

ชื่อเรื่อง	การสกัดและการแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า
ชื่อผู้เขียน	นางสาวศศิอาภา บุญคง
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. วิจิตรา แดงปรก

บทคัดย่อ

เอนไซม์ย่อยไฟบรินสามารถพบได้หลากหลายแหล่งทั้งในอาหารและไม่ใช่อาหาร โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผลิตภัณฑ์พื้นบ้านของนานาประเทศในแถบเอเชีย เอนไซม์ย่อยไฟบรินได้ตรวจพบจากการทดสอบเบื้องต้นในถั่วเน่า ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วหมักพื้นบ้านของไทยและมีการบริโภคกันทั่วไป ในเขตภาคเหนือของประเทศไทยเป็นระยะเวลายาวนานหลายทศวรรษ สารสกัดหยาบ (crude extract) จากถั่วเน่าสามารถทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วยเทคนิคการแยกสารที่มีประจุด้วย anion exchanger และนำเอนไซม์ที่ได้ศึกษาต่อด้วยเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยวิธี continuous-elution native polyacrylamide gel electrophoresis (CNA-PAGE) เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ให้แถบโปรตีนที่ 14.2 กิโลดาลตัน และสามารถย่อยสาย $A\alpha$, $E\beta$ และ γ ของไฟบริโนเจนได้ นอกจากนี้การตรวจสอบเอนไซม์ที่ผ่านการแยกด้วยวิธี anion chromatography โดยวิธีไฟบรินไซโมกราฟีมีเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่น้ำหนักโมเลกุล 14.2 กิโลดาลตัน และมีเอนไซม์ย่อยไฟบรินอย่างน้อย 4 ชนิด คือ น้ำหนักโมเลกุล 14.2, 20, 24 และ 45 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การทดสอบความคงทนของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในสารสกัดหยาบ พบว่าเอนไซม์สามารถคงทนความเป็นกรด-เบสในช่วง 5 ถึง 10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และเสื่อมสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย PMSF และ TLCK จึงจัดเป็น serine protease ในการศึกษา *in vitro* พบว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่าคงทนต่อการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน แต่ไม่สามารถทนต่อเอนไซม์เปปซิน ดังนั้นเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่าที่ได้จัดเป็นสารโภชนเภสัชภัณฑ์ (nutraceuticals) ชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เพื่อป้องกันและหรือบรรเทาอาการของโรคหัวใจและหลอดเลือดหรืออาจนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นยาย่อยสลายลิ่มเลือดต่อไป

Title	Extraction and Purification of a Fibrinolytic Enzymes from Thau Nao
Author	Miss Sasiapa Boonkong
Degree of	Master of Science in Food Technology
Advisory Committee Chairperson	Dr. Wichitra Daengprok

ABSTRACT

Fibrinolytic enzymes have been derived from various food and non-food sources in particular, traditional Asian foods. These potent enzymes were screened from *thau nao*, a traditional Thai fermented-soybean food and which has been consumed in the northern part of Thailand for several decades. The crude extract was purified using anion-exchange chromatography followed by the continuous-elution native polyacrylamide gel electrophoresis (CNA-PAGE). A 14.2 kDa fibrinolytic enzyme was purified and was able to cleave all chains of fibrinogen (i.e. A α -, B β - and γ -fibrinogen). Moreover, fibrinolytic enzymes besides the 14.2 kDa were found from the semi-purified extract by fibrin zymography. Thau nao extract contained four plasmin-independent fibrinolytic activities which were correlated with the presence of 14.2, 20, 24 and 45 kDa protease in the extract. The enzymes activity was stable in the pH range of 5 to 10 at 37°C for 1 hour and was completely abolished by heating at 70°C for 10 min. Thau nao enzyme activity was inhibited by protease inhibitors, PMSF and TLCK, indicating that they were serine protease. From *in vitro* digestion study, it was found that the extracted enzyme was resistant to tryptic digestion but was digested by pepsin. In conclusion, the fibrinolytic enzyme from *thau nao* may be used as nutraceutical to prevent and/or alleviate cardiovascular disease or may be further developed as a fibrinolytic drug.