บทคัดย่อ

Project Code: MRG5180029

Project title: การเก็บเกี่ยวและการแยกส่วนเอนไซม์โปรตีเนสจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย โดยวิธี Aqueous two-phase system

Investigator: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

E-mail Address: sappasith@tsu.ac.th

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย พบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายเคซีน เท่ากับ 9.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เอนไซม์โปรตีเนสจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยมีความคงตัวในช่วงพีเอช 7-11 เป็นระยะเวลา 30-120 นาที และมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30-120 นาที กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสถูกยับยั้งอย่างมีประสิทธิภาพด้วยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง (SBTI) benzamidine phenylmethylsulfonyl fluoride และ *N*-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 0-30) ขณะที่กิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (0-10^{-3} โมลาร์) เอนไซม์โปรตีเนสตัวหลักที่พบในเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23 และ 20 กิโลดาลตันเมื่อตรวจสอบโดยใช้ SDS-substrate gel จากการศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อการเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรตีเนส พบว่าสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ และ Brij 35 ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 เป็นสารสกัดที่สามารถเก็บเกี่ยวเอนไซม์โปรตีเนสได้สูงสุด ($p<0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์โปรตีเนสตัวหลักในเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีนที่มีลักษณะคล้ายทริปซิน

จากการศึกษาการเก็บเกี่ยวเอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยโดยใช้ Aqueous two-phase system (ATPS) พบว่า น้ำหนักโมเลกุลและความเข้มข้นของพอลิเอทธิลีนไกลคอลรวมทั้งชนิดและความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการแยกโปรตีน ส่วนใหญ่เอนไซม์ทริปซินจะแยกไปยังเฟสพอลิเอทธิลีนไกลคอลซึ่งอยู่ด้านบน ATPS ซึ่งประกอบด้วยพอลิเอทธิลีนไกลคอล (น้ำหนักโมเลกุล 4,000) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 20 และ โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นสภาวะที่ดีที่สุดในการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย และให้กิจกรรมจำเพาะสูงสุด (30.05 ยูนิต/ไมโครกรัมโปรตีน) และมี

ความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 27.3 จากการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยใช้ SDS-PAGE พบว่า เอนไซม์ภายหลังการแยกส่วนมีความบริสุทธิ์มากขึ้นและเมื่อตรวจสอบกิจกรรมเอนไซม์โดยใช้ SDS-substrate gel พบว่า ความเข้มข้นของแถบโปรตีเนสเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเครื่องในมีกิจกรรมจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น เอนไซม์ที่ผ่านการแยกส่วนมีกิจกรรมที่เหมาะสมที่พีเอช 9.0 และ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความคงตัวที่อุณหภูมิไม่เกิน 40 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงพีเอช 8-12 กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างเด่นชัดเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือ (ร้อยละ 0-30) เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการแยกส่วนด้วยวิธี ATPS สามารถย่อยสลายแอกโตไมโอซินธรรมชาติและคอลลาเจนจากเนื้อวัว ดังนั้นการเติมเอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยอาจนำมาใช้ในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อ

คำสำคัญ: โปรตีเนส เอนไซม์ทริปซิน เครื่องใน การจำแนกคุณลักษณะ การทำบริสุทธิ์

Abstract

Project Code: MRG5180029

Project title: Recovery and partitioning of proteinases from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) viscera by an aqueous two-phase system

Investigator: Asst. Professor Sappasith Klomklao, Ph.D.

E-mail Address: sappasith@tsu.ac.th

Proteolytic activity from viscera extract of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) was investigated. Optimal pH and temperature for casein hydrolysis were 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable to heat treatment up to 40°C and over a pH range of 7-11 for 30-120 min. The proteolytic activity was effectively inhibited by soybean trypsin inhibitor, benzamidine, phenylmethylsulfonyl fluoride and *N*-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone. Activities of the viscera extract continuously decreased as NaCl concentration (0-30%) increased while activities increased as $CaCl_2$ concentration (0-10^{-3} M) increased. Based on the proteinase activity of zones separated by electrophoresis, the molecular mass of the major proteinases in hybrid catfish viscera was 23 and 20 kDa. The effect of extraction media on recovery of proteinases was also studied. Extraction of the viscera powder with 50 mM Tris-HCl, pH 7.0 containing 0.5 M NaCl and 0.2% (v/v) Brij 35 rendered a higher recovery of proteinase activity than other extractants tested ($p<0.05$). The results suggested that major proteinases in hybrid catfish viscera were heat-activated alkaline proteinases, most likely trypsin-like serine proteinases.

The partitioning behavior of trypsin from hybrid catfish viscera in aqueous two-phase systems (ATPS) was studies. Factors such as PEG molecular mass and concentration as well as types and concentration of salts affected protein separation. Trypsin partitioned mainly in the top PEG-rich phase. ATPS formed by PEG of molecular weight 4000 (20%, w/w) and NaH_2PO_4 (20%, w/w) showed the best capability for trypsin purification from hybrid catfish viscera. Under such condition, the highest specific activity (30.05 units/μg protein) and purification fold (27.3) were obtained. SDS-PAGE analysis revealed that the enzyme after ATPS separation was near homogeneity and based on the activity staining, the band intensity of enzyme in ATPS fraction increased, indicating the greater specific activity of the viscera extract. The partitioned enzyme displayed optimal activity at pH 9.0 and 50°C, respectively. The enzyme was stable up to 40°C and within the pH range of 8-12. The enzyme exhibited a progressive decrease in activity with increasing NaCl concentration (0-30%). Partitioned trypsin was able to hydrolyze natural actomyosin (NAM) and collagen extracted from beef meat. Therefore, the addition of trypsin from hybrid catfish viscera might be used to improve meat tenderness.

Keywords: Proteinase, Trypsin, Viscera, Characterization, Aqueous two-phase systems, Purifiation