จาง เฉียวกัง : กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากกล้ามเนื้อปลานิลและผลิตภัณฑ์ไกลเคทหลังจากการย่อยในระบบย่อยอาหารจำลอง (ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF TILAPIA MUSCLE PROTEIN HYDROLYSATES AND THEIR GLYCATED PRODUCTS AFTER SIMULATED *IN VITRO* GASTROINTESTINAL DIGESTION) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 179 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความสามารถในการต้านออกซิเดชันทางเคมีและในเซลล์ของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากปลานิลที่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลอง (*in vitro* gastrointestinal digesta) และผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาไกลเคชันของไฮโดรไลเสท นอกจากนี้ได้ทำการระบุและจำแนกคุณลักษณะของเพปไทด์ที่มีสมบัติในการต้านออกซิเดชันที่ได้จากไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองที่แสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันสูงที่สุด

โปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) ที่ระดับการย่อย (degree of hydrolysis) แตกต่างกัน โปรตีนและตัวอย่างไฮโดรไลเสททั้งหมดถูกย่อยได้เล็กน้อยด้วยเอนไซม์เพปซิน (pepsin) และการย่อยเพิ่มขึ้นอย่างมากด้วยเอนไซม์แพนครีเอติน (pancreatin) ทั้งไฮโดรไลเสท และไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลอง (digesta) สามารถจับอนุมูลอิสระผ่านการถ่ายเทอะตอมของไฮโดรเจน (hydrogen atom transfer) เป็นหลัก กิจกรรมการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสมเพิ่มขึ้นเมื่อระดับการย่อยเพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดที่เวลาการย่อย 16 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าระดับการย่อยเท่ากับ 35.36 ± 0.06% อย่างไรก็ตาม หลังผ่านกระบวนการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลอง พบว่า ไฮโดรไลเสทที่ผ่านการย่อยเป็นเวลา 10 ชั่วโมง แสดงความสามารถในการจับอนุมูลอิสระทางเคมีและจับสารออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยา (reactive oxygen species; ROS) ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับ (HepG2 cells) ที่เหนียวนำจาก 2,2'-เอโซบีส-2-เมธิลโพรพิโอนามิดีนไดไฮโดรคลอไรด์ (2,2'- azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH) ได้สูงที่สุด ในขณะที่โปรตีนที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารมีประ สิทธิภาพน้อยที่สุด กระบวนการไกลเคชั่นของไฮโดรไลเสทเกิดมากที่สุดที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มขึ้นของโมเลกุลขนาดใหญ่ของเมลานอยดิน (melanoidins) กระบวนการไกลเคชั่นมีผลในการเพิ่มประสิทธิภาพของการไล่จับอนุมูลอิสระเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการรีดิวซ์ เมื่อเทียบกับน้ำตาลกลูโคล (glucose) และฟรุคโตส (fructose) น้ำตาลไซโลส (xylose) มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับปฏิกิริยาไกลเคชั่น ส่งผลให้ได้ผลิตผลที่มีความสามารถในการต้านออกซิเดชันสูงสุด อย่างไรก็ตาม ระดับสูงสุดของการเกิดกระบวนการไกลเคชั่นส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์และความสามารถในการย่อยได้

เคชั่นส่งผลให้ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในระดับเซลล์และความสามารถในการย่อยได้ (digestibility) ต่ำสุด กระบวนการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองมีผลลดความสามารถในการรีดิวซ์ของไฮโดรไลเสทที่ผ่านกระบวนการไกลเคชัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระ บวนการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองของไฮโดรไลเสทที่ผ่านกระบวนการไกลเคชันมีประสิทธิภาพในการจับสารออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาในระดับเซลล์ดีกว่าเมื่อเทียบกับผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองของไฮโดรไลเสท กระบวนการไกลเคชั่นมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความสามารถจับอนุมูลอิสระทางเคมี แต่ไม่ส่งผลดีต่อการแสดงกิจกรรมในระบบทางชีวภาพ ดังนั้น ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการย่อยในระบบทางเดินอาหารควรเป็นปัจจัยหนึ่งที่ใช้พิจารณาเพื่อกำหนดสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทและผลิตภัณฑ์จากกระบวนการไกลเคชั่น

เพปไทด์ 9 สายที่ระบุได้จากตัวอย่างไฮโดรไลเสทที่ย่อยเป็นเวลา 10 ชั่วโมงและ เพปไทด์ 6 สายที่เกิดจากกระบวนการย่อยอาหารจำลองโดยใช้ซอฟแวร์คอมพิวเตอร์ (*in silico* GI digestion) ได้ถูกสังเคราะห์ขึ้น ค่าความเข้มข้นที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดอนุมูลอิสระ2,2'-เอซิโนบีส (3-เอธิลเบนโซไธเอโซไลน์-6-ซัลโฟนิกแอซิด (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) ในระดับ 50% (50% effective concentration; EC_{50}) ของเพปไทด์ที่มีซิสเตอีน (C) และ ไทโรซีน (Y) ในโครงสร้างอยู่ในช่วง 2 ถึง 17 ไมโครโมลลาร์ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่ากรดแอสคอบิก และเพปไทด์ที่มีไลซีน (K) อยู่ในโครงสร้าง เพปไทด์ LPGYF และ SC เป็นเพปไทด์ตั้งต้นและเพปไทด์ที่เกิดจากการย่อยที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดตามลำดับ ซึ่งให้ผลในการจับอนุมูล $ABTS^{\bullet+}$ ได้สูงสุด เพปไทด์จากการย่อยอาหารด้วยคอมพิวเตอร์ที่มี C และ Y ในโครงสร้าง ได้แก่ SC, CH, PGY, และ EVPGY ยังคงแสดงกิจกรรมได้สูงเมื่อเทียบกับเพปไทด์ตั้งต้น เพปไทด์ทั้ง 15 สายแสดงศักยภาพในการไล่จับอนุมูลออกซิเจนที่ไวต่อปฏิกิริยาภายในเซลล์ นอกจากนี้ เพปไทด์ SC, CH, และ PGY เพิ่มการแสดงออกของยีนส์เอนไซม์คาตาเลส (catalase gene; *CAT*) และ ยีนส์เอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase gene; *SOD1*) ทั้งใน HepG2 เซลล์และ HepG2เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย AAPH แต่ไม่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนส์เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase gene; *GPx1*) โดยเพปไทด์ PGY มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้ดีที่สุด ดังนั้น เพปไทด์ที่ได้จากการย่อยด้วยระบบย่อยอาหารจำลองของโปรตีนไฮโดรไลเสทจากเนื้อ ปลานิลมีศักยภาพในการเป็นสารอาหารที่ให้ประโยชน์ต่อสุขภาพในการต้านออกซิเดชัน

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา Xiaogang Zhang

ปีการศึกษา 2562 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ZHANG XIAOGANG : ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF TILAPIA MUSCLE PROTEIN HYDROLYSATES AND THEIR GLYCATED PRODUCTS AFTER SIMULATED *IN VITRO* GASTROINTESTINAL DIGESTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 179 PP.

ANTIOXIDANT ACTIVITY/GASTROINTESTINAL DIGESTION/PROTEIN HYDROLYSATE/GLYCATED PRODUCTS/PURIFICATION

This study aimed at systematically assessing the chemical and cellular antioxidant activities of the *in vitro* gastrointestinal (GI) digesta of tilapia protein hydrolysates, and their glycated products. Antioxidant peptides derived from the hydrolysate whose digesta showed the highest activity were also identified and characterized.

Tilapia muscle protein was hydrolyzed by Alcalase to various degree of hydrolysis (DH). Proteins and all hydrolysates were slightly digested by pepsin but hydrolyzed extensively by pancreatin. Both hydrolysate and digesta predominantly scavenged free radicals via hydrogen atom transfer (HAT). The antioxidant activities of the hydrolysates increased with the increasing DH and reached the highest at 16 h of hydrolysis with 35.36 ± 0.06% DH. However, the digesta of 10-h hydrolysate displayed the highest chemical and intracellular reactive oxygen species (ROS) scavenging capacity on 2,2′-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH)-induced HepG2 cell oxidative stress model, while the protein digesta displayed the lowest. Glycation of hydrolysate was intensified at 90 °C for 12 h, accompanied by increasing larger molecular weight (MW) of melanoidins. Glycation drastically increased free radical scavenging capacity, especially reducing power. Compared with glucose and

fructose, xylose was the most effective sugar for glycation yielding the highest chemical antioxidant activities. However, the highest degree of glycation exhibited the lowest intracellular ROS scavenging capacity and digestibility. GI digestion reduced reducing power of glycated hydrolysates. All digesta of glycated hydrolysates were less effective at intracellular ROS scavenging capacity compared to their respective hydrolysate digesta. Glycation of hydrolysate could be effective to enhance chemical antioxidant activities but not efficiency to improve the activity in biological system. Antioxidant activity of digesta should be considered when optimizing conditions used for production of protein hydrolysate and glycated products.

Nine novel tilapia peptides identified from the 10-h hydrolysate and 6 fragments from their *in silico* GI digesta were synthesized. The 50% effective concentration (EC_{50}) of 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt radical cation ($ABTS^{\bullet+}$) scavenging capacity of all C- and Y-containing peptides ranged from 2 to 17 μM, which were more effective than that of ascorbic acid and K-containing peptides. LPGYF and SC were the best parent and digested peptides, respectively, that showed the highest $ABTS^{\bullet+}$ scavenging activity. The *in silico* digested C- and Y-containing peptides, namely SC, CH, PGY and EVPGY, remained high activity compared to the parents. Fifteen peptides showed potent intracellular ROS scavengers. In addition, SC, CH and PGY up-regulated expression of *CAT* and *SOD1* on both HepG2 and AAPH-induced HepG2 cell models, but not *GPx1* expression. PGY was the most effective cellular antioxidant. Tilapia hydrolysate digested peptides could be the potent nutraceuticals against oxidative stress.

School of Food Technology Student's Signature Xiaogang zhang

Academic Year 2019 Advisor's Signature