ศิริพร ศิริอังคณากุล : การจำแนกคุณลักษณะและการใช้ประโยชน์ของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสในส่วนของซาร์โคพลาสมิกจากกล้ามเนื้อปลาเขตร้อน (CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF PROTEINASE INHIBITOR IN SARCOPLASMIC FRACTION FROM TROPICAL FISH MUSCLE) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 210 หน้า.

ปลาไนมีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองต่ำกว่าปลาหนวดฤาษี ($P < 0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสและทรานสกลูตามิเนสในปลาไนและปลาหนวดฤาษีในตัวอย่างที่ผ่านการเตรียมด้วยกระบวนการสกัดด้วยด่างมีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่ผ่านการล้างด้วยน้ำ ($P < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ว่ากระบวนการสกัดด้วยด่างมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสอง เจลปลาไนที่ผ่านการล้างด้วยน้ำมีค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงที่สุด ($P < 0.05$) ในขณะที่การสกัดด้วยด่างส่งผลให้เจลปลาหนวดฤาษีมีค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงที่สุด ($P < 0.05$) นอกจากนี้การบ่มเจลที่อุณหภูมิต่ำ (เซตติ้ง) ของปลาทั้งสองชนิดที่ผ่านการเตรียมด้วยกระบวนการสกัดด้วยด่างไม่มีผลเพิ่มค่าเนื้อสัมผัสของเจล เจลจากปลาไนที่ผ่านการเตรียมด้วยการล้างด้วยน้ำและสกัดด้วยด่างมีค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงกว่าเจลจากปลาหนวดฤาษีที่เตรียมภายใต้สภาวะเดียวกัน

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากปลาไนมีความสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเมื่อทดสอบด้วยเทคนิคการยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitory activity staining) โดยโปรตีนที่มีมวล 35, 41, 47, 52 และ 69 กิโลดาลตันแสดงความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน เมื่อเติมโปรตีนซาร์โคพลาสมิก 0.18 เปอร์เซ็นต์ ลงในซูริมิปลาทรายแดงส่งผลให้เนื้อสัมผัสเพิ่มสูงขึ้น และพบการคงอยู่ของมัยโอซินสายหนักเพิ่มขึ้น จากผลการศึกษานี้แสดงว่าโปรตีนซาร์โคพลาสมิกสามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์โปรติเนสในซูริมิปลาทรายแดง เพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนส จึงทำบริสุทธิ์โดยการให้ความร้อน การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การแลกเปลี่ยนไอออน การแยกแบบจำเพาะ และการแยกตามขนาด ทำให้ได้โปรตีนบริสุทธิ์ที่มีมวล 47 (inhibitor I) และ 52 (inhibitor II) กิโลดาลตัน เมื่อระบุชนิดของโปรตีนทั้งสองด้วยเทคนิค LC-MS/MS พบว่าคือแอลฟ่าวัน-โปรติเนสอินฮิบิเตอร์ (α1-PI) สารยับยั้ง inhibitor I และ inhibitor II เป็นไกลโคโปรตีน มีน้ำตาลเชื่อมต่อกับกรดอะมิโนแอสพาราจีนที่ตำแหน่ง 214 (N214) และตำแหน่ง 226 (N226) การเติม α1-PI สามารถลดการเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักและโทรโปมัยโอซินของซูริมิปลาตาหวาน

ปลาทรายแดง ปลาตาหวานและปลาจวดเหลืองเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตซูริมิปลาเขตร้อน โดยโปรตีนซาร์โคพลาสมิกของปลาทั้ง 3 ชนิดที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 50-70 เปอร์เซ็นต์ และอยู่ในรูปผงด้วยการระเหิดแห้ง

สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ 92, 80 และ 85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อใช้เทคนิค GeLC-MS/MS พบโปรตีน α1-PI ในซาร์โคพลาสมิกโปรตีนผงจากปลาจวดเหลืองที่มีมวล 45-50 กิโลดาลตัน ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของซาร์โคพลาสมิกผงของปลา 3 ชนิดมีความเสถียรต่อความร้อนในช่วงของอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียสและมีความเสถียรต่อโซเดียมคลอไรด์จนถึงระดับ 0.2 โมลาร์ การเติมซาร์โคพลาสมิกโปรตีนผงจากปลาทรายแดงเข้มข้น 0.5 และ 1 เปอร์เซ็นต์ลงในซูริมิปลาทรายแดงและบ่มที่อุณหภูมิ 37 และ 65 องศาเซลเซียสส่งผลให้ความแข็งแรงของเจลจากซูริมิปลาทรายแดงเพิ่มขึ้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

SIRIPHON SIRIANGKANAKUN : CHARACTERIZATION AND UTILIZATION OF PROTEINASE INHIBITOR IN SARCOPLASMIC FRACTION FROM TROPICAL FISH MUSCLE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 210 PP.

ALKALI pH-SHIFT PROCESS/INHIBITOR/SARCOPLASMIC PROTEINS/ GLYCOSYLATION/LC-MS/MS/GELC-MS/MS

Autolytic activity of common carp was lower than that of goatfish ($P < 0.05$). The alkali-extracted fish protein isolate (FPI) of both common carp and goatfish showed lower autolytic and transglutaminase activity than thrice-washed samples ($P < 0.05$), implying that these enzymes were largely inactivated during alkali pH-shift process. Breaking force of common carp gels was the highest when prepared by conventional washing ($P < 0.05$). In contrast, gels prepared from FPI of goatfish exhibited the highest breaking force ($P < 0.05$). Setting did not enhance textural properties of FPI gels from both species. All gels prepared by conventional washing and alkali pH-shift process of common carp showed higher textural properties than those of goatfish under the same heating conditions.

Sarcoplasmic proteins (SP) from common carp were able to inhibit trypsin. Protein bands with molecular mass of 35, 41, 47, 52 and 69 kDa appeared on trypsin inhibitory activity staining. Textural properties of threadfin bream surimi were improved with addition of SP. In addition, retention of myosin heavy chain (MHC) increased when SP was added at 0.18%. Therefore, common carp SP showed inhibitory activity against trypsin and endogenous proteinases of threadfin bream

surimi. The proteinase inhibitor from common carp SP was purified using heat treatment, ammonium sulfate precipitation, anion exchange, affinity chromatography and gel filtration. Two protein bands with molecular mass of 47 (inhibitor I) and 52 (inhibitor II) kDa were observed. The inhibitors I and II were considered to be alpha-1-proteinase inhibitor (α1-PI), based on LC-MS/MS. They are glycoproteins with N-linked glycans attached to asparagines at N214 and N226. Moreover, addition of α1-PI was able to reduce degradation of MHC and tropomyosin of bigeye snapper surimi.

Threadfin bream, bigeye snapper and yellow croaker are the main species used as raw material for tropical surimi production. SP from three species were fractionated by 50-70% ammonium sulfate precipitation. Lyophilized fractionated SP of threadfin bream (TB-SP), bigeye snapper (BS-SP) and yellow croaker (YC-SP) exhibited 92, 80 and 85% trypsin inhibitory activity, respectively. Based on GeLC-MS/MS, YC-SP possessed α1-PI with molecular mass ranging from 45 to 50 kDa. Trypsin inhibitory activity of three species showed good stability at 30-60 °C and up to 0.2 M NaCl. In addition, textural properties of threadfin bream surimi were improved with addition of 0.5 and 1% TB-SP in conjunction with setting at 37 °C.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____