พัชรินทร์ ศิริงาน : คุณลักษณะของโปรตีเนสในปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) (CHRACTERISTICS OF ENDOGENOUS PROTEINASES IN INDIAN ANCHOVY (*Stolephorus* spp.)) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 99 หน้า. ISBN 974-533-429-4

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วน และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ในปลากะตัก (*Stolephorus* spp.)โดยศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมี คือ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม ผลของเกลือ ความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้น และสารยับยั้งกิจกรรมของโปรตีเนส พบว่า กิจกรรมย่อยสลายตัวเอง (autolytic activity) เกิดขึ้นสูงสุดที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลือมีผลให้การย่อยสลายลดลง โปรตีเนสที่สกัดจากปลากะตักทั้งตัวสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์สำหรับทริปซิน คือบิวทิลออกซิคาร์บอนิล-แอสพาร์ติก(เบนซิล)-โพรลีน-อาร์จีนีน-7-อะมิโด-4-เมทิลคลูมาริน (butyl-oxycarbonyl-Asp(oBzl)-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin) และถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งทริปซินในถั่วเหลือง (soybean trypsin inhibitor) ลิวเพปติน (leupeptin) และ โทซิล-แอล-ไลซีน คลอโรเมทิล คีโตน (*N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone) นอกจากนี้โปรตีเนสที่แสดงกิจกรรมสูงสุด คือ โปรตีเนสที่คล้ายทริปซิน (trypsin-like proteinase) และทริปซิน (trypsin) ที่สกัดจากเครื่องในของปลากะตัก ในขณะที่ในส่วนของกล้ามเนื้อปลา พบเฉพาะโปรตีเนสที่คล้ายทริปซิน โดยน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีเนสในส่วนของเครื่องในของปลากะตัก คือ 31, 35, 44, 49 และ 57 กิโลดาลตัน ซึ่งทำการตรวจวัดกิจกรรมด้วยวิธีการย้อมสี ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ ในส่วนของกล้ามเนื้อ พบโปรตีเนสที่มีขนาด 56 กิโลดาลตัน เมื่อทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการให้ความร้อน การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 30-60 การแยกด้วยเทคนิค การแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange) ความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาไฮโดรฟอบิก (hydrophobic interaction) และแยกตามขนาดมวลโมเลกุล (gel filtration) สามารถแยกโปรตีเนสได้เป็น 4 ส่วน คือ P111 P21 P31 และ P4 โดยพบว่าทั้ง 4 ส่วนสามารถย่อยสลายสารตั้งต้นสังเคราะห์สำหรับทริปซิน มีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมคือ 50-60 องศาเซลเซียส และ 8.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งทริปซินในถั่วเหลือง ลิวเพปติน และโทซิล-แอล-ไลซีน คลอโรเมทิล คีโตน สามารถยับยั้งกิจกรรมของโปรตีเนสที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนได้ และยังพบว่าแคลเซียมไอออนไม่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่แยกได้ยกเว้น P111 โดยโปรตีเนสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมีขนาด 27 ถึง 65 กิโลดาลตัน โปรตีเนสที่คล้ายทริปซินสามารถย่อยสลายเนื้อปลากะตักได้ที่อุณหภูมิ 35

ย่อยสลายเนื้อปลากะตักได้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของแต่ละส่วนในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์และพีเอช 8.5

พบโปรตีเนสที่คล้ายทริปซิน, ทริปซิน, ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) และคาเทปซิน แอล (cathepsin L) ตลอดระยะเวลาการหมักน้ำปลา 12 เดือน ในขณะที่พบกิจกรรมของเอนไซม์ลิวซีน-อะมิโนเปปติเดส (leucine-aminopeptidase) ในช่วงเดือนแรกของการหมักเท่านั้น และโปรตีเนสที่พบในน้ำปลาช่วงระยะการหมักต่างๆ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37, 47 และ 53 กิโลดาลตัน ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4.0 โมลาร์ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเอนไซม์ในปลากะตัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2547

ลายมือชื่อนักศึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

PATCHARIN SIRINGAN : CHARACTERISTICS OF ENDOGENOUS PROTEINASES IN INDIAN ANCHOVY (*Stolephorus* spp.). THESIS ADVISOR : ASST. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 99 PP. ISBN 974-533-429-4

CHARACTERISTICS/ENDOGENOUS PROTEINASE/INDIAN ANCHOVY/ TRYPSIN-LIKE PROTEINASE

The objectives of this study were to characterize and partially purify endogenous proteinases from Indian anchovy. In addition, biochemical characteristics, including pH and temperature optimum, effect of NaCl concentration, substrate specificity, and inhibitor were elucidated. Autolytic activity was maximum at 60 ^{o}C and decreased with increasing NaCl concentration. Crude proteinases isolated from whole fish effectively hydrolyzed synthetic substrates of trypsin, especially butyloxycarbonyl-Asp(oBzl)-Pro-Arg-7-amido-4-methylcoumarin and was inhibited by soybean trypsin inhibitor (SBTI), leupeptin, and *N*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK). Trypsin-like proteinase and trypsin from viscera exhibited the highest activity, while only activity of trypsin-like proteinases from muscle was predominant. Molecular weight (MW) of crude proteinases in viscera of Indian anchovy was estimated to be 31, 35, 44, 49, and 57 kDa by activity staining in the presence of 4.0 M NaCl. MW of crude proteinases extracted from muscle was 56 kDa. Trypsin-like proteinases were partially purified using heat treatment, 30-60% saturation ammonium sulfate fractionation, anion exchange, hydrophobic interaction, and gel filtration chromatography. Four fractions (P111, P21, P31, and P4) exhibiting

proteinase activity were obtained. All fractions preferably hydrolyzed synthetic substrates of trypsin. Optimal temperature and pH of all fractions were 50-60 °C and 8.5, respectively. SBTI, leupeptin, and TLCK also inhibited all partially purified proteinases activities. All purified proteinases were Ca^{2+} independent except for P111. Molecular weight of partially purified proteinases ranged from 27 to 65 kDa based on activity staining at 4.0 M NaCl, pH 8.5. Trypsin-like proteinases also hydrolyzed washed anchovy muscle mince in 4.0 M NaCl, pH 8.5, at either 35 °C or their optimal temperatures.

Trypsin-like, trypsin, chymotrypsin, and cathepsin L were found in commercial fish sauce samples throughout 12 months of fermentation. In contrast, leucine-aminopeptidase activity was detected only at the first month. MW of proteinases found in fish sauce at various fermentation periods was estimated to be 37, 47 and 53 kDa based on activity staining at 4.0 M NaCl, which was similar to that found in endogenous proteinases of fish.

School of Food Technology

Academic Year 2004

Student's Signature Pakhavin Jirayam

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature