ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร — **สาขา**

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร — **ภาควิชา**

เรื่อง การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่

Extraction of Hyaluronic Acid from Chicken Comb by Crude Enzyme Extract from Chicken Intestine and Pancreas

นามผู้วิจัย นางสาวพิมพ์พร ศรีสันติแสง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์สายพิณ ทานัชฌาสัย, D.Eng.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์อาภัสสรา ชูเทศะ, Dr.rer.nat.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่

Extraction of Hyaluronic Acid from Chicken Comb by Crude Enzyme Extract from Chicken Intestine and Pancreas

โดย

นางสาวพิมพ์พร ศรีสันติแสง

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิมพ์พร ศรีสันติแสง 2556: การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D. 87 หน้า

อุตสาหกรรมการแปรรูปไก่เนื้อในประเทศไทย มีอัตราการผลิตที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดเศษเหลือปริมาณมาก โดยเฉพาะส่วนหงอนที่มีการรายงานว่ามีสารสำคัญ คือ กรดไฮยาลูโรนิก การสกัดสารชนิดนี้ส่วนมากจะใช้น้ำ และเอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีน เพื่อปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงศึกษาการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนของไก่กระทง (อายุ 5-6 สัปดาห์) โดยใช้ไก่ 2 สายพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทย คือ Arbor Acres และ Ross ทั้งเพศผู้ และเพศเมีย พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ปาเปน (ทางการค้า) ย่อยหงอนที่ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้อยู่ในช่วง 1.28-4.97 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก คือ เพศ และผลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับเพศ ซึ่งเพศผู้ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าเพศเมีย ดังนั้นจึงเลือกหงอนเพศผู้ สายพันธุ์ Arbor Acres ซึ่งเป็นพันธุ์ที่มีสัดส่วนการบริโภคสูงถึง 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป คือ การเปรียบเทียบชนิดของเอนไซม์ระหว่างเอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ซึ่งเป็นเศษเหลืออีกส่วนหนึ่งจากการแปรรูปเช่นเดียวกัน พบว่า สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนสภาวะที่เอนไซม์มีความคงตัวค่อนข้างดี คือช่วงพีเอช 6-8 และอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โดยความคงตัวลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นสภาวะที่เลือกเพื่อใช้สกัดกรดไฮยาลูโรนิก คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นสภาวะที่สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูง และมีความคงตัวดี เมื่อนำเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มาย่อยหงอนไก่ เพศผู้ พันธุ์ Arbor Acres โดยใช้เอนไซม์ปาเปน 4 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ใช้ 16 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง ที่พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์แต่ละชนิด พบว่า ปริมาณเอนไซม์ มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ โดยการใช้ปริมาณเอนไซม์เพิ่มขึ้นจะได้สารสกัดเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) และเมื่อใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ ในปริมาณ 8 เท่า (โดยน้ำหนัก) ของเอนไซม์ปาเปน สามารถสกัดกรดไฮยาลูโรนิกได้ แต่ปริมาณต่ำกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปน และเมื่อนำสารสกัดไปวิเคราะห์เทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท และฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี ผลที่ได้บ่งชี้ว่าสารที่สกัดได้จากงานวิจัยนี้ คือ กรดไฮยาลูโรนิก

_____ _____ ____/____/____

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Pimporn Srisantisaeng 2013: Extraction of Hyaluronic Acid from Chicken Comb by Crude Enzyme Extract from Chicken Intestine and Pancreas. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Associate Professor Wunwiboon Garnjanagoonchorn, Ph.D. 87 pages.

Thailand poultry processing industry shows an increase in production rate which results in a large quantity of by-products. Chicken comb, an interesting by-product is revealed as a rich source of hyaluronic acid (HA). In the extraction process, HA is extracted by water and protein in comb structure is removed by digestion with proteolytic enzymes. In this study, HA extraction from male and female of Thailand two popular broiler breeds, Arbor Acres and Ross (5-6 weeks ages) was studied with the application of commercial papain (pH 6.5, 65 °C, 4 hr.). The yield of HA was between 1.28-4.97 µg uronic acid/mg dried comb. The factors which affected on HA yield were sex and interaction of breed and sex where HA yield was higher in male than female comb. According to higher consumption of Arbor Acres (70%), it was selected for HA extraction in the following study. Another by-products, chicken intestine and pancreas were used to extract crude proteolytic enzyme and applied for comb digestion. The study revealed the optimum conditions of crude protease extract at pH 7.5, 60 ºC. The pH stability of the crude protease extract was attained from pH 6 through 8 while the thermal stability declined from 30 to 50 ºC. Therefore, optimum conditions for digestion of broiler combs by crude protease extract in this study were selected at pH 7.5 and 50 ºC because crude enzyme retained high activity and stability. At the optimum condition of each enzyme the Arbor Acres male comb was digested with papain (4,8 µg/mg dried comb) and crude enzyme extract (16,32 µg/mg dried comb). The results illustrated that increase the amount of enzyme caused the increase in the yield of extracted HA ($P<0.05$). Digestion of chicken combs with crude protease extract from chicken intestine and pancreas gave less HA yield than that of commercial papain. Similar identity of HA standard and extracted HA were verified by cellulose acetate electrophoresis and fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy.

_____ _____ ____/____/____

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ดร.สายพิณ ทานัชฌาสัย และ รศ.ดร.อาภัสสรา ชูเทศะ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และขอบพระคุณ ดร.เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ ผู้ทรงคุณวุฒิ และ ดร.กนิฐพร วังใน ประธานในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่ได้อบรมสั่งสอน ขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่ดีตลอดมา และภาควิชาสรีรวิทยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนันสนุนในโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม (Mag-Window I) ประจำปี 2553

ขอกราบขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์รุจเวทย์ ทหารแกล้ว ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนา และคุณชุตินันท์ กาญจนอภิรักษ์ ผู้จัดการอาวุโสฝ่ายพัฒนาผลิตภัณฑ์ เครือเบทาโกร ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี และขอขอบคุณ บริษัท ศูนย์วิทยาศาสตร์ เบทาโกร จำกัด และบริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด เครือเบทาโกร ที่ให้ทุนสนับสนุน และเอื้อเฟื้อวัตถุดิบในการดำเนินการวิจัย

สุดท้ายขอขอบคุณพี่หลิว พี่นก พี่เตย ฝน ทีค พี่ เพื่อน น้อง ทุกคน และกราบขอบพระคุณป่าป๊า หม่าม้า และสมาชิกในครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนอย่างดีมากเสมอมา

พิมพ์พร ศรีสันติแสง

กุมภาพันธ์ 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	26
อุปกรณ์	26
วิธีการ	32
ผลและวิจารณ์	38
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
สรุป	58
ข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	69
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหงอนไก่	70
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก	76
ภาคผนวก ค การวิเคราะห์ค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบ ของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่	79
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกเทียบกับ สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก	84
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	87

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ประเภทของไกลโคซามิโนไกลแคน	11
2	เอนไซม์ในระบบการย่อยอาหารของไก่	25
3	ปริมาณผลได้ (yield) ของหงอน จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนัก 2.4-2.6 กิโลกรัม ทั้งเพศผู้และเพศเมีย	39
4	องค์ประกอบทางเคมีในหงอนของไก่	40
5	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง) ที่สกัดได้ โดยใช้เอนไซม์ปาเปน	41
6	ปริมาณผลได้เฉลี่ยของไส้ และตับอ่อนของไก่ หลังล้างทำความสะอาด โดยเทียบจากน้ำหนักไส้ไก่ทั้งพวง จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม	43
7	การศึกษาชนิดของสารสกัดเอนไซม์ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้ จากส่วนไส้ และตับอ่อนของไก่	44
8	ค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีน ของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่	45
9	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง) ที่สกัดได้จากหงอนของไก่พันธุ์ Arbor Acres เพศผู้ โดยใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่	53
10	Wavenumber (cm^{-1}) ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ในสเปคตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก	57

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของหงอนไก่	5
2	ภาพตัดขวางของโครงสร้างภายในของหงอนไก่ (บริเวณสีดำ คือชั้นของมิวโคอิลาสติก ที่มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบ)	6
3	ลักษณะโครงสร้างของไกลโคซามิโนไกลแคน	10
4	โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก	12
5	ลักษณะการเกิดเจลของกรดไฮยาลูโรนิก	13
6	โครงสร้างของสายโปรตีนที่เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์	18
7	ระบบการย่อยอาหารของไก่	20
8	หงอนของไก่เพศผู้ และเพศเมีย จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม	38
9	ลักษณะของหงอนแห้ง	39
10	ลักษณะของเครื่องในไก่ทั้งพวงก่อนล้างทำความสะอาด	42
11	ลักษณะของไส้ (1 = ลำไส้เล็ก, 2 = ลำไส้ใหญ่) และตับอ่อน (3) ของไก่	42
12	ไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว	43
13	ลักษณะของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นของเหลว (ก) และเอนไซม์ผงแห้งหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง (ข)	45
14	ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 องศาเซลเซียส	46
15	ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่พีเอช 7.5	47
16	ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่อุณหภูมิการบ่ม 60 องศาเซลเซียส	48
17	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ (วิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)	50
18	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ (วิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)	50

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะการเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิกบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท 1 คือ สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก 2, 3 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน 4, 5 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่ และลูกศรชี้ คือจุดเริ่มต้นใส่ตัวอย่าง	54
20	สเปคตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก ก) สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน ข) สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ค) สารมาตรฐาน	56

ภาพผนวกที่

ข1	กราฟมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน $y = 0.0315$ และ $R^2 = 0.9930$	78
ค1	กราฟมาตรฐานของไทโรซีน $y = 1.4599x$ และ $R^2 = 0.9998$	81
ค2	กราฟมาตรฐานของโบวายเซรั่มแอลบูมิน $y = 0.0007$ และ $R^2 = 0.9867$	83

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่

Extraction of Hyaluronic Acid from Chicken Comb by Crude Enzyme Extract from Chicken Intestine and Pancreas

คำนำ

ปัจจุบันไก่เนื้อเป็นสัตว์เศรษฐกิจสำคัญของประเทศไทย โดยในปี 2555 มีปริมาณการผลิตไก่เนื้อถึง 1,020.07 ล้านตัวต่อปี (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ซึ่งพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงและนำมาแปรรูปเพื่อการบริโภค คือ Arbor Acres และ Ross อุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อไก่ ส่งผลให้เกิดเศษเหลือเป็นปริมาณมาก ได้แก่ หัว หงอน ขน ไส้ กระดูก และเลือด เป็นต้น ซึ่งคิดเป็นปริมาณถึง 28-30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักซากไก่ (carcass weight) โดยเศษเหลือเหล่านี้ส่วนมากจะขายรวมกันเพื่อเป็นอาหารสัตว์ ในราคาที่ต่ำ (Jamdar and Harikumar, 2005)

หงอนเป็นเศษเหลือที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่พบการนำหงอนของไก่ไปศึกษา และไม่พบรายการอาหารที่ปรุงจากหงอน แต่มีรายงานว่าหงอนมีสารสำคัญ คือ กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid: HA) ซึ่งเป็นพอลิแซคคาไรด์ ที่มีราคาแพง พบมากที่ผิวหนังของสัตว์และมนุษย์ น้ำไขข้อ เอ็น สายสะดือ หงอนไก่ และในเซลล์แบคทีเรีย (Lee and Spicer, 2000; Kakehi *et al*., 2003; Kogan *et al*., 2007; Price *et al.,* 2007) สมบัติสำคัญของกรดชนิดนี้ คือ ละลายน้ำได้ดี และเกิดเจลได้ (Matarasso, 2004) ทำให้สารชนิดนี้มีความสามารถหลากหลาย เช่น เป็นสารหล่อลื่นบริเวณข้อต่อต่างๆ ภายในร่างกาย ควบคุมความชื้นในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ด้วยสมบัติเหล่านี้ จึงมีการนำกรดไฮยาลูโรนิกมาประยุกต์ใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์ทางการแพทย์ เช่น ช่วยรักษาโรคไขข้ออักเสบ โรคข้อเสื่อม (Kogan *et al*., 2007; Almond, 2007) และใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว (Matarasso, 2004) วิธีการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกที่มีการศึกษา และพัฒนาจากอดีตจนถึงปัจจุบัน พบว่ามีขั้นตอน และสารที่ใช้สกัดแตกต่างกันอยู่บ้าง แต่ส่วนมากจะใช้น้ำในการสกัด และใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีน เพื่อให้ปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิกออกมาจากเนื้อเยื่อที่ต้องการได้มากขึ้น นอกจากนั้นยังมีปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ในการสกัด เพศของสัตว์ อายุ เป็นต้น ที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพ และผลของการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ (Arbor Acres และ Ross) และเพศของไก่ ที่มีผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในหงอนไก่ ซึ่งแต่เดิมในกระบวนการสกัดจะใช้เอนไซม์โปรติเอสที่เป็นเอนไซม์ทางการค้า ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง จึงมีแนวคิดที่จะปรับเปลี่ยนชนิดของเอนไซม์ที่นำมาย่อยโปรตีนในหงอนไก่ด้วย โดยทำการสกัดเอนไซม์จากเศษเหลืออีกส่วนหนึ่งของอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์ปีก นั่นคือ ไส้และตับอ่อนของไก่ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่เป็นแหล่งสำคัญของเอนไซม์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์โปรติเอส (Jamdar and Harikumar, 2005) แล้วนำมาใช้ย่อยโปรตีนในเนื้อเยื่อของหงอนเพื่อปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิก และเปรียบเทียบผลกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า โดยเปรียบเทียบเชิงปริมาณ และทำการเปรียบเทียบเชิงการพิสูจน์เอกลักษณ์ กับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

1.1 เพื่อสำรวจและเก็บข้อมูลโดยประมาณของปริมาณหงอนไก่

1.2 ศึกษาปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ไก่ และเพศที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในหงอนไก่

2. การสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่

2.1 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้

2.2 ศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรม และความคงตัวของเอนไซม์

3. เปรียบเทียบผลของการใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

3.1 เปรียบเทียบปริมาณผลได้ของกรดไฮยาลูโรนิก

3.2 เปรียบเทียบโดยการพิสูจน์เอกลักษณ์ ระหว่างกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ กับสารมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันมีการผลิตและแปรรูปไก่เนื้อ เพื่อการบริโภคภายในประเทศ และการส่งออกไปทั่วโลกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อุตสาหกรรมเนื้อไก่แปรรูปขยายตัวอย่างกว้างขวาง ผลจากการขยายตัวที่เพิ่มมากขึ้น ก่อให้เกิดเศษเหลือเป็นปริมาณมาก ได้แก่ หัว หงอน ขน ไส้ กระดูก และเลือด เป็นต้น โดยเศษเหลือเหล่านี้ส่วนมากจะขายรวมกันเพื่อเป็นอาหารสัตว์ ในราคาที่ต่ำ (Jamdar and Harikumar, 2005) ดังนั้นการศึกษาเพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือเหล่านี้ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ซึ่งพบการศึกษาที่น่าสนใจ ได้แก่ การสกัดแคลเซียมจากกระดูกไก่ (Sittikulwitit *et al*., 2004) การสกัดคอลลาเจนจากตีนไก่ (Liu *et al*., 2001; Cheng *et al*., 2009) การสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส เอ็น จากไส้ไก่ (Mane *et al*., 2010) และ การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก จากหงอนไก่ (Swann, 1968; Balazs, 1979; Nakano *et al*., 1994) เป็นต้น

หงอนเป็นเศษเหลือที่มีปริมาณมาก ที่มีศักยภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ โดยในประเทศไทยยังไม่พบการนำหงอนของไก่ไปศึกษา และไม่พบรายการอาหารที่ปรุงจากหงอน แต่มีรายงานว่าหงอนมีสารสำคัญ คือ กรดไฮยาลูโรนิก (Hyaluronic acid: HA) ซึ่งเป็นสารที่มีราคาแพง และมีประโยชน์ทางการแพทย์อย่างมาก

หงอนไก่

1. ลักษณะของหงอน

หงอนไก่ (comb) เป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่พัฒนาเปลี่ยนแปลงมาจากผิวหนังชั้นบน (epidermis) โดยเป็นส่วนเนื้อเยื่อลำดับที่สองที่บ่งบอกถึงเพศ (secondary sexual characters) (Rice *et al.*, 1946) หงอนเป็นส่วนที่มีเส้นเลือดแดงและเส้นเลือดดำฝอยมาเลี้ยงมากมาย ทำให้เห็นเป็นสีแดง โดยทั่วไปแล้วมีรูปร่างคล้ายพระจันทร์ครึ่งเสี้ยว ขนาดและรูปร่างจะแตกต่างกันตามเพศ พันธุ์ อายุ และอิทธิพลของฮอร์โมน เป็นต้น (วิโรจน์, 2537)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 1 ลักษณะของหงอนไก่

ที่มา: Anonymous (n.d.); Anonymous (2008)

2. โครงสร้างของหงอนไก่

วิโรจน์ (2537); Hult (1949) and Hodges (1974) อธิบายถึงโครงสร้างของหงอนไก่ โดยแบ่งออกเป็น 3 ชั้น คือ

2.1 ชั้นในสุด (central layer หรือ core)

ประกอบด้วยมัดของคอลลาเจนไฟเบอร์ (collagen fibers) ที่หยาบ ซึ่งยึดติดอยู่กับเยื่อหุ้มกระดูกของกะโหลกศีรษะ ไปจนถึงปลายของหงอน ไฟเบอร์บางเส้นจะเชื่อมกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชั้นกลาง (intermediate layer) ทางด้านข้าง บริเวณนี้จะมีการเชื่อมประสานกันระหว่างเส้นเลือดแดงและดำ ในสัตว์ปีกที่ร่างกายแข็งแรง ส่วนชั้นในสุดจะมีไขมันอยู่มาก โดยเฉพาะที่ฐานของหงอน

2.2 ชั้นกลาง (intermediate layer)

ลักษณะของโครงสร้างอยู่กันอย่างหลวมๆ มากกว่าชั้นในสุด ส่วนมากประกอบไปด้วยเรติคูลาร์ไฟเบอร์ (reticular fibers) โดยมีคอลลาจีนัส (collagenous) และอิลาสติกไฟเบอร์ (elastic fibers) แทรกอยู่บ้าง ส่วนเซลล์ที่ไม่พบในชั้นนี้ คือเซลล์ไขมัน เซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของชั้นนี้มีขนาดใหญ่ ระหว่างเส้นใยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีสารที่มีลักษณะเป็นเมือกคล้ายวุ้น จึงเรียกชั้นนี้ว่า ชั้นมิวโคอิลาสติก (muco-elastic layer) (ภาพที่ 2) สารที่เป็นเมือกคล้ายวุ้นนี้เป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารประกอบเฮกโซซามีน (hexosamine) มีคุณสมบัติในการสร้างพันธะกับน้ำ (water-binding property) ได้ดี นั่นคือ กรดไฮยาลูโรนิก (hyaluronic acid) (Szirmai, 1956)

2.3 ชั้นนอก (peripheral layer)

มีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อัดตัวกันแน่น ประกอบ ด้วยคอลลาเจน และอิลาสติก ไฟเบอร์ แต่มีเรติคูลาร์ไฟเบอร์อยู่น้อย โดยมีแขนงเส้นเลือดฝอยแทรก มีลักษณะเป็นร่างแห ซึ่งมีการเจริญดี เมื่อมีเลือดมาคั่งทำให้มองเห็นหงอนเป็นสีแดงสดใส

ภาพที่ 2 ภาพตัดขวางของโครงสร้างภายในของหงอนไก่ (บริเวณสีดำ คือชั้นของมิวโคอิลาสติก ที่มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบ)

ที่มา: Balazs (2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

1. หน้าที่ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

ทำหน้าที่ช่วยรักษาโครงสร้าง และเป็นตัวกลางในการแลกเปลี่ยนสาร ได้แก่ สารอาหาร ของเสียต่างๆ และออกซิเจน ระหว่างเลือดและเซลล์ ช่วยป้องกันและปกป้องร่างกาย เช่น การสร้างแอนติบอดี้เพื่อต่อต้านกับแอนติเจน และยังเป็นแหล่งในการเก็บสะสมไขมันด้วย (Gartner and Hiatt, 2001)

2. องค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

เนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีองค์ประกอบหลัก 2 ส่วน (Young and Health, 2000) คือ

2.1 เซลล์ (cells)

แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ตามหน้าที่พื้นฐานของเซลล์นั้น

2.1.1 เซลล์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ และซ่อมแซม extracellular material เรียกว่า ไฟโบร บลาสต์ (fibroblasts)

2.1.2 เซลล์ที่ทำหน้าที่เก็บสะสมพลังงานในรูปไขมันและเผาผลาญไขมัน เรียกว่า อะดิโพไซต์ (adipocytes)

2.1.3 เซลล์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ mast cells และเซลล์เม็ดเลือดขาว (white blood cells)

2.2 เอกซ์ตราเซลลูลาร์ เมทริกซ์ (extracellular matrix)

เป็นส่วนสำคัญที่มีอิทธิพลต่อคุณสมบัติเชิงกายภาพของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแต่ละชนิด โดยประกอบด้วยเมทริกซ์ของ organic material เรียกว่า กราวนด์ ซับสแตนซ์ (ground substance) และไฟเบอร์ (fiber)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.1 กราวนด์ ซับสแตนซ์ (ground substance)

เป็นสารที่มีรูปร่างไม่แน่นอน โปร่งใส และมีคุณสมบัติเป็นสารกึ่งของเหลว (semi-fluid gel) ประกอบด้วยไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans: GAGs) โปรติโอไกลแคน (proteoglycans) และไกลโคโปรตีน (glycoproteins)

2.2.2 ไฟเบอร์ (fiber)

แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ คอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นโปรตีนหลักในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และอิลาสติน (elastin) เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญ มีคุณสมบัติในการยืดและหดตัว ช่วยเพิ่มความยืดหยุ่น

ไกลโคซามิโนไกลแคน

1. องค์ประกอบของไกลโคซามิโนไกลแคน

ไกลโคซามิโนไกลแคน (glycosaminoglycans: GAGs) มีชื่อเดิม คือมิวโคพอลิแซคคาไรด์ (mucopolysaccharide) เป็นพอลิแซคคาไรด์สายยาว ไม่มีกิ่ง ซึ่งเกิดจากการเชื่อมกันของหน่วยซ้ำของไดแซคคาไรด์ ซึ่งต้องเป็นหน่วยซ้ำของการเชื่อมกัน ระหว่างน้ำตาลอะมิโน (amino sugar) และกรดยูโรนิก (uronic acid) (Gartner and Hiatt, 2001) ได้แก่

1.1 น้ำตาลอะมิโน

ได้แก่ เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน (N-acetyl glucosamine) หรือ เอ็น-อะซิติล กาแล็กโตซามีน (N-acetyl galactosamine)

1.2 กรดยูโรนิก

ได้แก่ กรดไอดูโรนิก (iduronic acid) หรือ กรดกลูคิวโรนิก (glucuronic acid)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไกลโคซามิโนไกลแคนเป็นกรดที่มีประจุลบอยู่บนโมเลกุลซึ่งเป็นผลมาจากหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) หมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และหมู่ซัลเฟต (sulfate group) บนหน่วยของไดแซคคาไรด์ (Young and Health, 2000) ซึ่งเป็นผลให้มีความสามารถในการสร้างพันธะกับน้ำได้ดี

2. ประเภทของไกลโคซามิโนไกลแคน

ไกลโคซามิโนไกลแคนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม แสดงดังตารางที่ 1

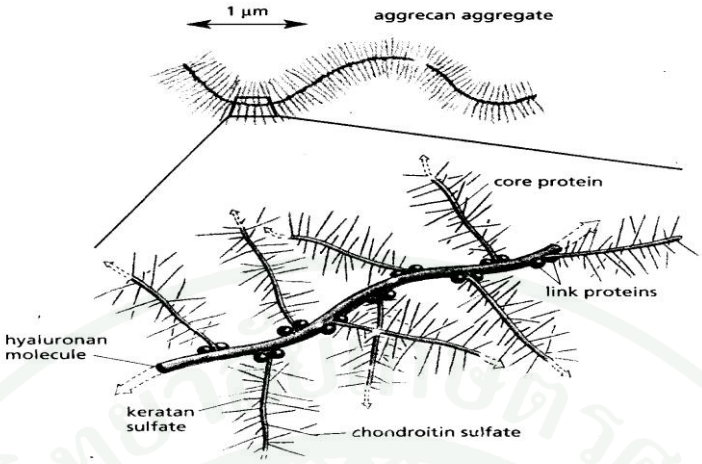
2.1 กลุ่มที่ไม่มีซัลเฟต (non-sulfated group)

กรดไฮยาลูโรนิก ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของไดแซคคาไรด์มากกว่า 25,000 หน่วย ซึ่งจับกับโมเลกุลโปรตีนด้วยโปรตีนเชื่อมต่อ (link proteins) (Kakehi *et al*., 2003; Kogan *et al.* 2007) ดังภาพที่ 3

2.2 กลุ่มที่มีซัลเฟต (sulfated group)

ประกอบด้วยหน่วยซ้ำของไดแซคคาไรด์น้อยกว่า 300 หน่วย ได้แก่ เคอร์ราแตนซัลเฟต (keratin sulfate) เฮพพาแรน ซัลเฟต (heparan sulfate) เฮพพาริน (heparin) คอนดรอยติน 4-ซัลเฟต (chondroitin 4-sulfate) คอนดรอยติน 6-ซัลเฟต (chondroitin 6-sulfate) และ เดอร์มาแตนซัลเฟต (dermatan sulfate) โดยไกลโคซามิโนไกลแคน ในกลุ่มนี้จะจับกับแกนโปรตีน (core protein) ด้วยพันธะโควาเลนท์ ในการสร้างโปรติโอไกลแคน ดังภาพที่ 3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 3 ลักษณะโครงสร้างของไกลโคซามิโนไกลแคน

ที่มา: Alberts *et al.* (2002)

Nakano and Sim (1989) ศึกษาลักษณะของไกลโคซามิโนไกลแคนที่แยกได้จากหงอนและเหนียงของไก่ โดยใช้เฉพาะไก่เพศผู้ พันธุ์ White leghorn อายุ 52 สัปดาห์ ซึ่งสกัดไกลโคซามิโนไกลแคน ด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) และวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate electrophoresis) พบว่าในหงอนไก่มีปริมาณกรดยูโรนิก มากกว่าในเหนียงประมาณ 2 เท่า และในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดนี้ มีกรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารไกลโคซามิโนไกลแคนหลัก และมีเดอร์มาแตน ซัลเฟต ปนอยู่เล็กน้อย โดยเมื่อดูจาก electrophoresis profile จะเห็นว่ามีสัดส่วนของกรดไฮยาลูโรนิก ประมาณ 92 เปอร์เซ็นต์

Nakano and Sim (1991) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไกลโคซามิโนไกลแคน ที่สกัดจากหงอนและเหนียงของไก่เพศผู้ สายพันธุ์ White leghorn โดยใช้โครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) พบว่า ในหงอนไก่มีความเข้มข้นของไกลโคซามิโนไกลแคน สูงกว่าในเหนียง แต่ในเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิด มีสัดส่วนของกรดไฮยาลูโรนิก กับไกลโคซามิโนไกลแคนที่มีหมู่ซัลเฟต ใกล้เคียงกัน และมีเดอร์มาแตน ซัลเฟต เป็นตัวหลักในส่วนของไกลโคซามิโนไกลแคนที่มีหมู่ซัลเฟต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ประเภทของไกลโคซามิโนไกลแคน

Glycosaminoglycans	Molecular mass (Da)	Repeating disaccharides	Sulfated amino sugar	Covalent linkage	Location in body
Hyaluronic Acid	10^7-10^8	Glucuronate and *N*-acetylglucosamine	None	No	synovial fluid, cartilage, dermis
Keratan sulfate	10,000-30,000	Galactose and *N*-acetylglucosamine	*N*-Acetylglucosamine	Yes	cartilage, cornea, intervertebral disk
Heparan sulfate	15,000-20,000	Glucuronate (or iduronate) and *N*-acetylgalactosamine	*N*-Acetylgalactosamine	Yes	blood vessels, lung, basal lamina
Heparin	15,000-20,000	Glucuronate (or iduronate) and *N*-acetylglucosamine	*N*-Acetylglucosamine	No	mast cell granule, liver, lung, skin
Chondroitin 4-sulfate	10,000-30,000	Glucuronate and *N*-acetylgalactosamine	*N*-Acetylgalactosamine	Yes	cartilage, bone, cornea, blood vessels
Chondroitin 6-sulfate	10,000-30,000	Glucuronate and *N*-acetylgalactosamine	*N*-Acetylgalactosamine	Yes	cartilage, Wharton's jelly, blood vessels
Dermatan	10,000-30,000	Glucuronate (or iduronate) and *N*- acetylgatosamine	*N*-Acetylgalactosamine	Yes	heart valves, skin, blood vessels

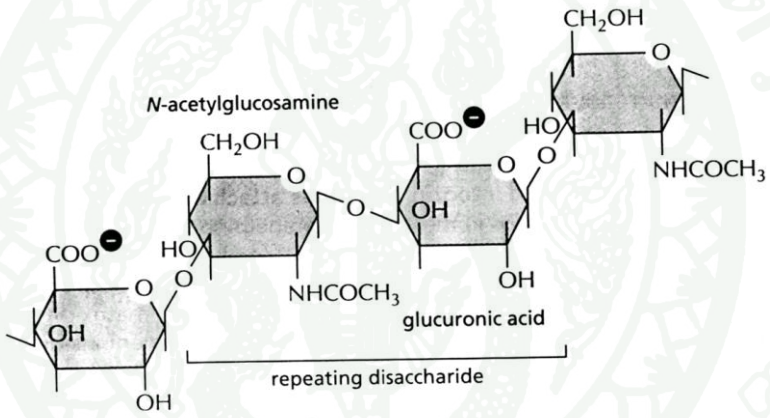
ที่มา: Gartner and Hiatt (2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดไฮยาลูโรนิก

1. องค์ประกอบของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิก เป็นไกลโคซามิโนไกลแคนที่พบในส่วนเอกซ์ตราเซลลูลาร์ เมทริกซ์ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 10^7-10^8 ดาลตัน (Gartner and Hiatt, 2001) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยซ้ำกันของไดแซคคาไรด์เป็นสายยาวระหว่าง เอ็น-อะซิติล กลูโคซามีน และดี-กลูคิวโรนิกแอซิด ในสัดส่วนโมเลกุลที่เท่ากัน (Schiller, 1966) โดยเชื่อมกันด้วยพันธะ β (1-4) และ β (1-3) ตามลำดับ (Laurent and Fraser, 1992; Laurent *et al*., 1995, 1996; Alberts *et al*., 2002; Kakehi *et al*., 2003) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา: Alberts *et al*. (2002)

Meyer and Palmer (1934) ศึกษาการแยกสารชนิดหนึ่งจากของเหลวในโพรงลูกตาของวัว ซึ่งพบว่า สารชนิดนั้นประกอบด้วยหน่วยซ้ำกันของน้ำตาล 2 โมเลกุล หรือไดแซคคาไรด์ ที่หนึ่งในนั้นคือ กรดยูโรนิก และเรียกสารชนิดนี้ว่า กรดไฮยาลูโรนิก

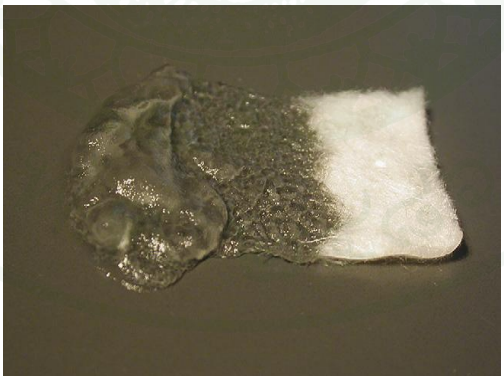
ในร่างกายจะพบกรดไฮยาลูโรนิกในรูปของเกลือ หรือไฮยาลูโรเนต (hyaluronate) (Necas *et al*., 2008) แต่สารชนิดนี้จะมีปริมาณลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Matarasso, 2004; Tezel and Fredrickson, 2008) กรดไฮยาลูโรนิกยังพบในปริมาณมากในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดอ่อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(soft connective tissue) ได้แก่ สายสะดือ (umbilical cord), น้ำไขข้อ (synovial fluid), ผิวหนัง (skin) และของเหลวคล้ายวุ้นในโพรงลูกตา (vitreous body) นอกจากนั้นยังพบกรดชนิดนี้ในหงอนไก่อีกด้วย (Fraser *et al*., 1997; Kakehi *et al*., 2003; Kogan *et al*., 2007; Price *et al*., 2007; Rosa *et al*., 2007; Necas *et al*., 2008)

2. คุณสมบัติเชิงหน้าที่ของกรดไฮยาลูโรนิก

กรดไฮยาลูโรนิกมีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี และเกิดเป็นเจล ดังภาพที่ 5 ทำหน้าที่เป็นสารหล่อลื่น (lubricant) ในการเคลื่อนที่ของส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น ข้อต่อ กล้ามเนื้อ (Laurent *et al*., 1996; Price *et al*., 2007) กรดชนิดนี้จะมีคุณสมบัติที่มีทั้งความหนืดและความยืดหยุ่นรวมอยู่ด้วยกัน (viscoelastic) มีความสามารถในการเข้ากันได้กับร่างกายของสิ่งมีชีวิต (biocompatibility) และไม่ก่อให้เกิดอาการแพ้ (non-immunogenicity) จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ได้ เช่น นำมาใช้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคข้ออักเสบ เพื่อเพิ่มความสามารถในการหล่อลื่นบริเวณข้อต่อ สามารถทำหน้าที่เป็นสารตัวพาในการนำยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery agent) (Necas *et al*., 2008) นอกจากนั้นยังใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง เพื่อเพิ่มความชุ่มชื้นให้แก่ผิว และช่วยลบเลือนริ้วรอย (Matarasso, 2004; Price *et al*., 2007; Necas *et al*., 2008; Tezel and Fredrickson, 2008)



ภาพที่ 5 ลักษณะการเกิดเจลของกรดไฮยาลูโรนิก

ที่มา: Price *et al*. (2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การสกัดและวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก

เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ที่ละลายน้ำได้ดี และเชื่อมอยู่กับโปรตีนเชื่อมต่อ ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Kakehi *et al*., 2003; Kogan *et al.* 2007) วิธีการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกโดยส่วนมากจึงสกัดด้วยน้ำ และใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีน เพื่อให้กรดไฮยาลูโรนิกถูกปลดปล่อยออกมาได้มากขึ้น นอกจากนั้นยังมีการใช้เทคนิคต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ลักษณะของกรดไฮยาลูโรนิกในแง่มุมต่างๆ เพื่อเป็นการยืนยันสารที่สกัดได้ หรือเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างถูกต้อง และปลอดภัย ดังงานวิจัยต่อไปนี้

Swann (1968) ศึกษาการเตรียมและสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนของไก่พันธุ์ White Leghorn และ Rhode Island White โดยทำการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก ด้วยวิธีการสกัดอย่างต่อเนื่อง แยกออกเป็น 4 Fractions โดยสกัด Fraction 1 ด้วยน้ำกลั่น Fraction 2 ได้จากการนำตะกอนในส่วนแรกหลังจากการเหวี่ยงแยกมาบด และสกัดด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำตะกอนจาก Fraction 2 หลังจากการเหวี่ยงแยกมาสกัดด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ได้เป็น Fraction 3 ส่วน Fraction สุดท้ายได้จากการนำตะกอนจาก Fraction 3 ละลายในทริส บัฟเฟอร์ และย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โพรเนส (pronase) พบว่า Fraction 2 ที่มีการบด และใช้น้ำกลั่นในการสกัด ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด ส่วนการใช้สารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และเอนไซม์โพรเนสเป็นการช่วยสกัดกรดไฮยาลูโรนิกที่ยังเหลืออยู่ในหงอนไก่ออกมาได้มากขึ้น ซึ่งเปอร์เซ็นต์ผลได้ของกรดไฮยาลูโรนิกทั้งหมดที่สกัดได้คือ 6 เปอร์เซ็นต์ ของหงอนไก่แห้ง

Balazs (1979) ได้จดสิทธิบัตรการสกัด และการทำบริสุทธิ์กรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนโดยใช้ไก่อายุ 6 เดือน ถึง 3 ปี และเลือกพันธุ์ที่มีหงอนขนาดใหญ่ โดยทำการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกด้วยน้ำและคลอโรฟอร์ม และมีการใช้เอนไซม์ดีเอนเอส (DNase) เอนไซม์อาร์เอนเอส (RNase) เพื่อกำจัด DNA และ RNA และใช้เอนไซม์โพรเนส (pronase) ในการช่วยย่อยโปรตีน หลังจากนั้นผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซิติลไพริดิเนียม คลอไรด์ สเตอริไลส์อะซิโตน และสเตอริไลส์บัฟเฟอร์ พบว่าได้กรดไฮยาลูโรนิกที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.5×10^6 ดาลตัน และมีความบริสุทธิ์สูง สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mizuno *et al*. (1991) ศึกษาการแยก และสมบัติของกรดไฮยาลูโรนิก จากลูกตาปลาทูน่า โดยย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์แอกติเนส อี (Actinase E) ในบัฟเฟอร์พีเอช 7.8 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สารที่สกัดได้สามารถยืนยันได้ว่าเป็นกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase) และสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิก มีขนาดโมเลกุล 5.6 x 10^5 ดาลตัน

Nakano *et al*. (1994) ศึกษาวิธีวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในหงอน และเหนียงของไก่พันธุ์ White leghorn อายุ 52 สัปดาห์ โดยการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และใช้เอนไซม์ปาเปน (papain) ในการช่วยย่อยโปรตีน ซึ่งได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 40 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง และใช้อิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท ในการวิเคราะห์เพื่อดูลักษณะการเคลื่อนที่ของสารสกัด โดยเทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย สะดวกในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัด และได้ผลวิเคราะห์ภายใน 1 วัน

Lago *et al.* (2005) ศึกษาการแยก การทำให้บริสุทธิ์ และลักษณะของกรดไฮยาลูโรนิกจากสายสะดือคน สำหรับขั้นตอนของการแยกกรดไฮยาลูโรนิก หลายขั้นตอนดัดแปลงจากวิธีของ Balazs (1979) โดย Lago และคณะกล่าวว่า การใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ในการแยกกรดไฮยาลูโรนิก และการกำจัดกรดนิวคลิอิก และนิวคลิโอไทด์ ด้วยเอทธานอล ความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนหน้านี้ ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีใหม่ที่เหมาะในการแยกกรดไฮยาลูโรนิก จากสายสะดือ เพราะเมื่อนำกรดไฮยาลูโรนิก ไปศึกษาดูองค์ประกอบ และลักษณะต่างๆ ด้วยวิธีทางเคมี พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้มีลักษณะใกล้เคียงกับสารมาตรฐาน

Rosa *et al*. (2007) ศึกษาการสกัด การวิเคราะห์ปริมาณ และการหาน้ำหนักโมเลกุลของกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ โดยใช้ไก่อายุ 48 วัน สัดส่วนตัวผู้ต่อตัวเมียเป็น 50 ต่อ 50 ซึ่งสกัดด้วย digestion buffer และย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ปาเปน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตกตะกอนกรดไฮยาลูโรนิก ด้วยซิติลไพริดิเนียม คลอไรด์ พบว่ากรดไฮยาลูโรนิกมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.27 x 10^6 ดาลตัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก

ปัจจุบันวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิก มีหลายวิธี สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

4.1 วิธีอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis method)

ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate electrophoresis) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรด (acidic polysaccharides) ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิก เฮพาริน เป็นต้น โดยมีขีดจำกัดในการวิเคราะห์ถึงระดับนาโนกรัม (Szewczyk, 1983; Volpi and Maccari, 2006) เป็นวิธีที่ง่าย และวิเคราะห์ได้หลายตัวอย่างพร้อมกัน (Wegrowski and Maquart, 2001; Kakehi *et al*., 2003) โดยใช้เวลาสั้นเพียง 1 วัน (Gaál *et al*., 1980; Nakano *et al*., 1994)

Szewczyk (1983) ได้มีการนำเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท มาใช้ในการตรวจสอบพอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรด

Nakano *et al*. (1994) ใช้เทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ เทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก

Matsuno *et al.* (2008) ได้มีการนำเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท มาใช้ในการศึกษาผลของความคงทนของกรดไฮยาลูโรนิกทางการค้าที่สกัดมาจากแหล่งต่างๆ ต่อการย่อยของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อการนำกรดไฮยาลูโรนิกไปใช้ประโยชน์ทั้งทางการแพทย์ และในอุตสาหกรรมต่อไป

4.2 วิธีทางสเปกโตรโฟโตเมทรี (Spectrophotometry method)

ใช้วิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี (Fourier transform infrared spectroscopy: FT-IR) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการจำแนก และหาหมู่ฟังก์ชันของสารอินทรีย์ เช่น โมโนแซคคาไรด์ โฮโมพอลิแซคคาไรด์ ไกลโคซามิโนไกลแคน และกรดอะมิโน (Longas *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Servaty *et al.* (2001) ศึกษาสมบัติการจับน้ำของกรดไฮยาลูโรนิก และคอนดรอยติน ซัลเฟต ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญในกระดูกอ่อน โดยใช้ FT-IR เทคนิค ATR (Attenuated Total Reflectance)

Alkrad *et al.* (2003) นำ FT-IR และเทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมทรีอื่นๆ ได้แก่ NMR, Raman และ UV-Vis มาใช้ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของกรดไฮยาลูโรนิก หลังจากผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส

Haxaire *et al.* (2003) ได้นำ FT-IR มาใช้ในการศึกษาสมบัติการจับกับน้ำของกรดไฮยาลูโรนิก และดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง โดยเปรียบเทียบจาก spectra ที่เกิดขึ้น

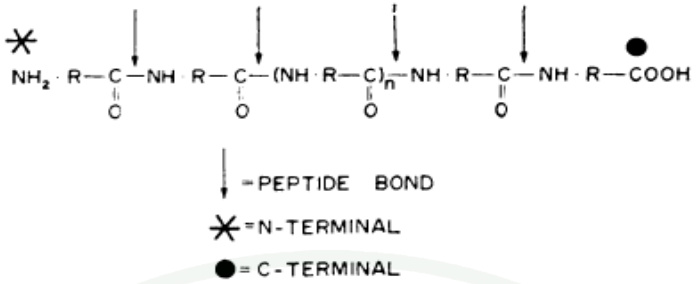
เอนไซม์

เอนไซม์ คือโปรตีนที่มีความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมี (biochemical reaction) หรือเรียกว่า ตัวเร่งทางชีวภาพ (biological catalysts) ผลิตขึ้นจากภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (Sobti, 2008) สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ด้วยปริมาณเอนไซม์เพียงระดับไมโครโมลาร์ นอกจากนั้นเอนไซม์ยังมีความจำเพาะต่อสารตั้งต้น (substrate) และเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ยังคงสภาพเดิม ไม่เปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์อื่น (ปราณี, 2547)

1. เอนไซม์โปรติเอส

เอนไซม์โปรติเอส (proteases) มีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรติเนส (proteinase) เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolase) และเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) (ปราณี, 2547) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนให้กลายเป็นกรดอะมิโน มีลักษณะปฏิกิริยา คือ สลายพันธะเปปไทด์ (peptide bond : -CO-NH-) ภายในสายโปรตีนด้วยน้ำ (hydrolysis) (ภาพที่ 6) โปรติเอสเป็นเอนไซม์ประเภทหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น ใช้เปลี่ยนแปลงเนื้อสัมผัสของเนื้อให้นิ่มลง ใช้ลดการเกิดความขุ่นของเบียร์หลังจากผ่านการแช่เย็น ใช้เอนไซม์เรนนินในกระบวนการผลิตเนยแข็ง เป็นต้น (Walsh, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 โครงสร้างของสายโปรตีนที่เชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์

ที่มา: Beck (1973)

2. ชนิดของเอนไซม์โปรติเอส

2.1 แบ่งตามลักษณะการย่อยพันธะเปปไทด์

การย่อยพันธะเปปไทด์ บนสายโปรตีน ของเอนไซม์โปรติเอส มี 2 ลักษณะ (เพทาย, 2538; ปราณี, 2547; Whitaker, 1994; Sobti, 2008) คือ

2.1.1 เอกโซเปปติเดส (exopeptidases)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายด้านใดด้านหนึ่งของโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidases) เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidases) เอนไซม์ไดเปปติเดส (dipeptidases) และเอนไซม์ไตรเปปติเดส (tripeptidases)

2.1.2 เอนโดเปปติเดส (endopeptidases)

เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระ ภายในสายโปรตีน เช่น เอนไซม์เปปซิน (pepsin) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) เอนไซม์ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เอนไซม์ปาเปน (papain) เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 แบ่งตามลักษณะกลไกการทำงาน

เอนไซม์โปรติเอสแต่ละชนิดมีลักษณะกลไกการทำงานแตกต่างกัน แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งชื่อของแต่ละกลุ่มบ่งบอกถึงหมู่ที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ (Whitaker, 1994; Walsh, 2002) ได้แก่

2.2.1 โปรติเอสซีรีน (serine proteases)

มีอนุมูลซีริล (seryl residue) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และสามารถถูกยับยั้งได้โดย DPF (diisopropyl-phospho-fluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ของอนุมูลซีริล เอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไคโมทริปซิน และเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานเป็นเบส ในช่วง 7-11 หรือเรียกว่า alkaline proteases

2.2.2 โปรติเอสซัลฟไฮดริล (sulfhydryl proteases)

มีอนุมูลซัลฟไฮดริล (sulfhydryl residue) ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ซึ่งถูกยับยั้งได้โดย sulfhydryl reagents หรือ sulfhydryl group (-SH) เอนไซม์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่สกัดได้จากพืชชั้นสูง ได้แก่ เอนไซม์ปาเปน จากยางมะละกอ เอนไซม์โบรมิเลน จากสับปะรด เป็นต้น โดยมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมเป็นกลาง คือ 6-7.5 หรือเรียกว่า neutral proteases และมีความคงตัวสูงในช่วงอุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส ที่พีเอชเป็นกลาง โดยเอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร

2.2.3 โปรติเอสที่มีโลหะ (metal-containing proteases)

มีไอออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ ซึ่งถูกยับยั้งได้โดยสารจับไอออนของโลหะ (metal-chelating agents) เช่น Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 1,10-phenanthroline เป็นต้น เอนไซม์ที่สำคัญในกลุ่มนี้ คือ เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส มีช่วงพีเอชที่เหมาะสม คือ 6.5-7.5 หรือ neutral proteases

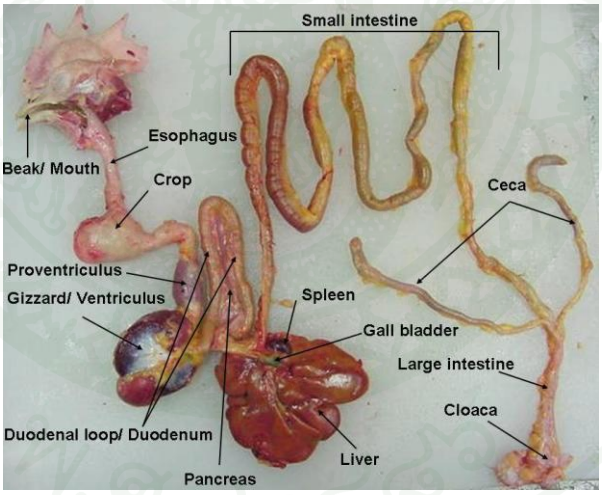
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.4 โปรติเอสแอสปาติก (aspartic proteases)

มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl groups) ของอนุมูลกรดแอสปาติก (aspartic acid) อยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์ที่มีบทบาทในกลุ่มนี้ ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์เรนนิน โดยมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมเป็นกรด คือ 1-2 หรือเรียกว่า acid proteases

3. เอนไซม์โปรติเอสในระบบการย่อยอาหารของไก่

ระบบย่อยอาหาร เป็นระบบสำคัญในการเปลี่ยนอาหารที่กินเข้าไปให้กลายเป็นสารอาหารที่ร่างกายสามารถนำไปใช้ประโยชน์คือ เพิ่มการเจริญเติบโต ซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และสร้างผลผลิต เช่น ไข่ไก่ ซึ่งกระบวนการย่อยอาหารของไก่จะเริ่มจากปาก (mouth) หลอดอาหาร (esophagus) กระเพาะพัก (crop) กระเพาะแท้ (proventriculus) กระเพาะบด (gizzard) ลำไส้เล็ก (small intestine) ลำไส้ใหญ่ (large intestine) และจบที่ส่วนปลายสุดของลำไส้ (cloaca) ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 ระบบการย่อยอาหารของไก่

ที่มา: Jacob and Pescatore (n.d.)

กระบวนการที่สามารถเปลี่ยนอาหารให้กลายเป็นสารอาหารที่ร่างกายต้องการนั้น เกิดขึ้นได้จาก 2 กระบวนการ (Jacob and Pescatore, n.d.) คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 กระบวนการทางกล (mechanical action)

โดยทั่วไป คือการเคี้ยวอาหาร แต่เนื่องจากในปากของไก่ไม่มีฟัน จึงไม่สามารถเคี้ยวอาหารได้ แต่ในปากจะมีตุ่มที่หลั่งน้ำลาย (saliva) ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ ทำให้เกิดการย่อยอาหารตั้งแต่บริเวณนี้ และไก่มีกระเพาะบด (gizzard) ทำหน้าที่ในการบด เพื่อลดขนาดอาหาร

3.2 กระบวนการทางเคมี (chemical action)

คือการย่อยอาหารด้วยเอนไซม์ (ตารางที่ 2)โดยเฉพาะการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่หลั่งออกมาจากส่วนต่างๆ ของร่างกาย (Sturkie, 1976; Whitaker, 1994) ได้แก่

3.2.1 กระเพาะอาหาร (proventriculus)

หลั่งเอนไซม์เปปซิน และกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เพื่อย่อยโปรตีนให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง โดยสภาวะการย่อยเป็นกรด พีเอชอยู่ในช่วง 1-2 เนื่องจากการย่อยโปรตีนในขั้นตอนนี้ยังไม่เสร็จสมบูรณ์ อาหารจะถูกส่งต่อไปยังลำไส้เล็กเพื่อถูกย่อยต่อไป

3.2.2 ตับอ่อน (pancreas)

หลั่งเอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์อิลาสเทส ไปยังลำไส้เล็ก โดยมีสภาวะการย่อยเป็นกลางถึงเบสอ่อน มีพีเอชใกล้ 8 ซึ่งในขั้นตอนนี้เอนไซม์เปปซินจะสูญเสียกิจกรรมไป เนื่องจากสภาวะที่เปลี่ยนจากกรดเป็นเบส

เนื่องจากกระบวนการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกส่วนมากจะใช้เอนไซม์ปาเปน ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า เพื่อย่อยโปรตีน และมีการใช้สภาวะที่เป็นกลางถึงเบส จึงเลือกสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่มาใช้ เพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิต นอกจากนั้นยังสามารถเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมด้วย เมื่อมีการสกัดเอนไซม์มาใช้ประโยชน์ สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึง คือ ปัจจัยทางกายภาพต่างๆ ที่ส่งผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์ เพื่อสามารถนำเอนไซม์ไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ปัจจัยที่ส่งผลต่อคุณสมบัติของเอนไซม์

ปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ (ปราณี, 2547; Godfrey and West, 1996; Sobti, 2008) ได้แก่

4.1 พีเอช (pH)

เป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ โดยมีผลต่อการแตกไอออน (ionization) ของหมู่ที่อยู่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ที่เป็นตัวควบคุมโครงรูปสามมิติ ซึ่งมีผลต่อการเบี่ยงเบนในการจับกับสารตั้งต้น ดังนั้น เมื่อพีเอชเกิดการเปลี่ยนแปลงไปอยู่ในช่วงที่ไม่เหมาะสม จึงส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง

นอกจากนั้น พีเอชยังส่งผลต่อความคงตัวของเอนไซม์ด้วย เนื่องจากผลของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตั้งแต่ระดับทุติยภูมิ (secondary structure) ของเอนไซม์ เช่น ใช้สภาวะที่เป็นกรดแก่หรือเบสแก่ ส่งผลให้เอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation)

ดังนั้นเอนไซม์แต่ละชนิดจึงมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์บางชนิดมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมเป็นกรด ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน (พีเอช 1-2) และถูกยับยั้งกิจกรรมทันทีที่พีเอช 7 ในขณะที่เอนไซม์ทริปซินมีช่วงพีเอชที่เหมาะสมเป็นเบส (พีเอช 7-11)

4.2 อุณหภูมิ (temperature)

เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม และความคงตัวของเอนไซม์ เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะช่วยเพิ่มพลังงานจลน์ให้กับสารที่ทำปฏิกิริยา เพื่อให้เปลี่ยนไปเป็นผลผลิตอย่างรวดเร็ว เพราะฉะนั้นการเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเกินกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดนั้นๆ ส่งผลให้เอนไซม์ถูกทำลายเนื่องจากเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์มีกิจกรรม และเสถียรภาพลดต่ำลง (Sobti, 2008)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นเอนไซม์จะมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ในสัตว์เลือดอุ่นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 40 องศาเซลเซียส แต่ในขณะที่ในสัตว์เลือดเย็นจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่ำกว่า

4.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น (substrate concentration)

มีผลต่ออัตราการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้นสูงขึ้นจนถึงจุดสูงสุด หลังจากนั้นอัตราการเกิดปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นอีก

4.4 ความเข้มข้นของเอนไซม์ (enzyme concentration)

อัตราการเกิดปฏิกิริยายังขึ้นกับความเข้มข้นของเอนไซม์ด้วย ในกรณีที่ภายในระบบมีสารตั้งต้นมากเกินพอ เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ ส่งผลให้การเปลี่ยนสารตั้งต้นให้เป็นผลิตภัณฑ์เร็วขึ้น แต่เมื่อสารตั้งต้นจับกับโมเลกุลของเอนไซม์จนหมด การเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์จะไม่ส่งผลต่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาอีก

จากการศึกษางานวิจัยที่ผ่านมามีการสกัด ทำบริสุทธิ์ และวิเคราะห์คุณสมบัติของเอนไซม์โปรติเอสจากอวัยวะภายในระบบการย่อยอาหารของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ไก่ ปลา เป็นต้น รวมถึงการนำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดปริมาณเศษเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรม และเพิ่มมูลค่าให้กับเศษเหลือด้วย

Alencar *et al*. (2003) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส ที่สกัดจากอวัยวะภายใน ได้แก่ ไส้ติ่ง (pyloric caeca) ไส้ (intestine) และตับ (liver) ของปลาเขตร้อน โดยสกัดเอนไซม์ด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่าสภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยอะโซเคซีน คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 7-9 และมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และเทคโนโลยีชีวภาพ

Bezerra *et al*. (2005) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์โปรติเอสในสภาวะที่เป็นเบสที่สกัดจากไส้ปลานิล ใช้สภาวะการสกัดเหมือนกับ Alencar *et al*. (2003) และมีวิธีทำให้บริสุทธิ์ 3 ขั้นตอน คือ ใช้ความร้อน ตกตะกอนด้วยสารละลายเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และกรองผ่านเจล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่มีรูพรุน (gel filtration) เอนไซม์ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ คือเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้าย ทริปซิน (trypsin-like enzyme) โดยสภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยอะโซเคซีน คือ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พีเอช 8 และสามารถคงตัวได้นาน 30 นาที

Souza *et al.* (2007) ศึกษาและพัฒนาวิธีการทำให้บริสุทธิ์ของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้าย ทริปซิน (trypsin-like enzyme) ที่สกัดได้จากไส้และไส้ติ่งของปลาแพะ (*Spotted goatfish*) โดยใช้วิธีสกัดและทำให้บริสุทธ์ เดียวกับ Bezerra *et al*. (2005) พบว่า สภาวะที่เอนไซม์มีประสิทธิภาพสูงสุดในการย่อยอะโซเคซีน คือ อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส พีเอช 9 หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เอนไซม์ที่สกัดได้จากไส้ติ่งมีการสูญเสียประสิทธิภาพของกิจกรรมของเอนไซม์ไป 10 เปอร์เซนต์

Mane *et al.* (2010) ศึกษาการทำบริสุทธิ์ และสมบัติของเอนไซม์อะมิโนเปปติเอส เอ็น (aminopeptidase N) ที่สกัดจากไส้ไก่โดยใช้น้ำกลั่น และเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟี พบว่า เอนไซม์มีพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ พีเอช 6 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นี้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการลดรสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสทได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 เอนไซม์ในระบบการย่อยอาหารของไก่

Organ and secretion	Enzyme	Substance acted upon	Intermediate or end product
Saliva	Amylase (ptyalin)	Starch	Maltose
Proventriculus (gastric juice)	Pepsin	Protein	Proteoses and peptones
Gizzard and extracts	Pepsin (from proventriculus)		
Pure intestinal juice or tissue	Amylase		
	Invertase		
	Trypsin	Proteoses, peptones and peptides	Amino acids
Pancreas; pancreatic juice	Amylase	-	
	Invertase	Sucrose	Simple sugars
	Trypsin	Intermediate N products	Amino acids
	Lipase	Fat	Fatty acids and glycerol
Bile	Amylase	-	-

ที่มา: Sturkie (1965)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 หงอนไก่ (chicken comb) ได้จากหัวของไก่จากไก่ 2 สายพันธุ์ คือ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด เครือเบทาโกร

1.2 เครื่องในไก่ทั้งพวง (internal organs) ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด เครือเบทาโกร

2. สารเคมี

2.1 สารเคมีในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหงอนไก่

2.1.1 คอบเปอร์ซัลเฟต (Copper(II) sulfate, $CuSO_4$: analytical grade: Fisher)

2.1.2 โปแตสเซียมซัลเฟต (Potassium sulfate, K_2SO_4: analytical grade: Merck)

2.1.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid, H_2SO_4: analytical grade: Merck)

2.1.4 กรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3: analytical grade: Merck)

2.1.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: analytical grade: Ajax)

2.1.6 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl: analytical grade: Ajax)

2.1.7 เมทธิลเรด (Methyl red, $C_{15}H_{15}N_3O_2$: analytical grade: Panreac)

2.1.8 โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol green, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$: analytical grade: Ajax)

2.1.9 ปิโตรเลียมอีเธอร์ (Petroleum ether, C_6H_{14}: analytical grade: Fisher)

2.2 สารเคมีในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

2.2.1 อะซิโตน (Acetone, C_3H_6O: analytical grade: Fisher)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.2 เอนไซม์ปาเปน (Papain, 2×crystallized, EC 3.4.22.2, 2.22 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน, ปริมาณโปรตีน 38.57 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอนไซม์ (ดัดแปลงจาก Cupp-Enyard, 2008): Sigma-Aldrich) (ภาคผนวก ค)

2.2.3 กรดเอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$: analytical grade: Ajax)

2.2.4 ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ (Cysteine hydrochloride, $C_3H_7NO_2S{\cdot}HCl$: analytical grade: Fisher)

2.2.5 โซเดียม เอไซด์ (Sodium azide, NaN_3: analytical grade: Ajax)

2.2.6 กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, $C_2HCl_3O_2$: analytical grade: Fisher)

2.2.7 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$: analytical grade: Ajax)

2.2.8 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Disodium hydrogen phosphate dihydrate, $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$: analytical grade: Ajax)

2.3 สารเคมีในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

2.3.1 คาร์บาโซล (Carbazole, $C_{12}H_9N$: analytical grade: Fluka)

2.3.2 โซเดียมเตตระบอเรต (Sodium tetraborate, $Na_2B_4O_7$: analytical grade: Ajax)

2.3.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น (Sulfuric acid, H_2SO_4: analytical grade: Merck)

2.3.4 เอทธานอลบริสุทธิ์ (Ethanol, C_2H_5OH: analytical grade: Merck)

2.3.5 ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน (D-Glucuronolactone, $C_6H_8O_6$: analytical grade: Fluka)

2.4 สารเคมีในการสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่

2.4.1 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride, NaCl: analytical grade: Merck,)

2.5 สารเคมีในการวิเคราะห์กิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

2.5.1 เคซีน (Casein: Fluka)

2.5.2 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, $NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$: analytical grade: Ajax)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5.3 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดไฮเดรต (Disodium hydrogenphosphate dihydrate, $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$: analytical grade: Ajax)

2.5.4 ไกลซีน (Glycine, $C_2H_5NO_2$: analytical grade: Usb)

2.5.5 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: analytical grade: Ajax)

2.5.6 กรดไตรคลอโรอะซิติก (Trichloroacetic acid, $C_2HCl_3O_2$: analytical grade: Fisher)

2.5.7 โซเดียมคาร์บอเนต (แอนไฮดรัส) (Sodium carbonate anhydrous, Na_2CO_3: analytical grade: Rankem)

2.5.8 โฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล (Folin&Ciocalteu's Phenol reagent): analytical grade: Sigma-Aldrich)

2.5.9 ไทโรซีน (Tyrosine, $C_9H_{11}NO_3$: analytical grade: Fluka)

2.6 สารเคมีในการตรวจหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

2.6.1 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3: commercial grade)

2.6.2 คอบเปอร์ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต (Copper sulfate pentahydrate, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$: analytical grade: Fisher)

2.6.3 โพแทสเซียม โซเดียม ทาร์เทรต (Potassium sodium tartrate, $KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$: analytical grade: Ajax)

2.6.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: analytical grade: Ajax)

2.6.5 โฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล (Folin&Ciocalteu's Phenol reagent): analytical grade: Sigma-Aldrich)

2.6.6 โบวายน์เซรั่มอัลบูมิน (Bovine serum albumin: Fluka)

2.7 สารเคมีในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท

2.7.1 ไพริดีน (Pyridine, C_5H_5N: analytical grade: Ajax)

2.7.2 กรดอะซิติก (Acetic acid, CH_3COOH: analytical grade: Merck)

2.7.3 โซเดียม เอไซด์ (Sodium azide, NaN_3: analytical grade: Ajax)

2.7.4 แอลเชี่ยนบลู 8 จี เอ็กซ์ (Alcian blue 8GX, $C_{56}H_{68}C_{l4}CuN_{16}S_4$: analytical grade: Sigma-Aldrich)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.7.5 สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ (Sodium salt from rooster comb: Sigma-Aldrich)

2.8 สารเคมีในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโคปี

2.8.1 เอทธานอลบริสุทธิ์ (Ethanol, C_2H_5OH: analytical grade: Merck)

2.8.2 สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ (Sodium salt from rooster comb: Sigma-Aldrich)

3. อุปกรณ์ และเครื่องมือ

3.1 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหงอนไก่

3.1.1 ภาชนะอลูมิเนียมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 เซ็นติเมตร พร้อมฝาปิด

3.1.2 โถแก้วดูดความชื้น

3.1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Plus, Ohaus)

3.1.4 ตู้อบลมร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Memmert)

3.1.5 หลอดย่อยโปรตีน

3.1.6 กระดาษกรอง เบอร์ 4 (Whatman)

3.1.7 glass bead

3.1.8 อุปกรณ์ที่ใช้ในการไตเตรท

3.1.9 เครื่องย่อยโปรตีน (Digestion Unit K-435, Buchi)

3.1.10 เครื่องกลั่นเพื่อวิเคราะห์โปรตีน (Distillation Unit B-324, Buchi)

3.1.11 เครื่องดักจับไอกรด (Scrubber B-414, Buchi)

3.1.12 thimbles

3.1.13 เครื่องวิเคราะห์ซอกเท็กซ์ (Soxtex System HT 1043 Extraction Unit, Tecator)

3.1.14 กระดาษกรองเบอร์ 41 (ashless) (Whatman)

3.1.15 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ

3.1.16 เตาเผาไฟที่ปรับและควบคุมอุณหภูมิได้ (Muffle Furnace size 3, Gallenkamp)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

3.2.1 เครื่องแก้ว

3.2.2 ถุงไดอะไลซิส (ขนาดของรูพรุน 6,000-8,000 ดาลตัน, Cellu Sep)

3.2.3 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Plus, Ohaus)

3.2.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)

3.2.5 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Rannin)

3.2.6 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (MSH basic, Yellowline)

3.3 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

3.3.1 เครื่องแก้ว

3.3.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)

3.3.3 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Rannin)

3.3.4 เครื่องผสมสาร (VX 100, Labnet)

3.3.5 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesis 10 series, Thermo)

3.4 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้และตับอ่อนของไก่

3.4.1 มีด

3.4.2 เขียงพลาสติก

3.4.3 ตะแกรงที่มีขนาดรูพรุน 40 เมช

3.4.4 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Precision Advanced, Ohaus)

3.4.5 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Analytical Plus, Ohaus)

3.4.6 เครื่องปั่นผสมอาหาร (HR2011/70, Philips)

3.4.7 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RC 6-Plus, Thermo Fisher)

3.4.8 เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (FD 2.5, Heto)

3.4.9 ตู้แช่แข็ง

3.5 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

3.5.1 เครื่องแก้ว

3.5.2 กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)

3.5.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Rannin)

3.5.5 เครื่องวัดพีเอช (pH-Vision 6071, Jenco)

3.5.6 เครื่องกวนแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (MSH basic, Yellowline)

3.5.7 เครื่องผสมสาร (VX 100, Labnet)

3.5.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesis 10 series, Thermo)

3.6 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการตรวจหาปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

3.6.1 เครื่องแก้ว

3.6.2 กระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman)

3.6.3 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Edelstahl, Post Frei และ BS-11, Lab Companion)

3.6.4 เครื่องดูดจ่ายสารละลายอัตโนมัติ (Rannin)

3.6.5 เครื่องวัดพีเอช (pH-Vision 6071, Jenco)

3.6.6 เครื่องกวนแบบควบคุมอุณหภูมิได้ (MSH basic, Yellowline)

3.6.7 เครื่องผสมสาร (VX 100, Labnet)

3.6.8 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genesis 10 series, Thermo)

3.7 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท

3.7.1 แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท (ขนาด 60 x 76 มิลลิเมตร, Titan III, Helena Laboratories)

3.7.2 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท (Titan Plus, Helena Laboratories)

3.7.3 ตู้อบลมร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิได้ (Memmert)

3.8 อุปกรณ์ และเครื่องมือในการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก ด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี

3.8.1 แผ่นแก้วแบเรียมฟลูออไรด์ (Barium Fluoride, BaF_2)

3.8.2 เครื่องเป่าลม

3.8.3 เครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ (Tensor 27, Bruker)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก จากหงอนของไก่

1.1 สำรวจและเก็บข้อมูลโดยประมาณของปริมาณหงอนไก่

โดยสอบถามข้อมูลกำลังการผลิตไก่เนื้อจาก บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด เครือเบทาโกร และสุ่มตัวอย่างหัวไก่จำนวน 20 หัว นำมาแยกส่วนหงอนและชั่งน้ำหนักทั้งหัวและหงอนเพื่อคำนวณสัดส่วนที่ต้องการ

1.2 ศึกษาปัจจัยของสายพันธุ์และเพศ ที่มีผลต่อองค์ประกอบทางเคมี และปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกในหงอน

1.2.1 การเตรียมตัวอย่างหงอน

เตรียมจากหัวไก่ 2 สายพันธุ์ คือ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม ทั้งเพศผู้และเพศเมีย นำมาตัดเอาเฉพาะส่วนหงอน และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนใช้จึงหั่นและสับหงอนเป็นชิ้นเล็ก เพื่อนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ส่วนตัวอย่างสำหรับการศึกษาการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก ทำโดยหั่นและสับหงอนเป็นชิ้นเล็ก จากนั้นแช่ในสารละลายอะซิโตนที่อุณหภูมิห้อง สัดส่วนหงอนไก่ 300 มิลลิกรัมต่อสารละลายอะซิโตน 3 มิลลิลิตร ซึ่งจะเปลี่ยนสารละลายอะซิโตนทุก 10 นาที ทำซ้ำแบบเดิม 3 ครั้ง แยกสารละลายอะซิโตนออก แล้วนำตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ (Nakano *et al*., 1994) จะได้หงอนแห้ง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

นำหงอนไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น เถ้า โปรตีน และไขมัน ตามวิธี AOAC (2000) ส่วนคาร์โบไฮเดรต ได้จากการหักลบจาก 100 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.2.3 การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

สกัดโดยใช้วิธีของ Nakano *et al*. (1994) โดยชั่งน้ำหนักหงอนแห้ง 150 มิลลิกรัม แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปน (ที่พีเอช 6.5, 65 องศาเซลเซียส มีกิจกรรม 2.22 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน) ในอัตราส่วน เอนไซม์ 4 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมหงอนแห้ง (เอนไซม์ปาเปน 1 ไมโครลิตร เท่ากับ 500 ไมโครกรัม) ซึ่งมีกิจกรรมเท่ากับ 0.1 ยูนิต ในสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.5 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วย 0.005 โมลาร์ กรดเอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (EDTA) 0.005 โมลาร์ซิสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ และ 0.02 เปอร์เซนต์ โซเดียมเอไซด์ ทำการย่อยที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการกำจัดโปรตีน โดยเติมกรดไตรคลอโรอะซิติก อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนมีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 7 เปอร์เซ็นต์ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ข้ามคืน นำมาเหวี่ยงแยกที่ความเร็วรอบ 7,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เพื่อกำจัดตะกอน แล้วนำส่วนใสไปทำไดอะไลซิส (ขนาดรูพรุน 6,000-8,000 ดาลตัน) ในน้ำไหล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และในน้ำกลั่นเย็นอีก 24 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก และยืนยันเอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ต่อไป

1.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

วิเคราะห์โดยวิธีคาร์บาโซล (Bitter and Muir, 1962) ในรูปกรดยูโรนิก โดยใช้ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน เป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ข)

2. การสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่

2.1 การเตรียมตัวอย่างไส้และตับอ่อน

นำเครื่องในไก่ทั้งพวงมาแยกเอาเฉพาะส่วนไส้และตับอ่อน แล้วล้างทำความสะอาดทั้งภายนอกและภายใน เพื่อกำจัดไขมันและเศษอาหารที่ค้างอยู่ภายในไส้ออก จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยแยกเก็บแต่ละพวง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 การสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Rathinaraj *et al*. (2010) โดยนำวัตถุดิบที่เตรียมไว้ มาหั่นและบด เป็นเวลา 3 นาที แล้วปั่นผสมกับน้ำกลั่นเย็น ในอัตราส่วน 1:1 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 10,000g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 ได้สารละลายเอนไซม์ นำไปทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง สุดท้ายร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 เมช ได้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ผง นำไปบรรจุถุงพลาสติก (PE) แล้วใส่ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ ปิดผนึกให้สนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ดัดแปลงจากวิธีการของ Cupp-Enyard (2008) โดยใช้สารละลายเคซีน ความเข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารตั้งต้น และใช้ไทโรซีนเป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ค) ซึ่ง 1 ยูนิต ของเอนไซม์ หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เปลี่ยนเคซีนให้เกิดเป็นไทโรซีน 1 ไมโครโมล ต่อนาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

2.4 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์โดยวิธี Lowry (Lowry *et al*., 1951) โดยใช้โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน เป็นสารมาตรฐาน (ภาคผนวก ค)

2.5 การศึกษาหาพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

2.5.1 การหาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ศึกษาที่พีเอช 6, 7, 7.5, 8 และ 9 โดยวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 10 นาที เริ่มจากการเตรียมสารละลายเคซีน ความเข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเอนไซม์ (เอนไซม์ผงแห้ง 1 มิลลิกรัม ในบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร) โดยในช่วงพีเอช 6-8 ใช้ 0.2 โมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และที่พีเอช 9 ใช้ 0.2 โมลาร์ไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์ บัฟเฟอร์ (Ruzin, 1999) เป็นตัวทำละลาย แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 2.3

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5.2 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

ศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยวิเคราะห์ที่พีเอชที่เหมาะสม จากข้อ 2.5.1 บ่มเป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ ตามวิธีในข้อ 2.3

2.6 การศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิ ต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

2.6.1 ผลของพีเอช ต่อความคงตัวของเอนไซม์

ทำโดยละลายเอนไซม์ผงในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 6-9 แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยไม่เติมสารตั้งต้น เป็นเวลา 0-12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ โดยใช้พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม ที่ศึกษาได้จากข้อ 2.5

2.6.2 ผลของอุณหภูมิ ต่อความคงตัวของเอนไซม์

ทำโดยละลายเอนไซม์ผงในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 7.5 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส โดยไม่เติมสารตั้งต้น เป็นเวลา 0-12 ชั่วโมง เมื่อครบตามเวลา ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ โดยใช้พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสม เช่นเดียวกับข้อ 2.6.1

2.7 การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีผลต่อกิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ในการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ นำเอนไซม์ผงที่เตรียมได้จากข้อ 2.2 ไปบรรจุถุงพลาสติก (PE) จากนั้นใส่ในถุงอลูมิเนียมฟอยล์ และปิดผนึกให้สนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 30 วัน จึงสุ่มตัวอย่างมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 2.5 แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับกิจกรรมของเอนไซม์ ณ วันที่ 0 โดยนำมาคำนวณตามสมการที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง (%) = 100 – ((กิจกรรม ณ วันที่ 30/ กิจกรรม ณ วันที่ 0) × 100) (1)

3. ศึกษาการเปรียบเทียบของการใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้และตับอ่อนของไก่ ในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

3.1 ผลของชนิดและปริมาณเอนไซม์

สกัดกรดไฮยาลูโรนิกตามวิธีในข้อ 1.2.3 ใช้เอนไซม์ปาเปน โดยแปรปริมาณเอนไซม์ 2 ระดับ คือ เอนไซม์ 4 และ 8 ไมโครกรัม/หงอนแห้ง 1 มิลลิกรัม และสกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ โดยใช้ปริมาณเอนไซม์ผงแห้ง 2 ระดับ คือ สารสกัดหยาบของเอนไซม์ผง 16 และ 32 ไมโครกรัม/หงอนแห้ง 1 มิลลิกรัม เปรียบเทียบการสกัดโดยใช้หงอนแห้ง 150 มิลลิกรัม สภาวะการย่อยของ ปาเปน คือ พีเอช 6.5 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (กิจกรรม 85.71 ยูนิต/มิลลิลิตร เอนไซม์) และของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง (กิจกรรม 0.20 ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผง) นำสารที่สกัดได้ทั้งหมดมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก ตามวิธีการในข้อ 1.2.4

3.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้

3.2.1 วิธีอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลส อะซิเตท ทำโดยดัดแปลงวิธีจาก Nakano *et al*. (1994) (ภาคผนวก ง) โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดโดยใช้เอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกสกัดจากหงอนของไก่ (Sigma-Aldrich, ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

3.2.2 วิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี โดยวัดค่า transmittance ด้วยโหมด ATR (ภาคผนวก ง)โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดโดยใช้เอนไซม์ปาเปน และเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่ เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกสกัดจากหงอนของไก่ (Sigma-Aldrich)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

4.1 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากหงอนไก่

ใช้แผนการทดลองแบบ 2×2 factorial in CRD โดยการทดลองมี 2 ปัจจัย ได้แก่ สายพันธุ์ และเพศ ในแต่ละปัจจัยมี 2 ระดับ และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างคู่ โดยใช้ Duncan's multiple range test (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

4.2 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ Duncan's multiple range test (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

4.3 ศึกษาผลการเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม SPSS ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ วิเคราะห์ความแปรปรวน โดยใช้ Duncan's multiple range test (ทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

5. สถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร และภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (บางเขน)

6. ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

1 มิถุนายน 2553 - 31 พฤษภาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การสกัดกรดไฮยาลูโรนิก จากหงอนไก่

1.1 การหาปริมาณผลได้ (yield) ของหงอนไก่

หงอนของไก่หนุ่ม หรือไก่สาว ที่มีอายุเพียง 5-6 สัปดาห์ จะมีสีชมพูอ่อน และมีขนาดค่อนข้างเล็ก มีความยาวประมาณ 2.3 เซนติเมตร และ 1.8 เซนติเมตร ตามลำดับ และจากการเก็บข้อมูลเปอร์เซ็นต์ผลได้ของหงอน พบว่า เพศผู้ให้ yield สูงกว่าเพศเมีย (ภาพที่ 8) เนื่องจากการเจริญของหงอนเป็นผลมาจากฮอร์โมนเพศผู้ ได้แก่ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (testosterone) ซึ่งทำให้หงอนไก่เพศผู้มีขนาดใหญ่ และหนากว่าเพศเมีย (Hodges, 1974 and Balazs, 2009) โดยปริมาณหงอนที่ได้อยู่ในช่วง 0.05-0.07 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวในไก่เพศผู้ และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวในไก่เพศเมีย (ตารางที่ 3) และเมื่อนำหงอนไปทำแห้งโดยแช่ในสารละลายอะซิโตน และอบจนน้ำหนักคงที่ (ภาพที่ 9) ได้ปริมาณหงอนแห้งประมาณ 22 กรัม (เพศผู้) และ 20 กรัม (เพศเมีย) จากหงอนสด 100 กรัม

ปริมาณหงอนที่ได้ดูเหมือนเป็นเปอร์เซ็นต์ที่ค่อนข้างต่ำ แต่จากสถิติในปี 2555 ประเทศไทยมีปริมาณการผลิต ไก่เนื้อถึง 1,020.07 ล้านตัวต่อปี (สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2555) ดังนั้นทำให้มีเศษเหลือส่วนหัวและหงอนของไก่ปริมาณมากจึงเห็นสมควรแก่การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

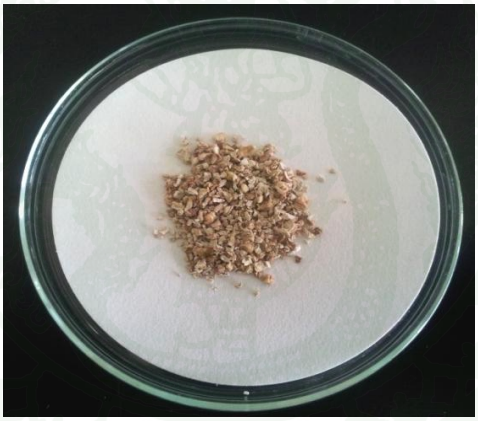
ภาพที่ 8 หงอนของไก่เพศผู้ และเพศเมีย จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 ปริมาณผลได้ (yield) ของหงอน จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres และ Ross อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนัก 2.4-2.6 กิโลกรัม ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

สายพันธุ์	เพศ	ปริมาณผลได้ (yield) ของหงอน (เปอร์เซ็นต์)	
		เทียบจากน้ำหนักหัวไก่	เทียบจากน้ำหนักไก่ทั้งตัว
Arbor Acres	ผู้	2.02 ± 0.74	0.05 ± 0.02
	เมีย	0.82 ± 0.24	0.01 ± 0.00
Ross	ผู้	2.78 ± 0.89	0.07 ± 0.02
	เมีย	0.69 ± 0.23	0.01 ± 0.00

หมายเหตุ สุ่มตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง



ภาพที่ 9 ลักษณะของหงอนแห้ง

1.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหงอนไก่

ทำโดยสุ่มตัวอย่างหงอนสดส่วนหนึ่งมาศึกษาองค์ประกอบทางเคมี เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางการเพิ่มมูลค่า และศักยภาพของการนำหงอนของไก่มาใช้ประโยชน์มากกว่าการใช้แค่เพียงเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ ซึ่งพบว่า ในหงอนมีปริมาณความชื้น 61-69 โปรตีน 14-17 ไขมัน 8-15 เถ้า 0.4-0.7 และคาร์โบไฮเดรต 6-11 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักเปียก (ตารางที่ 4) โดยสังเกตพบว่านอกจากน้ำแล้ว องค์ประกอบที่มีปริมาณสูง คือ โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ทั้งในหงอนเพศผู้ และเพศเมียจากไก่ทั้ง 2 พันธุ์ ส่วนของคาร์โบไฮเดรต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประกอบด้วยสารสำคัญ คือ กรดไฮยาลูโรนิก ซึ่งเป็นสารประเภทพอลิแซคคาไรด์ ที่มีราคาแพง จึงได้ศึกษาการสกัดสารดังกล่าว

ตารางที่ 4 องค์ประกอบทางเคมีในหงอนของไก่

องค์ประกอบทางเคมี (เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเปียก)	พันธุ์ Arbor Acres		พันธุ์ Ross	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
ความชื้น	67.02	60.85	69.03	66.55
โปรตีน	14.48	15.31	14.35	16.56
ไขมัน	11.60	14.66	8.32	11.06
เถ้า	0.71	0.57	0.51	0.42
*คาร์โบไฮเดรต	6.19	9.27	7.80	10.91

* คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์) = 100 – (%ความชื้น+%โปรตีน+%ไขมัน+%เถ้า)

1.3 ศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่

โดยศึกษาตามวิธีของ Nakano *et al*. (1994) ซึ่งใช้น้ำเป็นสารสกัด เนื่องจากสารพอลิแซคคาไรด์ชนิดนี้สามารถละลายน้ำได้ดี และใช้เอนไซม์ปาเปน ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสทางการค้าในการย่อยโปรตีนที่เชื่อมต่ออยู่กับกรดไฮยาลูโรนิก ภายในโครงสร้างของหงอนไก่ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้ปลดปล่อยกรดไฮยาลูโรนิก จากการศึกษาพบว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก คือ เพศ และผลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับเพศ โดยเพศผู้ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก สูงกว่าเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกใน 1 มิลลิลิตร ของสารละลายที่สกัดได้จากหงอนของไก่เพศผู้ มีกรดยูโรนิกประมาณ 78.35-99.32 ไมโครกรัม คิดเป็น 3.92-4.97 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง ส่วนใน 1 มิลลิลิตร ของสารสกัดจากหงอนเพศเมีย มีกรดยูโรนิกประมาณ 25.49-44.31 ไมโครกรัม คิดเป็น 1.28-2.22 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง (ตารางที่ 5) ซึ่งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากหงอนของไก่เพศผู้สูงกว่าเพศเมีย 2-3 เท่า ในทั้ง 2 สายพันธุ์ ขนาด และลักษณะภายนอกของหงอนไก่เพศผู้และเพศเมียมีความแตกต่างกันจึงน่าจะมีองค์ประกอบโครงสร้างภายในที่แตกต่างกันด้วย ซึ่ง Hodges (1974) รายงานว่า หงอนเพศผู้มีการเจริญของส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กรดไฮยาลูโรนิกเป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่า สำหรับสายพันธุ์ไก่ Arbor Acres และ Ross มีขนาดและลักษณะหงอนคล้ายคลึงกัน และพบว่าปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ไม่แตกต่างกันอย่างชัดเจน ($P>0.05$)

จากรายงานของ Nakano *et al*. (1994) พบกรดไฮยาลูโรนิกประมาณ 40 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง ที่สกัดได้จากหงอนไก่ เพศผู้ อายุ 52 สัปดาห์ ซึ่งมากกว่าหงอนไก่ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ ซึ่งอายุ 5-6 สัปดาห์ เกือบ 10 เท่า แสดงให้เห็นว่าอายุของไก่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก เนื่องจากฮอร์โมนเพศเป็นตัวกำหนดการเจริญของหงอน โดยเฉพาะฮอร์โมนเพศผู้ ซึ่งฮอร์โมนชนิดนี้จะมีการสร้างขึ้นเมื่อถึงเวลาการสืบพันธุ์จนตลอดชีวิตของไก่ ทำให้หงอนของไก่ที่มีอายุมากกว่า จะมีขนาดใหญ่กว่า และมีกรดไฮยาลูโรนิก เป็นองค์ประกอบอยู่มากกว่า (Balazs, 2009)

ตารางที่ 5 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง) ที่สกัดได้โดย ใช้เอนไซม์ปาเปน

สายพันธุ์	**เพศ**	
	ผู้	เมีย
Arbor Acres*	4.97 ± 0.57	1.28 ± 0.12
Ross*	3.92 ± 0.72	2.22 ± 0.20

*เปรียบเทียบตามแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนของไก่ อายุเพียง 5-6 สัปดาห์ สามารสกัดได้ด้วยเอนไซม์ปาเปน (บริษัท Sigma-Aldrich) ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสทางการค้า การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ซึ่งเป็นเศษเหลือจากการแปรรูปเนื้อไก่ จึงเป็นประเด็นของการศึกษาในตอนต่อไปของงานวิจัยนี้

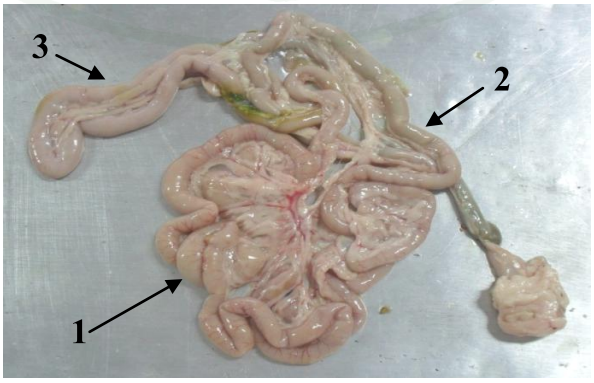
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่

2.1 การเตรียมตัวอย่าง และการหาปริมาณผลได้ (yield) ของไส้ และตับอ่อนของไก่

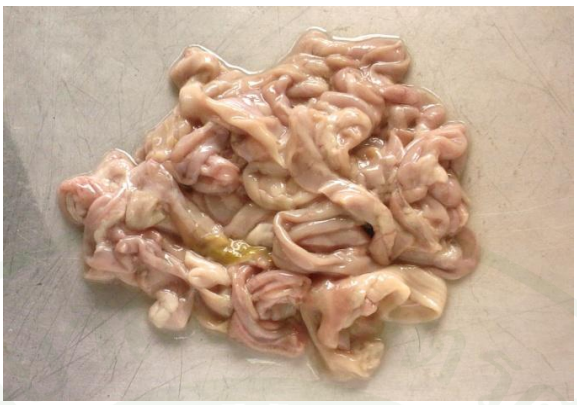
นำไส้ไก่ทั้งพวง ซึ่งประกอบด้วย หลอดอาหาร กระเพาะพัก กระเพาะแท้ กระเพาะบด ตับอ่อน ตับ ถุงน้ำดี ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และส่วนปลายสุดของลำไส้ ที่ยังไม่ผ่านการล้างทำความสะอาด (ภาพที่ 10) นำมาแยกเอาเฉพาะส่วนไส้และตับอ่อน ซึ่งเป็นส่วนที่จะใช้ในการสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส (ภาพที่ 11) จากนั้นนำมาล้างทำความสะอาดโดยการดึงพังผืด และไขมันออก แล้วจึงผ่าเอาเศษอาหารภายในไส้ออก และล้างทำความสะอาด (ภาพที่ 12) เนื่องจากส่วนของพังผืด ไขมัน และเศษอาหารที่ตกค้างอยู่ จะขัดขวางการสกัดเอนไซม์ และทำให้เกิดการเจริญของจุลินทรีย์ได้

ภาพที่ 10 ลักษณะของเครื่องในไก่ทั้งพวงก่อนล้างทำความสะอาด



ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 11 ลักษณะของไส้ (1 = ลำไส้เล็ก, 2 = ลำไส้ใหญ่) และตับอ่อน (3) ของไก่



ภาพที่ 12 ไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่ผ่านการล้างทำความสะอาดแล้ว

ในระหว่างการล้างทำความสะอาดได้ทำการหาปริมาณผลได้ ของไส้และตับอ่อนของไก่ ซึ่งเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นของการผลิตเอนไซม์ พบว่า เมื่อล้างทำความสะอาดแล้ว ได้ปริมาณผลได้ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบจากไส้สดทั้งพวง ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณผลได้เฉลี่ยของไส้ และตับอ่อนของไก่ หลังล้างทำความสะอาด โดยเทียบจากน้ำหนักไส้ไก่ทั้งพวง จากไก่สายพันธุ์ Arbor Acres อายุ 5-6 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว 2.4-2.6 กิโลกรัม

น้ำหนักไส้ไก่ทั้งพวง (กรัม)	**น้ำหนักไส้ และตับอ่อน (กรัม)**	**น้ำหนักไส้ และตับอ่อน หลังล้างทำความสะอาด (กรัม)**	**ปริมาณผลได้ (เปอร์เซ็นต์)**
240.50 ± 22.04	98.72 ± 14.04	54.15 ± 4.87	22.58 ± 1.84

หมายเหตุ สุ่มตัวอย่างจำนวน 10 ตัวอย่าง

2.2 การสกัด และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้และตับอ่อนของไก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.1 การทดสอบชนิดของสารสกัดเอนไซม์

โดยทำการเปรียบเทียบสารสกัดเอนไซม์ 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (น้ำเกลือ) ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (Souza *et al.*, 2007) และน้ำกลั่น (Rathinaraj *et al.*, 2010) เพื่อให้ทราบว่าสารสกัดชนิดใดสามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสออกมาได้ค่ากิจกรรมสูงกว่าและประหยัดค่าใช้จ่ายมากที่สุด ซึ่งพบว่า การใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัด สามารถสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่มีค่ากิจกรรมสูงกว่า การใช้น้ำเกลือเล็กน้อย ดังตารางที่ 7 นอกจากนั้นในขั้นตอนของการกรองแยกของเหลว ออกจากของแข็ง หลังจากผ่านกระบวนการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกสารสกัดเอนไซม์ สามารถทำได้ง่ายกว่าการใช้น้ำเกลือเป็นสารสกัด ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัดเอนไซม์

ตารางที่ 7 การศึกษาชนิดของสารสกัดเอนไซม์ ที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้ จากส่วนไส้ และตับอ่อนของไก่

สารสกัดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์)
สารละลาย 0.9 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์	96
น้ำกลั่น	100

การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปแบบของเหลว (ภาพที่ 13ก) ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ และไม่สะดวกต่อการนำไปใช้งาน จึงเลือกที่จะนำเอนไซม์ไปทำแห้งด้วยวิธีการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง (Freeze-drying) เพื่อทำให้เอนไซม์มีความคงตัวต่อการเก็บรักษา (Godfrey and West, 1996) และสะดวกต่อการใช้งานมากขึ้น (ภาพที่ 13ข) ซึ่งปริมาณไส้และตับอ่อน 100 กรัม สามารถสกัดสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส ในรูปผงแห้งได้ประมาณ 2.72 กรัม

การเลือกใช้น้ำกลั่นเป็นสารสกัดเอนไซม์ มีข้อดีอีกข้อหนึ่ง เพราะนอกจากเป็นสารสกัดที่ให้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมสูงขึ้น ยังช่วยลดขั้นตอนของการเตรียมสารเคมี และขั้นตอนการแยกสารที่ใช้สกัดออกจากตัวอย่างก่อนที่จะนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก)

ข)

ภาพที่ 13 ลักษณะของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นของเหลว (ก) และเอนไซม์ผงแห้งหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง (ข)

2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

นำเอนไซม์โปรติเอสที่เป็นของเหลวมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเบื้องต้นที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เอนไซม์เหลวมีค่ากิจกรรม 1.56 ยูนิต/มิลลิลิตร เอนไซม์ และมีปริมาณโปรตีน 21.14 มิลลิกรัม โปรตีน/มิลลิลิตร เอนไซม์ และเมื่อนำเอนไซม์ผงที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง มาวิเคราะห์ค่ากิจกรรม พบว่า เอนไซม์มีกิจกรรม 0.09 ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง ซึ่งในเอนไซม์ผงแห้ง 1 มิลลิกรัม มีโปรตีน 0.70 มิลลิกรัม (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีน ของ สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้และตับอ่อนของไก่

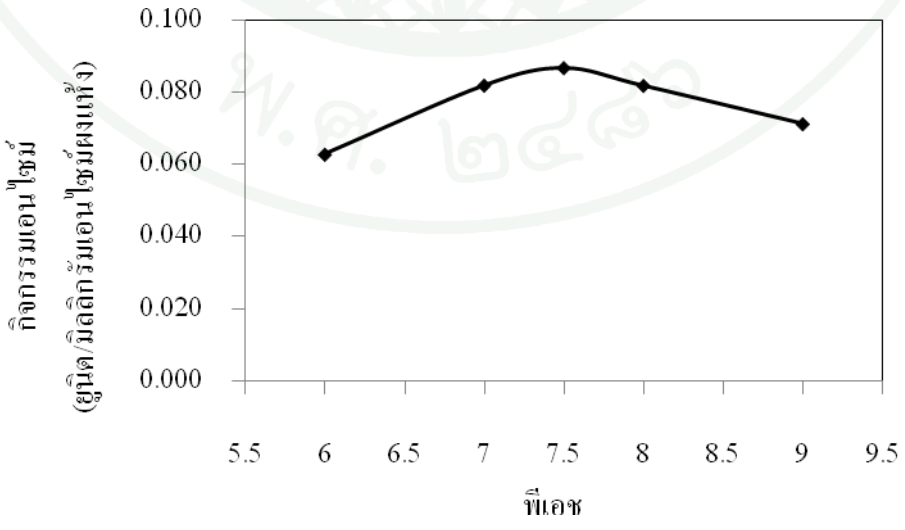
เอนไซม์โปรติเอส	กิจกรรมเอนไซม์		ปริมาณโปรตีน	
	ยูนิต/มิลลิลิตร เอนไซม์	ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง	มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เอนไซม์	มิลลิกรัม/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง
ของเหลว	1.56 ± 0.01	-	21.14 ± 0.24	-
ผงแห้ง	-	0.09 ± 0.00	-	0.70 ± 0.01

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.3 การศึกษาพีเอช และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อทราบค่ากิจกรรมเบื้องต้นแล้ว จึงนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์ ไปหาค่าพีเอชที่เหมาะสม โดยนำเอนไซม์ผงแห้งไปวิเคราะห์กิจกรรมในช่วงพีเอช 6-9 คือ พีเอช 6, 7, 7.5, 8 และ 9 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์สูงขึ้น เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น จากพีเอช 6 จนถึงพีเอช 7.5 หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ดังนั้น พีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส คือ พีเอช 7.5 (ภาพที่ 14)

แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงเบสอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับ Rathinaraj *et al*. (2010) ที่รายงานว่า เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากไส้ไก่มีพีเอชที่เหมาะสมในสภาวะที่เป็นเบส ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใกล้เคียงกับงานวิจัยก่อนหน้า ที่รายงานพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ที่สกัดจากไส้และตับอ่อนของไก่ ได้แก่ เอนไซม์อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7.5 (Jamadar *et al*., 2003; Damle *et al*., 2010; Mane *et al*. 2010; Mane *et al*., 2011) เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส บี (carboxypeptidase B) มีพีเอชที่เหมาะสม คือ พีเอช 8 (Bradley *et al*., 1996) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และไคโมทริปซิน (chymotrypsin) มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.5 (Guyonnet *et al*., 1999)



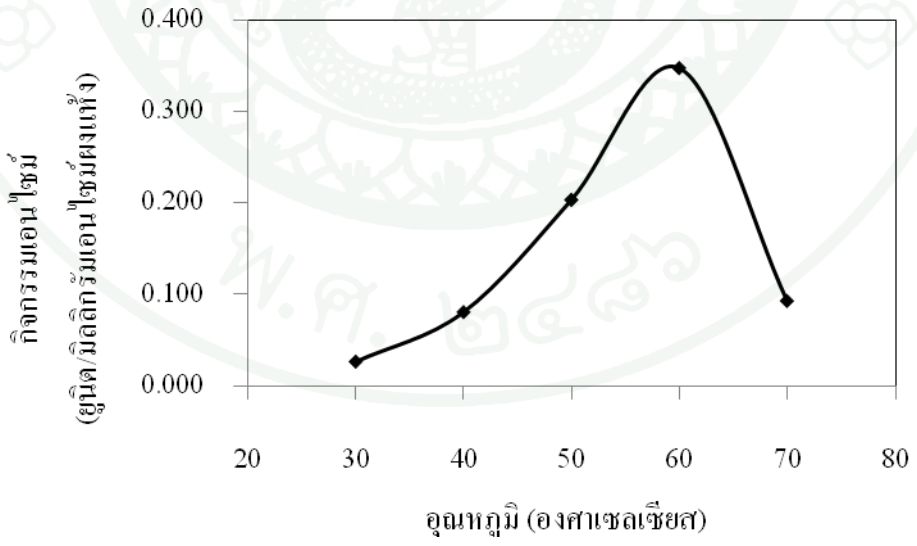
ภาพที่ 14 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่อุณหภูมิการบ่ม 37 องศาเซลเซียส

เมื่อทราบค่าพีเอชที่เหมาะสมแล้ว จึงนำสารสกัดเอนไซม์ผงแห้งไปศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป โดยทำการแปรอุณหภูมิ 5 ระดับ คือ 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ที่ พีเอช 7.5 พบว่า ที่ระดับอุณหภูมิต่ำ 30-40 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมค่อนข้างต่ำ หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดแตกต่างจากอุณหภูมิอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 0.35 ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิต่อไปอีกจนถึง 70 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างมาก (ภาพที่ 15)

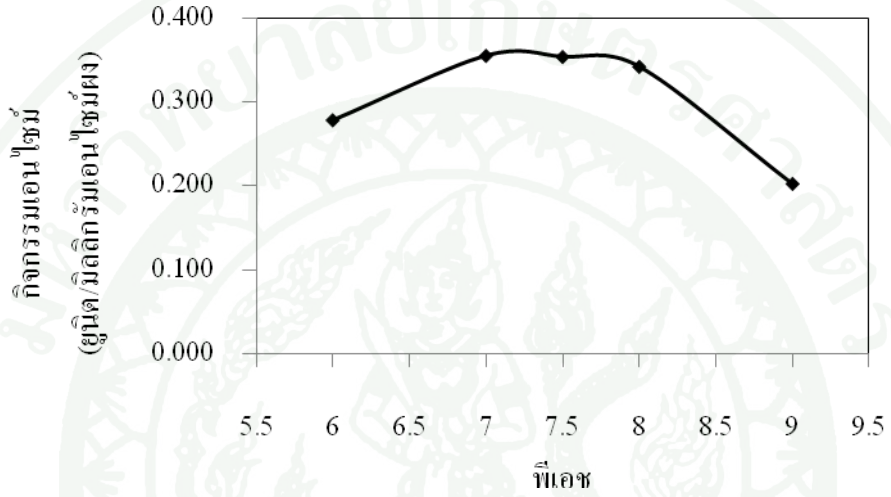
โดย ปราณี, 2547; Dixon and Webb (1979); Whitaker (1994); Fullbrook (1996) ได้อธิบายไว้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะสูงขึ้น ในขณะเดียวกันก็เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์เสียสภาพ (denature) ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายเกลียว (unfolding) จึงทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง ดังนั้นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสให้ค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการสกัดเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ ของ Guyonnet *et al*., (1999); Mane *et al*. (2010) ซึ่งเอนไซม์ที่สกัดได้มีอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 60 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ที่พีเอช 7.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้นทำการตรวจสอบว่าอุณหภูมิการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส ยังมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติอสเป็น 7.5 หรือไม่ โดยศึกษาผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ โดยเปลี่ยนอุณหภูมิจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 60 องศาเซลเซียส ซึ่งช่วงพีเอช 7-7.5 ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด แตกต่างจากสภาวะอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ที่อุณหภูมิการบ่ม 60 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองข้างต้นจึงสรุปว่า สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากไส้และตับอ่อนของไก่ มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน คือ พีเอช 7.5 และอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด คือ 60 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองเรื่องสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ยังไม่เพียงพอต่อการพิจารณาการนำเอนไซม์ไปใช้ ซึ่งควรมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ ด้วย ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงเลือกศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.4 การศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

เมื่อทราบค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมแล้ว จึงนำสภาวะที่ได้มาใช้ในการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ต่อไป โดยนำมาใช้ในการวิเคราะห์กิจกรรมที่เหลืออยู่ของเอนไซม์ หลังจากการบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช อยู่ในช่วง 6-9 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาตั้งแต่ 0-12 ชั่วโมง ซึ่งพบว่า ช่วงพีเอช 6-8 ตั้งแต่ 0-12 ชั่วโมง สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีความคงตัวดีมากโดยเอนไซม์มีกิจกรรมเกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่พีเอช 9 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 17) แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ มีความคงตัวดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลางถึงเบสอ่อน

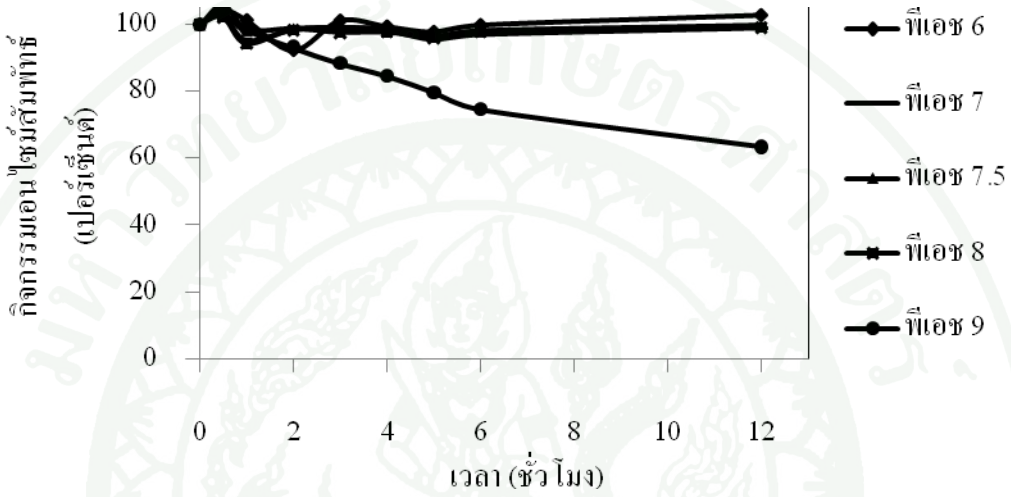
โดยส่วนมากเอนไซม์จะสูญเสียสภาพธรรมชาติ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดหรือเบสที่แรง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงประจุบนโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติ ทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม (Whitaker, 1994; Bisswanger, 2002)

การศึกษาผลของความร้อนต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ ทำโดยนำเอนไซม์ไปบ่มที่ช่วงอุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 7.5 เป็นเวลา 0-12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหากิจกรรมที่ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส บ่มนาน 10 นาที (ภาพที่ 18) พบว่าอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความคงตัวดี คือ อุณหภูมิต่ำประมาณ 30 องศาเซลเซียส โดยกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อบ่มนาน 12 ชั่วโมง ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 2 ชั่วโมง และเมื่อครบ 12 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์เหลือประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้นไปถึง 50 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์เริ่มลดลงตั้งแต่ 30 นาทีแรก เมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง เอนไซม์ยังคงเหลือกิจกรรมอยู่ แต่เหลือเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับช่วงอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมทั้งหมด เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 30 นาที นั่นแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากไส้และตับอ่อนของไก่ สามารถทนความร้อนได้ระดับหนึ่ง คือ อุณหภูมิไม่เกิน 60 องศาเซลเซียส ซึ่งส่วนมากเอนไซม์จะสูญเสียสภาพ และกิจกรรมเมื่อได้รับความร้อนสูง (Neilands and Stumpf, 1958; Whitaker, 1994)

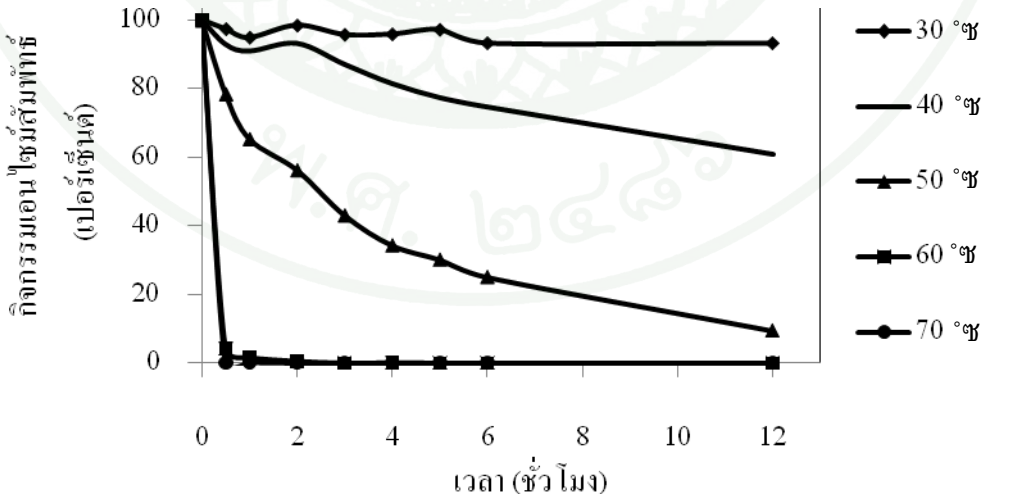
เมื่อพิจารณาจากพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน และความคงตัวของเอนไซม์ สามารถเลือกสภาวะที่จะนำเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ไปใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประโยชน์ในการย่อยหงอนต่อไป นั่นคือ ที่พีเอช 7.5 ซึ่งเป็นสภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมสูง และเอนไซม์มีความคงตัวดี ส่วนอุณหภูมิที่เลือก 50 องศาเซลเซียส เนื่องจาก อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีกิจกรรมค่อนข้างต่ำ และที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวต่ำมาก



ภาพที่ 17 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ (วิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)



ภาพที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสผงแห้งจากไส้ และตับอ่อนของไก่ (วิเคราะห์กิจกรรมที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.5 ผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเก็บรักษาเอนไซม์ผงแห้งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 30 วัน แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรม พบว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่มีกิจกรรมลดลงประมาณ 6.18 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่มีความคงตัวต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดีก่อนนำเอนไซม์ไปใช้ควรต้องมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนทุกครั้ง

เมื่อทำการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่ และทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการนำเอนไซม์ไปใช้แล้ว จึงนำเอนไซม์ที่สกัดได้ไปย่อยโปรตีนในหงอนไก่ โดยจากผลการทดลองในข้อ 1.3 ได้เลือกหงอนไก่เพศผู้ สายพันธุ์ Arbor Acres เนื่องจาก เพศผู้ให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงกว่าเพศเมีย และสายพันธุ์ Arbor Acres เป็นพันธุ์ไก่ที่มีการบริโภคกันมากถึง 70 เปอร์เซ็นต์ (บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด เครือเบทาโกร) โดยเปรียบเทียบผลการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก ระหว่างการใช้เอนไซม์ปาเปน ที่ 2 ระดับ คือ 4 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมหงอนแห้ง กับผงแห้งของสารสกัดหยาบของโปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ที่ 2 ระดับ 16 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง

3. การเปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิก

3.1 ปริมาณผลได้ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้

จากหงอนแห้ง 150 มิลลิกรัม สกัดกรดไฮยาลูโรนิกโดยใช้เอนไซม์ปาเปน (เอนไซม์ทางการค้า) โดยแปรระดับกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปน 2 ระดับ คือ 4 และ 8 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมหงอนแห้ง ส่วนผงแห้งของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส (สกัดจากไส้และตับอ่อนของไก่) แปรระดับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ คือ 16 และ 32 ไมโครกรัม/มิลลิกรัมหงอนแห้ง เนื่องจากเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ยังไม่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จึงใช้ในปริมาณที่สูงกว่าเอนไซม์ปาเปน 4 เท่า การสกัดใช้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละเอนไซม์ คือ เอนไซม์ปาเปนใช้ พีเอช 6.5, 65 องศาเซลเซียส และเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่ใช้ พีเอช 7.5, 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า เมื่อพิจารณาในแต่ละชนิดของเอนไซม์ การเพิ่มปริมาณของเอนไซม์จากเดิมเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2 เท่า ส่งผลทำให้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 9) แต่จะสังเกตเห็นว่า แม้เพิ่มปริมาณเอนไซม์จากไส้ และตับอ่อนของไก่เป็น 4 เท่าของเอนไซม์ปาเปน ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ยังคงต่ำกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 4.65 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง (เอนไซม์ปาเปน) และ 3.97 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง (เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่) และเมื่อเพิ่มเป็น 8 เท่า ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่ได้ คือ 4.39 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง แสดงให้เห็นว่าในสภาวะการย่อยหงอนไก่ ที่มีการเติม EDTA (Nakano *et al*., 1994) ซึ่งเหมาะกับการทำงานของเอนไซม์ปาเปน อาจไม่เหมาะกับสารสกัดเอนไซม์โปรติเอส เนื่องจาก ภายในไส้ และตับอ่อนของสัตว์ปีกประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิด เช่น เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเอส และเอนไซม์อะมิโนเปปติเดส เป็นต้น (Jamroz *et al*., 2001; Kadhim *et al*., 2011) ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มซีรีน และโปรติเอสในกลุ่มที่มีโลหะ ดังนั้นในสภาวะที่มี EDTA ซึ่งเป็นสารจับโลหะ จะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ จึงทำให้ความสามารถในการย่อยหงอนไก่ของสารสกัดเอนไซม์จากไส้ และตับอ่อนของไก่ ลดลง

ดังนั้น ในการนำสารสกัดเอนไซม์โปรติเอสไปใช้ น่าจะต้องมีการศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เพื่อหาสภาวะการย่อยหงอนไก่ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่สามารถสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนของไก่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก (ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง) ที่สกัดได้จากหงอนของไก่พันธุ์ Arbor Acres เพศผู้ โดยใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่

เอนไซม์ปาเปน			สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส		
ปริมาณเอนไซม์/สารตั้งต้น (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง)	ปริมาณเอนไซม์ (ไมโครลิตร)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก	ปริมาณเอนไซม์/สารตั้งต้น (ไมโครกรัม/มิลลิกรัม หงอนแห้ง)	ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิกรัม)	ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก
4	1.2	4.65 ± 0.16^{A}	16	2.52	3.97 ± 0.09^{a}
8	2.4	4.93 ± 0.12^{B}	32	5.04	4.39 ± 0.18^{b}

^{A,B} เปรียบเทียบในแถวแนวตั้ง อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

^{a,b} เปรียบเทียบในแถวแนวตั้ง อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

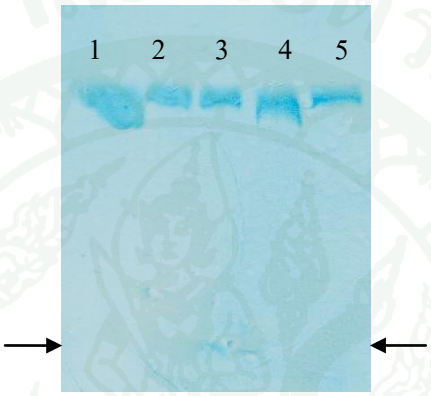
3.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ กับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก

3.2.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส แบบเซลลูโลสอะซีเตท

โดยนำกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้มาวิเคราะห์ผลเทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก (กรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่, Sigma Aldrich) ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์พอลิแซคคาไรด์ที่เป็นกรด (acidic polysaccharides) ได้แก่ กรดไฮยาลูโรนิก และเฮพาริน เป็นต้น โดยวิธีนี้มีขีดจำกัดในการวิเคราะห์อยู่ในระดับนาโนกรัม (Szewczyk, 1983; Volpi and Maccari, 2006) เป็นวิธีที่ง่าย สะดวก และสามารถวิเคราะห์ผลได้ภายใน 1 วัน (Gaál *et al*., 1980; Nakano *et al*., 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการทดลองดังภาพที่ 19 ในช่องที่ 1 คือ สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก ช่องที่ 2,3 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน และ ช่องที่ 4,5 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส พบว่า ลักษณะการเคลื่อนที่ของสารมาตรฐานและสารสกัดจากตำแหน่งเริ่มต้นเดียวกัน (ลูกศรชี้) เคลื่อนที่มาอยู่ในตำแหน่งที่เป็นแนวเดียวกัน จึงใช้ยืนยันได้ว่า สารที่สกัดได้ คือกรดไฮยาลูโรนิก (Nakano *et al*., 1994; Wegrowski and Maquart, 2001; Mutsuno *et al*., 2008)



ภาพที่ 19 ลักษณะการเคลื่อนที่ของกรดไฮยาลูโรนิก บนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท
1 คือ สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก 2, 3 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน 4, 5 คือ กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่ และลูกศรชี้ คือจุดเริ่มต้นใส่ตัวอย่าง

3.2.2 การวิเคราะห์ด้วยวิธีฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี

เป็นการใช้เทคนิคการวิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชั่น (functional group) ของสารด้วยเครื่องฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ ในช่วง Mid IR (Wavenumber 4000-800 cm^{-1}) โดยแสดงผลออกมาเป็นสเปคตรัมของสาร แล้วนำค่าไปเทียบหาหมู่ฟังก์ชันของสารนั้น

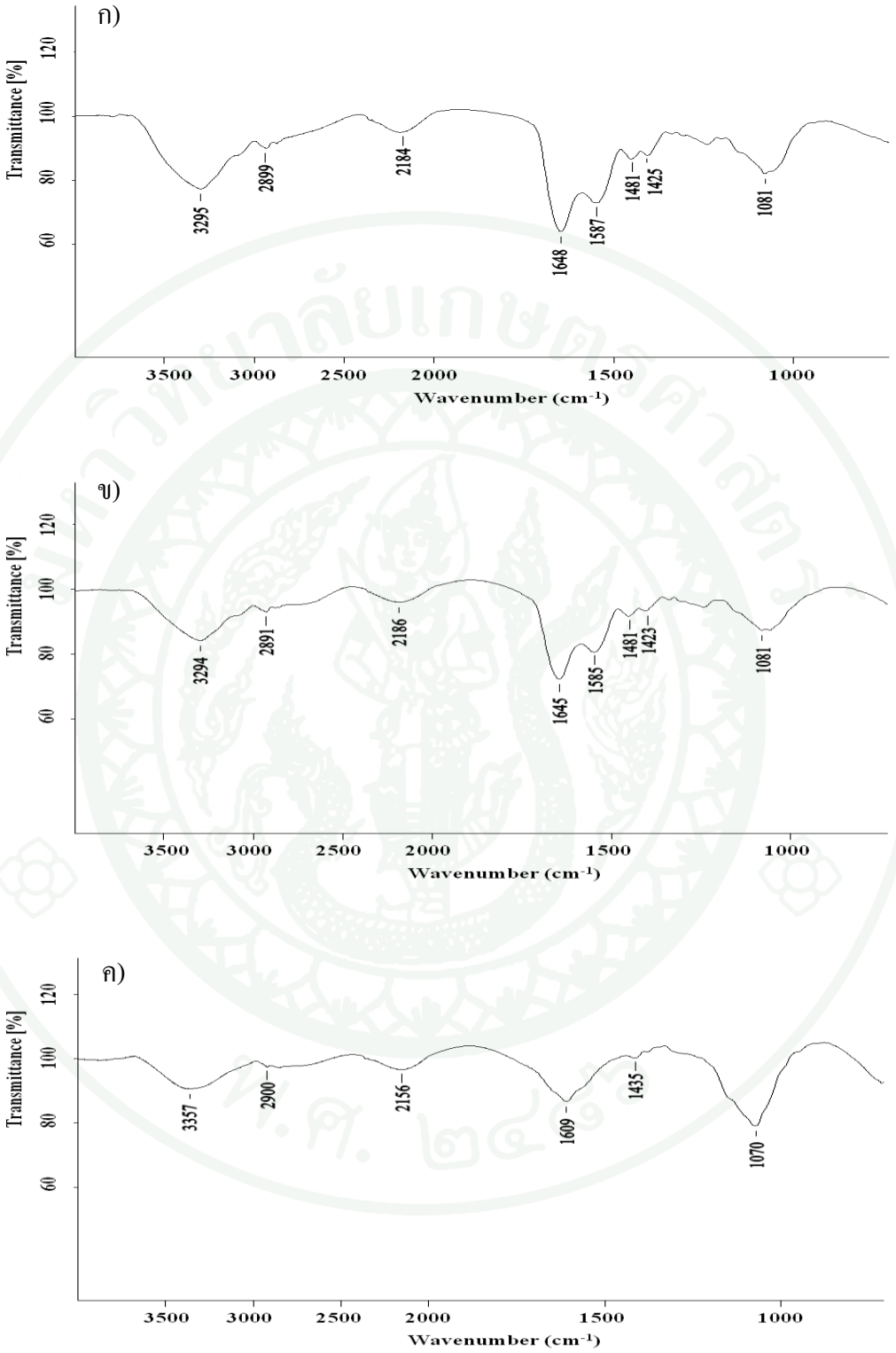
ภาพที่ 20ก และ 20ข คือ สเปคตรัมของกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน และกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ตามลำดับ ส่วนภาพที่ 20ค คือ สเปคตรัมของสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก โดยสามารถสรุปหมู่ฟังก์ชันที่พบจากตัวอย่างทั้งหมด ดังตารางที่ 10 พบว่า กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด มีสเปคตรัมที่เหมือนกัน นั่นแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างทั้ง 2 ประกอบด้วยหมู่ฟังก์ชันแบบเดียวกัน โดยตำแหน่งที่บ่งบอกว่าสารสกัดที่ได้ คือกรดไฮยาลูโรนิก คือบริเวณพีคที่พบ Amide group (CO-NH) ซึ่งใกล้เคียงกับงานของ Alkrad *et al.* (2003) นอกจากนั้นยังไม่พบพีคที่แสดงหมู่ซัลเฟต (sulfate group; HSO_4^-) คือช่วง 875-823 cm^{-1} (ละอองดาว, 2548) เนื่องจากกรดไฮยาลูโรนิกไม่มีซัลเฟตเป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ (Sigma Aldrich) ซึ่งอยู่ในรูปของโซเดียมไฮยาลูโรเนต พบว่าสเปคตรัมแตกต่างกันเล็กน้อย คือสารมาตรฐานพบ Amide II ที่ 1609 cm^{-1} แต่ไม่พบ Amide I และ NH deformation ในขณะที่กรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้ในงานวิจัยนี้ แสดงพีคของ Amide I (1648, 1645 cm^{-1}) Amide II (1587, 1585 cm^{-1}) และ NH deformation (1481 cm^{-1}) ซึ่งใกล้เคียงกันทั้งกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ โดยความแตกต่างระหว่าง Amide I และ Amide II คือ ลักษะการสั่น (vibration) ของโมเลกุล ซึ่งพีค Amide I เป็น stretching vibrations ของพันธะ C=O ที่เชื่อมต่อกับพันธะ N-H ส่วน Amide II เป็น bending vibrations ของพันธะ N-H (Gallagher, 2005)

ดังนั้นการที่สารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก อยู่ในรูปของกลือโซเดียมไฮยาลูโรเนต ซึ่งเป็นรูปแบบของกรดไฮยาลูโรนิก ที่ต่างจากกรดไฮยาลูโรนิกในงานวิจัยนี้ จึงอาจมีผลทำให้เกิดความแตกต่างของพันธะ Amide ซึ่งคล้ายกับงานของ Tomihata and Ikada (1997) ที่มีการวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิกด้วยวิธี FT-IR เช่นเดียวกัน พบว่า เมื่อมีการเปลี่ยนโครงสร้างของโซเดียมไฮยาลูโรเนต (อยู่ในรูปเกลือ) ให้กลายเป็นกรด คือ กรดไฮยาลูโรนิก แล้ววิเคราะห์ด้วย FT-IR สเปคตรัมที่ได้มีพีคใหม่เกิดขึ้นที่ 1650 cm^{-1}

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 สเปคตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก ก) สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน ข) สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ค) สารมาตรฐาน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 Wavenumber (cm^{-1}) ของหมู่ฟังก์ชันต่างๆ ในสเปคตรัมของกรดไฮยาลูโรนิก

หมู่ฟังก์ชัน	Wavenumber(cm^{-1})		
	สกัดด้วยเอนไซม์ปาเปน	สกัดด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส	สารมาตรฐาน (Sigma Aldrich)
NH stretching and OH stretching	3295	3294	3357
CH stretching	2899	2891	2900
C≡C stretching	2184	2186	2156
C=O carboxyl amide I	1648	1645	-
Amide II	1587	1585	1609
NH deformation	1481	1481	-
CH_2 methylene group	1425	1423	1435
C-O-C, C-O and C-O-H stretching	1081	1081	1070

ที่มา: Alkrad *et al*. (2003); Haxaire *et al*. (2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. หงอนไก่ตัวผู้มีขนาดใหญ่และหนากว่าหงอนของไก่เพศเมีย ในไก่ทั้งสองสายพันธุ์ คือ Arbor Aces และ Ross โดยพบว่าปริมาณผลได้ของหงอน เมื่อเทียบจากน้ำหนักไก่ทั้งตัว อยู่ในช่วง 0.05-0.07 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักไก่เพศผู้ และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักไก่เพศเมีย

2. ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากหงอนของไก่เพศผู้ และเพศเมีย โดยใช้เอนไซม์ปาเปน อยู่ในช่วง 3.92-4.97 และ 1.28-2.22 ไมโครกรัม กรดยูโรนิก/มิลลิกรัม หงอนแห้ง ตามลำดับ ซึ่งปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกที่สกัดได้จากหงอนของไก่เพศผู้สูงกว่าเพศเมีย 2-3 เท่า ในทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก คือ เพศ และผลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับเพศ ของไก่

3. จากไส้ไก่ทั้งพวงสามารถหาปริมาณผลได้เฉพาะส่วนไส้ และตับอ่อนหลังล้างทำความสะอาดได้ประมาณ 22 เปอร์เซ็นต์ (เทียบกับไส้ทั้งพวง) และจากไส้ 100 กรัม สามารถสกัดเอนไซม์โดยใช้น้ำกลั่น แล้วนำไปทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง ได้เอนไซม์ผง 2.72 กรัม โดยเอนไซม์ผงแห้ง 1 มิลลิกรัม มีโปรตีนอยู่ 0.70 มิลลิกรัม

4. สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางถึงเบสอ่อน (พีเอช 7.5) และให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส คือ 0.35 ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง นอกจากนี้เอนไซม์ยังมีความคงทนที่พีเอช 6-8 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถทนความร้อนได้เกิน 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นสภาวะที่เลือกใช้ คือ พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

5. เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของไก่ ในการสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่เพศผู้ พันธุ์ Arbor Arces ภายใต้สภาวะการย่อยที่มี ซีสเตอีน และ EDTA โดยเอนไซม์โปรติเอสสามารถสกัดกรดไฮยาลูโรนิกได้แต่ยังได้ในปริมาณที่น้อยกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. การใช้เทคนิคอีเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท และฟูเรียร์ทรานสฟอร์ม อินฟราเรด สเปกโตรสโคปี สามารถยืนยันได้ว่าสารที่สกัดได้จากหงอนไก่โดยใช้เอนไซม์ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากไส้ และตับอ่อนของไก่ คือกรดไฮยาลูโรนิก

ข้อเสนอแนะ

ในการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ และตับอ่อนของไก่ ย่อยหงอนไก่ให้ได้ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิกสูงสุด ควรศึกษาสภาวะการย่อย ได้แก่

1. ศึกษาปัจจัย เช่น สารยับยั้ง ที่จะส่งผลต่อการทำงานของสารสกัดเอนไซม์

2. ศึกษาหาปริมาณเอนไซม์ต่อสารตั้งต้นที่เหมาะสม

3. ศึกษาระยะเวลาการย่อยที่เหมาะสม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **เอนไซม์ทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เพทาย พงษ์เพียจันทร์. 2538. **สรีรวิทยาสัตว์เลี้ยง.** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.

ละอองดาว ว่องเอกลักษณ์. 2548. **คอนดรอยติน ซัลเฟต ในกระดูกอ่อนจระเข้: การวิเคราะห์ทางเคมีและการศึกษาโครงสร้างทางจุลภาค.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิโรจน์ จันทรัตน์. 2537. **กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก.** พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

สำนักงานวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. 2555. **สถานการณ์สินค้าเกษตรที่สำคัญ และแนวโน้มปี 2555**. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. แหล่งที่มา: http://www.oae.go.th/download/journal/trends2555.pdf, 27 ธันวาคม 2555.

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter. 2002. **Molecular Biology of the Cell.** Garlan science, New York.

Alencar, R.B., M.M. Biondi, P.M.G. Paiva, V.L.A. Vieira, L.B.C. Junior and R. de S. Bezerra. 2003. Alkaline protease from the digestive tract of four tropical fishes. **Braz. J. Food Technol**. 6(2): 279-284.

Almond, A. 2007. Hyaluronan. **Cell. Mol. Life Sci.** 64: 1591-1596.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Alkrad, J.A., Y. Mrestani, D. Stroehl, S. Wartewig and R. Neubert. 2003. Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV-Vis spectroscopies. **J. Pharmaceut. Biomed.** 31: 545-550.

Anonymous. n.d. **Chickens.** Available source: http://www.sheppardsoftware.com/content/animals/animals /birds/chicken.htm, February 21, 2010.

Anonymous. 2008. **Comb Sweet Comb.** Available source: http://www.flickr.com/photos/forkie/2792559468/, February 21, 2010.

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis.** 17th ed. Assosiation of Official Anlytical Chemist, Washington DC.

Balazs, E.A. 1979. **Ultrapure hyaluronic acid and the use thereof.** US. Pat. 4,141,973.

Balazs, E.A. 2009. The role of hyaluronan in the structure and function of the biomatrix of connective tissues. **Struct. Chem.** 20: 233-243.

Beck, I.T. 1973. The role of pancreatic enzymes in digestion. **Am. J. Clin. Nutr.** 26: 311-325.

Bezerra, R.S., E.J.F. Lins, R.B. Alencar, P.M.G. Paiva, M.E.C. Chaves, L.C.B.B. Coelho and L.B.C. Jr. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem**. 40: 1829-1834.

Bisswanger, H. 2002. **Enzyme kinetics: principles and methods.** Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

Bitter, T. and H.M. Muir. 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. **Anal. Biochem**. 4: 330-334.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bradley, G., R.J. Naude, K. Muramoto, F. Yamauchi and W. Oelofsen. 1996. Ostrich (*Struthio camelus*) carboxypeptidase B: Purification, kinetic properties and characterization of the pancreatic enzyme. **J. Biochem. Cell Biol.** 28: 521-529.

Cheng, F.Y., F.W. Hsu, H.S. Chang, L.C. Lin, and R. Sakata. 2009. Effect of different acids on the extraction of pepsin-solubilised collagen containing melanin from silky fowl feet. **Food Chem.** 113: 563-567.

Cupp-Enyard, C. 2008. Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate. **J. Visual. Experiments.** 19: 1-2.

Damle, M.V., P. Harikumar and S.N. Jamdar. 2010. Debittering of protein hydrolysates using immobilized chicken intestinal mucosa. **Process Biochem.** 45: 1030-1035.

Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. **Enzymes**. 3rd ed. Academic Press, New York.

Fraser, J.R.E., T.C. Laurent and U.B.G. Laurent. 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. **J. Intern. Med.** 242: 27-33.

Fullbrook, P.D. 1996. Practical Limits and Prospects (Kinetics), pp. 504-539. *In* T. Godfrey and S. West, eds. **Industrial Enzymology**. 2nd ed. Macmillan Publishers Ltd., London

Gaál, Ö., G.A. Medgyesi and L. Vereczkey. 1980. **Electrophoresis in the Separation of Biological Macromolecules.** Akadémiai Kiadó. Budapest.

Gallagher, W. 2005. **FTIR analysis of protein structure.** Available Source: http://download.bioon.com.cn/upload/201110/10233820_7954.pdf, December 20, 2012.

Gartner, L.P. and J.L. Hiatt. 2001. **Color Textbook of Histology.** 2nd ed. W.B. Saunders company, Philadelphia.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Godfrey, T. and S. West. 1996. **Industrial Enzymology.** Stockton Press, New York.

Guyonnet, V., F. Tluscik, P.L. Long, A. Polanowski and J. Travis. 1999. Purification and partial characterization of the pancreatic proteolytic enzymes trypsin, chymotrypsin and elastase from the chicken. **J. Chromatogr. A.** 852: 217-225.

Haxaire, K., Y. Maréchal, M. Milas and M. Rinaudo. 2003. Hydration of polysaccharide hyaluronan observed by IR spectrometry. I. Preliminary experiments and band assignments. **Biopolymers.** 72: 10-20.

Hodges, R.D. 1974. **The Histology of the Fowl**. Academic Press Inc., New York.

Hult, F.B. 1949. **Genetics of the Fowl**. McGraw-Hill Inc., New York.

Jacob, J. and T. Pescatore. n.d. **Chicken Anatomy and Physiology: Digestive System.** UK cooperative extension service. University of Kentucky-College of Agriculture.

Jamdar, S.N. and P. Harikumar. 2005. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. **Bioresource Technol.** 96: 1276-1284.

Jamadar, V.K., S.N. Jamdar, S.P. Dandekar and P. Harikumar. 2003. Purification and characterization of aminopeptidase from chicken intestine. **J. Food Sci.** 68(2): 438-443.

Jamroz, D., K. Jakobsen, J. Orda, J. Skorupinska and A. Wiliczkiewicz. 2001. Development of the gastrointestinal tract and digestibility of dietary fibre and amino acids in young chickens, ducks and geese fed diets with high amounts of barley. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.** 130(4): 643-652.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kadhim, K.K., A.B.Z. Zuki, M.M. Noordin, S.M.A. Babjee and M. Zamri-Saad. 2011. Activities of amylase, trypsin and chymotrypsin of pancreas and small intestinal contents in the red jungle fowl and broiler breed. **Afr. J. Biotechnol.** 10(1): 108-115.

Kakchi, K., M. Kinoshita and S.I. Yasueda. 2003. Hyaluronic acid: separation and biological implications. **J. Chromatogr. B.** 797: 347–355.

Kogan, G., L. Šoltés, R. Stern and P. Gemeiner. 2007. Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. **Biotechnol. Lett.** 29: 17-25.

Lago, G., L. Oruña, J.A. Cremata, C. Pérez, G. Coto, E. Lauzan and J.F. Kennedy. 2005. Isolation, purification and characterization of hyaluronan from human umbilical cord residues. **Carbohyd. Polym.** 62: 321-326.

Laurent, T.C. and J.R.E. Fraser. 1992. Hyaluronan. **The FASEB J**. 6: 2397-2404.

Laurent, T.C., U. B.G., Laurent and J.R.E. Fraser. 1995. Functions of hyaluronan. **Ann. Rheum. Dis**. 54: 429-432.

Laurent, T.C., U. B.G., Laurent and J.R.E. Fraser. 1996. The structure and function of hyaluronan: An overview. **Immunol. Cell Biol.** 74: A1-A7.

Lee, J. Y. and A.P. Spicer. 2000. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule. **Curr. Opin. Cell Biol.** 12: 581-586.

Liu, D.C., Y.K. Lin and M.T. Chen. 2001. Optimum condition of extracting collagen from chicken feet and its characteristics. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.** 14(11): 1638-1644.

Longas, M.O., K. Cheairs, M.M. Puchalski and J.I. Park. 2011. Reliability of fourier transform infrared spectroscopy in the characterization of human skin. **Adv. Biol. Chem.** 1: 24-28.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.

Mane, S., M. Damle, P. Harikumar, S. Jamdar and W. Gade. 2010. Purification and characterization of aminopeptidase N from chicken intestine with potential application in debittering. **Process Biochem.** 45: 1011-1016.

Mane, S., W. Gade and S. Jamdar. 2011. Purification and characterization of proline aminopeptidase from chicken intestine. **Process Biochem.** 46: 1384-1389.

Matarasso, S.L. 2004. Understanding and using hyaluronic acid. **Aesthetic. Surg. J.** 24: 361-364.

Matsuno, Y.K., N. Kakoi, M. Kinoshita, Y. Matsuzaki, J.I. Kumada and K. Kakehi. 2008. Electrophoresis studies on the contaminating glycosaminoglycans in commercially available hyaluronic acid products. **Electrophoresis**. 29: 3628-3635.

Meyer, K. and J.W. Palmer. 1934. The polysaccharide of the vitreous humor. **J. Biol. Chem.** 107: 629-634.

Mizuno, H., N. Iso, T. Saito, H. Ogawa, H. Sawairi and M. Saito. 1991. Characterization of hyaluronic acid of yellowfin tuna eyeball. **Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.** 57(3): 517-519.

Nakano, T. and J.S. Sim. 1989. Glycosaminoglycans from the rooster comb and wattle. **Poultry Sci.** 68: 1303-1306.

Nakano, T. and J.S. Sim. 1991. Chemical composition of glycosaminoglycan fractions from the comb and wattle of single comb White leghorn roosters. **Poultry Sci.** 70: 2524-2528.

Nakano, T., K. Nakano and J.S. Sim. 1994. A simple rapid method to estimate hyaluronic acid concentrations in rooster comb and wattle using cellulose acetate electrophoresis. **J. Agric. Food Chem.** 42: 2766-2768.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Necas, J., L. Bartosikova, P. Brauner and J. Kolar. 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. **Vet. Med-Czech.** 53(8): 397-411.

Neilands, J.B. and P.K. Stumpf. 1958. **Outlines of enzyme chemistry.** 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.

Price, R.D., M.G. Berry and H.A. Navsaria. 2007. Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. **J. Plast. Reconstr. Aes.** 60: 1110-1119.

Rathinaraj, K., P.Z. Sakhare, N.M. Sachindra and N.S. Mahendrakar. 2010. Effect of ensilaging and organic solvent treatment on activity of proteases from chicken intestine. **Food Bioprocess Tech.** 3: 783-788.

Rice, J.E., G.O. Hall and D.R. Marble. 1946. **Judging Poultry for Production**. 3rd ed. John Wiley & Sons Inc., New York.

Rosa, C.S., J. Rotta, P.L.M. Barreto and L.H. Beirão. 2007. Extraction, quantification and molar mass determination of hyaluronic acid extracted from chicken crest. **Alim. Nutr.** 18(3): 237-240.

Ruzin, S.E. 1999. **Plant Microtechnique and Microscopy.** Oxford University Press, New York.

Schiller, S. 1966. Connective and supporting tissues: Mucopolysaccharides of connective tissues. **Annu. Rev. Physiol.** 28: 137-158.

Servaty, R., J. Schiller, H. Binmdier and K. Arnold. 2001. Hydration of polymeric components of cartilage-an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. **J. Biol. Macrom.** 28: 121-127.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sittikulwitit, S., P.P. Sirichakwal, P. Puwastien, V. Chavasit and P. Sungpuag. 2004. In vitro bioavailability of calcium from chicken bone extract powder and its fortified products. **J. Food Compos. Anal.** 17: 321-329.

Sobti, R.C. 2008. **Animal Physiology**. Alpha Science International Ltd., Oxford.

Souza, A.A.G., I.P.G. Amaral, A.R.E. Santo, L.B.C. Jr. and R.S. Bezerra. 2007. Trypsin-like enzyme from intestine and pyloric caeca of spotted goatfish (*Pseudupeneus maculatus*). **Food Chem.** 100: 1429-1434.

Sturkie, P.D. 1965. **Avian Physiology.** 2nd ed. Comstock Publishing Associates, New York.

Sturkie, P.D. 1976. **Avian Physiology.** 3nd ed. Springer Verlag New York Inc., New York.

Swann, D.A. 1968. Studies on hyaluronic acid: 1. The preparation and properties of rooster comb hyaluronic acid. **Biochim. Biophys. Acta.** 156: 17-30.

Szewczyk, B. 1983. A sensitive staining method for detecting acidic polysaccharides in cellulose acetate and agarose gels. **Anal. Biochem.** 130: 60-64.

Szirmai, J.A. 1956. Studies on the connective tissue of the cock comb: I. Histochemical observations on the ground substance. **J. Histochem. Cytochem.** 4(2): 96-105.

Tomihata, K. and Y. Ikada. 1997. Preparation of cross-linked hyaluronic acid films of low water content. **Biomaterials.** 18: 189-195.

Tezel, A. and G.H. Fredrickson. 2008. The science of hyaluronic acid dermal fillers. **J. Cosmet. Laser Ther.** 10: 35-42.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Volpi, N. and F. Maccari. 2006. Electrophoretic approaches to the analysis of complex polysaccharides. **J. Chromatogr. B.** 834: 1-13.

Walsh, G. 2002. **Proteins Biochemistry and Biotechnology.** John Wiley & Sons Ltd., Chicheter.

Wegrowski, Y. and F.-X. Maquart. 2001. Cellulose acetate electrophoresis of glycosaminoglycans, pp. 175-179. *In* R.V. Lozzo., ed. **Proteoglycans protocols.** Humana Press Inc., New Jersey.

Whitaker, J.R. 1994. **Principles of Enzymology for The Food Science**. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Young, B. and J.W. Health. 2000. **wheater's Functional Histology : A Text and Colour Atlas.** 4th ed. Harcourt Publishers Limited, Churchill.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในหงอนไก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหงอนไก่ (AOAC, 2000)

1. วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (วิธีอบโดยตรง)

1.1 วิธีวิเคราะห์

1.1.1 ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-3 กรัม (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) ในถ้วยอลูมิเนียมที่มีฝาปิด ซึ่งอบที่ 105 องศาเซลเซียส ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนแล้ว

1.1.2 อบตัวอย่างให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง

1.1.3 ปิดฝา แล้วนำออกมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น จนถึงอุณหภูมิห้อง แล้วชั่งน้ำหนัก

1.1.4 นำไปอบซ้ำอีกครั้ง ครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ 2 ครั้งติดต่อกัน ต่างกันไม่มากกว่า 0.001 กรัม แล้วนำไปคำนวณดังสมการที่ 2

1.2 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้นของตัวอย่าง (เปอร์เซ็นต์)} = 100 \times \frac{w}{W} \qquad (2)$$

w = น้ำหนักของตัวอย่างที่หายไป (กรัม)
W = น้ำหนักของตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)

2. วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (วิธีเคลดาล)

2.1 สารเคมี

2.1.1 คอปเปอร์ซัลเฟต
2.1.2 โปแตสเซียมซัลเฟต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.3 กรดซัลฟูริกเข้มข้น

2.1.4 สารละลายกรดบอริก ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมโดยใช้น้ำร้อน)

2.1.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์

2.1.6 กรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

2.1.7 มิกซ์ อินดิเคเตอร์

2.2 การ standardize สารละลายกรดซัลฟูริกมาตรฐาน ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล

2.2.1 ชั่งแอนไฮดรัส โซเดียมคาร์บอเนต ประมาณ 5 กรัม ใส่ในโกร่ง แล้วบดให้ละเอียด แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 200 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น

2.2.2 ชั่งแอนไฮดรัส โซเดียมคาร์บอเนต ที่อบแล้วมา 0.13 กรัม อย่างละเอียด ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร แล้วหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วนำไปไทเทรทกับกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู ให้จดเป็นปริมาตร A_1

2.2.3 นำสารละลายไปต้มจนเดือด (ใช้เวลาประมาณ 2-3 นาที) สารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปไทเทรทกับกรดซัลฟูริก จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอีกครั้ง จดปริมาตรเป็น A_2 แล้วนำไปคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายกรดซัลฟูริก ดังสมการที่ 3

$$\text{ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริก (โมลาร์)} = \frac{2000 \times \text{น้ำหนักของโซเดียมคาร์บอเนต (กรัม)}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของโซเดียมคาร์บอเนต} \times (A_1 + A_2)} \qquad (3)$$

2.3 วิธีวิเคราะห์

2.3.1 ชั่งตัวอย่าง 0.5-1 กรัม ลงในหลอดย่อยโปรตีน (เคดาลฟลาสค์)

2.3.2 ใส่ตัวเร่งปฏิกิริยา คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม โปแตสเซียมซัลเฟต 9.5 กรัม และเติมกรดซัลฟูริก 20 มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.3 นำไปย่อยบนเตาไฟฟ้า ที่ต่ออยู่กับชุดดักจับไอกรด ให้ความร้อนจนสารละลายตัวอย่างไม่มีฟอง และสารละลายใส ทิ้งให้เย็น (< 25 องศาเซลเซียส) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ลงในแต่ละหลอด แล้วนำไปกลั่น

2.3.4 นำขวดรูปชมพู่ ซึ่งบรรจุ กรดบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ไปตั้งที่ตำแหน่งรองรับของเครื่องกลั่น และใส่หลอดย่อยเข้ากับเครื่องกลั่น ใช้เวลาในการกลั่น 2-3 นาที หรือให้มีปริมาตรเพิ่มขึ้น 100 มิลลิลิตร

2.3.5 นำขวดรูปชมพู่รองรับ มาหยดมิกซ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด แล้วนำไปไทเทรทกับกรดซัลฟูริก ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล จนได้สีเทา จดปริมาตร แล้วนำไปคำนวณในสมการที่ 4, 5

2.4 วิธีคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน} = ((T-B) \times 14.007 \times 100 \times N) / w \quad (4)$$

$$\% \text{ โปรตีน (น้ำหนักเปียก)} = \% \text{ ไนโตรเจน} \times 6.25 \quad (5)$$

T = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรทตัวอย่าง (มิลลิลิตร)
B = ปริมาตรของกรดซัลฟูริกมาตรฐานที่ใช้ในการไทเทรทแบลงค์ (มิลลิลิตร)
N = ความเข้มข้นของกรดซัลฟูริกมาตรฐาน
w = น้ำหนักของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

3. วิเคราะห์ปริมาณไขมัน (ซอกเท็กซ์)

3.1 สารเคมี

3.1.1 ปิโตรเลียมอีเธอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 วิธีวิเคราะห์

3.2.1 ชั่งตัวอย่างที่อบจนแห้ง และบดเป็นเนื้อเดียวกันบนกระดาษกรอง ประมาณ 3-4 กรัม (ทราบน้ำหนักแน่นอน) แล้วใส่ลงใน thimble จากนั้นนำไปใส่ใน thimble holder แล้วนำเข้าเครื่องสกัด

3.2.2 ชั่งน้ำหนัก extraction cups ที่ผ่านการอบแห้งแล้ว แล้วเติมปิโตรเลียมอีเธอร์ ประมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปใส่ใน extraction cups holder แล้วนำไปใส่ในเครื่องสกัด

3.2.3 เริ่มสกัด โดยใช้เวลาสกัด 20 นาที แล้วทำการ rinsing นาน 10 นาที เมื่อครบตามเวลา ทำการ evaporation เพื่อกำจัดปิโตรเลียมอีเธอร์

3.2.4 นำ extraction cups ที่มีไขมันจากตัวอย่าง ไปอบไล่ตัวทำละลายให้หมด แล้วนำมาทำให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นนำมาชั่งน้ำหนัก แล้วนำไปคำนวณในสมการที่ 6

3.3 วิธีคำนวณ

$$\text{น้ำมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100 \qquad (6)$$

W_1 = น้ำหนักตัวอย่างที่อบแห้งแล้ว (กรัม)
W_2 = น้ำหนัก extraction cups เปล่า ซึ่งอบแห้งแล้ว (กรัม)
W_3 = น้ำหนัก extraction cups ที่มีน้ำมันจากตัวอย่าง (กรัม)

4. วิเคราะห์ปริมาณเถ้า

4.1 วิธีวิเคราะห์

4.1.1 ชั่งตัวอย่าง 3-5 กรัม ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่เผาและชั่งน้ำหนักแล้ว ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน แล้วนำไปเผาด้วยไฟอ่อนจนหมดควัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.1.2 นำมาเผาในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส จนได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา ประมาณ 2-3 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่โถดูดความชื้น ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปชั่ง

4.1.3 เผาตัวอย่างซ้ำนานครั้งละ 30 นาที จนกระทั่งผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ 2 ครั้ง ติดต่อกัน ต่างกันไม่เกิน 0.001 กรัม แล้วนำไปคำนวณในสมการที่ 7

4.2 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = 100 \times \frac{(W_2 - W)}{(W_1 - W)} \qquad (7)$$

W = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบ (กรัม)
W_1 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างก่อนเผา (กรัม)
W_2 = น้ำหนักของถ้วยกระเบื้องเคลือบและตัวอย่างหลังจากเผา (กรัม)

5. วิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรต

หักลบจาก 100 เปอร์เซ็นต์ ดังสมการที่ 8

คาร์โบไฮเดรต (เปอร์เซ็นต์) = 100 – (% โปรตีน + % ไขมัน + % ความชื้น + % เถ้า) (8)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดไฮยาลูโรนิก

วิเคราะห์ในรูปกรดยูโรนิก โดยใช้วิธีคาร์บาโซล (ดัดแปลงจาก Bitter and Muir, 1962)

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารละลายโซเดียม เตตระบอเรต ความเข้มข้น 0.025 โมลาร์ ในกรดซัลฟูริกเข้มข้น เตรียมโดยชั่งโซเดียม เตตระบอเรต 0.953 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น ทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้เกิดการละลายอย่างสมบูรณ์ แล้วปรับปริมาตรด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้นในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร (เตรียมล่วงหน้า 1 วัน ก่อนใช้)

1.1.2 สารละลายคาร์บาโซล ความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ เตรียมโดยชั่งคาร์บาโซล 0.125 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (เอธทานอล) แล้วปรับปริมาตรด้วยแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายมาตรฐานดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

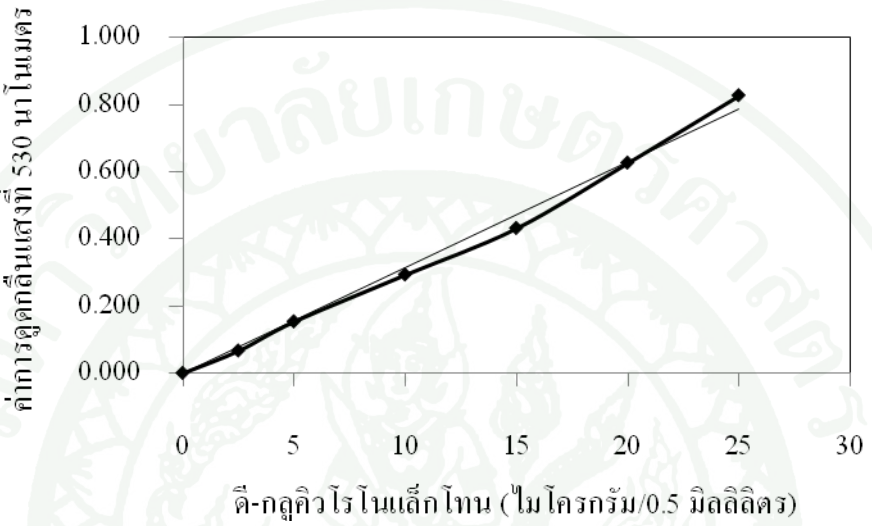
2.2 วิธีวิเคราะห์

เติมสารละลายโซเดียม เตตระบอเรต ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ซึ่งบรรจุอยู่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน หรือสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าของสารละลายอย่างระมัดระวัง ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำออกมาผสมด้วยเครื่องผสมสารอย่างรวดเร็ว เพื่อให้สารเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็ง เมื่อสารละลายเย็นลง เติมสารละลายคาร์บาโซล 0.1 มิลลิลิตร บนผิวหน้า และผสมด้วยเครื่องผสมสารทันที แล้วนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส อีกครั้ง เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วนำมาแช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 นาโนเมตร (ใช้ ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน เป็นสารมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การสร้างกราฟมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน

เตรียมสารละลาย ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน ความเข้มข้นเริ่มต้น 50 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานของ ดี-กลูคิวโรโนแล็กโทน $y = 0.0315x$ และ $R^2 = 0.9930$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ค่ากิจกรรม และปริมาณโปรตีน ของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส
จากไส้ และตับอ่อนของไก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส (ดัดแปลงจาก Cupp-Enyard, 2008)

1.1 สารเคมี

1.1.1 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

1.1.2 ไกลซีนบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

1.1.3 สารละลายเคซีน ความเข้มข้น 0.65 เปอร์เซ็นต์ (ละลายในบัฟเฟอร์ โดยให้ความร้อนบัฟเฟอร์จนมีอุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส แล้วค่อยๆ เติมเคซีน เมื่ออุณหภูมิถึง 80 องศาเซลเซียส เริ่มจับเวลา 10 นาที ควรคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 85 องศาเซลเซียส)

1.1.4 สารละลายกรดไตรคลอโรอะซีติก ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์

1.1.5 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ (ใช้โซเดียมคาร์บอเนต แอนไฮดรัส)

1.1.6 สารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์

1.1.7 สารละลายไทโรซีน ความเข้มข้น 1.1 มิลลิโมลาร์

1.2 วิธีวิเคราะห์

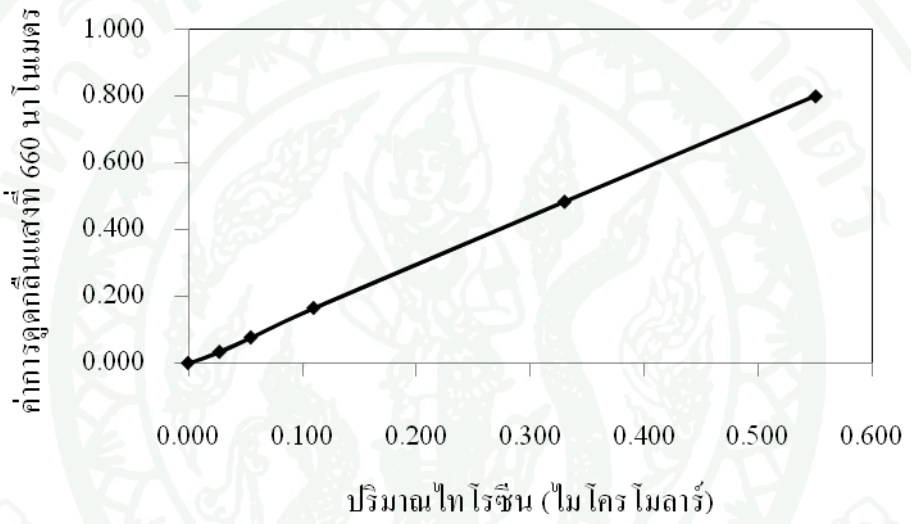
การวิเคราะห์กิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส ทำโดยใช้สารละลายเคซีนเป็นสารตั้งต้น โดยเติมเคซีน หลอดละ 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ (ละลายเอนไซม์ผง 5 มิลลิกรัม ในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 มิลลิลิตร) หลอดละ 1 มิลลิลิตร (ยกเว้นหลอดแบลงค์) บ่มเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมกรดไตรคลอโรอะซีติก ทุกหลอดหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายเอนไซม์ในหลอดแบลงค์เพื่อให้ทุกหลอดมีปริมาตรเท่ากัน และบ่มสารละลายทั้งหมดต่อไปอีก 30 นาที เมื่อครบตามเวลานำมากรองด้วยกระดาษกรอง เบอร์ 4 และดูดส่วนใสมาหลอดละ 2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต หลอดละ 5 มิลลิลิตร และเติมสารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล หลอดละ 1 มิลลิลิตร ทันที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อครบตามเวลา ทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (ใช้ไทโรซีน เป็นสารมาตรฐาน)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนทำตามวิธีข้างต้น แต่มีการเติม ซีสเตอีน ไฮโดรคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ และกรดเอทธิลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก (EDTA) ความเข้มข้น 0.005โมลาร์ เพิ่มลงไป โดยวิเคราะห์ที่ พีเอช 6.5, 65 องศาเซลเซียส

2. การสร้างกราฟสารมาตรฐานไทโรซีน

เตรียมสารละลายไทโรซีนความเข้มข้นเริ่มต้น 1.1 มิลลิโมลาร์



ภาพผนวกที่ ค1 กราฟมาตรฐานของไทโรซีน $y = 1.4599x$ และ $R^2 = 0.9998$

3. การคำนวณกิจกรรมเอนไซม์

นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน จะได้ปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น ในหน่วยไมโครโมลาร์ (X_1) และแทนค่าในสมการที่ 9 จะได้กิจกรรมเอนไซม์ ในหน่วยยูนิต/มิลลิลิตร เอนไซม์ (X_2)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/มิลลิลิตร) = $\frac{X_1 \times 11}{1 \times 10 \times 2}$ (9)

X_1 = ปริมาณไทโรซีน (ไมโครโมล)

11 = ปริมาณสารทั้งหมด (มิลลิลิตร)

1 = ปริมาณเอนไซม์ (มิลลิลิตร)

10 = เวลาในการทำปฏิกิริยา (นาที)

2 = ปริมาณสารละลายที่ใช้ในการวัดค่าการดูดกลืนแสง (มิลลิลิตร)

จากนั้นนำค่า X_2 คูณด้วย ปริมาณบัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร) ที่ใช้ในการเจือจางเอนไซม์ จะได้ค่ากิจกรรมในหน่วย ยูนิต จากนั้นคิดให้อยู่ในหน่วย ยูนิต/มิลลิกรัม เอนไซม์ผงแห้ง โดยเทียบจากปริมาณเอนไซม์ที่ใช้เริ่มต้น (มิลลิกรัม)

การคิดกิจกรรมเอนไซม์สัมพัทธ์ คำนวณโดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุด มีค่าเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และคิดค่าอื่นเทียบจาก 100

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Lowry *et al*., **1951)**

4.1 สารเคมี

4.1.1 complex-forming reagent: เตรียมก่อนใช้ทันที

สารละลาย A = โซเดียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น

สารละลาย B = คอบเปอร์ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น

สารละลาย C = โซเดียม โพแทสเซียม ทาร์เทรต ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น

4.1.2 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2 นอร์มัล

4.1.3 สารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

4.1.4 สารละลายมาตรฐานโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

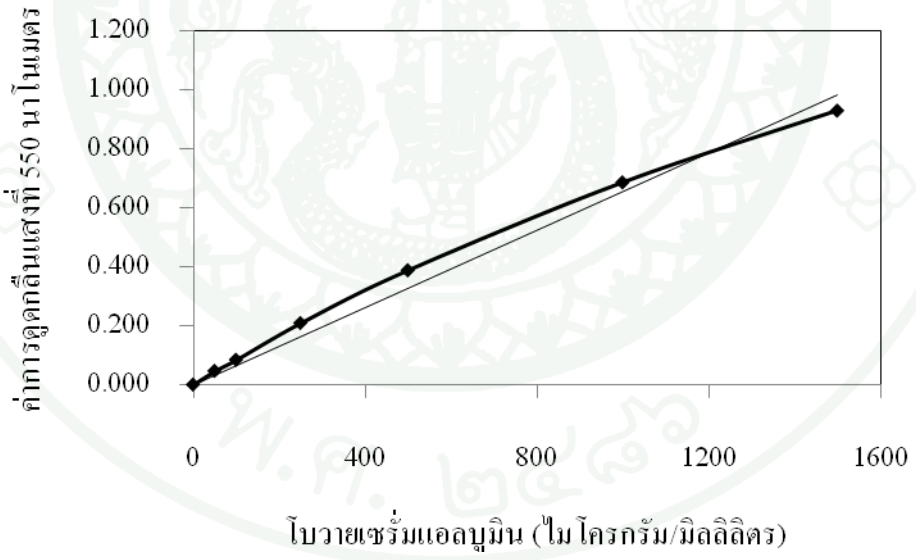
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 วิธีวิเคราะห์

ดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายมาตรฐานมา 0.3 มิลลิลิตร แล้วเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทำให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม complex-forming reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที สุดท้ายเติมสารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที (แต่ไม่เกิน 60 นาที) และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (ความเข้มข้นของสารละลายอยู่ในช่วง 100-2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ใช้โบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน เป็นสารมาตรฐาน)

5. การสร้างกราฟมาตรฐานของ โบวายซีรั่มแอลบูมิน

เตรียมสารละลายโบไวน์ซีรั่มอัลบูมิน ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ ค2 กราฟมาตรฐานของโบวายเซรั่มแอลบูมิน $y = 0.0007x$ และ $R^2 = 0.9867$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์กรดไฮยาลูโรนิก เทียบกับสารมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. อิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate electrophoresis) (Nakano *et al*., 1994)

1.1 สารเคมี

1.1.1 บัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 (ไพริดีน:กรดอะซีติก:น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:9:115)

1.1.2 สารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์

1.1.3 สารละลายกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยสารละลายโซเดียม เอไซด์ ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์

1.1.4 สารละลายแอลเชียน บลู 8 จีเอ็กซ์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (เตรียมโดยใช้สารละลายในข้อ 1.1.3)

1.1.5 สารละลายมาตรฐานกรดไฮยาลูโรนิก

1.2 วิธีวิเคราะห์

อิเล็กโตรโฟรีซีสแบบเซลลูโลสอะซิเตท ทำโดยดัดแปลงวิธีจาก Nakano *et al*. (1994) เริ่มต้นจากการแช่แผ่นเซลลูโลสอะซิเตท (Titan III, 60 x 76 mm, Helena Laboratories) ในบัฟเฟอร์ พีเอช 3.5 อย่างน้อย 30 นาที และรินบัฟเฟอร์ลงในแชมเบอร์ จากนั้นบรรจุตัวอย่าง และสารมาตรฐานลงในช่องบรรจุสารละลาย กดแอพพลิเคเตอร์ลงในช่องบรรจุสาร และนำมากดบนแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท แล้วนำแผ่นตัวกลางมาวางพาดใน แชมเบอร์ เปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า 150 โวลต์ นาน 45 นาที นำแผ่นเซลลูโลสอะซิเตท มาย้อมสีด้วยสารละลายแอลเชียน บลู 8 จีเอ็กซ์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในกรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ประกอบด้วยโซเดียม เอไซด์ ความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 5 นาที และล้างสีย้อมด้วย กรดอะซีติก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ นาน 2 นาที และอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรสโคปี

2.1 สารเคมี

2.1.1 เอธทานอลบริสุทธิ์

2.2 วิธีวิเคราะห์

2.2.1 หยดสารละลายมาตรฐาน หรือสารละลายตัวอย่าง ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงบนแผ่นแบเรียมฟลูออไรด์ (BaF_2) แล้วเป่าให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลม ทำซ้ำแบบเดิมประมาณ 3 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างเข้มข้นขึ้น จากนั้นประกบด้วยแผ่นแบเรียมฟลูออไรด์ อีกแผ่นหนึ่ง

2.2.2 วัดค่า transmittance ด้วยเครื่องฟูเรียทรานสฟอร์มอินฟราเรด สเปกโตรมิเตอร์ ในโหมด ATR ช่วง Mid-IR (Wavenumber 4000-800 cm^{-1})

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นางสาวพิมพ์พร ศรีสันติแสง

เกิดวันที่ 11 ธันวาคม 2529

สถานที่เกิด กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา วท.บ. (วิศวกรรมอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตำแหน่งหน้าที่การงานในปัจจุบัน -

สถานที่ทำงานปัจจุบัน -

ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ -

ทุนการศึกษาที่ได้รับ ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ฝ่ายอุตสาหกรรมในโครงการ IRPUS ประจำปี 2551 ในหัวข้อเทคนิควิจัยเรื่อง เครื่องดื่มจากเวย์โปรตีน (Whey Protein Beverage)

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ในโครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ประจำปี 2553 ในหัวข้อวิทยานิพนธ์เรื่อง การสกัดกรดไฮยาลูโรนิกจากหงอนไก่ ด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ จากไส้และตับอ่อนของไก่ (Extraction of Hyaluronic Acid from Chicken Comb by Crude Enzyme Extract from Chicken Intestine and Pancreas)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์