

เอ็ดดี้ นูร์ฮาร์ทาดี้ : การทำบริสุทธิ์และแสดงลักษณะของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียที่ได้จาก
ไฮโดรไลเซตจากโปรตีนข้าวโพด (PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
ANTIMICROBIAL PEPTIDES FROM CORN GLUTEN MEAL HYDROLYSATES) อาจารย์
ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวรรณ ยงสวัสดิกุล, 158 หน้า

คำสำคัญ : เปปไทด์ต้านแบคทีเรีย/จากโปรตีนข้าวโพด/กลไกการออกฤทธิ์/การทำให้บริสุทธิ์

จากโปรตีนข้าวโพดเป็นผลผลิตพลอยได้ที่มีโปรตีนสูงจากกระบวนการแปรรูปแป้งข้าวโพด
เปปไทด์ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่ได้จากไฮโดรไลเซตจากโปรตีนข้าวโพดยังไม่มีการศึกษาอย่าง
แพร่หลาย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเปปไทด์จากไฮโดรไลเซตจากโปรตีนข้าวโพด (Corn
gluten meal hydrolysate; CGMH) ที่มีฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย นอกจากนี้เพื่อแยก ระบุ และศึกษา
คุณลักษณะของเปปไทด์ต้านแบคทีเรียจาก CGMH และอธิบายกลไกการต้านแบคทีเรีย รวมถึงศึกษา
การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเปปไทด์เพื่อเพิ่มสมบัติต้านแบคทีเรีย

เปปไทด์จากที่แยกส่วน P1 จาก CGMH ที่ย่อยด้วยเปปซิน 4% และผ่านการแยกด้วยโคร
มาโทกราฟีขนาดกลาง แสดงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียสูงสุด โดยแสดงค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้ง
(Minimum inhibitory concentration; MIC) ต่อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ที่ 1
มิลลิโมลาร์ แพรคชัน (Fraction) P1 ทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค
กล้องคอนโฟคอล (Confocal laser scanning microscopy; CLSM) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscopy; SEM) และเทคนิคจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy; TEM) แสดงถึงพื้นผิวเซลล์ที่ถูก
ทำลายและการร่วออกของของเหลวภายในเซลล์หลังจากทดสอบกับแฟรคชัน P1 การทดสอบด้วย
เทคนิคฟูเรียร์ทรานซฟอร์หมอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (Synchrotron radiation-Fourier
transmission infrared microspectroscopy; SR-FTIR) พบว่าแฟรคชัน P1 ก่อให้เกิดการ
เปลี่ยนแปลงของกรดนิวคลีอิก โปรตีน และกรดไขมันภายในเยื่อหุ้มเซลล์ แฟรคชัน P1 มีผลต่อการ
ย่อยสลายเม็ดเลือดแดงต่ำ ผลการทดสอบเปปไทด์ในตัวอย่างนมที่ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูงใน
ระยะเวลาสั้น (Ultra-High Temperature; UHT) พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* ที่ถ่ายลงใน
ตัวอย่างที่ความเข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ เปปไทด์ชนิดใหม่ 11 ท่อนที่ระบุจากแฟรคชัน P1 อาจมีผลต่อ
ฤทธิ์การต้านแบคทีเรีย

เปปไทด์ EAGGGEDDKKKVE (EE13) มีประจุสุทธิลบที่ได้จากการทำบริสุทธิ์แฟรคชัน P1
แสดงฤทธิ์การต้าน *S. aureus* ที่ค่า MIC 4 มิลลิโมลาร์ โดยเปปไทด์ EE13 ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ที่
ความเข้มข้น 1×MIC เมื่อวิเคราะห์ด้วย CLSM การศึกษา SEM บ่งชี้ถึงรูปพรรณสัณฐานของเซลล์ที่
เปลี่ยนไป ผลการศึกษา SR-FTIR บ่งชี้การเปลี่ยนโครงสร้างของกรดนิวคลีอิก โปรตีน และกรดไขมัน
ของ *S. aureus* การศึกษาการจำลองการจับเชิงโมเลกุล (Molecular docking) แสดงให้เห็นว่าเปป-
ไทด์ EE13 สามารถจับเอนไซม์ทรานส์ไกลโคซิเลส (Transglycosylase) บนเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็น
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เพปทิโดไกลแคน (Peptidoglycan) การทดสอบความเป็นพิษต่อ

เซลล์เม็ดเลือดแดงแสดงให้เห็นว่า เพปไทด์ EE13 มีค่าการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงต่ำที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 8 มิลลิโมลาร์ การทดสอบผลเสริมฤทธิ์แสดงให้เห็นว่าการบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการเติมเพปไทด์ EE13 ที่ความเข้มข้น 2.0 มิลลิโมลาร์ ก่อให้เกิดการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *S. aureus*

การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของเพปไทด์ PTGAKVTKAAKKA (PA13) เป็น RLLRKVTKLWKKF (RF135) ทำให้ค่า MIC ต่อ *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 เท่ากับ 4 ไมโครโมลาร์ เพปไทด์ RF135 ที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย ส่งผลต่อการเรืองแสงของโพรพิเดียมไอโอไดด์เพิ่มขึ้น และเกิดการรั่วไหลของกรดนิวคลีอิก ซึ่งแสดงจากการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร ผลการทดสอบ SEM แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ RF135 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ เช่น การเกิดรอยยุบลึก รูปร่างใหญ่แบนเยื่อหุ้มเซลล์ ผิวเซลล์มีลักษณะขรุขระ และรูปทรงเซลล์ที่ไม่สม่ำเสมอมากขึ้น จนนำไปสู่การแตกสลายของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงที่พบจาก TEM คือปริมาณไฮโดรพลาสมิกที่เข้มข้นขึ้นและเยื่อหุ้มเซลล์ที่เสียหาย ผลของเพปไทด์ RF135 ที่ความเข้มข้น $1 \times \text{MIC}$ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ รวมถึงกรดไขมัน โปรตีน และกรดนิวคลีอิก เมื่อวิเคราะห์ด้วย SR-FTIR จากการวิเคราะห์การจับเชิงโมเลกุลพบว่า เพปไทด์ RF135 สามารถจับกับเอนไซม์ เออาร์เอ็นดี ดีฟอร์มิลเลส (ArnD deformylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์เยื่อหุ้มด้านนอกของ *S. Typhimurium* การทดสอบการย่อยสลายต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่า เพปไทด์ RF135 แสดงค่าการย่อยสลายต่ำกว่าร้อยละ 10 ที่ความเข้มข้น 512 ไมโครโมลาร์

ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ เพปไทด์สังเคราะห์ และเพปไทด์ที่ถูกปรับเปลี่ยนโครงสร้าง ที่ได้จาก CGMH ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ข้อค้นพบนี้บ่งชี้ว่าเพปไทด์ด้านแบคทีเรียจาก CGMH มีศักยภาพที่จะพัฒนาเพื่อประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารและยา

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2567

ลายมือชื่อนักศึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

EDHI NURHARTADI: PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ANTIMICROBIAL
PEPTIDES FROM CORN GLUTEN MEAL HYDROLYSATES

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, 158 PP.

Keywords: ANTIBACTERIAL PEPTIDES/CORN GLUTEN MEAL/MECHANISM OF ACTION/
/PURIFICATION

Corn gluten meal (CGM) is a high-protein byproduct from corn starch processing. The research on peptides with antimicrobial activity derived from CGM hydrolysis with enzymes is still rarely investigated. The current research objectives were to produce peptides from corn gluten meal hydrolysate (CGMH) with antibacterial activity. In addition, to isolate, identify, and characterize antibacterial peptides derived from pepsin-hydrolyzed CGM. Mechanisms underlying their antibacterial action were elucidated. Furthermore, structure modification of peptide was performed to enhance its antibacterial properties.

The P1 fraction isolated from the CGMH by 4% pepsin by preparative chromatography indicated the most potent antibacterial activity. The minimum inhibitory concentration (MIC) value of the P1 fraction was 1 mM toward *Staphylococcus aureus* ATCC 29213. The P1 fraction caused disruption of the membrane integrity of *S. aureus*, as observed by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The images of scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) showed cell surface damages and cytoplasmic leakages on *S. aureus* after exposure with the P1 fraction. Synchrotron radiation-Fourier transmission infrared (SR-FTIR) microspectroscopy demonstrated that the P1 fraction caused changes in nucleic acids, proteins, and fatty acids in the cell membrane. The P1 exhibited relatively low hemolytic. In the challenge test on the commercial ultra-high temperature milk inoculated with *S. aureus*, the P1 fraction was found to suppress *S. aureus* growth at 8 mM. Eleven novel peptides from the P1 that might have contributed to its antibacterial activity were identified.

The EAGGGEDDKKKVE (EE13) was an anionic peptide identified from the P1 fraction that showed the most potent antimicrobial activity with MIC at 4.0 mM against *S. aureus*. EE13 significantly disrupted the membrane integrity of *S. aureus* at 1×MIC, as observed by CLSM. SEM revealed that EE13 at 1×MIC caused morphological alterations of *S. aureus* cells. SR-FTIR spectroscopy indicated that EE13 induced alterations in nucleic acids, proteins, and fatty acids of *S. aureus*. Molecular docking studies showed

that EE13 exhibited a strong binding affinity for membrane-bound transglycosylase, an enzymes associated with peptidoglycan synthesis in *S. aureus*. The hemolytic test indicated that EE13 had low hemolytic activity below 8 mM. The synergistic effect was shown by treating cells at 50 °C for 10 min followed by 2.0 mM EE13, which induced membrane damage of *S aureus*.

The structural modification of the peptide PTGAKVTKAAKKA (PA13) to RLLRKVTKLWKKF (RF135) showed the most potent antibacterial activity with a MIC value of 4.0 µM against *Salmonella* Typhimurium TISTR 292. The RF135 caused membrane damage at 1×MIC, resulting in increased red fluorescence intensity of propidium iodide. The RF135 at 1×MIC induced nucleic acid release, as evidenced by an increase in OD₂₆₀ values. SEM demonstrated morphological alterations in *S. Typhimurium* cells triggered by RF135, such as deeper craters, enlarged pores in the envelope, rough surface, and an increasingly irregular cell shape that led to cell lysis. The ultrastructure of *S. Typhimurium* was altered after being induced with RF135, as observed with TEM, including concentrated cytoplasmic content and cell membrane damage. The effect of RF135 at 1×MIC on the intracellular biomolecules of *S. Typhimurium* cells led to changes in fatty acids, proteins, and nucleic acids as monitored by SR-FTIR spectroscopy. Molecular docking analysis revealed that RF135 strongly bound with ArnD deformylase, an enzyme associated with the outer membrane of *S. Typhimurium*. The hemolysis assay showed the safety of the RF135 with hemolysis activity below 10% at a concentration below 512 µM.

The results demonstrated that the peptide fraction, the synthetic peptide, and the modified peptide derived from CGMH employed a membrane-damaging mechanism on the tested Gram-positive and Gram-negative bacteria. The research findings suggest that antibacterial peptides obtained from CGMH could potentially be developed for applications in the food and pharmaceutical industries.

School of Food Technology
Academic Year 2024

Student's Signature
Advisor's Signature