รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เอนไซม์โปรตีเนสจากลำไส้ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ: การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะ

Proteinases from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Intestine: Purification and Characterization

ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สนับสนุนโดย งบประมาณเงินแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552

มหาวิทยาลัยทักษิณ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ สำหรับเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเรื่อง “เอนไซม์โปรตีเนสจากลำไส้ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ : การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะ ” จำนวน 350,000 บาท ขอขอบพระคุณ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สำหรับการวิจัยครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สุทธวัฒน์ เบญจกุล นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และสารเคมีตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์สำหรับการทำวิจัยครั้งนี้

ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย เอนไซม์โปรตีเนสจากลำไส้ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ : การทำบริสุทธิ์และการจำแนกคุณลักษณะ

Proteinases from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*): Purification and characterization

ชื่อผู้วิจัย ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

โทรศัพท์/โทรสาร 074-693996

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท การวิจัยประยุกต์ ประจำปี พ.ศ. 2552 จำนวนเงิน 350,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม 2551 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2552

เอนไซม์ทริปซินสองไอโซฟอร์ม (เอ และ บี) จากลำไส้ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ สามารถทำบริสุทธิ์โดยการใช้ Sephacryl S-200 Sephadex G-20 และ DEAE-cellulose ตามลำดับ โดยเอนไซม์ทริปซิน เอ และ บี มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 177 และ 257 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 23 และ 21 ตามลำดับ เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนเจลของ native-PAGE เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิวเตรชันและ SDS-PAGE เอนไซม์ทริปซินทั้งสองมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24 กิโลดาลตัน เอนไซม์ทริปซิน เอ และ บี มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีพีเอชที่เหมาะสมที่ พีเอช 9 เอนไซม์ทั้งสองมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวในช่วงพีเอช 6-11 แคลเซียมไอออนมีผลเพิ่มความคงตัวต่อเอนไซม์ทริปซิน เอ และ บี กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินทั้งสองลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น (ร้อยละ 0-30) และถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งจำเพาะกับเอนไซม์ทริปซิน เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง และ *N*-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone เอนไซม์ ทริปซิน เอ และ บี มีค่า K_m และ K_{cat} เท่ากับ 0.22-0.31 มิลลิโมลาร์ และ 69.5-82.5 ต่อวินาที ตามลำดับ จากการตรวจสอบลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโนจำนวน 20 หน่วยย่อย พบว่าเอนไซม์ทริปซิน เอ และ บี มีลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้านหมู่อะมิโน คือ IVGGYECQAHSQPPQVSLNA และ IVGGYECQAHSQPPQVSLNS ตามลำดับ

Two trypsins (A and B) from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) were purified by Sephacryl S-200, Sephadex G-50 and DEAE-cellulose with a 177 and 257-fold increase in specific activity and 23 and 21% recovery for trypsin A and B, respectively. Purified trypsins revealed a single band on native-PAGE. The molecular weights of both trypsins were 24 kDa as estimated by size exclusion chromatography and SDS-PAGE. Trypsin A and B exhibited the maximal activity at 55°C and 60 °C, respectively, and had the same optimal pH at 9.0. Both trypsins were stable up to 50°C and in the pH range from 6.0 to 11.0. Both trypsin A and B were stabilized by calcium ion. Activity of both trypsins continuously decreased with increasing NaCl concentration (0-30%) and were inhibited by the specific trypsin inhibitors-soybean trypsin inhibitor and *N*-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone. Apparent K_m and K_{cat} of trypsin A and B were 0.22-0.31 mM and 69.5-82.5 S^{-1}, respectively. The N-terminal amino acid sequences of the first 20 amino acids of trypsin A and B were IVGGYECQAHSQPPQVSLNA and IVGGYECQAHSQPPQVSLNS, respectively.

คำสำคัญ: ทริปซิน โปรตีเนสชนิดซีรีน ปลาทูน่า การทำบริสุทธิ์ การสกัด เครื่องใน

Keywords: Trypsin, Serine proteinase, Tuna, Purification, Isolation, Viscera

CONTENTS

	Page
Contents	v
List of Tables	vi
List of Figures	vii
Introduction	1
Literature review	3
Proteolytic enzyme	3
Classification of proteases	3
Fish digestive proteinases	5
Classification of digestive proteinases from marine animals	6
Isolation and characterization of digestive proteinases from marine animals	10
Materials and Methods	17
Results and Discussion	24
Purification of trypsins from skipjack tuna intestine	24
Electrophoretic pattern	28
Optimal pH and temperature	31
pH and thermal stability	33
Effect of calcium ions on the thermal stability	36
Effect of NaCl	38
Effect of inhibitors	40
Kinetic study	42
N-terminal sequencing	44
Conclusion	46
References	47

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Purification of trypsins from skipjack tuna intestine	26
2	Effect of various inhibitors on the activity of purified trypins from skipjack tuna intestine	41
3	Kinetic properties of skipjack tuna intestine trypsins for the hydrolysis of TAME	43

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Action of endopeptidases and exopeptidases on protein structure	3
2	Purification of trypsins from skipjack tuna intestine	27
3	Protein pattern from native-PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of purified trypsin A and B from skipjack tuna intestine	29
4	Calibration curve for the molecular weight determination of the purified trypsin A and B on Sephacryl S-200 chromatography	30
5	pH (a) and temperature (b) profiles of purified trypsin A, and B from skipjack tuna intestine and porcine trypsin	32
6	pH (a) and thermal (b) stability of purified trypsin A and B from skipjack tuna intestine and porcine trypsin	35
7	Effect of calcium ion and EDTA on the stability of purified trypsin A and B from skipjack tuna intestine and porcine trypsin	37
8	Effect of NaCl concentrations on activities of purified trypsin A and B from skipjack tuna intestine	39
9	Comparison of N-terminal amino acid sequences of the purified trypsin A and B from skipjack tuna intestine with other enzymes	45