

ซึ่งบ่งชี้ว่า เอนไซม์โปรตีนเอสหลักทั้งสองชนิดในกล้ามเนื้อปลาตาหวานชนิดหนึ่งบางเป็น เอนไซม์โปรตีนเอสชนิดซีริน

สำหรับเอนไซม์โปรตีนเอสในของเหลวซาร์โคพลาสซึมของกล้ามเนื้อปลาตาหวานชนิดหนึ่งหนานั้นมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจวิเคราะห์ที่พีเอชเท่ากับ 5.0 และ 8.5 โดยสารยับยั้ง pepstatin A สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 5.0 ประมาณร้อยละ 75 ในขณะที่เอนไซม์โปรตีนเอสที่มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 8.5 ถูกยับยั้งด้วย E-64, soybean trypsin inhibitor, lactacystin และ EDTA เป็นต้น ดังนั้นกล้ามเนื้อปลาตาหวานชนิดหนึ่งหนาประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีนเอสซาร์โคพลาสซึมหลายชนิด

การทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรตีนเอสในของเหลวซาร์โคพลาสซึมจากกล้ามเนื้อปลาตาหวานชนิดหนึ่งบางกระทำโดยการใช้ความร้อน ตามด้วยการใช้โครมาโทกราฟีต่างๆ ซึ่งประกอบด้วย phenyl-Sepharose 6 fast flow, Source 15Q และ Superose 12 HR 10/30 ตามลำดับ เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5,180 เท่า และได้ผลผลิตร้อยละ 0.8 โดยมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 72 กิโลดาลตัน เมื่อตรวจสอบด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน จากการศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดยใช้ SDS-substrate gel ในสภาวะที่ไม่มีสารรีดิวซิ่ง พบว่าเอนไซม์ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 66 และ 13.7 กิโลดาลตัน เอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการย่อยสลายเคซีนเท่ากับ 8.0-8.5 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์ถูกยับยั้งด้วย soybean trypsin inhibitor ร้อยละ 82.7 และถูกยับยั้งบางส่วนด้วย EDTA ในขณะที่ E-64 และ pepstatin A ไม่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ เอนไซม์สามารถย่อยสลายสับสเตรทสังเคราะห์ Boc-Phe-Ser-Arg-MCA ได้เป็นอย่างดี และสามารถย่อยสลาย Z-Phe-Arg-MCA และ Z-Arg-Arg-MCA ได้เพียงเล็กน้อย เอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์สามารถย่อยสลายไมโอซินเส้นหนัก แต่ไม่สามารถย่อยสลายแอกติน ดังนั้น เอนไซม์โปรตีนเอสที่ผ่านการทำบริสุทธิ์เป็นชนิดซีรินที่ถูกกระตุ้นกิจกรรมด้วยความร้อนและอาจมีผลต่อการอ่อนตัวของเจลของชูริมิจากปลาตาหวาน

Thesis Title Purification and Characterization of Proteinase from
Bigeye Snapper, *Priacanthus macracanthus* and
Priacanthus tayenus Muscle.

Author Miss Kittima Leelapongwattana

Major Program Food Technology

Academic Year 2001

Abstract

Proteolysis of muscles from two species of bigeye snapper was studied. Autolysis of mince and washed mince at 50 and 60 °C was compared. A higher degradation of myosin heavy chain (MHC) was observed in both mince and washed mince from *P. macracanthus*, compared to that of *P. tayenus*, especially when incubation time increased. Mince from both species showed a higher degradation than washed mince, indicating a higher proteolytic activity in mince. The result suggested that *P. macracanthus* muscle had a higher activity of either sarcoplasmic or myofibril-associated proteinases. Myofibril-associated proteinases in both species were inhibited by soybean trypsin inhibitor, suggesting that those proteinases were serine proteinases. When sarcoplasmic proteinases in *P. macracanthus* muscle were characterized by using casein-TCA-Lowry assay, two activity peaks with an optimum temperature of 60 °C were observed at pHs of 6.5 and 8.5. Activity of 70-80% was inhibited by soybean trypsin inhibitor, suggesting that the major proteinase belonged to serine proteinase. For *P. tayenus* sarcoplasmic proteinase, two activity peaks with an optimum temperature of 60 °C were found at pHs of 5.0 and 8.5. The first peak activity of 75% was inhibited by pepstatin A, while another peak activity was inhibited by various inhibitors including E-64, soybean trypsin inhibitor, lactacystin, EDTA, etc. The result indicated that different sarcoplasmic proteinases were present in *P. tayenus*

muscle. Therefore, *P. macracanthus* muscle generally had the higher proteolytic activity, compared to *P. tayenus* muscle.

Sarcoplasmic proteinase was purified from *P. macracanthus* ordinary muscle by a heat treatment and a series of chromatographies on phenyl-Sepharose 6 fast flow, Source 15Q and Superose 12 HR 10/30. It was purified to 5,180 folds with a yield of 0.8%. The molecular weight of purified proteinase was estimated to be 72 kDa by Superose 12 HR 10/30 gel filtration. On non-reducing SDS-substrate gel, this proteinase appeared as two proteinase activity bands with a molecular weights of 66 and 13.7 kDa. Accordingly, it was found to consist of two different subunits. The optimum pH and temperature for the hydrolysis of casein were 8.0-8.5 and 60°C, respectively. The proteolytic activity was strongly inhibited by soybean trypsin inhibitor (82.7%) and partially inhibited by EDTA, while pepstatin A and E-64 showed no inhibition. Purified proteinase hydrolyzed Boc-Phe-Ser-Arg-MCA, but slowly hydrolyzed Z-Phe-Arg-MCA and Z-Arg-Arg-MCA. In addition, it mainly degraded myosin heavy chain, not actin. These results suggest that purified proteinase was heat activated serine proteinase, which was probably involved in gel weakening of bigeye snapper surimi.