

บทคัดย่อ

เอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาอุกบึกอยู่สามารถทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกด้วยโครมาโตกราฟีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Sephacryl S-200 Sephadex G-20 และ DEAE-cellulose โดยเอนไซม์ทริปซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47.6 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 12.7 เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนเจลของ native-PAGE เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิเวอเรนซ์และ SDS-PAGE พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย N^{α} -*p*-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) คือพีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวต่อความร้อนในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 6-11 แคลเซียมไออนอนมีผลเพิ่มความคงตัวต่อเอนไซม์ทริปซิน กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินถูกยับยั้งอย่างมีประสิทธิภาพโดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง และ *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone และถูกยับยั้งบางส่วนโดย ethylenediaminetetraacetic acid กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 0-30) เอนไซม์ทริปซินมีค่า K_m เท่ากับ 0.3 มิลลิโมลาร์ และ K_{cat} เท่ากับ 92.1 ต่อวินาทีสำหรับการย่อยสลาย TAME จากการตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโนจำนวน 20 หน่วยย่อย พบว่าเอนไซม์ทริปซินมีลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโน คือ IVGGYECQAHSQPPTVSLNA ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ทริปซินจากปลาชนิดอื่น ๆ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนจากส่วนสกัดเครื่องในปลาอุกบึกอยู่ (*Clarias macrocephalus* $\times$ *Clarias gariepinus*) พบว่าเอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายกล้ามเนื้อปลาแป้นเขียว (*Gazza minuta*) เท่ากับ 9.0 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อศึกษาการใช้ส่วนสกัดเครื่องในปลาอุกบึกอยู่สำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาแป้นเขียว พบว่า ความเข้มข้นของส่วนสกัด ระยะเวลาในการทำปฏิกิริยา และอัตราส่วนระหว่างกล้ามเนื้อปลาและบัฟเฟอร์ มีผลต่อระดับการย่อยสลายและการเก็บเกี่ยวไนโตรเจน (Nitrogen recovery, NR) ($p < 0.05$) การใช้ส่วนสกัดเครื่องในปลาอุกบึกอยู่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3.5 โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 15 นาที และใช้อัตราส่วนระหว่างกล้ามเนื้อปลาและบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาแป้นเขียว ความสัมพันธ์ระหว่างระดับการย่อยสลาย (Degree of hydrolysis, DH) และ NR มีค่าสูง ($R^2 = 0.974$) โปรตีนไฮโดรไลเสตจาก

กล้ามเนื้อปลาเป็นเนื้อที่ผ่านการทำแห้งโดยการระเหิดมีปริมาณโปรตีนสูง (ร้อยละ 89.02) และมีสีเหลืองอมน้ำตาล ($L^* = 63.67$, $a^* = 6.33$, $b^* = 22.41$) นอกจากนี้โปรตีนไฮโดรไลเซตประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นในปริมาณสูง (ร้อยละ 48.22) โดยเฉพาะอย่างยิ่งไลซีนและอาร์จินีน

จากการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่และกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระของโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้ามเนื้อปลาเป็นเนื้อที่ผ่านการเตรียมโดยใช้ส่วนสกัดเครื่องในปลาอุกบู่ก้อยที่ระดับการย่อยสลาย ร้อยละ 70 พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเซตสามารถละลายได้ดี (ร้อยละ 77) เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซตเพิ่มขึ้นดัชนีกิจกรรมการเกิดอิมัลชันมีค่าลดลง ($p < 0.05$) ส่วนความสามารถในการเกิดโฟมกลับมีค่าเพิ่มขึ้น นอกจากนี้เมื่อความเข้มข้นของโปรตีนไฮโดรไลเซตเพิ่มขึ้น กิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS รีดิวซิงพาวเวอร์ และ กิจกรรมการจับโลหะเพิ่มขึ้น ดังนั้นโปรตีนไฮโดรไลเซตจากกล้ามเนื้อปลาเป็นเนื้อที่ผลิตโดยส่วนสกัดเครื่องในปลาอุกบู่ก้อยสามารถใช้เป็นแหล่งของเปปไทด์ที่มีกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระที่มีศักยภาพ

คำสำคัญ: โปรตีนสเอนไซม์ทริปซิน เครื่องใน การทำบริสุทธิ์ โปรตีนไฮโดรไลเซต สมบัติเชิงหน้าที่ สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Trypsin was purified to homogeneity from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) through ammonium sulfate fractionation and a series of chromatographies including Sephacryl S-200, Sephadex G-50 and DEAE-cellulose. It was purified to 47.6-fold with a yield of 12.7%. Based on native-PAGE, the purified trypsin showed a single band. The molecular mass of purified trypsin was estimated to be 24 kDa by size exclusion chromatography and SDS-PAGE. The optimum pH and temperature for *N*^α-*p*-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) hydrolysis were 8.0 and 60°C, respectively. Trypsin was stable to heat treatment up to 50°C, and over a pH range of 6.0-11.0. Trypsin was stabilized by calcium ion. The trypsin activity was strongly inhibited by soybean trypsin inhibitor and *N*-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone and partially inhibited by ethylenediaminetetraacetic acid. Activity decreased continuously as NaCl concentration (0-30%) increased. Apparent *K*_m value of trypsin was 0.3 mM and *K*_{cat} value was 92.1 S⁻¹ for TAME. The N-terminal amino acid sequence of 20 residues of trypsin was IVGGYECQAHSQPPTVSLNA, which is highly homologous with trypsins from other fish species.

Proteolytic activity of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) was studied. The optimal pH and temperature were 9.0 and 50°C, respectively, when toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle was used as a substrate. When viscera extract from hybrid catfish

was used for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish muscle, extract concentration, reaction time, and fish muscle/buffer ratio affected the hydrolysis and nitrogen recovery (NR) ($p < 0.05$). Optimum conditions for toothed ponyfish muscle hydrolysis were 3.5% hybrid catfish viscera extract, 15 min reaction time and fish muscle/buffer ratio of 1:3 (w/v). High correlation between the degree of hydrolysis (DH) and NR ($R^2 = 0.974$) was observed. Freeze-dried hydrolysate had a high protein content (89.02%, dry weight basis) and it was brownish yellow in color ($L^* = 63.67$, $a^* = 6.33$, $b^* = 22.41$). The protein hydrolysate contained a high amount of essential amino acids (48.22%) and had arginine and lysine as the dominant amino acids.

Functional properties and antioxidative activities of a protein hydrolysate prepared from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle, using viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* $\times$ *Clarias gariepinus*), with a degree of hydrolysis (DH) of 70%, were investigated. The protein hydrolysate had an excellent solubility (77%). The emulsifying activity index of the protein hydrolysate decreased with increasing concentration ($p < 0.05$). Conversely, the foaming abilities increased as the hydrolysate concentrations increased ($p < 0.05$). Protein hydrolysate exhibited the increases in 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiazothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging activities, ferric reducing power (FRAP) and metal chelating activity as hydrolysate concentration increased ($p < 0.05$). Therefore, protein hydrolysate from the muscle of toothed ponyfish produced by viscera extract from hybrid catfish can be used as a promising source of functional peptides with antioxidant properties.

Keywords: Proteinase, Trypsin, Viscera, Purification, Protein hydrolysate, Functionalities, Antioxidant