

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการวิจัย คุณสมบัติของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากเครื่องในปลา
คูกบีกอูย

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 ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2553 ถึง วันที่ 30 กันยายน 2554

เอนไซม์ทริปซินจากเครื่องในปลาคูกบีกอูยสามารถทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกด้วยโครมาโตกราฟีชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Sephacryl S-200 Sephadex G-20 และ DEAE-cellulose โดยเอนไซม์ทริปซินมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 47.6 เท่าและได้ผลผลิตร้อยละ 12.7 เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ปรากฏเป็นแถบโปรตีนเดี่ยวบนเจลของ native-PAGE เอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 24 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิวเรชันและ 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, โปรรตีนเอสชนิดซีรีน, การทำบริสุทธิ์, การจำแนกคุณลักษณะ, เครื่องใน

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