บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: RSA6080044

ชื่อโครงการ: เอนไซม์โปรติเนสจากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบยาว (*Thunnus alalunga*): การทำบริสุทธิ์ การแยกส่วนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

ชื่อนักวิจัย: รองศาสตราจารย์ ดร.สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า มหาวิทยาลัยทักษิณ

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

ระยะเวลาโครงการ: 30 พฤษภาคม 2560 ถึง 29 พฤษภาคม 2563

เอนไซม์ทริปซินสองไอโซฟอร์ม (เอ และ บี) จากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบยาว (*Thunnus alalunga*) สามารถทำบริสุทธิ์โดยการใช้ Sephacryl S-200 Sephadex G-50 และ DEAE-cellulose ตามลำดับ เอนไซม์ทริปซินทั้งสองปรากฏเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนเจล native-PAGE เอนไซม์ทริปซิน เอ และ บี มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 และ 55 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีพีเอชที่เหมาะสมที่พีเอช 8.5 เมื่อใช้ TAME เป็นสารตั้งต้น สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง และ TLCK แสดงกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์อย่างมีประสิทธิภาพ ลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโนจำนวน 20 หน่วยย่อยของเอนไซม์ทริปซินทั้งสองไอโซฟอร์ม มีลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโนที่มีความคล้ายกันและคล้ายกับเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำอื่น ๆ เมื่อศึกษาการใช้ส่วนสกัดเอนไซม์โปรติเนสจากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบยาวสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาวัวพบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาวัว คือการใช้ส่วนสกัดจากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบยาวที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 5.5 โดยใช้ระยะเวลาในการย่อยสลาย 40 นาที และใช้อัตราส่วนระหว่างกล้ามเนื้อปลากับบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1 : 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นอกจากนี้จากการศึกษาคุณลักษณะของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตจากกล้ามเนื้อปลาวัวที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมีปริมาณโปรตีนสูง โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำเป็นในปริมาณสูง (ร้อยละ 45.62) และมีสีเหลืองอ่อน จากการศึกษากิจกรรมการต้านออกซิเดชันและสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตจากกล้ามเนื้อปลาวัวโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบยาวที่มีระดับการย่อยสลายร้อยละ 60 พบว่า ค่ากิจกรรมการจับอนุมูลอิสระ DPPH ABTS FRAP และกิจกรรมการจับโลหะเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณเพิ่มขึ้นสำหรับสมบัติเชิงหน้าที่ พบว่า โปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ทริปซินเพิ่มความสามารถในการละลาย โปรตีนไฮโดรไลเสตแสดงคุณสมบัติระหว่างพื้นผิวซึ่งขึ้นกับระดับความเข้มข้น ดังนั้นผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อปลาวัวสามารถนำมาผลิตเป็นโปรตีนไฮโดรไลเสตและสามารถใช้เป็นส่วนผสมที่มีศักยภาพในอาหารฟังก์ชันรวมถึงใช้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระธรรมชาติในระบบอาหารที่มีลิปิด

คำสำคัญ: โปรติเนส เอนไซม์ทริปซิน การทำบริสุทธิ์ โปรตีนไฮโดรไลเสต

Abstract

Project Code: RSA6080044

Project Title: Proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Purification, partitioning and their application for protein hydrolysate production

Investigator: Assoc. Prof. Dr. Sappasith Klomklao Thaksin University

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

Project Period: May 30, 2017 – May 29, 2020

Two trypsins (A and B) from the liver of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) were purified to homogeneity using a series of column chromatographies including Sephacryl S-200, Sephadex G-50 and Diethylaminoethyl-cellulose. Both trypsins showed only one band on native-PAGE. Trypsin A and B exhibited the maximal activity at 60 $^{\circ}$C and 55 $^{\circ}$C, respectively, and had the same optimal pH at 8.5 using TAME as a substrate. The inhibition test demonstrated strong inhibition by soybean trypsin inhibitor and TLCK. The N-terminal amino acid sequence of 20 residues of two trypsin isoforms had high homology compared to those of other fish trypsin. Proteinases from liver extract from albacore tuna were used to produce protein hydrolysate from starry triggerfish muscle. Hydrolysis conditions for preparing protein hydrolysate from starry triggerfish muscle were optimized. Optimum conditions for triggerfish muscle hydrolysis were 5.5% liver extract, 40 min reaction time and fish muscle/buffer ratio of 1:3 (w/v). The freeze dried protein hydrolysate was characterized with respect to chemical composition, amino acid composition and color. The product contained high protein and exhibited high amount of essential amino acids (45.62%). It was light yellow in color. Protein hydrolysates from starry triggerfish muscle with a degree of hydrolysis (DH) of 60% were also prepared using trypsin from albacore tuna liver and investigated for antioxidant activity and functional properties. Antioxidant activities including DPPH, ABTS radical scavenging activity, FRAP and metal chelating activity of hydrolysate samples were dose dependent. For functional properties, hydrolysis by trypsin increased protein solubility. The hydrolysates possessed interfacial properties, which were governed by their concentrations. Therefore, the results of the present study suggest that starry triggerfish can effectively be converted to protein hydrolysate and could be a potential ingredient in functional food as well as natural antioxidants in lipid food systems.

Keywords: Proteinase, Trypsin, Purification, Protein hydrolysate