คุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย

Properties of Trypsin Purified from the Viscera of Hybrid Catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2554

มหาวิทยาลัยทักษิณ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยทักษิณ สำหรับเงินอุดหนุนโครงการวิจัยเรื่อง ‘‘คุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย’’ จำนวน 400,000 บาท ขอขอบพระคุณ คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ สำหรับการวิจัยครั้งนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย คุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุย

Properties of trypsin purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*)

ชื่อผู้วิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร

คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ

อำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง 93110

โทรศัพท์/โทรสาร 074-693996

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท การวิจัยประยุกต์ ประจำปี พ.ศ. 2554 จำนวนเงิน 400,000 บาท ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2554

เอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาดุกบิ๊กอุยสามารถทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกด้วยโครมาโตกราฟีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Sephacryl S-200 Sephadex G-20 และ DEAE-cellulose โดยเอนไซม์ทริปซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47.6 เท่าและได้ผลผลิตร้อยละ 12.7 เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนเจลของ native-PAGE เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิวเตรชันและ SDS-PAGE พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลาย N^{α}-*p*-tosyl-L-arginine methyl ester hydrochloride (TAME) คือพีเอช 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวต่อความร้อนในช่วงอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงพีเอช 6-11 แคลเซียมไอออนมีผลเพิ่มความคงตัวต่อเอนไซม์ทริปซิน 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 พบว่าเอนไซม์ทริปซินมีลำดับของกรดอะมิโนปลายสายด้าน

หมู่อะมิโน คือ IVGGYECQAHSQPPTVSLNA ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับเอนไซม์ทริปซินจากปลาชนิดอื่น ๆ

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.

คำสำคัญ: ทริปซิน, โปรติเนสชนิดซีรีน, การทำบริสุทธิ์, การจำแนกคุณลักษณะ, เครื่องใน

Keywords: Trypsin, Serine proteinase, Purification, Characterization, Viscera

CONTENTS

	Page
Contents	v
List of Tables	vi
List of Figures	vii
Chapter 1 Introduction	1
Chapter 2 Literature review	3
Proteolytic enzyme	3
Fish digestive proteinases	5
Isolation and characterization of fish digestive proteinases	11
Chapter 3 Materials and Methods	17
Chapter 4 Results and Discussion	25
Purification of trypsin from hybrid catfish viscera	25
Purity and molecular mass	29
pH and temperature profiles	32
pH and thermal stability	34
Effect of calcium ions on the thermal stability	37
Effect of NaCl	39
Effect of inhibitors	40
Kinetic study	42
N-terminal sequencing	44
Chapter 5 Conclusion	46
References	48

LIST OF TABLES

Table		Page
1	Purification of trypsin from hybrid catfish viscera	27
2	Effect of various inhibitors on the activity of purified trypsin from hybrid catfish viscera	41
3	Kinetic parameters of trypsin from viscera of hybrid catfish and other fish trypsins using TAME as substrate	43

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Elution profiles of trypsin from hybrid catfish viscera on Sephacryl S-200 column (a); Sephadex G-50 column (b) and DEAE-cellulose column (c).	28
2	Protein pattern from native-PAGE (a) and SDS-PAGE (b) of purified trypsin from hybrid catfish viscera	30
3	Calibration curve for the molecular mass determination of the purified trypsin from hybrid catfish viscera on Sephacryl S-200 chromatography	31
4	pH (a) and temperature (b) profiles of purified trypsin from hybrid catfish viscera	33
5	pH (a) and thermal (b) stability of purified trypsin from hybrid catfish viscera	36
6	Effect of calcium ions and EDTA on the stability of purified trypsin from hybrid catfish viscera	38
7	Effect of NaCl concentrations on activities of purified trypsin from hybrid catfish viscera	39
8	Comparison of N-terminal amino acid sequences of the purified trypsin from hybrid catfish viscera with other trypsins	45