

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จากถั่วอะชูกิ (*Vigna angularis*) พบว่า การสกัดเมล็ดถั่วด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์สามารถเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้สูงกว่าการใช้ตัวทำละลายอื่นๆ ($P < 0.05$) เวลาในการสกัด 30 นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วอะชูกิ ($P < 0.05$) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วอะชูกิสามารถทำบริสุทธิ์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว ร้อยละ 30-65 และการใช้เจลฟิльтраชัน ชนิด SephacrylS-200 โดยสารยับยั้งมีผลผลิตร้อยละ 53.9 และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 10.91 เท่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14 กิโลดาลตัน เมื่อทำการตรวจสอบโดย SDS-PAGE และ inhibitory activity staining สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความตัวต่อพิเซในช่วงกว้างและมีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเหลืออยู่สูงหลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0-3 ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเมล็ดถั่วอะชูกิ อย่างไรก็ตามกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูญเสียเมื่อสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินทำปฏิกิริยากับ β -mercaptoethanol ก่อนทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

จากการศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (TI) ต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนและสมบัติการเกิดเจลของปลาทรายแดง (*Nemipterus bleekeri*) พบว่า TI (ร้อยละ 0-3) มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซาร์โคพลาสมิกและกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาทรายแดงบดที่ผ่านและไม่ผ่านการล้างโดยขึ้นกับระดับความเข้มข้นของ TI ที่ใช้ TI มีประสิทธิภาพในการป้องกันการย่อยสลายโปรตีนโดยเห็นได้จากผลของ SDS-PAGE พบว่าแถบโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก (MHC) มีความเข้มของแถบโปรตีนสูงกว่า นอกจากนี้จากการศึกษาผลของ TI (ร้อยละ 0.5 1 2 และ 3) ต่อสมบัติการเกิดเจลของซูริมิปลาทรายแดง พบว่า ค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลคามาโบโกะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ TI ที่เติมเพิ่มขึ้น โดยมีการลดลงของปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก อย่างไรก็ตามค่าความขาวของเจลซูริมิมียังลดลงเมื่อความเข้มข้นของ TI เพิ่มขึ้น ดังนั้น TI ที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งทางเลือกใหม่ในซูริมิสำหรับปรับปรุงคุณภาพเจล

คำสำคัญ: โปรตีนเอส สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน การจำแนกคุณลักษณะ การทำบริสุทธิ์ ซูริมิ

Abstract

Trypsin inhibitor from adzuki bean (*Vigna angularis*) seed was isolated and characterized. Extraction of seed with NaCl at the concentration of 0.15 M showed a higher recovery of trypsin inhibitor than other solvents tested ($p < 0.05$). Optimal extraction time for the recovery trypsin inhibitor from adzuki bean seed was 30 min ($p < 0.05$). Purification of inhibitor was achieved by heat-treatment at 90°C for 10 min, followed by ammonium sulfate precipitation with 30-65% saturation and size exclusion chromatography on Sephacryl S-200, presenting a yield and purification of 53.9% and 10.91 fold, respectively. The apparent molecular weight of trypsin inhibitor was estimated to be 14 kDa based on SDS-PAGE and inhibitor activity of zones separated by electrophoresis. The purified inhibitor was stable over a broad pH range and retained high inhibitory activity toward trypsin after incubation at 90°C for 60 min. NaCl, at 0-3% concentration, did not affect the inhibitory activity of purified trypsin inhibitor, however, the activity was lost when sample was treated with β -mercaptoethanol prior to electrophoresis.

Trypsin inhibitor (TI) from adzuki bean seed was partially purified by heat-treatment at 90°C for 10 min and it was used to study the impact on proteolysis and gelling properties of threadfin bream (*Nemipterus bleekeri*). TI (0-3%) showed the inhibitory activity against sarcoplasmic proteinases and autolysis of threadfin bream mince and washed mince in a concentration dependent manner. TI was effective in proteolysis prevention as shown by more retained myosin heavy chain (MHC) on SDS-PAGE. Effect of TI (0.5, 1, 2 and 3%) on the properties of threadfin

bream surimi was also investigated. Breaking force and deformation of kamaboko gel increased as added levels of TI increased ($P<0.05$). This was associated with lower levels of protein degradation, as evidenced by the decreased in trichloroacetic acid-soluble peptide content ($P<0.05$). However, whiteness slightly decreased ($P<0.05$) with increasing TI levels. Therefore, TI at an appropriate level could be an alternative food-grade inhibitor to improve gel properties of surimi.

Keywords: Proteinase, Trypsin inhibitor, Characterization, Purification, Surimi