ชื่อวิทยานิพนธ์ สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสจากพลาสมาเลือดไก่: การทำบริสุทธิ์ การศึกษาคุณลักษณะ และการประยุกต์ใช้ในซูริมิ

ผู้เขียน นายสาโรจน์ รอดคืน

สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

ปีการศึกษา 2548

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของพลาสมาเลือดไก่ต่อสมบัติของเจลซูริมิจากปลาเขตร้อนซึ่งประกอบด้วยปลาตาหวาน ปลาเหลน ปลาซาร์ดีน และปลาเขตอบอุ่น ได้แก่ ปลาแปซิฟิกไวทิง พบว่าการเติมพลาสมาเลือดไก่ร่วมกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 หรือ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 นาที ให้เจลซูริมิซึ่งมีค่าแรงเจาะทะลุและระยะทางก่อนเจาะทะลุสูงกว่าเจลซูริมิชุดควบคุมซึ่งไม่มีการเติมพลาสมาเลือดไก่ พลาสมาเลือดไก่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการย่อยสลายของโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรตีเนส โดยทั้งมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิได้ดีกว่าโปรตีนไอโซเลตจากถั่วเหลืองแต่ด้อยกว่าโปรตีนจากพลาสมาเลือดวัว เลือดหมู และโปรตีนจากไข่ขาว การเติมพลาสมาจากเลือดไก่มีผลให้ความขาวของเจลซูริมิมีค่าลดลงโดยเฉพาะเมื่อความเข้มข้นของพลาสมาเลือดไก่เพิ่มขึ้น โครงสร้างทางจุลภาคของเจลซูริมิที่เติมพลาสมาเลือดไก่มีการเชื่อมประสานกันระหว่างเส้นสายของโปรตีนน้อย และมีลักษณะโครงสร้างแบบเส้นใยอย่างหยาบ ซึ่งบ่งชี้ถึงการขัดขวางการเชื่อมประสานของโปรตีนไมโอไฟบริลด้วยพลาสมาเลือดไก่ ในขณะที่โครงสร้างแบบเส้นใยที่จัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบสามารถสังเกตได้จากเจลชนิดโมโดริ อันบ่งชี้ถึงความสามารถของพลาสมาเลือดไก่ในการป้องกันการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริล

พลาสมาเลือดไก่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสจากซาร์โคพลาสมิคและการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาตาหวาน และปลาเหลนบดที่ผ่านการล้างและไม่ล้าง โดยสามารถยับยั้งการย่อยสลายของโปรตีนไมโอซินเส้นหนักในเนื้อล้าง และไม่ล้างที่ผ่านการบ่มด้วยอุณหภูมิสูง (60 องศาเซลเซียส สำหรับปลาตาหวาน และ 65 องศาเซลเซียส สำหรับปลาเหลน) และการเติมพลาสมาเลือดไก่สามารถป้องกันการลดลงของค่า Storage modulus ของซูริมิจากปลาแปซิฟิกไวทิงในช่วง อุณหภูมิ 47 ถึง 57 องศาเซลเซียส

การแยกส่วนสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนจากพลาสมาเลือดไก่สามารถกระทำโดยใช้พอลิเอทธิลีนไกลคอล (พีอีจี) ที่ระดับความเข้มข้น 200-400 กรัมต่อลิตรของ

ปริมาณพลาสมาเลือดไก่ โดยแฟรกชั่นที่ได้ (ตะกอน II) มีกิจกรรมการยับยั้งและความบริสุทธ์สูงที่สุด สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในแฟรกชั่นมีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 90 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แต่เมื่อระยะเวลาการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น เป็นผลให้กิจกรรมการยับยั้งของสารดังกล่าวในแฟรกชั่นลดลงอย่างเด่นชัด นอกจากนั้นโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ถึง 3 ไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในแฟรกชั่น จากการวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนโดยเทคนิคเจลอิเล็คโทรโฟรีซีสแสดงให้เห็นว่า แฟรกชั่นของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนมีประสิทธิภาพในการป้องกันการย่อยสลายของโปรตีนไมโอซินเส้นหนัก โทรโปไมโอซิน และ โทรโปนิน-ที จากเนื้อปลาแปซิฟิกไวทิง และปลาแอโรทูชฟลาวเดอร์บดที่ผ่าน และไม่ผ่านการล้าง และจากซูริมิปลาแปซิฟิกไวทิง ซึ่งบ่มที่สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ (55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีสำหรับปลาแปซิฟิกไวทิง และ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีสำหรับปลาแอโรทูชฟลาวเดอร์) ค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุของเจลโมโดริจากปลาแปซิฟิกไวทิง มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแฟรกชั่นที่เติมเพิ่มขึ้นโดยมีการลดลงของปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก การเติมแฟรกชั่นของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนไม่มีผลต่อค่าความขาวของเจลซูริมิ

การทำบริสุทธิ์สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนจากพลาสมาเลือดไก่ด้วยการตกตะกอนด้วยพอลิเอทธิลีนไกลคอล และการใช้โครมาโทรกราฟีแบบจำเพาะต่อปาเปน พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 96.8 เท่าและได้ผลผลิตร้อยละ 28.9 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนมีน้ำหนักโมเลกุล 122 กิโลดาลตันภายใต้การย้อมกิจกรรมการเป็นสารยับยั้งต่อปาเปน สารยับยั้งเอนไซม์ที่ได้มีความคงตัวต่อความร้อนในช่วงอุณหภูมิ 40 ถึง 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แต่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งปาเปนมากกว่าร้อยละ 50 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที นอกจากนั้นมีความคงตัวต่อเกลือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลาแปซิฟิกไวทิงและปลาแฮโรทูชฟลาวเดอร์ โดยประสิทธิภาพการยับยั้งขึ้นกับความเข้มข้นของสารยับยั้ง ดังนั้นพลาสมาหรือแฟรกชั่นของพลาสมาสามารถใช้เป็นสารเติมแต่งทางเลือกใหม่ในซูริมิสำหรับปรับปรุงคุณภาพเจล

Thesis Title	Protease Inhibitor from Chicken Plasma: Purification, Characterization and its Application in Surimi
Author	Mr. Saroat Rawdkuen
Major Program	Food Technology
Academic Year	2005

ABSTRACT

Effect of chicken plasma protein (CPP) on gel properties of surimi from tropical fish including bigeye snapper, lizardfish and sardine and temperate fish involving Pacific whiting was investigated. Addition of CPP in combination with setting at 40°C or incubating at 60°C for 30 min prior to heating at 90°C for 20 min resulted in the greater breaking force and deformation, when compared with the control gel (without CPP) ($P<0.05$). CPP exhibited the superior efficacy in proteolysis prevention and gel strengthening to soy protein isolate, but was poorer than bovine, porcine plasma and egg white protein. CPP addition resulted in the decrease in whiteness of resulting gels, especially when the levels added increased. Microstructure of surimi gels added with CPP had less linkage between protein strands with a coarser fibrillar structure, indicating the interfering effect of CPP on cross-linking of myofibrillar proteins, while an ordered fibrillar structure was observed in modori gels, indicating a preventive effect of CPP on hydrolysis of myofibrillar protein.

CPP showed the inhibitory activity towards sarcoplasmic proteinases and autolysis of mince and washed mince from bigeye snapper and lizardfish. CPP effectively prevented the degradation of myosin heavy chain (MHC) in mince and washed mince incubated at elevated temperature (60°C and 65°C for bigeye snapper and lizardfish, respectively). The abrupt loss of G' upon heating from 47 to 57°C of Pacific whiting surimi was prevented by the addition of CPP.

Cysteine proteinase inhibitor (CPI) from chicken plasma was successfully fractionated using polyethylene glycol (PEG-4000) at the level of 200-400 g/L based on the original volume of plasma protein. The highest inhibitory activity and purification fold were obtained in PEG precipitate II (CPI fraction). The CPI fraction was stable in the temperature ranges of 40-90°C for 10 min but extended incubation time at 90°C

markedly decreased the inhibitory activity of CPI fraction. The fraction was stable in the presence of salt ranging from 0.5 to 3%. SDS-PAGE pattern revealed that the CPI fraction effectively prevented the degradation of MHC, tropomyosin and troponin-T in mince, washed mince from Pacific whiting and arrowtooth flounder and Pacific whiting surimi incubated at elevated temperature (55°C/60 min and 60°C/30 min for Pacific whiting and arrowtooth flounder, respectively). The breaking force and deformation of modori gels from Pacific whiting increased as the concentration of CPI fraction increased with a concomitant decrease in TCA-soluble peptides ($P<0.05$). The addition of CPI fraction had no detrimental effect on whiteness of surimi gels ($P>0.05$).

The cysteine proteinase inhibitor from chicken plasma was purified to 96.8 folds with a yield of 28.9% by using PEG fractionation and affinity chromatography on carboxymethyl-papain-Sepharose-4B. Based on inhibitory activity staining for papain, CPI was shown to have an apparent molecular weight of 122 kDa. CPI was stable in the temperature ranges of 40-70°C for 10 min; however the inhibitory activity toward papain was lost more than 50% within 30 min of heating at 90°C. CPI was stable in the presence of salt up to 3.0%. The purified CPI exhibited the inhibitory activity toward autolysis of natural actomyosin (NAM) in a concentration-dependent manner. Therefore, chicken plasma or its fraction can be used as an alternative additive for improving the quality of surimi gels.