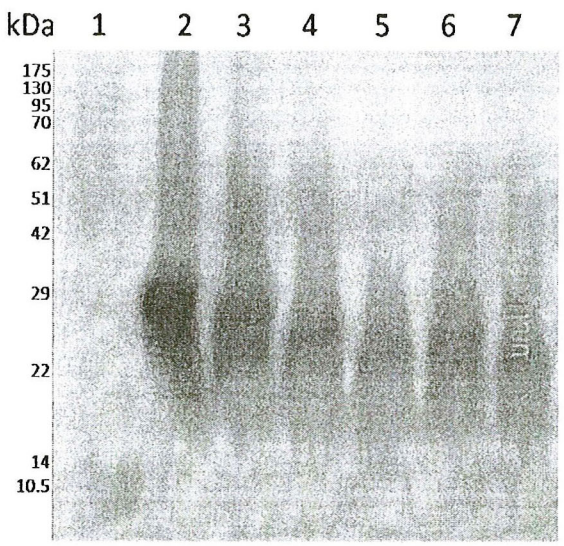


Figure 1 Ficain catalysed hydrolysis of soy isolated protein solution 2.5 ml, ficain 5,800 CDU. SDS-PAGE analysis was performed after incubation 0 minute (Lane 2), 30 minutes (Lane 3), 60 minutes (Lane 4), 90 minutes (Lane 5), 120 minutes (Lane 6), 150 minutes (Lane7), 180 minutes and standard protein markers (Lane 1).

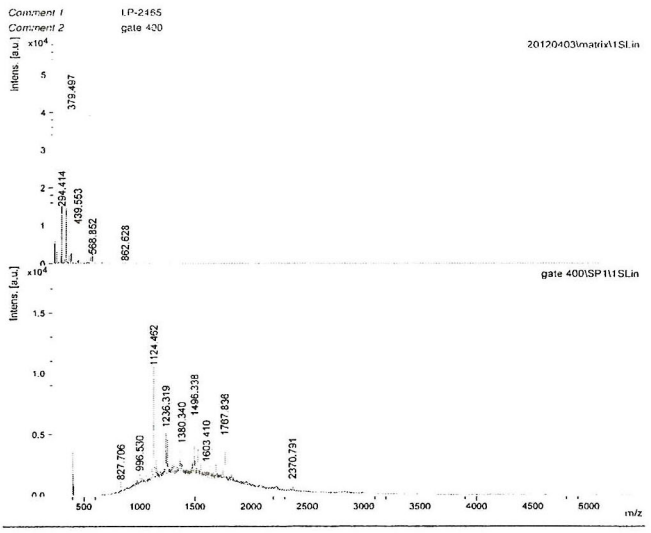


Figure 2 MALDI-TOF MS spectra of ficain catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

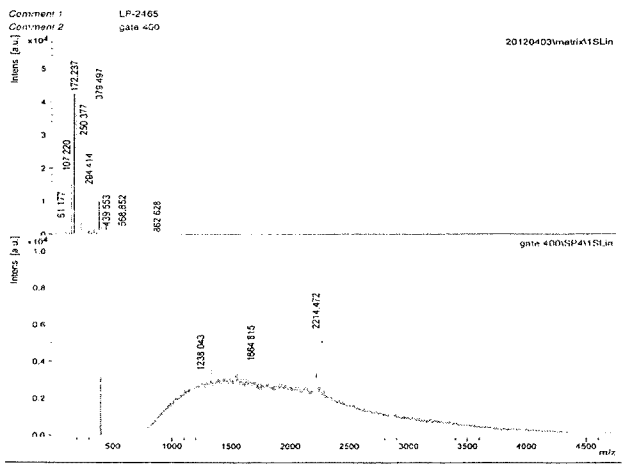


Figure 3 MALDI-TOF MS spectra of pepsin catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

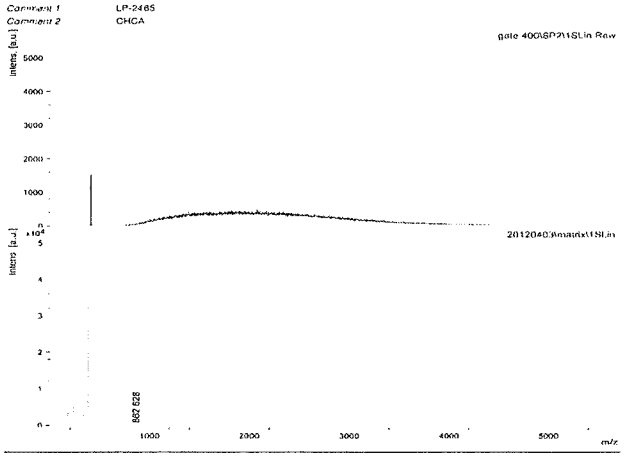


Figure 4 MALDI-TOF MS spectra of trypsin catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

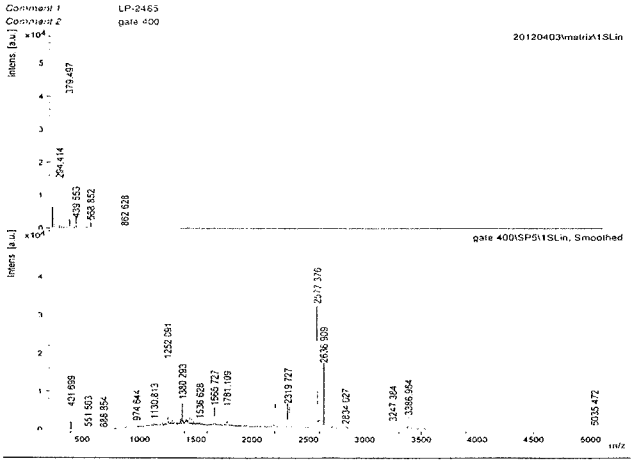


Figure 5 MALDI-TOF MS spectra of serine proteinase from *Bacillus licheniformis* catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

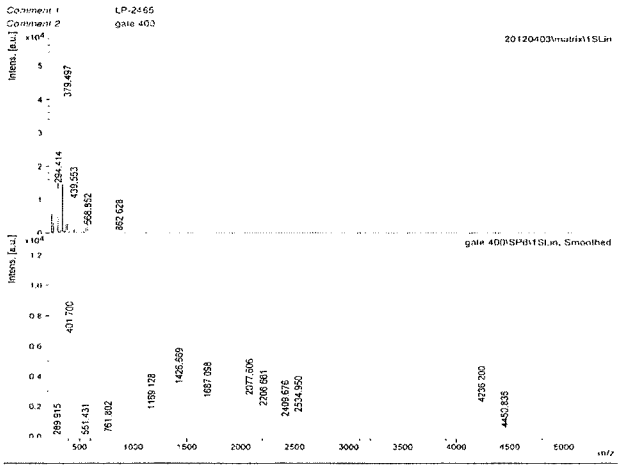


Figure 6 MALDI-TOF MS spectra of serine proteinase from *Aspergillus oryzae* catalysed hydrolysis of soy protein isolated.

Discussion

A MALDI-TOF MS was applied for analysis of hydrolysated from complex soy peptide mixtures. The method is fast analysis per sample and is characterized by a relatively low running cost. Ficain, pepsin, trypsin, serine proteinases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae* was selected in this work for soy protein isolated hydrolysis due to its highly specific endogenous cleavages. MALDI-TOF MS analysis showed an intense peak of enzymatic hydrolysis of soy protein isolated products at m/z 294.414, 172.237, 862.628, 294.414 and 2,636.909 for ficain, pepsin, trypsin, serine proteinases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis*, respectively

Acknowledgements

This research was supported by the University of the Thai Chamber of Commerce Research Fund to RS. Associate Professor Dr. Aporn Wongwichan, Department of Microbiology, Faculty of Science, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand is gratefully acknowledged for supporting freeze drying facility.

References

Dave KA, Headlam MJ, Wallis TP, Gorman JJ. 2011. Preparation and analysis of proteins and peptides using MALDI TOF/TOF Mass Spectrometry. In: Taylor, G, Seiries Editor. Current Protocols in Protein Science. New Jersey: John Wiley & Son. p 63:16.13.1-16.13.21.

de la Barca AMC, Ruiz-Salazar RA, Jara-Marini ME. 2000. Enzymatic hydrolysis and synthesis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. J Food Sci 65(2):246-53.

Fan J, Hu X, Tan S, Zhang Y, Tatsumi E, Li L. 2009. Isolation and characterization of novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide derived from *douchi*, a traditional Chinese fermented soybean food. J Sci Food Agric 89(4):603-8.

Kim SE, Kim HH, Kim JY, Kang YI, Woo HJ, Lee HJ.2000. Anticancer activity of hydrophobic peptides from soy proteins. BioFactors 12(1-4):151-5.

Li GH, Wan JZ, Le GW, Shi YH. 2006. Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides isolated from Alcalase hydrolysate of mung bean protein. J Peptide Sci 12(8):509-14.

Park SY, Lee JS, Baek HH, Lee HG. 2010. Purification and characterization of antioxidant peptides from soy protein hydrolysate. J Food Biochem 34 (s1):120-32.

Salplachta J, Rehulka P, Chmelik J. 2004. Identification of proteins by combination of size-exclusion chromatography with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and comparison of some desalting procedures for both intact proteins and their tryptic digests. J Mass Spectrom 39(12):1395-401.

Sun XD. 2011. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. International J Food Sci Tech 46(12):2447-59.

Vorm O, Roepstorff P. 1994. Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Biol Mass Spectrom 23(12): 734-40.

Aim & Objective
Organization
Contact
Sponsor & Exhibition

Member sign in
Important dates
Registration

Topics
Important Dates
Keynote Speaker
Updated TSB Program
Plenary & Invited Speaker
Updated Jatropha Program

Instructions for Oral Presentation
Call for Paper
Guideline
Payment Information
Participant Information
Payment Status

Excursion
Accommodation
Useful Information
Venue information

Staff Login

NEW!

Update!

Assoc.Prof. Penjit Srinophakun, Ph.D
President of Thai Society for Biotechnology (TSB)

Assist. Prof. Janpen Intaraprasert,Ph.D
Chairperson, Conference Organizing Committee, TSB 2012

WELCOME to TSB2012

Instructions for Oral Presentation

Download conference invitation letter for Thai participant
(หนังสือเชิญ ประกอบการขออนุมัติไปราชการ) NEW!

Check your presentation schedule here

Update! (September 21, 2012)

UPDATED TSB PROGRAM

Update! (November 19, 2012)

UPDATED JATROPHA PROGRAM

Antihypertensive, antioxidant and antimicrobial properties of bioactive peptides from soy protein isolate hydrolysed with an aspartic, cysteine and serine proteinases

Ratchanee Saiprajong[a] and Surapong Pinitglang[a]

[a]*Department of Food Science and Technology, School of Science and Technology, University of the Thai Chamber of Commerce, Vibhavadee Rangsit Road, Bangkok 10400 Thailand.*

Abstract

Bioactive peptides might be released from food proteins through enzymatic hydrolysis. These molecules could be potentially employed in functional food products. Bioactive peptides were separated by Superose^{TM}12 gel filtration chromatography and further separation by ultrafiltration with molecular weight cut off 3 kDa resulting in fractions rich in bioactive peptides with the potential to act as antihypertensive, antioxidant and antimicrobial properties. The present studies investigated the angiotensin-I converting enzyme (ACE-I) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities for hydrolysates produced by hydrolyzing soy protein isolate as well as ultrafiltered bioactive peptide fractions from these hydrolysates. Ficain, pepsin, trypsin, serine proteinases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis* were used to produce extensively hydrolyzed soy protein isolate. Bioactive peptides were determined molecular mass using Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis. The range of molecular mass spectra profiles of bioactive peptides were comparable to ficain, pepsin, trypsin, proteases from *Aspergillus oryzae* and *Bacillus licheniformis* by enzymatic hydrolysis of soy protein isolated as 294.414-2370.791, 61.177-2214.472, 862.628, 289.915-2534.950 and 294.414-3386.954 dalton, respectively. ACE-I inhibitory activity was observed to increase up to 90 minutes of trypsin hydrolysis (92.65% of inhibition) and declining afterwards. Trypsin hydrolysates were shown to inhibit the growth of *Enterobacter aerogenes*. Hydrolysate showed low 2,2′-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging ability, with higher activity 75.77% reached after 90 minutes of trypsin hydrolysis. The results indicate the possibility of these obtainined bioactive peptides from to be useful ingredients in food applications for physiologically functional foods with antihypertensive, antioxidant and antimicrobial activities.

Keywords: bioactive peptide, soy protein isolate, proteinases, antihypertensive, antioxidant

Introduction and Objective

Soybean is a plant source of bioactive peptides. It can be observed that the main approach used to produce peptides is by enzymatic hydrolysis. These peptides are then further isolated by either ultrafiltration or by gel filtration chromatography. Thus, peptides with different amino acid sequences that possess various biological activities can be obtained, depending on the initial protein source, enzyme used, and processing conditions [1]. Hypertension is a major life-style disease. The rennin-angiotensin system plays a dominant role in the regulation of blood pressure, thus angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity was chosen for the hypertension factor search study [2]. Soy beans are excellent sources of bioactive proteins and peptides. The antioxidant property of these plant-derived proteins and peptides has been associated with many beneficial health-promoting properties such as reducing cholesterol levels. The antioxidative properties of soy protein hydrolysates have been ascribed the co-operative effect of a number of properties, including their ability to scavenge free radicals [3-4]. Most of the proteases used in protein hydrolysis can be applied to soy hydrolysis. At present, some of the enzymes employed in the production of hydrolysates for food use are from plant or microbial origin, as papain or ficain due to their large scale availability thus generally used in food processing. The result from soy protein digestion using proteolytic enzymes to study the activities of bioactive soy peptides

are summarized, and possibilities use them as active ingredients for functional food applications such as drinks, yogurts, and many others.

Materials and Methods

Determination of molecular weight of soy peptide by Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGE was performed on a GE Healthcare Life Science, Amersham ECL™ Gel Box system, Amersham ECL 10% gel and Amersham ECL Gel running buffer according to Laemmli [5]. Standard gel staining procedure used PluseOne Coomasie Blue PhastGel R-300 Tabletes.

Enzymatic hydrolysis and separation of soy peptide by ultramembrane filtration

Ficain, pepsin, trypsin, serine proteinases from *Bacillus licheniformis* and *Aspergillus oryzae* were prepared by dissolving 1.0 g in 5.0 mL enzyme optimum pH buffer. These mixture solutions were prepared fresh daily by pipetting 1.0 ml enzyme solution into 1 mL soy protein isolated solution, and placed in room temperature for 30, 60, 120, 150, 180 minutes. To stop the enzymatic hydrolysis reaction, place the test tube in the water bath at 95℃, for 5 minutes, allow to fully coagulate the precipitated protein. Peptide solutions were separated and concentrated in Amicon centrifuge Ultramembrane molecular weight cut off 3 kDa [6]. The penetrate fraction was collected and stored at 4°C prior to analysis by Matrix – Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS).

Determination of mass spectra by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer

MALDI spectra were obtained using a Bruker Daltonics (Bremen, Germany) Autoflex II Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer. The instrument used an N_2 laser (337 nm). It was also equipped with delayed extraction technology. All spectra were the average of 20 individual spectra. Sample was mixed with matrix solution (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid) if needed. Then 1 μL of the solution was spotted directly onto three separate wells of the plate and air-dried. External mass calibration was performed with a separated acquisition of a mixture of standard peptide for low mass or standard protein for high mass, spotted in wells close to the samples, and loaded in the same manner as sample analysis. Laser power was opportunely adjusted to finally reach the best signal-to-noise ratio. The number of laser shot accumulated was determined as needed to obtain good responses of all sample. Typically, 250 laser shots were acquired for each mass spectrum. The instrument operated with an accelerating voltage of 20 kV. Mass spectra were elaborated using Flex Analysis software supplied by Bruker Daltonics.

Assay of Angiotensin-converting enzyme-I (ACE-I) inhibitory activity of soy peptides

Angiotensin-converting enzyme (ACE-I) is one of the vasopressor principle. ACE-I converts angiotensin I to angiotensin II, that has a vasopressor action, in the renin-angiotensin system and also inactivates bradykinin that is an antihypertensive peptide. Recently, modification of the conventional ACE inhibition assay procedure has been requested because of the use of harmful organic solvent such as ethyl acetate for the extraction of hippuric acid cleaved from Hippuryl-His-Leu by ACE and its complicated procedure. ACE Kit-WST is a simple and convenient kit to measure the ACE inhibitory activity [7-11]. 3-Hydroxybutyryl-Gly-Gly-Gly (3HB-GGG) is utilized as a substrate for ACE, and the amount of cleaved 3-hydroxybutyric acid (3HB) from 3HB-GGG is measured by the enzymatic method. Neither organic solvent nor extraction procedure is required through the whole procedure. In addition, since ACE Kit-WST is optimized for 96-well microplate assay, a large number of samples can be tested at once. Calculation the ACE inhibitory activity (inhibition rate % was calculated using the following equation:

ACE inhibitory activity (inhibition rate %)

ACEi = [(Ablank 1 - Asample) / (Ablank 1 - Ablank 2)] X 100

Blank 1 is a positive control (without ACE inhibition). Blank 2 is a reagent blank.

Determination of antioxidation activity

The percentage of antioxidant activity (AA%) of each substance was assessed by 2,2′-diphenyl-1-picryhydrazyl (DPPH) free

radical assay. The measurement of the DPPH radical scavenging activity was performed according to the methodology described by Brand-Williams et al. [12]. The samples were reacted with the stable DPPH radical in an ethanol solution. The reaction mixture consisted of 0.5 mL of sample, 3 mL of absolute ethanol and 0.3 mL of DPPH radical solution 0.5 mM in ethanol. When DPPH reacts with an antioxidant compound, which can donate hydrogen, it is reduced. The changes in color (from deep violet to light yellow) were read [Absorbance (Abs)] at 517 nm after 100 min of reaction using a UV-VIS spectrophotometer (UV1601, Shimadzu, Japan). The mixture of ethanol (3.3 mL) and sample (0.5 mL) serve as blank. The control solution was prepared by mixing ethanol (3.5 mL) and DPPH radical solution (0.3 mL). The scavenging activity was measured at 518 nm and converted into the according to percentage antioxidant activity (AA%) using the following formula: [13].

$$AA\%=100-[(Abs_{sample}- Abs_{blank}/Abs_{control})]x100$$

Determination of antimicrobial properties

Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus, Escherichia coli and *Enterobacter aerogenes* were used for antibacterial activity. The cultures were prepared by inoculating tryptic soy broth. Inocula were prepared by diluting overnight cultures in saline to approximately 10^8 cfu ml^{-1}. The short peptides were separated by Amicon Centrifuge Ultramembrane with a molecular weight cut off 3 kDa. Determination of antimicrobial properties by agar diffusion method followed the modification of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).

Gel filtration Chromatography by Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)

A GE Healthcare Life Sciences AKTA^{TM} Fast Protein Liquid Chromatography system was used to purify soy peptide. This system consists of a Liquid Chromatography Controller, a High Precision Pump, and FRAC100 Fraction collector. FPLC was used to purify soy peptide using Superose^{TM} 12 gel filtration chromatography column.

Results and Discussion

In order to determine the possible effect of the amino acid profile on antioxidant activity, the amino acid compositions of the active antioxidant fractions resulting from separation of Amicon Centrifuge Ultrafiltration 3 kDa were analyzed (Table 1).

Table 1 *Comparative amino acid profiles of fractionated soy peptide hydrolysates by pepsin and trypsin*

Amino acid (mg/100g)	Peptide		
	Soy protein isolate	Pepsin	Trypsin
Alanine	175.6	94.86	115.91
Arginine	331.92	-	158.79
Aspartic acid	483.94	187.35	282.13
Glutamic acid	1098.94	298.10	553.03
Glycine	188.77	98.21	96.52
Isoleucine	98.63	-	-
Leucine	253.21	90.2	118.91
Lysine	269.01	74.8	93.63
Phenylalanine	184.22	68.65	79.84
Proline	238.50	80.48	141.98
Serine	244.83	90.29	130.42
Threonine	148.16	-	61.00
Tryptophan	73.07	-	95.30
tyrosine	114.77	-	50.12
valine	111.33	-	-

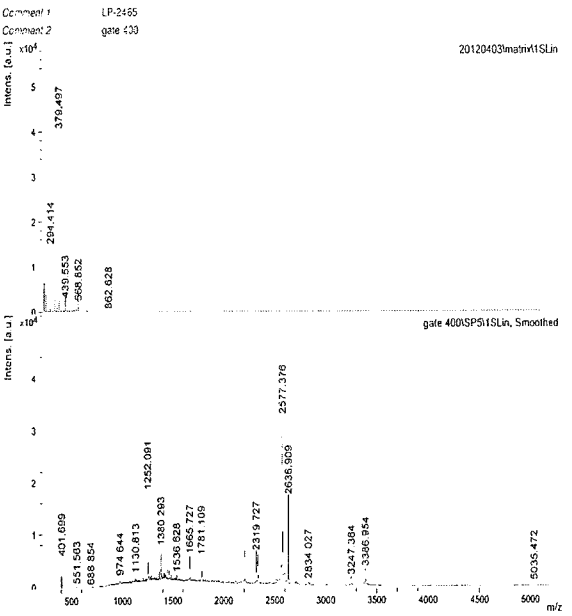


Figure 1 *MALD-TOF MS spectra of soy peptide permeated from Amicon Centrifuge Ultramembrane MW cut off 3 kDa generated by serine proteinase from Bacillus licheniformis.*

Table 2 *Antioxidation activity evaluated with the DPPH method of soy peptides generated by different enzymes*

Soy peptide (%)	% Inhibition				
	ficain	pepsin	trypsin	*B. licheniformis*	*A. oryzae*
100	75.77 ± 0.38	84.36 ±0.22	75.77 ±0.42	65.14 ±1.58	67.50 ±0.42
50	75.3 ± 0.22	82.4 ± 0.22	75.3 ±0.24	59.6 ±0.42	51.5 ±0.24
25	74.6 ± 0.38	80.0 ±0.38	74.6 ± 0.64	52.4 ± 0.24	46.7 ±0.42
12.5	70.0 ± 0.77	58.1 ±0.38	72.4 ± 0.24	50.3 ±0.24	44.4 ±0.24
6.25	58.5 ± 0.38	37.2 ±0.22	62.2 ±0.64	35.1 ±1.05	29.3 ±0.24
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 3 *ACE-I inhibitory activity of peptides derived from soy protein isolate hydrolysates generated by trypsin*

Sample	Protein (mg/ml)	ACEi(%)
Peptide concentrate with Ultramembrane filtration 3 kDa	112.4	92.65±0.54
Fraction 11	0.37±0.00	80.69±0.53
Fraction 18	0.15±0.02	91.79±0.10

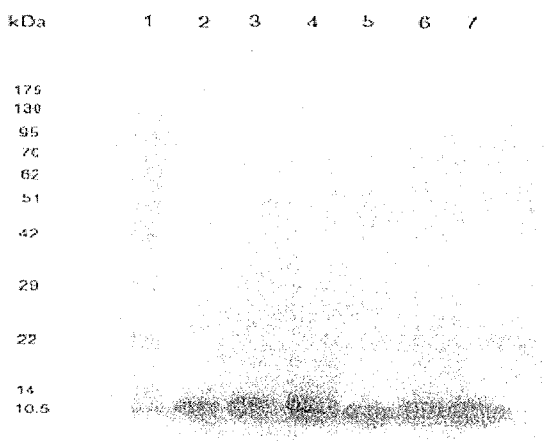


Figure 2 *Ficain catalysed hydrolysis of soy isolated protein solution 2.5 ml, ficain 5,800 CDU. SDS-PAGE analysis was performed after incubation 0 minutes (Lane 2), 30 minutes (Lane 3), 60 minutes (Lane 4), 90 minutes (Lane 5), 120 minutes (Lane 6), 150 minutes (Lane7) and standard protein markers (Lane 1).*

Table 1 shows examples of amino acid compositions of soy peptides compared with those of soy protein isolate. As shown, these peptides differ slightly in amino acid composition from soy protein isolate because they differ in specificity on enzymatic hydrolysis reaction.

Antioxidation peptides were initially fractionated using the ultrafiltration system with MW cut off 3 kDa and the results were shown in Table 2. The antioxidation activity was widely observed in all elution profile of soy peptides, suggesting that many antioxidant peptides with various short of amino acid sequence were included in the soy protein hydrolysates. The ACE-inhibitory activity of the soy peptide hydrolysed by trypsin is presented in Table 3.

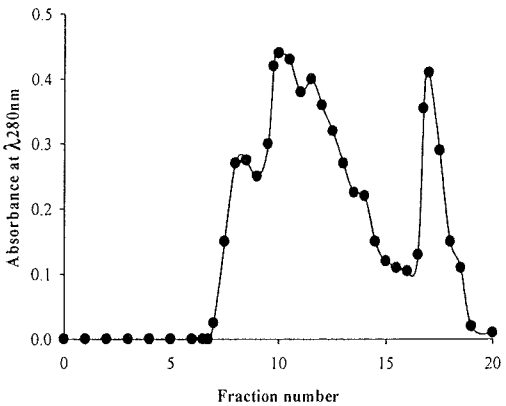


Figure 3 *Elution profile of soy peptides, which exhibited high angiotensin-I converting enzyme (ACE-I) inhibitory. Gel filtration chromatography conditions: column, Superose™ 12, mobile phase, distilled water; flow rate 1 mLmin^{-1}, detection; absorbance at 280 nm.*

The ACE-inhibitory activities of fractions 11 and 18 from gel filtration chromatography were 80.69 and 91.79%, respectively. The MALDI-TOF spectra of serine proteinases from *Bacillus licheniformis* catalysed hydrolysis of soy protein isolated is shown in Figure 1. The range of molecular mass spectra profiles of soy bioactive peptides hydrolysed by *Bacillus licheniformis* are 294.414-3386.954 dalton. Ficain catalysed hydrolysis of soy protein isolated was fractionated by ultrafiltration system MW cut off 3 kDa. The result of fractionation of soy peptide was shown electrophoresis patterns in Figure 2. The Superose™12 chromatogram of the low molecular weight soy peptide fraction

is shown in Figure 3. The low molecular weight soy peptide fraction was split into four portions. Fraction 18 exhibited the highest ACE-inhibitory activity with ACEi is 91.79%. Recently, oligopeptides from Korean soybean paste and tofuyu, a fermented soybean food, were identified that have ACE inhibitory activity [14], but their effects on blood pressure have not been confirmed clinically.

Acknowlegements

This research was supported by the University of the Thai Chamber of Commerce Research Fund under a grant of academic year 2011 program to R.S. I also thank Miss Wichittra Bomrungnok and Miss Bongkoch Apitanaruk for their collaborative works on SDS-PAGE.

References

1. Wang W, de Mejia EG. A new frontier in soy bioactive peptides that may prevent age-related chronic diseases. Compr Rev Food Sci. 2005; 4(4): 63-78.
2. Nakahara T, Sugimoto K, Sano A, Yamaguchi H, Katayama H, Uchida R. Antihypertensive mechanism of a peptide-enriched soy sauce-like seasoning: the active constituents and its suppressive effect on renin–angiotensin–aldosterone system. J Food Sci. 2011; 76(8): 201-6.
3. Sun XD. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilization. Int J Food Sci Tech. 2011; 46: 2447-59.
4. Zhang UZ, Wang HY, Fu XQ, Wu XX, Xu GL. Bioactive small peptides from soybean protein. Ann NY Acad Sci. 1998; 864: 640-45.
5. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 277(5259): 680-85.
6. Roblet C, Amiot J, Lavigne C, Marette A, Lessard M, Jean J, Ramassamy C, Moresoli C, Bazinet L. screening of *in vitro* bioactivities of a soy protein hydrolysate separated by hollow fiber and spiral-wound ultrafiltration membranes. Food Res Int. 2012; 46(1): 237-49.
7. Lam LH, Shimamura T, Manabe S, Ishiyama M, Ukeda H. Assay of angiotensin I-converting enzyme – inhibiting activity based on the detection of 3hydroxybutyrate with water-soluble tetrazolium salt. Anal Sci. 2008; 24: 1057-60.
8. Chen JR, Okada T, Muramoto K, Suetsuna K, Yang SC. Identification of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from the peptic digest of soybean protein. J Food Biochem. 2002; 26: 543-54.
9. Kodera T, Nio N. Identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from protein hydrolysates by a soybean protease and the antihypertensive effects of hydrolysates in spontaneously hypertensive model rats. J Food Sci. 2006; 71(3): 164-73.
10. Medina-Godoy S, Ambriz-Pérez DL, Fuentes-Gutiérrez CI, Germán-Báez LJ, Gutiérrez-Dorado R, Reyes-Moreno C, Valdez-Ortiz A. Angiotensin-converting enzyme inhibitory and antioxidative activities and functional characterization of protein hydrolysates of hard-to-cook chickpeas. J Sci Food Agric. 2012; 92(9): 1974-81.
11. Fan J, Hu X, Tan S, Zhang Y, Tatsumi E, Li L. Isolation and characterisation of a novel angiotensin I-converting enzyme-inhibitory peptide derived from douchi, a traditional Chinese fermented soybean food. J Sci Food Agric. 2009; 89(4): 603-8.
12. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm Wiss U Technol. 1995; 28: 25-30.
13. Mensor LL, Menezes FS, Leita˜o GG, Reis AS, Santos TC, Coube CS, Leita˜o SC. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytother Res. 2001; 15(2): 127–30.
14. Masuda O, Nakamura Y, Takano T. Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. J. Nutr. 1996; 126: 3063-68.