บทที่ 1
ความเป็นมาและความสำคัญ

สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนพบในพืชหลายชนิด ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ และสัตว์ โดยเฉพาะเมล็ดพืชตระกูลถั่ว มันฝรั่ง และธัญพืชชนิดต่าง ๆ พบสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนปริมาณสูง ปริมาณของสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนในพืชแต่ละชนิดขึ้นอยู่กับความหลากหลายของพันธุ์และคุณลักษณะทางสรีรวิทยาของพืช รวมทั้งระดับความเสียหายจากการทำลายของแมลง (Richardson, 1977; Benjakul *et al*., 2000) สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สำคัญที่พบในพืชต่าง ๆ เช่น สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน สารยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซิน สารยับยั้งเอนไซม์ซีสเตอีนโปรติเนส สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถสกัด ทำบริสุทธิ์ และศึกษาคุณลักษณะจากพืชและเมล็ดพืชตระกูลถั่วและธัญพืชหลายชนิด เช่น ข้าวสาลี เมล็ดข้าวโพด ข้าวไรน์ (Whitaker and Sgarbieri, 1981), pigeon pea (Godbole *et al*., 1994), terary bean (Campos *et al*., 1997), black gram (Padhye and Salunkhe, 1991, red kidney bean (Wu and Whitaker, 1990), soybean (Liu and Markakis, 1991), cowpea, bambara groundnuts (Benjakul *et al*., 2000) และถั่วอะซูกิ (Klomklao *et al*., 2010) การมีสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว ธัญพืชหรือพืชชนิดต่าง ๆ มีผลกระทบทางด้านคุณค่าทางโภชนาการสำหรับผู้บริโภคทั้งมนุษย์และสัตว์ โดยพบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเนสชนิดซีรีนจากตับอ่อนและลำไส้เล็กได้ (Misra *et al*., 1987) เป็นต้น นอกจากนี้เมล็ดพืชตระกูลถั่วและธัญพืชถูกนำมาใช้เป็นแหล่งอาหารสัตว์หลายชนิด การมีสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนในเมล็ดพืชตระกูลถั่วและธัญพืชจึงมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของสัตว์อีกด้วย อย่างไรก็ตามสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถสกัดนำมาใช้ประโยชน์เป็นสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงคุณภาพของอาหารในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ ได้ โดยเฉพาะควบคุมการย่อยสลายโปรตีน เช่น ในกระบวนการผลิตซูริมิ สารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนถูกนำมาใช้เป็นสารเติมแต่งเพื่อควบคุมการย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อปลาเพื่อให้ได้คุณลักษณะของเจลซูริมิที่มีความแข็งแรงมากขึ้น (Benjakul *et al*., 2000)

ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวพันธุ์พื้นเมืองชนิดหนึ่งของจังหวัดพัทลุง ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางอาหาร ซึ่งเป็นข้าวที่มีลักษณะแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น คือ ข้าวสารหรือข้าวกล้องมีเยื่อหุ้มเมล็ดสีขาวปนสีแดงจาง ๆ จนถึงสีแดงเข้มในเมล็ดเดียวกัน ข้าวสังข์หยดมีโปรตีนสูง วิตามินสูง โดยเฉพาะไนอาซีน ดังนั้นข้าวสังข์หยดจึงเป็นแหล่งรายได้ที่สำคัญของเกษตรกรของประเทศไทย อย่างไรก็ตามจากการศึกษาวิจัยเบื้องต้นพบว่า ข้าวสังข์หยดมีสารยับยั้งเอนไซม์ย่อย

โปรตีนในปริมาณสูงโดยเฉพาะสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งมีผลกระทบหลักในแง่ของคุณค่าทางโภชนาการโดยมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพอัตราการย่อยสลายโปรตีนของผู้บริโภค และการมีสารยับยั้งในปริมาณสูงในข้าวสังข์หยดจึงสามารถนำมาสกัดและใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมได้ เช่น การผลิตซูริมิเพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเจล อย่างไรก็ตามยังไม่ข้อมูลเกี่ยวกับผลของสารสกัด การทำบริสุทธิ์บางส่วน และคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนในข้าวสังข์หยด ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งศึกษาถึงการสกัด การทำบริสุทธิ์บางส่วน และจำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉพาะสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในข้าวสังข์หยดที่เพาะปลูกในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในข้าวสังข์หยดเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้สามารถนำมาใช้ประโยชน์หรือนำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารซึ่งจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของข้าวสังข์หยด และผลิตภัณฑ์อาหารอื่น ๆ ที่นำสารยับยั้งไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งเป็นการลดการนำเข้าสารยับยั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น โปรตีนหางนม และสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลือง ซึ่งมีราคาสูง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสารสกัดและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด
2. ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด
3. จำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากข้าวสังข์หยด

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้าวสังข์หยด

ข้าวสังข์หยด เป็นข้าวพื้นเมืองชนิดหนึ่งของจังหวัดพัทลุง ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ข้าวสังข์หยดเป็นข้าวที่ไวต่อช่วงแสง ปลูกมากในพื้นที่อำเภอเมืองพัทลุง อำเภอเขาชัยสน อำเภอควนขนุน และอำเภอป่าพะยอม จังหวัดพัทลุง ปลูกได้เฉพาะนาปี ซึ่งจะปลูกต้นเดือนสิงหาคม และข้าวจะออกดอกประมาณเดือนมกราคม และเก็บเกี่ยวได้ในเดือนกุมภาพันธ์ ต้นข้าวจะมีความสูงประมาณ 140 ซม. มีการแตกกอเฉลี่ย 8 ต้น/กอ และให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ

ข้าวสังข์หยด มีลักษณะเด่นแตกต่างจากข้าวพันธุ์อื่น ๆ คือ

- เยื่อหุ้มเมล็ดมีสีขาวปนสีแดงจาง ๆ จนถึง แดงเข้มในเมล็ดเดียวกัน
- เมื่อหุงสุกแล้วจะมีลักษณะเข้ม รสชาติอร่อย ย่อยง่าย
- คุณค่าทางอาหารสูง

สำหรับผู้ที่ไม่เคยบริโภคมาก่อน เวลาหุงควรผสมกับข้าวสารที่รับประทานอยู่เป็นประจำในอัตราส่วน 1 : 4 หุงตามปกติ และค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

คุณสมบัติของเมล็ดข้าวทางกายภาพ เปลือกเมล็ดมีสีฟาง ข้าวกล้อง ข้าวสารมีสีขาวปนแดง เมล็ดเรียว ยาว 6.5 มิลลิเมตร กว้าง 1.9 มิลลิเมตร เมล็ดข้าว 100 เมล็ด หนัก 1.98 กรัม คุณภาพการสีดี คุณสมบัติทางเคมี มีปริมาณแอมิโลสร้อยละ 13.8 ถือว่าต่ำที่สุดในบรรดาข้าวพื้นเมือง ซึ่งมีผลทำให้คุณสมบัติของข้าว เมื่อหุงสุกมีความอ่อนนุ่ม ค่อนข้างเหนียว ทำให้ย่อยง่าย เหมาะกับผู้สูงอายุ และผู้ที่ไม่ใช้แรงงานหนัก

คุณค่าทางโภชนาการ ต่อน้ำหนักข้าว 100 กรัม มีโปรตีน 6.2 กรัม เท่ากับข้าวหอมมะลิ ไขมัน 3.3 กรัม แคลเซียม 65 มิลลิกรัม วิตามินบี 10.037 มิลลิกรัม วิตามินบี 20.96 มิลลิกรัม และไนอะซิน 2.2 มิลลิกรัม

ข้าวกล้อง (Brown rice) คือ ข้าวเปลือกที่ผ่านการขัดสีแค่ครั้งเดียวเพื่อเอาเปลือกออก (แกลบ) โดยที่ยังมีจมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าว (รำ) อยู่ ข้าวที่ได้จึงมีสีน้ำตาลขุ่น จมูกข้าวและเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวนี้เป็นส่วนที่อุดมด้วยวิตามิน แร่ธาตุ และเส้นใยอาหาร จึงเป็นประโยชน์ต่อร่างกายมากกว่าข้าวขัดขาว เมื่อหุงจะมีกลิ่นหอมมาก แต่เนื้อสัมผัสนุ่มนวลสู้ข้าวขาวไม่ได้ ฉะนั้นสำหรับผู้ที่ไม่คุ้นเคยแนะนำให้หุงข้าวกล้องผสมกับข้าวขาวแล้วค่อย ๆ ลดปริมาณข้าวขาวลง

ข้าวซ้อมมือ (Coarse rice) เป็นชื่อเรียกข้าวที่เอาเปลือกออกโดยการตำ ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในสมัยโบราณ ชาวบ้านโดยทั่วไปจะใช้วิธีตำข้าวกินกันเองจึงเรียกข้าวที่ตำว่า “ข้าวซ้อมมือ” เริ่มจากการนำข้าวเปลือกมาสีเอาเปลือกออก จากนั้นนำมาตำเพื่อขจัดเยื่อหุ้มเมล็ดข้าวออกไปบางส่วน แล้วใช้กระด้งฝัดแยกเปลือกและรำออกข้าวซ้อมมือหุงง่ายและเมื่อสุกจะนุ่มกว่าข้าวกล้อง

2. โปรติเอส (Protease)

เอนไซม์โปรติเอส คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ (Simpson, 2000) เอนไซม์โปรติเอสมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ อุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมอื่น ๆ (Klomklao *et al*., 2006) เอนไซม์โปรติเอสที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนจากถั่วเหลือง การทำซีอิ๊ว (รัชนี ตัณฑะพานิชกุล, 2537) นอกจากนี้จะใช้เติมลงไประหว่างการผลิตเบียร์ จะช่วยให้เบียร์ทนต่อความเย็น ที่เรียกว่า chill proofing และจะไม่ทำให้เกิดความขุ่นที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโปรตีนกับแทนนินและเอนไซม์โปรติเอสยังใช้เป็นสารช่วยทำให้สารละลายใส (clarification) ได้ด้วย นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ยังใช้เอนไซม์โปรติเอสเป็นสารทำให้เนื้อนุ่ม (tenderiser) ลดความเหนียวของเนื้อสัตว์ทำให้เคี้ยวได้ง่ายขึ้น (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549)

เอนไซม์โปรติเอส (protease) หรือ เปปติเดส (peptidase) เป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการแยกสลายพันธะเปปไทด์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ (Reed, 1988)

1. เอนโดเปปติเดส (Endopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่แยกสลายพันธะเปปไทด์ภายในโซ่โมเลกุลโปรตีนได้เป็นสารประกอบเปปไทด์โซ่สั้น ๆ หรือบางครั้งเรียกว่า โปรตีเนส (Proteinase)

2. เอกโซเปปติเดส (Exopeptidase) เป็นเอนไซม์ที่สลายพันธะเปปไทด์ด้านปลายโซ่ของโมเลกุล ถ้าเป็นการสลายพันธะทางปลายด้านหมู่อะมิโนก็จะเรียกว่า อะมิโนเปปติเดส ขณะที่การสลายพันธะทางปลายหมู่คาร์บอกซิล จะเรียกว่า คาร์บอกซิเปปติเดส

การจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรติเอส

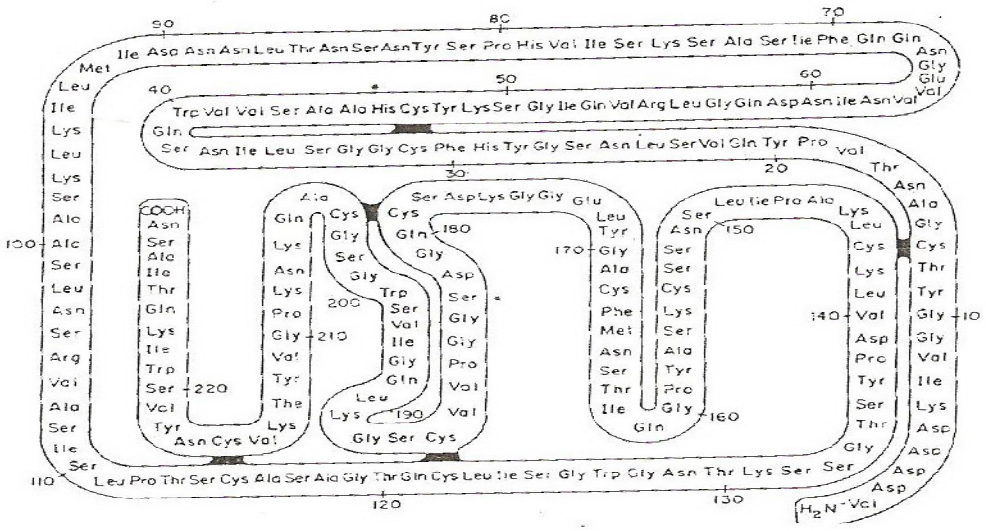
การจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเนสกระทำได้โดยการพิจารณาจากหมู่ที่เร่งปฏิกิริยาใน active site ของเอนไซม์ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 4 ประเภท (Bond and Butle, 1987)

1. โปรตีเอสชนิดซีรีน (Serine protease, Alkaline protease)
2. โปรตีเอสชนิดซีสเตอีน (Cysteine protease, Sulhydril protease, Thiol protease)
3. โปรตีเอสชนิดแอสปาร์ติก (Aspartic protease, Acid protease)
4. โปรตีเอสชนิดเมทัลโล (Metallo protease)

3. เอนไซม์ทริปซิน

เอนไซม์ทริปซิน (EC 3.4.21.4) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความจำเพาะในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของโปรตีนและเปปไทด์ที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโนอาร์จีนีนและไลซีน ส่วนใหญ่จะมีบทบาทในกระบวนการทางชีววิทยาซึ่งประกอบด้วยกระบวนการย่อย การกระตุ้นของไซโมเจนของไคโมทริปซินและเอนไซม์อื่นๆ (Kim *et al*., 1992; Kim *et al*., 1994)

นอกจากนี้เอนไซม์ทริปซินยังเป็นเอนไซม์ไฮโดรไลติกชนิดหนึ่งซึ่งเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของพันธะเปปไทด์ในสภาพที่ไม่ทำงานเอนไซม์ทริปซินจะอยู่ในรูปทริปซิโนเจน (trypsinogen) โดยที่โครงสร้างปฐมภูมิของโบวีนทริปซิโนเจนประกอบด้วยเปปไทด์สายเดี่ยวที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 229 ตัวซึ่งจับกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 5 พันธะ (ภาพที่ 1) เอนไซม์ในสภาพไม่ทำงานสามารถทำให้อยู่ในสภาพที่พร้อมทำงานโดยอาศัยเอนไซม์ enterokinase (Boyer,1971) enterokinase เป็นสารที่ถูกหลั่งหรือถูกปลดปล่อยจากเซลล์ของเยื่อเมือก (mucus membrane) ของลำไส้เล็ก มีหน้าที่ตัดเฮกซะเปปไทด์ (HZN - Val - Asp - Lsy - COOH) จากทริปซิโนเจน พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเร่งกิจกรรมการทำงานของทริปซิโนเจนอยู่ระหว่าง 7.0 - 9.0 ทริปซินไม่คงตัวที่พีเอชประมาณ 2.0 – 3.0



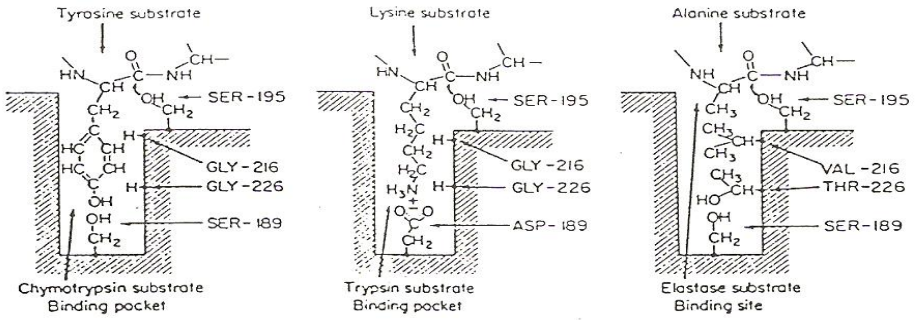
ภาพที่ 1 โครงสร้างปฐมภูมิของโบวีนทริปซิโนเจน

ที่มา : Boyer (1971)

คุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซิน

เอนไซม์ทริปซินเป็นเอนไซม์ชนิด เอนโดเปปซิเดส ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนแตกต่างกันไปตามแหล่งที่พบ โดยปกติเอนไซม์เหล่านี้ประกอบด้วยหมู่อิมิดาโซล (imidazole) และแอสปาร์ติลคาร์บอกซิล (aspartyl carboxyl group) ที่บริเวณเร่ง (active site) ลำดับของกรดอะมิโนใกล้กับหมู่ซีรีนและฮีสติดีนของเอนไซม์แต่ละชนิดมีลักษณะใกล้เคียงกันความจำเพาะของสับสเตรตจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเอนไซม์ เอนไซม์กลุ่มนี้จะเหมือนกันจะแตกต่างกันที่กลุ่มที่จำเพาะในการจับกับสับสเตรทที่แตกต่างกันซึ่งมีผลจำเพาะที่แตกต่างกัน สำหรับไคโมทริปซินและทริปซินประกอบด้วย binding pocket ที่มีลักษณะเปิดกว้างอันเป็นผลมาจาก Gly-216 และ Gly-226 ทำให้ side chain ของกรดอะมิโนสามารถเข้าไปใน binding pocket ได้ ความแตกต่างของทริปซินและไคโมทริปซิน คือ ทริปซินจะมี Asp-183 ที่บริเวณก้นของ pocket ส่วนไคโมทริปซินประกอบด้วย Ser-189 (ภาพที่ 2) (Whitaker, 1994)

จุดไอโซไอออนิกของโบวีนไซโมเจน (bovine zymogen) และพอซีนไซโมเจน (porcine zymogen) มีค่าเท่ากับ 9.3 และ 7.5 ตามลำดับในขณะที่จุดไอโซไอออนิกของทั้งทริปซินและพอซีนทริปซินมีค่าเท่ากัน คือ 10.8 ทริปซิโนเจนมีความคงตัวในสภาพกรด การเร่งปฏิกิริยาของทริปซินจะเกิดขึ้นในสภาวะพีเอชเป็นกลางหรือด่างโดยทริปซินจะมีความคงตัวที่พีเอชประมาณ 3 สามารถรักษากิจกรรมที่พีเอชนี้และอุณหภูมิต่ำได้นานเป็นสัปดาห์โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงและจะสูญเสียสภาพในสภาวะที่เป็นด่างสูง หรือตกตะกอนด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (TCA) หรือโดยยูเรียที่มีความเข้มข้นสูง ๆเอนไซม์เหล่านี้ถูกยับยั้งได้โดย diisopropylphosphorofluoridate ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮ ดรอกซิลของซีรีนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ (Boyer, 1971)



ภาพที่ 2 ลักษณะและตำแหน่งการจับตัวระหว่างสับสเตรทและเอนไซม์แอลฟาไคโมทริปซินและอิลาสเตส

ที่มา : Whitaker (1994)

แหล่งของเอนไซม์ทริปซิน

เอนไซม์ทริปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนพวกแรกที่สามารถแยกให้อยู่ในรูปบริสุทธิ์จากตับอ่อนของลูกวัว นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ เช่น คน หมู แกะ ไก่งวง นอกจากนี้ยังสามารถแยกได้จากปลาฉลาม กุ้งแม่น้ำ กุ้งตัวไหม และจาก *Streptomyces* 2 สายพันธุ์ (Boyer, 1971) นอกจากนี้สามารถพบได้ในพืชและแบคทีเรีย โดยเฉพาะในถั่วเหลือง (Kishimura *et al*., 2001)

การยับยั้งเอนไซม์

การยับยั้งเอนไซม์หรือการทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ดำเนินไปช้าลงหรือหยุดทำงานมีความสำคัญต่อการที่จะควบคุมอัตราเร็วของเมแทบอลิซึมในร่างกาย สารโมเลกุลเล็กที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท (Whitaker, 1994) คือ

1. ตัวยับยั้งแบบผันกลับไม่ได้ (Irreversible inhibitor) สารกลุ่มนี้จะจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะโควาเลนซ์ ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาและไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพที่เร่งปฏิกิริยาได้

2. ตัวยับยั้งแบบผันกลับได้ (Reversible inhibitor) มีอยู่ 2 ชนิดคือ

2.1 ตัวยับยั้งแบบแข่งขัน (Competitive inhibitor) มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับสับสเตรทจึงสามารถจับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ เช่นเดียวกับสับสเตรททำให้เกิดการแข่งขันระหว่างตัว

ยับยั้งกับสับสเตรทในการที่จะจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งเดียวกัน มีผลทำให้ค่า K_m ของสับสเตรทสูงกว่าที่เป็นจริง การเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทสามารถลดประสิทธิภาพการทำงานของตัวยับยั้งแบบแข่งขันได้

2.2 ตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) มีโครงสร้างไม่เหมือนกับสับสเตรทจึงสามารถจับกับเอนไซม์ได้ถึงแม้จะมีสับสเตรทจับอยู่ ทำให้เกิดทั้ง EI และ ESI complex (I = inhibitor) ซึ่งไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้ เนื่องจากตัวยับยั้งประเภทนี้ไม่ได้จับที่บริเวณเร่งของเอนไซม์จึงไม่มีผลต่อค่า K_m ของสับสเตรท แต่จะลดอัตราความเร็วสูงสุด (V_{max}) (Whitaker, 1994)

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสามารถได้รับผลจากปัจจัยทางกายภาพ (อุณหภูมิและพีเอช) การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างโมเลกุล (การสูญเสียสภาพของโมเลกุล) การแปรสภาพทางเคมี การแทนที่ของอนุมูลของกรดอะมิโนและการลดลงของพันธะไดซัลไฟด์ หรือเกิดจากการเชื่อมต่อกันอย่างจำเพาะกับโมเลกุลที่มีมวลโมเลกุลต่ำหรือสารยับยั้งจากธรรมชาติ (Boyer, 1971)

โดยทั่วไปแล้วสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่พบอยู่ในธรรมชาติจะมีลักษณะคล้ายคลึงกันโดยความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน แต่จะมีความแตกต่างกันที่สมบัติและองค์ประกอบทางชีวเคมี สารเหล่านี้มีมวลโมเลกุลต่ำ (6,000-8,000 ดาลตัน) และมีโครงสร้างตติยภูมิที่แน่นมาก เนื่องจากมีพันธะไดซัลไฟด์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีความคงตัวต่อการสูญเสียสภาพหรือมีความคงตัวต่อการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยโปรตีน สารยับยั้งเอนไซม์เหล่านี้นอกจากสามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินแล้วยังสามารถยับยั้ง ทรอมบิน ไคโมทริปซิน คาลลิเคอริน เป็นต้น (Boyer, 1971)

สารยับยั้งเอนไซม์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น *p*-aminebenzamidine และ benzamidine มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน โดยสารทั้งสองชนิดนี้มีลักษณะของ side-chain เหมือนกับของไลซีนและอาร์จินีน นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้ง เช่น alkyl และ arylquanidin, amidine และอนุพันธุ์ของ agmatine, benzoyl และ tosylarginine, aliphatic aromatic amine เป็นต้น (Boyer, 1971)

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากธัญพืชและพืชตระกูลถั่ว

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินเป็นสารประกอบพวกโปรตีนที่พบในเมล็ดถั่วหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นตัวลดการนำสารอาหารโปรตีนไปใช้ประโยชน์ (Maria and Valdemiro, 1997)

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินกระจายอยู่ในเมล็ดพืชตระกูลถั่วและเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี เมล็ดข้าวโพด และต้นอ่อนของข้าวไรน์ ลักษณะสำคัญของสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสจากพืชตระกูลถั่ว คือ มีมวลโมเลกุลประมาณ 8-25 กิโลดาลตัน สามารถยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินได้ในเวลาเดียวกัน ประกอบด้วย กรดแอสพาติก ซีรีนในปริมาณมาก ซีสเตอีนในปริมาณปานกลาง และวาลีน ลิวซีน ฟีนิลอะลานีน ไทโรซีน อาร์จินีนในปริมาณต่ำ สารเหล่านี้สามารถทนต่อความร้อนได้สูงโดยไม่เสียสภาพ (Whitaker and Sgarbieri, 1981)

ในพืชตระกูลถั่วและธัญพืชจะมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

Kunitz inhibitor เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 21,000 ดาลตัน มีความเฉพาะเจาะจงกับเอนไซม์ทริปซิน โดยรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 1:1

Bowman-Birk inhibitor เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 8,300 ดาลตัน ยับยั้งได้ทั้งเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซิน โดยรวมตัวกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนในอัตราส่วน 1:1:1

ในพืชตระกูลถั่วและธัญพืชทุกชนิดมีสารยับยั้งเป็น Bowman-Birk inhibitor ส่วน Kunitz inhibitor มีพันธะไดซัลไฟด์ 2 อัน ทนความร้อนได้น้อยกว่า Bowman-Birk inhibitor เนื่องจากมีพันธะไดซัลไฟด์ 7 อัน (นิธิยา รัตนาปนนท์, 2549)

สารยับยั้งชนิด Bowman-Birk สามารถพบได้ทั่วไปในเมล็ดพืชตระกูลถั่ว เช่นใน lima beans garden beans และใน adzuki beans บริเวณที่เกิดปฏิกิริยาของสารยับยั้งดังกล่าว อยู่ในตำแหน่ง homologus domain ของสายโซ่เปปไทด์ ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของถั่ว (Norioka *at el.*, 1982) Boisen (1983) ได้จำแนกเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากธัญพืชออกเป็น 6 ประเภท คือ

1. สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก endosperm ซึ่งมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 12,000-14,000
2. สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก Germ (Embryo) ซึ่งมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 14,000-17,000
3. สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก Germ ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 10,000
4. สารยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซิน และ microbial serine protease
5. สารยับยั้งเอนไซม์ Subtilism มีมวลโมเลกุลประมาณ 20,000
6. สารยับยั้งเอนไซม์ endogenous protease (EPI)

Carvalho และ Sgarbieri (1997) พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วมีความคงตัวต่อความร้อนที่พีเอชเป็นกลางและเป็นกรด และไม่คงตัวในสภาวะที่เป็นด่างสูง เมื่อให้ความร้อนเป็น

เวลา 20 นาทีที่พีเอช 12 สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ เมื่อนึ่งถั่วเมล็ดภายใต้ความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะสูญเสียกิจกรรมไปร้อยละ 75 เมื่อเพิ่มเวลาในการให้ความร้อนเป็น 20 นาที สูญเสียกิจกรรมไปร้อยละ 80

Cheung และคณะ (1997) กล่าวว่า องค์ประกอบของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินไม่ใช่โปรตีน มีอยู่ร้อยละ 21.2-55.8 ในถั่วเหลืองและร้อยละ 3.37-14.2 ในถั่วพูเทียบกับปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินทั้งหมด สารกลุ่มนี้เช่น สารให้สีน้ำตาลไฟเตท แทนนิน และเยื่อใย ซึ่งสามารถเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนให้กับสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

Ryan (1989) รายงานว่า เมื่อสารประกอบเชิงซ้อนของสารละลายเอนไซม์ทริปซินและตัวยับยั้งทำปฏิกิริยากับ β–mercaptoethanol ซึ่งเป็นสารรีดิวซ์ กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจะกลับคืนมาขึ้นทีละน้อยในระยะเวลา 1.5 ชั่วโมง กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจะกลับคืนมาร้อยละ 80 - 90 ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อพันธะไดซัลไฟด์ถูกรีดิวซ์ตัวยับยั้งจะสูญเสียโครงสร้างตติยภูมิทำให้ความสามารถในการยับยั้งโมเลกุลของเอนไซม์ทริปซินหมดไป

Whitaker และ Sgarbieri (1982) รายงานว่าการลดลงของพันธะไดซัลไฟต์ร้อยละ 50 ในสารยับยั้งจะมีผลให้การยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์

Yan-li และคณะ (2009) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากมันฝรั่ง พบว่า อุณหภูมิมีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากมันฝรั่งโดยพบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง ประสิทธิภาพในการยับยั้งและความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลง อย่างไรก็ตามความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งยังคงมีกิจกรรมสูงเมื่อทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงประมาณร้อยละ 6 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยมีกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินคงเหลือร้อยละ 87.40

Chaudhary และคณะ (2009) ศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Putranjiva roxburghii* พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวแตกต่างกันในช่วงอุณหภูมิ 20-100 องศาเซลเซียส สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินไม่มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้จากการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชพบว่ากิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวในช่วงพีเอชเป็นกรดสูงและด่างสูง เมื่อทำการบ่มที่พีเอช 8 กิจกรรมคงเหลือร้อยละ 95

Benjakul และคณะ (2000) ศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากพืชตระกูลถั่วของไทย ได้แก่ ถั่ว cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) *Wasp*.)

ถั่วแระ *(Cajanus cajan* (L.) *Millsp.*) และถั่วหรั่ง *(Voarbzeia subterranean* (L.) *Thou.*) พบว่าการสกัดเมล็ดถั่วต่าง ๆ ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 โมลาร์สามารถเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงกว่าการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดอื่น นอกจากนี้เวลาในการสกัดยังมีผลต่อการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน โดยเวลาที่เหมาะสมในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วแระและถั่วหรั่งอยู่ที่ 3 ชั่วโมง ส่วน cowpea อยู่ที่ 1 ชั่วโมง เนื่องจากสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่ว cowpea จะเสียสภาพธรรมชาติในระหว่างการสกัดและเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้น

บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

วัตถุดิบ

ข้าวสังข์หยดซ้อมมือและข้าวสังข์หยดกล้อง โดยรับซื้อจากศูนย์จำหน่ายสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ จังหวัดพัทลุง ขนส่งมายังสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง เพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับการทดลองต่อไป

สารเคมี

- สารเคมีสำหรับใช้ในการสกัดและตรวจสอบคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

อุปกรณ์และเครื่องมือ

- เครื่องหมุนเหวี่ยงยี่ห้อ Sigma Centrifuge รุ่น 2 -16K
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WNB22
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ SHIMADZU รุ่น UV - 1700
- เครื่องโฮโมจีไนซ์ ยี่ห้อ IAK รุ่น T18
- Vortex mixer ยี่ห้อ Vortex-genie 2 รุ่น G-560E
- เครื่องวัดพีเอช ยี่ห้อ Sartorius รุ่น 2-16K

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาผลของการกำจัดไขมันต่อการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

1.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวสังข์หยด

เตรียมข้าวสังข์หยดบดละเอียด โดยดัดแปลงตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2006) โดยการนำข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมาบดให้ละเอียด โดยใช้เครื่องปั่น

นำข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดที่ผ่านการบดมาทำการกำจัดไขมันตามวิธีของ Banjakul และคณะ (2000) โดยผสมกับเฮกเซนในอัตราส่วน 1:5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการปั่นผสมเป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง No. 4 โดยการกรองด้วยปั๊มสุญญากาศ จากนั้นนำข้าวสังข์หยดที่เหลือบนกระดาษกรอง ชะล้างด้วยเฮกเซน 3 ครั้ง นำข้าวสังข์หยดที่เหลือบนกระดาษกรองไปทำแห้งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-30 องศาเซลเซียส) จนแห้งและหมดกลิ่นฉุนของเฮกเซน เก็บข้าวสังข์หยดที่ผ่านการกำจัดไขมันที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำไปใช้

1.2 การเตรียมสารสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

สกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด ดัดแปลงจากวิธีการทดลองของ Klomklao และคณะ (2004) โดยมีขั้นตอนคือ นำข้าวสังข์หยดบดละเอียดทั้งสองชนิดที่ผ่านการกำจัดไขมันและที่ไม่ผ่านการกำจัดไขมัน เติมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:7 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าอย่างเบา ๆ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 สารสกัดส่วนใสที่ได้ เรียกว่า ส่วนสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

นำส่วนสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ไปตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ปริมาณโปรตีน และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของส่วนสกัดต่าง ๆ คัดเลือกตัวอย่างที่ให้กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์สูงที่สุดเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

1.3 การตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ตรวจสอบกิจกรรมการเป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) โดยใช้ BAPNA (Nα-Benzoyl-DL-arginene-*p*-nitroanilide) เป็นสารตั้งต้น เติมส่วนสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด 200 ไมโครลิตรผสมกับเอนไซม์จากตับอ่อนของหมู (porcine pancreas) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร นำของผสมไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย

ผสม 1,000 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย 0.5 มิลลิโมลาร์ BAPNA ปริมาณ 800 ไมโครลิตร และน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยาเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นหยุดปฏิกิริยา โดยการเติมสารละลายกรดอะซิติก เข้มข้นร้อยละ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินที่เหลืออยู่ในส่วนใส ภายหลังการเหวี่ยงแยกโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ระดับความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร เนื่องจากการปลดปล่อย p-nitroaniline หนึ่งหน่วยของกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเท่ากับจำนวนของสารยับยั้งที่ให้ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.01 ต่อเวลาต่อมิลลิลิตรของสารสกัด ส่วนของ blank จะดำเนินในลักษณะเดียวกัน ยกเว้นเติมสารสกัดยับยั้งเอนไซม์ทริปซินภายหลังจากการบ่มเอนไซม์ทริปซินกับสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร)

1.4 การตรวจสอบปริมาณโปรตีน

ตรวจสอบความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธี Lowry (Robinson and Hodgen, 1940) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตราฐาน

2. ศึกษาการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

2.1 ศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

นำข้าวสังข์หยดที่ผ่านการกำจัดไขมันของข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิดมาสกัดตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) โดยใช้สารสกัดดังนี้

- น้ำกลั่น
- สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0
- สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0

ทำการสกัดเช่นเดียวกับข้อ 1.2 แล้วนำไปตรวจสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (ตามข้อ 1.3) ปริมาณโปรตีน (ตามข้อ 1.4) และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของส่วนสกัดต่าง ๆ คัดเลือกสารสกัดที่ให้กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

นำตัวอย่างข้าวสังข์หยดที่ผ่านการกำจัดไขมันทั้งสองชนิด มาผสมกับสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยมีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.5 0.75 และ 1.0 โมลาร์ หลังจากนั้นทำการสกัดส่วนยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเช่นเดียวกับข้อ 1.2 คัดเลือกสารสกัดที่ให้กิจกรรมของสารยับยั้งของเอนไซม์ที่สูงที่สุดเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

2.3 ผลของระยะเวลาต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

นำตัวอย่างข้าวสังข์หยดที่ผ่านการกำจัดไขมันทั้งสองชนิด มาทำการสกัดด้วยสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 โดยมีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1: 9 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เขย่าอย่างต่อเนื่องที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 30 60 90 และ 180 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำไปหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง สารละลายที่ได้ใสที่ได้นำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์เอนไซม์ทริปซิน ปริมาณโปรตีน และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน คัดเลือกเวลาในการสกัดที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่สูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3. ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

3.1 การให้ความร้อน

ทำการบ่มสารสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดที่อุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา นำตัวอย่างมาแช่ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นทำการหมุนเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายใสที่ได้ไปกรอง สารละลายที่ได้นำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ปริมาณโปรตีน และความจำเพาะเจาะจงในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน คัดเลือกอุณหภูมิที่ให้ความจำเพาะในการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุดเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. ศึกษาคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

4.1 ศึกษาความคงตัวต่อความร้อน

ตรวจความคงตัวต่อความร้อน โดยดัดแปลงวิธีของ Benjakul และคณะ (1999) โดยนำสารสกัดยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน (ข้อ 3.1) ไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นทันที่ด้วยการแช่น้ำที่มีน้ำแข็งผสมอยู่ จากนั้นทำการตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่เหลือตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) และรายงานผลเป็น relative activity เปรียบเทียบกับกิจกรรมเริ่มต้น

4.2 ศึกษาความคงตัวพีเอช

ตรวจสอบค่าความคงตัวต่อพีเอช โดยนำสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนไปบ่มกับสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอช 2 3 4 5 6 7 8 9 10 และ 11 เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สารละลาย McIlvaine's buffer (โซเดียมฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และโซเดียมซิเตรตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ สำหรับพีเอช 2-8 และสารละลาย 0.1 โมลาร์ glycine-NaOH สำหรับพีเอช 9-11) จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่เหลือตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) และรายงานผลเป็น relative activity

4.3 ผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

ตรวจสอบผลของโลหะ โดยดัดแปลงวิธีของ Choi และคณะ (2002) โดยนำส่วนสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้าวสังข์หยดมาบ่มกับสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีจากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่เหลือตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) และรายงานผลเป็น relative activity

4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

ตรวจสอบผลของโซเดียมคลอไรด์ โดยดัดแปลงวิธีของ Choi และคณะ (2002) โดยนำส่วนสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้าวสังข์หยดมาบ่มกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 0 1 2 และ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่

อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30นาที จากนั้นตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่เหลือตามวิธีของ Klomklao และคณะ (2008) และรายงานผลเป็น relative activity

5. การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

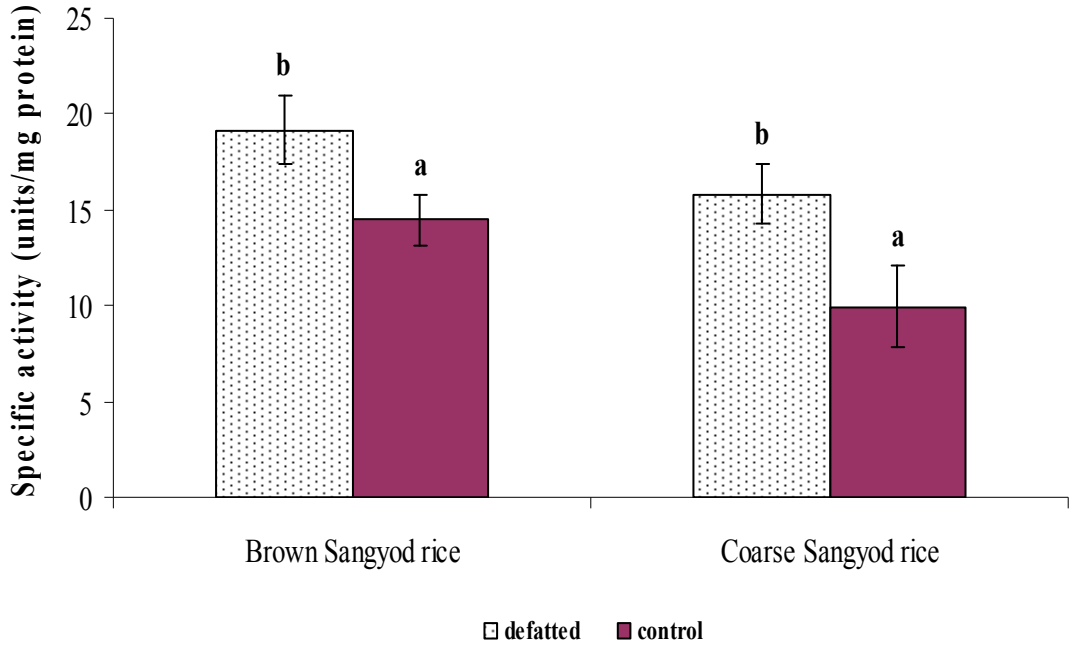
การวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) แต่ละสิ่งทดลองทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (Steel and Torrie,1980) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11 สำหรับการวิเคราะห์ความแตกต่างผลของการกำจัดไขมันโดยใช้ T-test

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของการกำจัดไขมันต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

จากการศึกษาผลของการกำจัดไขมันต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ พบว่า เมื่อทำการกำจัดไขมัน กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์จากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือมีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือที่ไม่ผ่านการกำจัดไขมัน ($p<0.05$) (ภาพที่ 3) ทั้งนี้ผลที่ได้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากไขมันในปริมาณมากอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงได้ เฮกเซนเป็นตัวทำละลายที่มีคุณสมบัติในการแย่งจับกับน้ำในโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีผลทำให้น้ำถูกกำจัดออกจากโมเลกุลของโปรตีนในสภาวะที่มีตัวทำละลาย (Hoyle and Merritt, 1994) ดังนั้นการกำจัดน้ำออกจากโมเลกุลของโปรตีนในข้าวสังข์หยด อาจส่งผลให้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวมากขึ้นในระหว่างการสกัด

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินระหว่างข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือพบว่า ข้าวสังข์หยดกล้องที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดไขมัน มีกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงกว่าข้างสังข์หยดซ้อมมือที่ผ่านและไม่ผ่านการกำจัดไขมัน ระดับของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่แตกต่างกันอาจเกี่ยวข้องกับแหล่งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินส่วนใหญ่พบมากในส่วนคัพภะของข้าว ข้าวสังข์หยดกล้องเป็นข้าวที่มีการขัดสีเพียงครั้งเดียวจึงมีส่วนของคัพภะมากกว่าข้าวสังข์หยดซ้อมมือ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการเจริญเติบโต กระบวนการเก็บเกี่ยว การผลิต และกระบวนการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางด้านสรีระวิทยา เช่น กระบวนการเมแทบอลิซึม ฤดูกาล อายุ พื้นที่ที่ใช้ในการเพาะปลูก เป็นต้น



ภาพที่ 3 ผลของการกำจัดไขมันต่อกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

<u>หมายเหตุ</u> : ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแบบของแผนภูมิเปรียบเทียบข้าวสังข์หยดชนิดเดียวกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

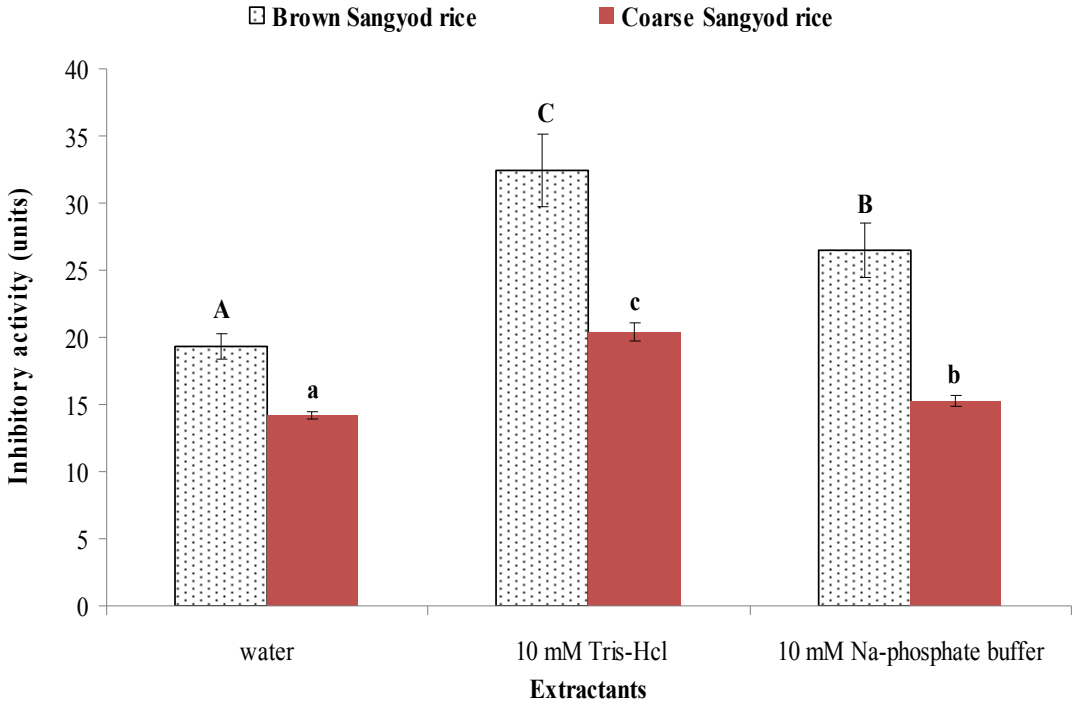
2. ศึกษาการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

2.1 ศึกษาผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

จากการศึกษาผลของสารสกัดต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ ซึ่งทำการสกัดด้วยสารสกัดต่างๆ คือ น้ำกลั่น สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 และสารละลาย Na-phosphate buffer ความเข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 มีประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดสูงกว่าการใช้สารละลาย Na-phosphate buffer และน้ำกลั่นตามลำดับ ($p<0.05$) (ภาพที่ 4) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า Tris-HCl มีประสิทธิภาพความสามารถในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุด Chaudhary และคณะ (2009)ใช้

สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 ในการสกัดและวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Putranjiva roxburghii* นอกจากนี้ Kishimura และคณะ (2001) ศึกษาการสกัดและการจำแนกคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของปลาหมึกโดยใช้สารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8 ในการสกัดและศึกษากิจกรรมการยับยั้ง

ปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการละลายและการเก็บเกี่ยวโปรตีนประกอบด้วย อัตราส่วนของโปรตีนกับสารละลาย ขนาดอนุภาคที่ผ่านการบด อุณหภูมิ ระยะเวลาในการสกัด พีเอช ความแรงของไอออน ประเภทและความเข้มข้นของสารสกัด และคุณสมบัติการรวมตัวกับน้ำของโปรตีน (Sathe and Salunkhe, 1981)



ภาพที่ 4 ผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

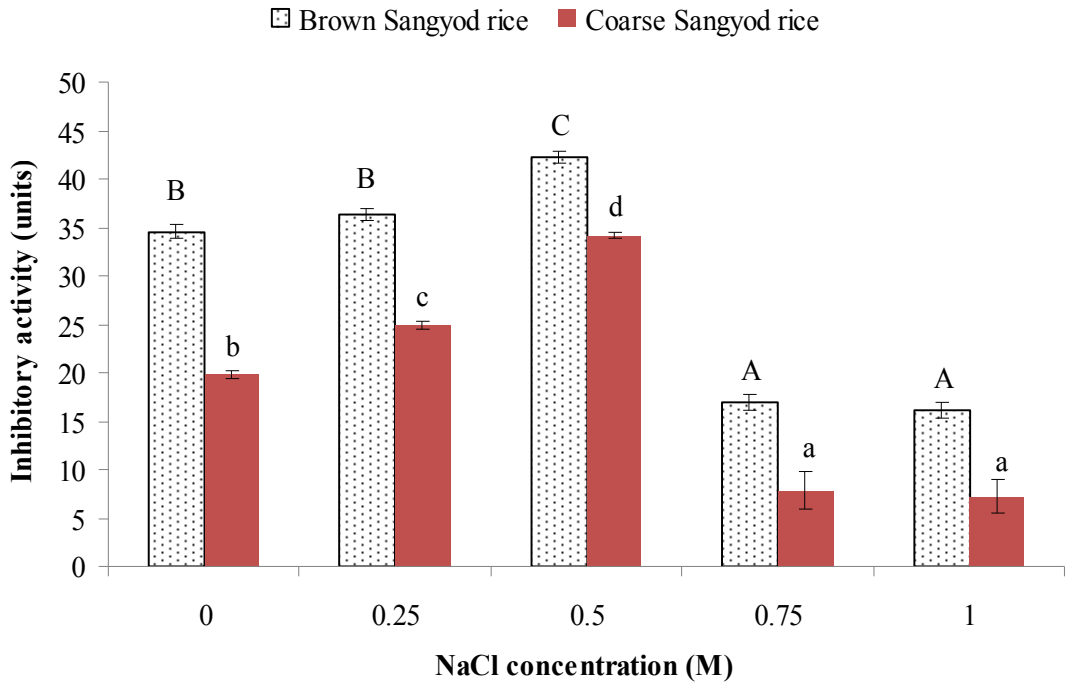
<u>หมายเหตุ</u> : ตัวอักษรที่ต่างกันแต่ละแบบของแผนภูมิเปรียบเทียบข้าวสังข์หยดชนิดเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.2 ศึกษาผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

ภาพที่ 5 แสดงผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ที่ระดับความเข้มข้น 0 0.25 0.50.75 และ 1.0 โมลาร์ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ พบว่า ประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงสุดเมื่อทำการสกัดด้วยสารละลาย Tris-HCl ที่มีโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ทั้งในข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงกว่า 0.5 โมลาร์ กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงอย่างเห็นได้ชัด และที่ระดับความเข้มข้นของเกลือเดียวกัน พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องมีกิจกรรมการยับยั้งสูงกว่าข้าวสังข์หยดซ้อมมือ การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินอาจมีสาเหตุเนื่องจากการสูญเสียสภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยผลของปรากฏการณ์

“salting out” โดยโซเดียมคลอไรด์จะไปแย่งจับกับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลของเอนไซม์ ทำให้สารยับยั้งเอนไซม์เสียสภาพ (Klomklao *et al*., 2007) Benjakul และคณะ (2000) รายงานว่า การสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วทั้ง 4 ชนิด (cowpea pigeon pea bambara groundnut var. T bambara groundnut var. HY) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.15 โมลาร์ ทำให้สามารถสกัดสารยับยั้งที่มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงที่สุด ($p<0.05$) แต่เมื่อทำการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ พบว่า กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกันหรือต่ำกว่า ทั้งนี้การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเกิดขึ้นเนื่องจากการสกัดด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ระดับความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ มีผลให้ปริมาณโปรตีนในสารสกัดเพิ่มสูงขึ้น ($p<0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Maity และ Patra (2003) พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก water fern มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงสุดเมื่อทำการสกัดโดยใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.15 โมลาร์และสามารถสกัดหรือเก็บเกี่ยวสารยับยั้งได้สูงกว่าการใช้โซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.3 โมลาร์และการใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการสกัดเนื่องจากในสภาวะที่เป็นด่างและการใช้สารสกัดที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงทำให้สามารถเก็บเกี่ยวโปรตีนได้มากกว่า

ดังนั้นจากผลการทดลองสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 ในสภาวะที่มี NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นสารสกัดที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดสูงสุด



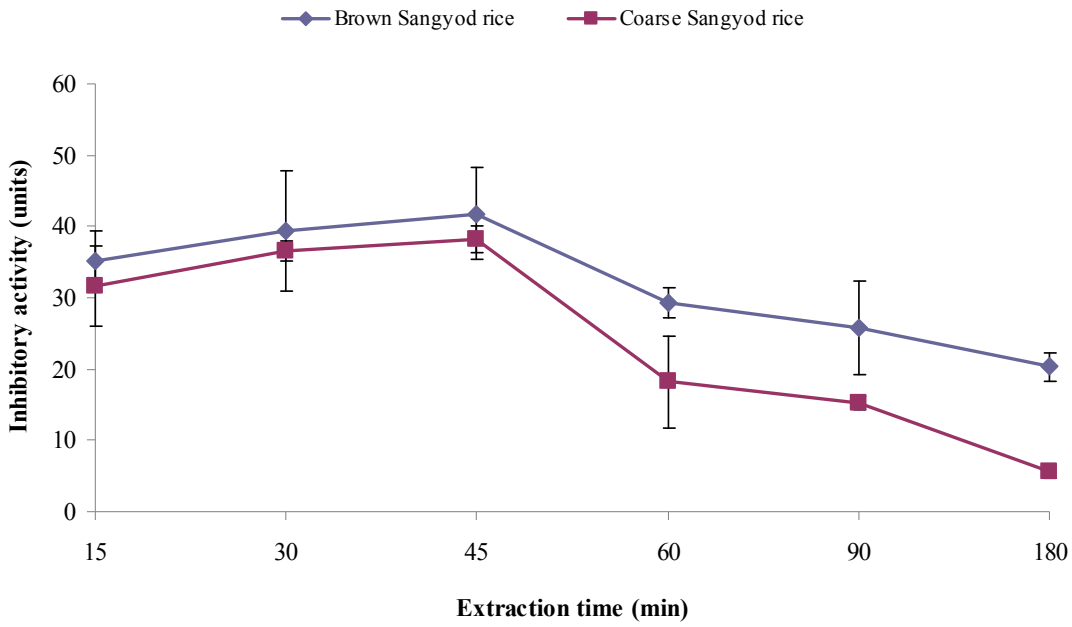
ภาพที่ 5 ผลความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

<u>หมายเหตุ</u> : ตัวอักษรที่ต่างกันแต่ละแบบของแผนภูมิเปรียบเทียบข้าวสังข์หยดชนิดเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.3 ผลของระยะเวลาต่อประสิทธิภาพการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

ระยะเวลาในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ โดยใช้สารสกัด Tris-HCl ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิด (ภาพที่ 6) ระยะเวลาแตกต่างกันมีผลต่อการสกัดแตกต่างกัน โดยประสิทธิภาพในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิดสูงสุดเมื่อทำการสกัดที่ระยะเวลา 45 นาที อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการสกัดนานกว่า 45 นาที ทำให้กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิดลดลง ($p<0.05$) ทั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดที่นานเกินไปมีผลต่อการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิด

ดังนั้นไม่เฉพาะสารสกัด แต่ระยะเวลาในการสกัดมีผลต่อการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิด จากผลการทดลองเวลาในการสกัด 45นาทีเป็นเวลาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิด Benjakul และคณะ (2000) รายงานว่า เวลามีผลต่อการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วทั้ง 4 ชนิด (cowpea pigeon pea bambara groundnut var. T bambara groundnut var. HY) โดยพบว่าการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่ว pigeon pea และ bambara groundnut เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสกัดโดยที่ให้กิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงสุด อย่างไรก็ตามสำหรับถั่ว cowpea ระยะเวลาที่เหมาะสมในการสกัดคือ 1 ชั่วโมง นอกจากนี้ Benjakul และคณะ (2000) รายงานว่า เมื่อเวลาที่ใช้ในการสกัดนานขึ้นจะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีสาเหตุมาจากการสูญเสียสภาพของโปรตีนในระหว่างการสกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อใช้เวลาในการสกัดนานขึ้นและจากการศึกษาของ Maity และ Patra (2003) พบว่าที่เวลา 3 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริป ซินจาก water fern โดยพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อใช้เวลาในการสกัดมากขึ้นถึง 3 ชั่วโมงและจะมีกิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อใช้เวลาในการสกัดเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ผลของระยะเวลาต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

3. ศึกษาการทำบริสุทธิ์บางส่วนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยด

3.1 การให้ความร้อน

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส พบว่า อุณหภูมิและชนิดของข้าวสังข์หยดที่ต่างกันมีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดต่างกัน (ตารางที่ 1) โดยข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจำเพาะสูงสุดเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจำเพาะลดลงเมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิสูงขึ้น อาจเป็นผลมาจากการสูญเสียสภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยความร้อน ดังนั้นจากผลการทดลอง การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที เป็นวิธีการทำบริสุทธิ์เพื่อที่จะกำจัดโปรตีนบางตัวที่ไม่ต้องการอย่างรวดเร็วสำหรับข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด Benjakul และคณะ (2000) พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วทั้ง 4 ชนิด (cowpea pigeon pea bambara groundnut var. T bambara groundnut var. HY) มีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะสูงสุดเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส และจากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากการบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เนื่องจากความร้อน

ทำให้โครงสร้างเกิดการคลายตัวโดยพันธะไดซัลไฟด์ (Godbole *et al*., 1994) ส่วนกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง90 องศาเซลเซียสและลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส (Benjakul *et al*., 2000)

ตารางที่ 1 ผลของการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

Sample	Temperature (°C)	Total activity ** (units)	Total protein ** (Mg)	Specific activity ** (Unit/mg protein)
brown	Control	1041.67 ± 27.58d	16.03 ± 0.40f	65.01 ± 1.70bc
Sangyod rice	50	1055.20 ± 7.31d	15.65 ± 0.52f	72.58 ± 11.08cd
	60	1082.29 ± 36.32e	14.97 ± 0.41e	72.04 ± 2.05cd
	70	1093.75± 12.50e	14.05 ± 0.70d	77.59 ± 3.82d
	80	920.83 ± 15.14c	13.15 ± 0.41c	65.87 ± 9.53bc
	90	592.71 ± 8.31b	9.95 ± 0.51b	59.46 ± 2.77b
	100	263.54 ± 10.01a	7.61 ± 0.57a	34.78 ± 2.92a
coarse	Control	911.46± 9.20d	14.66 ± 0.82f	62.39 ± 3.42c
Sangyod rice	50	933.33 ± 10.94d	14.56 ± 0.50ef	66.01 ± 2.36cd
	60	964.58 ± 6.45e	13.78 ± 0.41de	70.58± 2.56d
	70	1023.96 ± 52.59f	13.28 ± 0.82d	77.32 ± 5.74e
	80	851.04 ± 19.53c	12.23 ± 0.84c	69.89 ± 5.74d
	90	296.88 ± 9.48b	7.87 ± 0.86b	38.13 ± 4.42b
	100	90.63± 14.11a	5.08 ± 0.21a	18.14 ± 4.56a

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่ต่างกันในคอลัมน์เดียวกันของข้าวสังข์หยดชนิดเดียวกันแสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

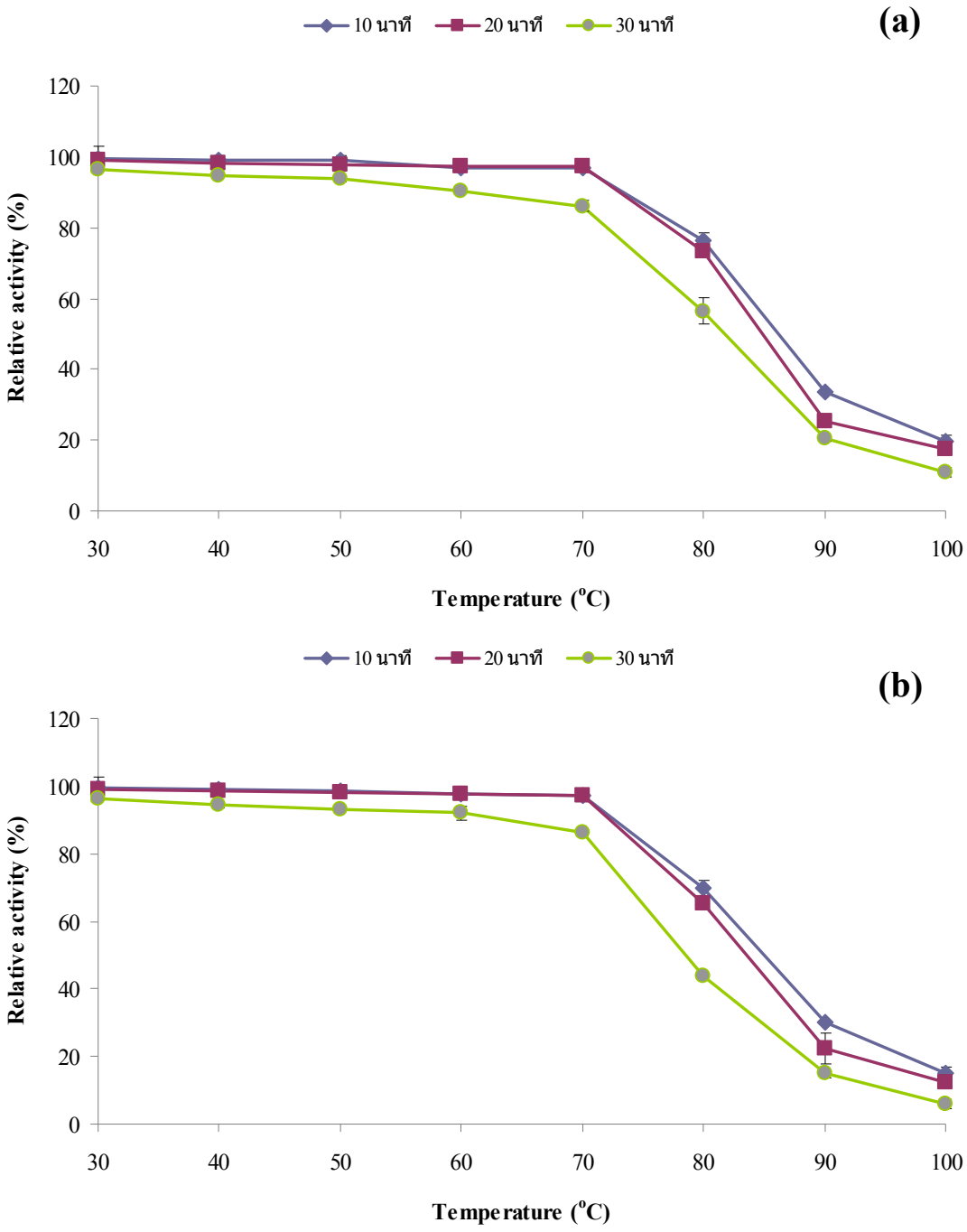
** ค่าเฉลี่ย ± SD จากผลการทดลอง 3 ซ้ำ

4. ศึกษาคุณลักษณะของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

4.1 ศึกษาความคงตัวต่อความร้อน

จากการศึกษาคุณสมบัติความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือที่ผ่านการทำบริสุทธ์บางส่วนซึ่งทำการตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิต่าง ๆ (30 40 50 60 70 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที พบว่า อุณหภูมิ ชนิดของข้าวสังข์หยด และเวลามีผลต่อความคงตัวต่อความร้อนที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 7) กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติความคงตัวต่อความร้อนแนวโน้มไปในทางเดียวกัน คือกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมีความคงตัวต่อความร้อนเมื่อทำการบ่มสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิไม่เกิน 70 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 10-20 นาที อย่างไรก็ตามกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อทำการบ่มสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียส ระยะเวลานานขึ้น เนื่องจากเกิดการสูญเสียสภาพโดยความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จากการศึกษาของ Benjakul และคณะ (2000) พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วทั้ง 4 ชนิด (cowpea pigeon pea bambara groundnut var. T bambara groundnut var. HY) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที โดย pigeon pea จะมี relative activity ต่ำที่สุด สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วที่ต่างกันมีความคงตัวต่อความร้อนที่แตกต่างกันอาจมีผลเนื่องมาจากลักษณะทางธรรมชาติที่แตกต่างกัน เช่น การยึดเหนี่ยวกันด้วยพันธะที่แตกต่างกัน (Cheftel *et al*., 1985) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วเหลืองบราซิลจะถูกทำลายอย่างสมบูรณ์เมื่อให้ความร้อนที่ 92 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าปัจจัยที่มีผลในการทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในถั่ว เช่น อุณหภูมิ ระยะเวลาในการให้ความร้อน ขนาดอนุภาคของถั่ว และปริมาณความชื้นของถั่ว (Vasconcelos *et al*., 1997) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kumar และคณะ (2008) พบว่า กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Putranjiva roxburghii* จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิสูงกว่า 70 องศาเซลเซียสกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงเล็กน้อยกิจกรรมเหลืออยู่ประมาณร้อยละ 85 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส และกิจกรรมจะลดลงต่ำกว่าร้อยละ 80 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Rawdkuen และคณะ (2009) ได้รายงานว่า ในการศึกษาความคงตัวต่อความร้อนของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่ว 3 ชนิด (navy bean red kidney bean และ adzuki bean) ในช่วงอุณหภูมิ 40-100 องศาเซลเซียส พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก red kidney bean มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วน navy bean และ adzuki bean มีความคงตัวต่อความร้อนที่

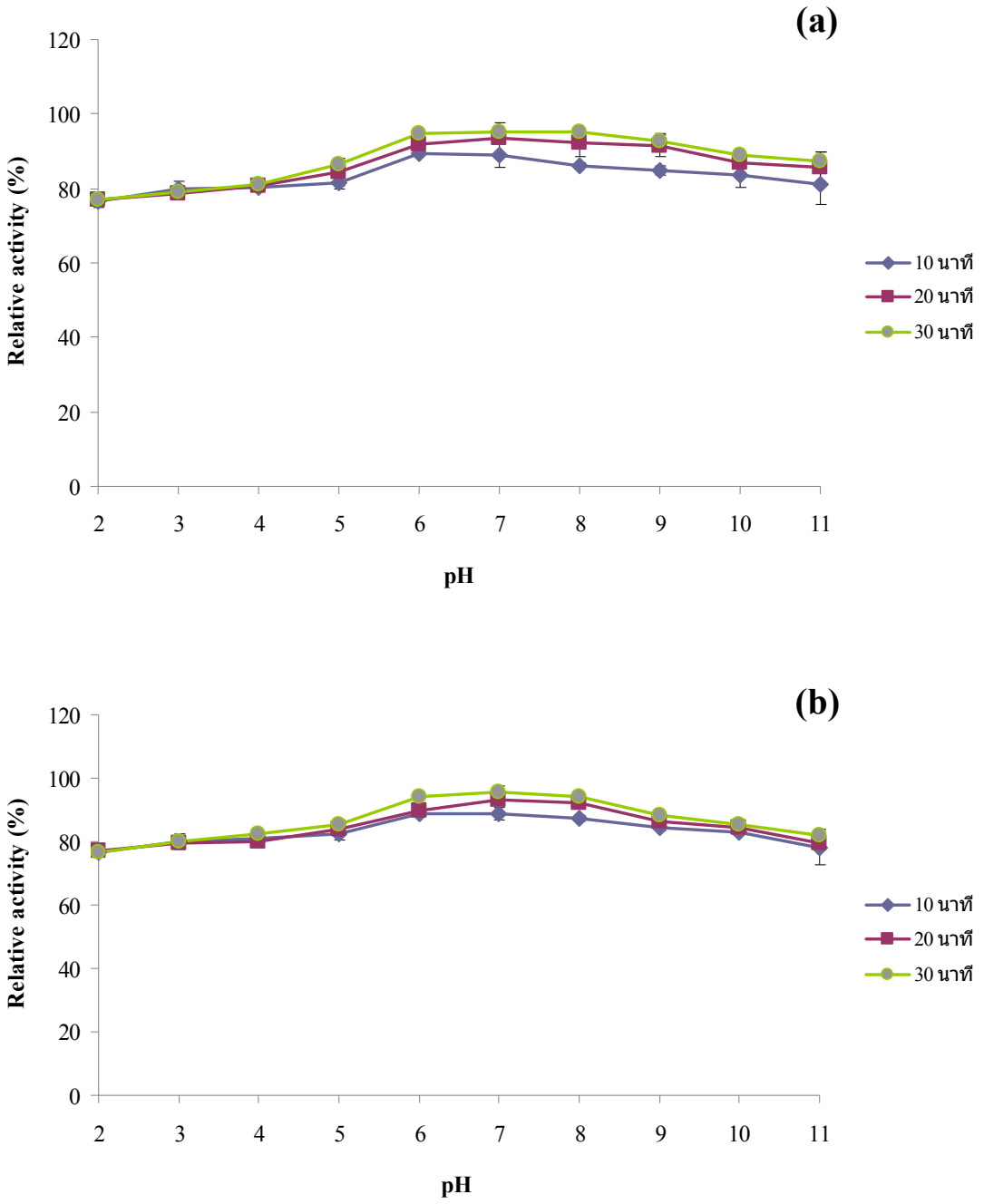
อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อใช้อุณหภูมิในการบ่มเพิ่มขึ้นค่า relative inhibitory activity ลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงจุดต่ำสุดที่ 100 องศาเซลเซียส Yoshizaki และคณะ (2007) พบว่า กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Calliiandra selloi Macbride* จะมีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงโดยมีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 75 หลังจากทำการบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส กิจกรรมลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 เนื่องจากโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพเนื่องจากความร้อน จากผลการทดลองสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด มีความคงตัวต่อความร้อน จึงสามารถใช้ในอุตสาหกรรมที่ให้ความร้อนได้หลายประเภท เช่น กระบวนการเกิดเจลในซูริมิ



ภาพที่ 7 ผลของความคงตัวต่อความร้อนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์-หยดกล้อง (a) และข้าวสังข์หยดซ้อมมือ (b)

4.2 ศึกษาความคงตัวต่อพีเอช

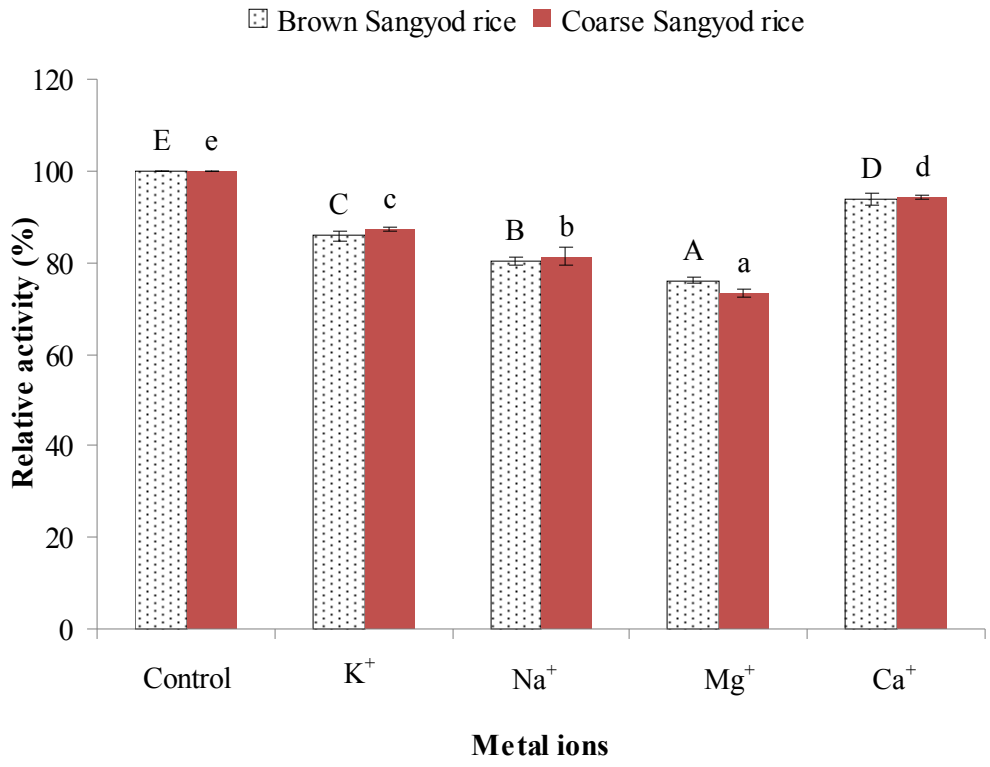
จากการศึกษาผลของความคงตัวต่อพีเอชต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน ซึ่งทำการตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด ที่พีเอชต่าง ๆ (2 3 4 5 6 7 8 9 10 และ 11) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที พบว่าพีเอช ชนิดของข้าวสังข์หยดและเวลา มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (ภาพที่ 8) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง (pH 6-9) ที่ระยะเวลา 10-20 นาที การลดลงของกิจกรรมเล็กน้อยพบเมื่อทำการบ่มสารสกัดที่ pH ต่ำกว่า 6 และสูงกว่า 9 และเมื่อทำการบ่มเป็นเวลา 30 นาที อย่างไรก็ตามที่ทุกพีเอชกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินยังคงเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 80 สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่พีเอช 7 ดังนั้นสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมีความคงตัวในช่วงพีเอชเป็นกลาง กรด และด่าง โดยทั่วไปโปรตีนส่วนใหญ่มีความคงตัวที่พีเอชเฉพาะ แต่ที่พีเอชสูงหรือต่ำมากๆ จะเกิดการสูญเสียสภาพได้หรือเกิดการคลายตัวของโครงสร้างโมเลกุลโปรตีน เนื่องจากการผลักกันของประจุที่อยู่ในโมเลกุลภายใน (Cheltel *et al*., 1996) จากการศึกษาของ Benjakul และคณะ (2000) พบว่า สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ดถั่วทั้ง 4 ชนิด (cowpea pigeon pea bambara groundnut var. T bambara groundnut var. HY) ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะลดลงที่พีเอชต่ำ กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจาก bambara groundnut จะลดลงที่พีเอชเป็นด่าง ทั้งนี้ผลที่ได้อาจเกิดขึ้นเนื่องจากพีเอชที่สูงจนเกินไปมีผลทำให้โมเลกุลของโปรตีนสามารถคลายตัวซึ่งเป็นผลมาจากการผลักกันของประจุภายในโมเลกุลส่งผลให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติไป (Damodaran, 1996) นอกจากนี้ Kumar และคณะ (2008) รายงานว่า กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Putranjiva roxburghii* จะมีความคงตัวสูงในสภาวะที่มีความเป็นกรดและด่างสูง สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Putranjiva roxburghii* มีความคงตัวต่อพีเอชสูงสุดที่พีเอช 8 แสดงกิจกรรมสูงกว่าร้อยละ 95 เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Yoshizaki และคณะ (2007) พบว่า กิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากเมล็ด *Calliiandra selloi Macbride* จะมีกิจกรรมลดลงร้อยละ 25 ที่พีเอชสูงที่สุด (pH 4)



ภาพที่ 8 ผลของความคงตัวต่อพีเอชต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์-หยดกล้อง (a) และข้าวสังข์หยดช้อมมือ (b)

4.3 ผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์ซ้อมมือ

จากการศึกษาผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ ซึ่งทำการตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวทั้ง 2 ชนิดด้วยการบ่มกับสารละลายชนิดต่าง ๆ คือ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ แมกนีเซียมคลอไรด์ และแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ได้บ่มด้วยสารละลายโลหะไอออน ($p<0.05$) โดยพบว่าการบ่มด้วยสารละลายดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้นการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินระหว่างสารละลายทั้งหมดจะเห็นได้ว่า ชุดการทดลองที่บ่มด้วยแคลเซียมคลอไรด์ยังคงมีกิจกรรมยับยั้งสูงที่สุด รองลงมาคือ โพแทสเซียมคลอไรด์ โซเดียมคลอไรด์ และที่มีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุด คือ แมกนีเซียมคลอไรด์ (ภาพที่ 9) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Choi และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาผลของโลหะต่อกิจกรรมสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากไข่ปลาทูน่าท้องแถบ โดยใช้ K^+ Na^+ Mg^{2+} และ Ca^{2+} พบว่า Ca^{2+} มีผลเพิ่มหรือกระตุ้นกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินดีที่สุด (ร้อยละ100) นอกจากนี้ Cherif และ Gargouri (2009) ศึกษาผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Ca^{2+} Mg^{2+} ต่อกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ พบว่า Ca^{2+} มีผลเพิ่มหรือกระตุ้นกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน และได้รายงานว่าการเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งของเอนไซม์ทริปซิน อาจเกิดจากแคลเซียมไอออนมีการเชื่อมประสานระหว่างเอนไซม์และตัวสารยับยั้งเข้าด้วยกันและ Ca^{2+} อาจเหนี่ยวนำให้เอนไซม์ทริปซินเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่งผลให้เกิดการจับกันที่สมบูรณ์ของสารยับยั้ง (Cottin *et al.,* 1981)



ภาพที่ 9 ผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

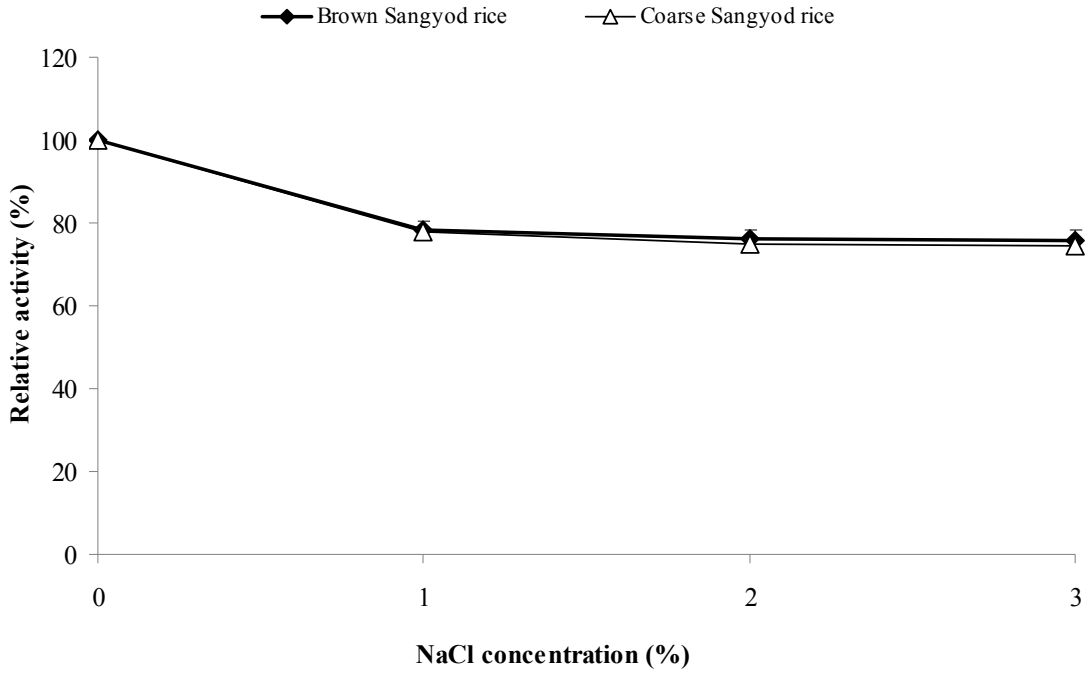
<u>หมายเหตุ</u> : ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละแบบของแผนภูมิเปรียบเทียบข้าวสังข์หยดชนิดเดียวกัน แสดงว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

จากการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้องและข้าวสังข์หยดซ้อมมือ ซึ่งทำการตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดด้วยการบ่มกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คือ โซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1 2 และ 3 ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด ลดลงเล็กน้อยเมื่อระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มสูงขึ้น(ภาพที่ 10) ทั้งนี้เนื่องจากการลดลงของกิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินอาจมีสาเหตุเนื่องจากการสูญเสียสภาพของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินโดยผลของ

ปรากฏการณ์ salting out Rawdkuen และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่ว 3 ชนิดคือ navy bean red kidney bean และ adzuki bean พบว่า กิจกรรมการยับยั้งลดลงเล็กน้อยสำหรับ navy bean และ adzuki bean ในขณะที่ red kidney bean จะมีกิจกรรมการยับยั้งต่ำที่สุดเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ($p<0.05$) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากถั่วทั้ง 3 ชนิดมีความคงตัวที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 ซึ่งเห็นได้จากการมีกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูงกว่าร้อยละ 95 อาจเกิดขึ้นเนื่องจากการเชื่อมกันระหว่างประจุหรือการลดลงของพันธะไฮโดรเจนในพันธะคู่ คุณลักษณะดังกล่าวส่งผลให้การยืดเหนี่ยวของสายโพลีเพปไทด์ลดลง (Horton, *et al*., 1992)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมเหลืออยู่มากกว่าร้อยละ 80 เมื่อทำการบ่มกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 3 ดังนั้นจึงสามารถนำสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้ง 2 ชนิดมาใช้ในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์โปรติเนส โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิเพื่อใช้เพิ่มความแข็งแรงของเจล



ภาพที่ 10 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง และข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดทั้งสองชนิดที่ผ่านการกำจัดไขมันมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเมื่อทำการสกัดด้วยสารละลาย Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.0 ภายใต้สภาวะที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์เป็นเวลา 45 นาที ทั้งนี้สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนมีความคงตัวต่อความร้อนและทนต่อพีเอชในช่วงกว้าง แต่กิจกรรมการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงเมื่อบ่มสารสกัดด้วยสารละลายโลหะไอออนชนิดต่างๆและเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์

เอกสารอ้างอิง

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2549). เคมีอาหาร. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

รัชนี ตัณฑะพานิชกุล. (2537). เคมีอาหาร. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

Azarkan, M., Dibiani, R., Goormaghtigh, E., Raussens, V. and Baeyens-Volant, D. (2006). The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β-sheet glycoprotein. Biochem. Biophys. Acta. 1764, 1063–1072.

Benjakul, S., Visessaquan, W. and Thummaratwasik, P. (1999). Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. J. Food. Biochem. 24, 107-127.

Banjakul, S., Visessanguan, W. and Thummaratwasik, P. (2000). Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from some Thai legume seeds. J. Food Biochem. 24, 107-127.

Boisen, S. (1983). Protease inhibitors in cereals. Acta. Scan. 33, 369-381.

Bond, J.S. and Butler, P.E. (1987). Intracelluar protease. Ann. Rev. Biochem. 56, 333-364.

Boyer, P.D. (1971). The Enzymes,3rd ed. pp. 250-274. New York : Academic Press.

Carvalho, M.R.B. and Sgarbieri, V.C. (1997). Heat treatment and inactivation of trypsin-chrmotrypsin inhibitors and lectins from beans (*Phuseolus vulguris* L.). J. Food Biochem. 21, 219-233.

Chaudhary, N. S., Shee, C., Islam, A., Ahmad, F., Yernool, D., Kumar, P. and Sharma, A.K. (2009). Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburg-hii* seeds. Phytochem. 69, 2120-2126.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L. and Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and protein. New York : Marcel Dekker.

Cherif, S. and Gargouri, Y. (2009). Thermoactivity and effects of organic solvents on digestive lipase from hepatopancreas of the green crab. Food Chem. 116, 82-86.

Cheung, P.C.K., Chau, C.F. and Wong, Y.H. (1997). Effect of cooking on content of amino acides and antinutrients in three Chinese indigenous legume seeds. J. Sci. Food Agric. 75, 447-452.

Choi, P.C.K., Chau, C.F. and Kim, S.K. (2002). Purification and characterization of trypsin inhibitors from the egg of skipjack tuna *Katsuwonus pelamis*. Fisheries Sci. 68, 1367-1373.

Cottin, P., Vidalenc, P.L. and Ducastaing, A. (1981). Ca^{2+}- dependent association between a Ca^{2+}-activated neutral proteinase (CaANP) and its specific inhibitor. *FEBS Lett*. 136, 221-224.

Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and protein. New York : Marcel Dekker.

Dopico, B., Labrador, E., Jiménez, T., Martín, I. and Hernández-Nistal, J. (2009). Two cell wall Kunitz trypsin inhibitors in chickpea during seed germination and seeding growth. Plant Physiol. Biochem. 47, 181-187.

Hoyle, N. and Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea herrengus*). J. Food Sci. 59, 76-79.

Godbole, S.A., Krishna, T.G. and Bhatia, C.R. (1994). Purification and characterization of protease inhibitor from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp) seeds. J. Sci. Food Agric. 64, 87-93.

Gupta, R., Beg, Q. K. and Lorenz, P. (2002). Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59, 13–32.

Horton, H.R., Moran, L.A., Ochs, R.S., Rawn, J.D. and Scrimgeour, K.G. (1992). Principles of biochemistry. New Jersey : Prentice-Hall.

Kim, H. R., Meyers, S. P. and Godber, J. S. (1992). Purification and characterization of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia*. Comp. Biochem. Physiol. B, 103, 391–398.

Kim, H. R., Meyers, S. P., Pyeun, J. H. and Godber, J. S. (1994). Enzymatic properties of anionic trypsins from the hepatopancreas of crayfish, *Procambarus clarkia*. Comp. Biochem. Physiol. B, 107, 197–203.

Kishimura, H., Saeki, H. and Hayashi, K., (2001). Isolation and characteristics of trypsin inhibitor from the hepatopancreas of a squid (*Todarodes pacificus*). Comp. Biochem. Physiol. B, 130, 117-123.

Kishimura, H., Klomklao, S., Benjakul, S. and Chun, B. (2008). Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). Food Chem. 106, 194-199.

Klomklao, S., Benjakul, S. and Visessaquan, W. (2004). Comparative studies on proteolytic activity of spleen extracts from three tuna species commonly used in Thailand. J. Food Biochem. 40, 355-372.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, S., Kishimura, H. and Simpson, B.K. (2006). Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characterization of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbsa*). Food Chem. 98, 440-452.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessaquan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. (2007). Purification and characterization of trypsin from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Food Chem. 100, 1580-1589.

Klomklao, S., Kishimura, H. and Benjakul, S. (2008). Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). Food Chem. 107, 213-220.

Klomklao, S., Benjakul, S. and Kishimura, H. (2010). Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. J. Food Biochem. 34, 711-729.

Lajolo, F.M. and Genovese, M.I. (2002). Nutritional signification of lectins and enzyme inhibitors from legumes. J. Sci. Food Agric. 50, 6592-6598.

Liu, K. S. and Markakis, P. (1991). Aqueous ethanol extraction of soybean trypsin inhibitors and characterization of a calcium-sensitive fraction. J. Food Biochem. 15,159-168.

Maity, J. and Patra, B.C. (2003). Isolation and characterization of trypsin inhibitor from the water fern, *Azolla Pinnara* R. Br. J. Food Biochem. 23, 281-294.

Rao, M. B., Tanksala, A. M., Ghatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998). Molecular and biotech-nological aspects of microbial proteases. Microbiol. Res. 62, 597–635.

Rawdkuen, S., Banjakul, S., Theppakorn, T. and Wati, R.K. (2009). Three-phase partitioning of trypsin inhibitor from legume seeds. Proc. Biochem. 44, 1307-1314.

Rekha, K., Ram, G., Kirpa, K., Kalika, K. and Vijay, G. (2008). Purification, characterization and evaluation of insectisidal potential of trypsin inhibitor from mungbean (*Vignaradiate* L.Wilczek) seeds. Acta. Physiol. Plant. 30(6), 761–8.

Robinson, H. W. and Hodgen, C. G. (1940). The biuret reaction in the determination of serum protein. I. A study of the condition necessary for the production of the stable color which

bears a quantitative realtionship to the protein concentration. J. Biol. Chem. 135, 707–725

Sangorrín, M.P., Folco, E.J., Martone, C.M. and Sánchez, J.J. (2001). Purification and characterization of a proteinase inhibitor from white croaker skeletal muscle (*Micropogon opercularis*). Int. J. Biochem. Cell Biol. 33, 691-699.

Sathe, S.K. and Salunkhe, D.K. (1981). Solubilization and electrophoretic characterization of the Great Northern bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins. J. Food Sci. 46, 82-87.

Simpson, B. K. (2000). Digestive proteinases from marine animals. In Haard, N. M. and Simpson, B. K. (eds), Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality. (pp. 531 - 540). New York : Marcel Dekker.

Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. (1980). Principles and Procedures of Statistics; A Biometrical Approach. New York : McGraw-Hill.

Vasconcelos, J.N. (1997). Composition toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soy bean (*Glycine max*). J. Sci. Food Agric. 75, 419-426.

Whitaker, J.R. (1994). Principle of enzymology for the food science. New York : Marcel Dekker.

Whitaker, J. R. and Sgarbieri, V. C. (1981). Purification and composition of the trypsin-chymotrypsin inhibitors of *Phaseolus vulgaris* L. var Rosinha G2. J. Food Biochem. 5, 197-213.

Wu, C. and Whitaker, J.R. (1990). Purification and partial characterization of four trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney beans (*Phaseolus vulgaris* var. Linden). J. Agric. Food Chem. 38, 1523– 1529.

Yakoby, N. and Raskin, I. (2004). A simple method to determine trypsin and chymotrypsin inhibitory activity. J. Biochem. Bioph. Methods. 59, 241-251.

Yan-li, S., Jun-mao, S. and Qing-peng. (2009). Purification and trypsin inhibitor activity of a Sporamin B from sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam. 55-2). Agric. Sci. 8, 808-820.

Yoshizaki, L., Troncoso, M.F., Lopes, J.L.S., Hellman, U., Beltramini, L.M. and Wolfenstein-Todel, C. (2007). *Calliandra selloi* Macbride trypsin inhibitor: Isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. Phytochem. 68, 2625-2634.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
การตรวจสอบกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

สารเคมี

1. สารละลายของเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลาย buffer พีเอช 8.0

2. Nα-Benzoyl-DL-arginene-*p*-nitroanilide (BAPNA) 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

3. กรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 30 โดยปริมาตร

วิธีการ

1. ดูดสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเจือจางที่ความเหมาะสมด้วยไมโครปิเปตจำนวน 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 20 ไมโคกรัมต่อมิลลิลิตร ที่เจือจางในระดับที่เหมาะสม จำนวน 200 ไมโครลิตร

3. ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex mixer

4. บ่มในอ่างควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. เติมสารละลายผสม BAPNA ความเข้มข้น 0.5 1 มิลลิโมลาร์ จำนวน 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

6. หยุดปฏิกิริยาโดยการเติมกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 30 จำนวน 900 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน

7. นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

8. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

9. ชุดควบคุม (positive control) ใช้น้ำกลั้นจำนวน 200 ไมโครลิตร แทนสารละลายตัวอย่าง สำหรับ blank ของชุดควบคุมกระทำโดยการหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 30 ก่อนที่จะทำการเติมสารละลาย BAPNA และ blank ของตัวอย่างทำเช่นเดียวกับ blank ของชุดควบคุมแต่ใช้สารละลายตัวอย่างแทนการใช้น้ำกลั้น

ภาคผนวก ข.
การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry

วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์

1. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์
2. หลอดทดลอง
3. นาฬิกาจับเวลา
4. Vortex mixer
5. ไมโครปิเปต
6. สารละลายโปรตีนมาตรฐาน Bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 1 mg/ml
7. สารละลาย A : โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ร้อยละ 2 ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มัล
8. สารละลาย B : คอบเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2.5H_2O$) ร้อยละ 0.5 ในสารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้นร้อยละ 1
9. สารละลาย C : สารละลายโฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu's phenol reagent) เข้มข้น 1 นอร์มัล(จากขวดเข้มข้นร้อยละ 2 ก่อนใช้ เตรียมสาร C โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 **(เตรียมก่อนใช้เท่านั้น)**
10. สารละลาย D : นำสารละลาย B จำนวน 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย A จำนวน 50 มิลลิลิตร **(เตรียมก่อนใช้เท่านั้น)**

วิธีการทดลอง

1. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างที่ได้รับ (Unknown) 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย D จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที
3. เติมสารละลาย C 200 ไมโครลิตร ลงในสารละลายผสมในข้อ 1 ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที
4. นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบดับกราฟมาตรฐาน BSA

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ดูดสารละลาย BSA เข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 0 20 40 60 100 140 และ 200 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 200 ไมโครลิตร ดังตารางต่อไปนี้

หลอดที่	ปริมาตร BSA (µl)	ปริมาตรน้ำ (µl)	ความเข้มข้น (mg/ml)
1	0	200	0
2	20	180	0.1
3	40	160	0.2
4	60	140	0.3
5	100	100	0.5
6	140	60	0.7
7	200	0	1.0

2. นำสารละลาย BSA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ในข้อ 1 มาหาปริมาณโปรตีนเช่นเดียวกับตัวอย่าง

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐาน และหาสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร แทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐาน BSA

ภาคผนวก ค.

ตารางภาคผนวกที่ 1 ผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	514.274	2	257.137	64.409*
Error	59.884	15	3.992	
Total	574.157	17		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลของสารสกัดชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพการสกัดและการเก็บเกี่ยวสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatmant	134.660	2	67.330	283.953*
Error	3.557	15	.237	
Total	138.217	17		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatmant	2167.079	4	541.770	37.634*
Error	215.939	15	14.396	
Total	2383.018	19		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของเนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	2109.856	4	527.464	375.364*
Error	21.078	15	1.405	
Total	2130.934	19		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผวกที่ 5 ผลของเวลาต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	2041.675	5	408.335	13.476*
Error	909.052	30	30.302	
Total	2950.727	35		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลของเวลาต่อประสิทธิภาพในการสกัดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	5214.384	5	1042.877	78.328*
Error	399.427	30	13.314	
Total	5613.811	35		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
treatment	3635647.321	6	605941.220	1578.266*
Error	13437.500	35	383.929	
Total	3649084.821	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 8 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	356.728	6	59.455	226.590*
Error	9.184	35	.262	
Total	365.912	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 9 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ (specific activity) ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	7295.356	6	1215.893	28.456*
Error	1495.501	35	42.729	
Total	8790.857	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 10 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	4959321.057	6	826553.509	1555.321*
Error	18600.260	35	531.436	
Total	4977921.317	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 11 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	495.199	6	82.533	166.921*
Error	17.306	35	.494	
Total	512.505	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 12 ผลของความร้อนในการทำบริสุทธิ์บางส่วนต่อกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะ (specific activity) ของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	16229.920	6	2704.987	146.065*
Error	648.168	35	18.519	
Total	16878.088	41		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผวกที่ 13 ผลของความคงตัวต่อความร้อนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	25986.745	7	3712.392	1469.326*
Error	40.426	16	2.527	
Total	26027.170	23		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 14 ผลของความคงตัวต่อความร้อนต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	30707.820	7	4386.831	1514.641*
Error	46.341	16	2.896	
Total	30754.160	23		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 15 ผลของความคงตัวต่อพีเอชต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1283.596	9	142.622	22.119*
Error	128.958	20	6.448	
Total	1412.554	29		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 16 ผลของความคงตัวต่อพีเอชต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1130.106	9	125.567	71.893*
Error	34.932	20	1.747	
Total	1165.038	29		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 17 ผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1118.035	4	279.509	3077.161*
Error	.908	10	.091	
Total	1118.943	14		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 18 ผลของโลหะต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1334.383	4	333.596	353.783*
Error	9.429	10	.943	
Total	1343.813	14		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ภาคผนวก ค. (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ 19 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารเอนไซม์ทริปซินจากข้าวสังข์หยดกล้อง

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1220.283	3	406.761	117.048*
Error	27.801	8	3.475	
Total	1248.084	11		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางภาคผนวกที่ 20 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารเอนไซม์ทริปจากข้าวสังข์หยดซ้อมมือ

SV	SS	df	MS	F
Treatment	1329.855	3	443.285	155.613*
Error	22.789	8	2.849	
Total	1352.644	11		

หมายเหตุ

* มีความแตกต่าง ๆ กันทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ประวัติผู้เขียน

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** นายศราวุธ เหมหมัด
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Sarawut Hemmad
2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** นักวิทยาศาสตร์ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
3. **หน่วยงาน** สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
   คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน
   มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
   222 หมู่ 2 ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม
   จังหวัดพัทลุง 93210
   โทรศัพท์: 074-693996
   E-mail: raider_048@hotmail.com

4. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่สำเร็จการศึกษา	ระดับ	ชื่อปริญญา	สถาบัน
2552	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยทักษิณ

5. **สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ**
   เคมีอาหาร (Food Chemistry)
6. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย**

6.1 ผลงานตีพิมพ์

ผุสดี ตังวัชรินทร์ อำนวย บินแหละ **ศราวุธ เหมหมัด** และวลัยรัตน์ นาเลื่อน. 2553. คุณภาพทางจุลินทรีย์และทางกายภาพของปลาดุกสดและปลาดุกร้าในอำเภอควนขนุน จังหวัดพัทลุง. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมมส. 29: 404-412.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. **ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)** รองศาสตราจารย์ ดร.สรรพสิทธิ์ กล่อมเกล้า

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Dr. Sappasith Klomklao

2. **ตำแหน่งปัจจุบัน** อาจารย์

3. **หน่วยงาน** สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหาร
คณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน
มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง
222 หมู่ 2 ตำบลบ้านพร้าว อำเภอป่าพะยอม
จังหวัดพัทลุง 93210

โทรศัพท์: 074-693996

E-mail: sappasith@tsu.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่สำเร็จการศึกษา	ระดับ	ชื่อปริญญา	สถาบัน
2545	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) เกียรตินิยมอันดับสอง	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2550	ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีอาหาร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

5. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (ระบุสาขาวิชาการ)

เคมีและชีวเคมีทางอาหาร (Food Biochemistry and Chemistry)

การทำบริสุทธิ์โปรตีน (Protein Purification)

เอนไซม์ในอาหาร (Food Enzyme)

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 ผลงานตีพิมพ์

1. **Klomklao, S.**, Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2004. Comparative studies on

proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. J. Food Biochem. 28: 355-372.

2. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Simpson, B.K. and Kishimura, H. 2005. Partitioning and recovery of proteinases from tuna spleen by aqueous two-phase systems. Process Biochem. 40: 3061-3067.
3. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Proteolytic degradation of sardine (*Sardinella gibbosa*) proteins by trypsin from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. Food Chem. 98: 14-22.
4. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis)* on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). Food Chem. 98: 440-452.
5. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K. and Saeki, H. 2006. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. Comp. Biochem. Physiol. 144B: 47-56.
6. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Purification and characterization of trypsin from the spleen of tongol tuna (*Thunnus tonggol)*. J. Agric. Food Chem. 54: 5617-5622.
7. Kishimura, H., Tokuda, Y., **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Ando, S. 2006. Enzymatic characteristics of trypsin from the pyloric ceca of spotted mackerel (*Scomber australasicus*). J. Food Biochem. 30: 466-477.
8. Kishimura, H., Tokuda, Y., **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Ando, S. 2006. Comparative study on enzymatic characteristics of trypsins from the pyloric ceca of yellow tail (*Seriola quinqueradiata*) and brown hakeling (*Physiculus japonicus*) J. Food Biochem. 30: 521-534.
9. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2007. Purification and characterization of trypsins from the spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis)*. Food Chem. 100: 1580-1589.

10. Kishimura, H., Tokuda, Y., Yabe, M., **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Ando, S. 2007. Trypsins from the pyloric ceca of jacopever (*Sebastes schlegeli*) and elkhorn sculpin (*Alcichthys alcicornis*): Isolation and characterization. Food Chem. 100: 1490-1495.

11. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2007. 29 kDa trypsin from the pyloric ceca of Atlantic bonito (*Sarda sarda*): Recovery and characterization. J. Agric. Food Chem. 55: 4548-4553.

12. **Klomklao, S**., Kishimura, H., Mamoru, Y. and Benjakul, S. 2007. Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). Comp. Biochem. Physiol. Part 147B: 682-689.

13. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2007. Trypsin from the pyloric ceca of bluefish (*Pomatomus saltatrix*). Comp. Biochem. Physiol. Part B. 148: 382-389.

14. Kishimura, H., **Klomklao, S**. and Benjakul, S. 2008. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollok (*Theragra chalcogramma*). Food Chem. 106: 194-199.

15. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2008. Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). Food Chem. 107: 213-220.

16. **Klomklao, S**., Kishimura, H., Nonami, Y. and Benjakul, S. 2009. Biochemical properties of two isoforms of trypsin purified from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). Food Chem. 115: 155-162.

17. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2009. Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shell with the aid of bluefish trypsin. J. Food Biochem. 33: 201-217.

18. Fuchise, T., Kishimura, H., Sekizaki, H., Nonami, Y., Kanno, G., **Klomklao**, **S**., Benjakul, S. and Chun, B.S. 2009. Purification and characteristics of trypsins from cold-zone fish, Pacific cod (*Gadus macrocephalus*) and saffron cod (*Eleginus gracilis*). Food Chem. 116: 611-616.

19. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2009. Autolysis and Biochemical properties of endogenous proteinases in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*). Int. J. Food Sci. Tech. 44: 1344-1350.

20. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2009. Trypsin from the pyloric ceca of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and characterization. J. Agric. Food Chem. 57: 7097-7103.

21. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K. and Tanaka, M. 2010. A heat stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): Effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. Int. J. Food Sci. Tech. 45: 163-169.

22. Kishimura, H., **Klomklao**, **S**., Nalinanon, S., Benjakul, S., Chun, B.S. and Adachi, K. 2010. Comparative study on thermal stability of trypsin from the pyloric ceca of threadfin hakeling (*Laemonema longipes*). J. Food Biochem. 34: 50-65.

23. Chun, B.S., Kishimura, H., Kanzawa, H., **Klomklao, S.,** Nalinanon, S., Benjakul, S. and Ando, S. 2010. Application of supercritical carbon dioxide for preparation of starfish phospholipase A_2. Process Biochem. 45: 689-693.

24. Kishimura, H., Nagai, Y., Fukumorita, K.,Adachi, K., Chiba, S., Nagajima, S., Saeki, H., **Klomklao**, **S**., Nalinanon, S., Benjakul, S. Chun, B.S. and Saeki, H. 2010. Acid-and heat-stable trypsin inhibitory peptide from the viscera of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*). J. Food Biochem. 34: 748-763.

25. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2010. Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. J. Food Biochem. 34: 711-729.

26. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K. and Tanaka, M. 2010. Effect of salts and polyethylene glycol on the partitioning and recovery of trypsin from hybrid catfish viscera in aqueous two phase systems. J. Food Biochem.34: 730-747.

27. **Klomklao, S**., Kishimura, H., Benjakul, S., Simpson, B.K. and Visessanguan, W. 2010. Cationic trypsin: A predominant proteinases in Pacific saury (*Cololabis Saira*) pyloric ceca. J. Food Biochem. 34: 1105-1123.

28. Kanno, G., Kishimura, H., Ando, S., **Klomklao, S.**, Nalinanon, S., Benjakul, S., Chun, B.S. and Saeki, H. 2011. Structural properties of trypsin from cold-adapted fish, arabesque greenling (*Pleurogrammus azonus*). Eur. Food Res. Technol. 232: 381-388.

29. **Klomklao, S.**, Benjakul, S., Kishimura, H. and Chaijan, M. 2011. 24kDa trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). Food Chem. 129: 739-746.

30. **Klomklao, S.**, Benjakul, S., Kishimura, H. and Chaijan, M. 2011. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.)R. Wilczek. Food Chem. 129: 1348-1354.

31. Chun, B.S., Kishimura, H., Nalinanon, S., **Klomklao, S.** and Benjakul, S. 2011. Mackerel trypsin purified from defatted viscera by supercritical carbon dioxide. J. Amino Acids. 1-7

32. Fuchise, T., Kojoma, M., Sekizaki, H., Kishimura, H., **Klomklao, S.,** Nalinalon, S., Benjakul, S. and Chum, B.S. 2011. Simple preparation of Pacific cod trypsin for enzymatic peptide synthesis. J. Amino Acids.1-8.

33. Kanno, G., Kishimura, H., Yamamoto, J., Ando, S., Shimizu, T., Benjakul, S., **Klomklao, S.,** Nalinanon, S., Chun, B.S. and Saeki, H.2011.Cold-adapted structural properties of trypsins from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) and Arctic cod (*Boreogadus saida*). Eur. Food Res. Technol. 233: 963-972.

34. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2013. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. Food Chem. 136: 1006-1012.

35. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2013. Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates from toothed ponyfish muscle treated with the viscera extract from hybrid catfish. Int. J. Food Sci. Tech. 48: 1483-1489**.**

36. Chaijan, M., **Klomklao, S.** and Benjakul, S. 2013. Characterization of muscles from Frigate mackerel (*Auxis thazard*) and catfish (*Clarias macrocephalus*). Food Chem. 139: 414-419.

37. Wongwichian, C., Chaijan, M. and **Klomklao, S**. 2013. Physicochemical instability of muscles from two species of scad during iced storage. Chiang Mai J. Sci. 40: 681-388.

38. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Kishimura, H. 2014. Optimum extraction and recovery of trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe and its biochemical properties. Int. J. Food Sci. Tech. 49: 168-173.

39. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2014. Anionic trypsin in Pacific saury (*Cololabis Saira*) viscera: Purification and biochemical characteristics. J. Aquatic Food Prod. 23: 186-200.

40. Limsuwanmanee, J., Chaijan, M., Manurakchinakorn, S., Panpipat, W., **Klomklao, S.** and Benjakul, S. 2014. Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from stingray (*Himantura signifier*) non-protein nitrogenous fraction and sugar model systems. LWT-Food Sci. Technol. 57: 718-724.

41. Takahashi, K., Amemiya, H., Tanaka, M., **Klomklao, S.,** Okazaki, E. and Osako, K. 2014. Influence of endogenous protease on heat-induced gelation properties of pink shrimp *Pandalus eous* meat. Nippon Suisan Gakkaishi. 80: 979-988.

42. Wongwichian, C., **Klomklao, S.,** Panpipat, W., Benjakul, S. and Chaijan, M. 2015. Interrelationship between myoglobin and lipid oxidations in oxeye scad (*Selar boops*) muscle during iced storage. Food Chem. 174: 279-285.

43. **Klomklao, S.** and Benjakul, S. 2015. Effect of trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*) on proteolysis and gel properties of threadfin bream (*Nemipterus bleekeri*). LWT-Food Sci.Technol. 63: 906-911.

44. **Klomklao, S.**, Benajkul, S. and Simpson, B.K. 2015.Inhibition of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus)* proteinases by trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe. J. Food Biochem. 39: 501-507.

45. Kimtun, P., Choonut, O., Yunu, T., Paichid, N., **Klomklao, S.** and Sangkharak, K. 2015. Biodiesel production using lipase from oil palm fruit as a catalyst. Energy Procedia. 79: 822-826.

46. **Klomklao , S.**, Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K. and Simpson, B.K. 2016. Trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe: Effects on gel properties of surimi from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*). LWT-Food Sci.Technol. 65: 122-127.

47. Sripokar, P., Poonsin, T., Chaijan, M., Benjakul, S. and **Klomklao, S.** 2015. Proteinases from albacore tuna liver: Characterization and optimum extractant. J. Food Biochem. **Accepted.**

48. Wongwichian, C., Chaijan, M., **Klomklao, S.** and Benjakul, S. 2015. Autolysis and characterization of sarcoplasmic and myofibril associated proteinases of oxeye scad (*Selar boops*) muscle. J. Aquatic. Food Prod. T. **Accepted.**

49. **Klomklao, S.,** Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K. and Simpson, B.K. 2015. Purification and characterization of trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe. J. Food Biochem. **Accepted.**

50. Sripokar, P., Chaijan, M., Benjakul, S. and **Klomklao, S.** 2015. Enzymatic hydrolysis of starry triggerfish (*Abalistes stellaris*) muscle using liver proteinase from albacore tuna (*Thunnus alalunga*). J. Food Sci. Tech. **Accepted.**

6.2 ผลงานประชุมเชิงวิชาการ

1. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2003. Characterization of proteinases from tuna spleen. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, October 20-22, 2003. Golden Jubilee Convention Hall, Khon Kean, Thailand.
2. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Simpson, B.K. 2004. Partitioning and recovery of proteinases from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen by aqueous two-phase systems. The 6th Agro-Industrial Conference, May 28-29, 2004. Impact, Bangkok, Thailand.
3. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Simpson, B.K. 2004. Partitioning and recovery of proteinases from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen by aqueous two-phase systems. RGJ Seminar XXX: Biosciences and Biotechnology for Development of Southern Thailand, August 13, 2004. Faculty of Agro-Industry, PSU, Songkhla, Thailand.
4. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., Simpson, B.K. and Saeki, H. 2005. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: Purification and characterization. The Joint Meeting of the Tohoku-Hokkaido Branches of JSFS, November 4-5, 2005. Faculty of Agriculture, TohokuUniversity, Sendai, Japan.
5. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Enzymatic hydrolysis of sardine proteins by trypsin from tuna spleen. 2006 CIFST/AAFC Joint Conference, May 28-30, 2006. Delta Hotel, Downtown, Montreal, Canada.
6. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2006. Purification and characterization of trypsins from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spleen. IUFoST 13th World Congress of Food Science and Technology, September 17-21, 2006. Nantes, France.
7. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K.

2007. A 29 kDa protease from the digestive glands of Atlantic bonito (*Sarda sarda*): Recovery and characterization. Food Innovation Asia 2007: The 9th Agro-Industrial Conference "Q" Food for Good Life, June 14-15, 2007. BITEC, Bangkok, Thailand.

8. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2007. Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shell with the aid of bluefish trypsin. IFT 2007 Annual Meeting & Food Expo, July 28- August 1, 2007. Chicago, USA.
9. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. and Simpson, B.K. 2007. Trypsin from tongol tuna (*Thunnus tonggol*) spleen: Purification and characterization. The 33rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 33), October 18-20, 2007. WalailakUniversity, Nakhon Si Thammarat, Thailand.
10. **Klomklao, S**., Benjakul, S.and Kishimura, H. 2008. Biochemical characteristics of proteinases from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) viscera. Food Innovation Asia Conference 2008: FoSTAT-The 10th Agro-Industrial Conference, June 12-13, 2008. BITEC, Bangkok, Thailand.
11. **Klomklao, S**., and Kishimura, H. 2008. Properties of trypsin purified from the pyloric ceca of Pacific saury (*Cololabis saira*). The 34rd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 34), October 31- November 2, 2008. QueenSirikitNationalConvention Center, Bangkok, Thailand.
12. Amemiya, H., Tanaka, M., **Klomklao, S.** and Osako, K.Studies on the gelation property of deep-sea water shrimp (*Pandalus borealis*) meat. Spring Meeting 2009 of the Japanese Society of Fisheries Science, March 27-31, 2009. TokyoUniversity of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan.
13. **Klomklao, S**., Benjakul, S., Osako, K. and Tanaka, M. 2009. Extraction, purification and biochemical properties of trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*). Food Innovation Asia Conference 2009: FoSTAT-The 11th Agro-Industrial Conference, June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.
14. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2009. Endogenous proteinases in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*): Autolysis and biochemical characteristics. Food

Innovation Asia Conference 2009: FoSTAT-The 11th Agro-Industrial Conference, June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand.

15. **Klomklao, S**., Benjakul, S., and Kishimura, H. 2009. Proteinases in hybrid catfish viscera: Characterization and effect of extraction media. 9th the Annual Thailand Research Fund Meeting, October 15-17, 2009. HolidayInnResortReagentBeach, Cha-Am, Petchburi, Thailand

16. Chamsai, P., Chaijan, M. and **Klomklao, S**. 2009. Antioxidative activity of Maillard reaction products from porcine sarcoplasmic protein-sugar model system. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 35), October 15 – October 17, 2009. The Tide Resort (BansaenBeach), Chonburi, Thailand.

17. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2009. Two isoforms of trypsin from the intestine of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*): Purification and characterization. 11th ASEAN Food Conference 2009, October 21-23, 2009. The Rizqun International Hotel, Bandar Seri Begawan, Brunei Darussalam.

18. **Klomklao, S**., Kishimura, H. and Benjakul, S. 2010. Two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*): Purification and biochemical properties. Food Innovation Asia Conference 2010: The 12th Agro-Industrial Conference, June 17-18, 2010. BITEC, Bangkok, Thailand.

19. **Klomklao, S**. and Benjakul, S. 2010. Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinops melanostictus*). Food Innovation Asia Conference 2010: The 12th Agro-Industrial Conference, June 17-18, 2010. BITEC, Bangkok, Thailand.

20. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Simpson, B.K. 2010. Trypsin from the pyloric ceca of bluefish: Purification and biochemical properties. International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2010, November 19-20, 2010. MaeFahLuangUniversity, Chiang Rai, Thailand.

21. **Klomklao, S**. and Benjakul, S. 2010. Production and acceleration of fish sauce fermentation by adding skipjack tuna spleen and reducing the salt content. 2nd ChiangMaiUniversity Agro-Industrial Conference, November 22-23, 2010. ChiangMaiUniversity, Chiang Mai, Thailand.

22. Amemyia, H., Tanaka, M., **Klomklao, S.** and Osako, K. 2010. The effects of egg white on the aptitude of pink shrimp as a raw material for kamaboko product. 5th International Conference on Innovations in Food & Bioprocess Technology, December 7-9, 2010. Asian Institute of Technology, Pathumthani, Thailand.

23. **Klomklao, S.** and Benjakul, S. Isolation of trypsin from hybrid catfish viscera by partitioning in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-phosphate. 12th ASEAN Food Conference 2011, June 16-18, 2011. BITEC, Bangkok, Thailand.

24. **Klomklao, S**., Benjakul, S. and Kishimura, H. Purification and biochemical properties of trypsin from the pyloric ceca of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*). 12th ASEAN Food Conference 2011, June 16-18, 2011. BITEC, Bangkok, Thailand.

25. Chaijan, M., Panpipat, W., Benjakul, S., **Klomklao, S.** and Riebroy, S. 2012. Characterization of dark and ordinary muscles from frigate mackerel (*Auxisthazard*). International Conference on Food and Applied Bioscience, February 6-7, 2012. Kantary Hills Hotel, Chiang Mai, Thailand.

26. Wongwichian, C., Chaijan, M. and **Klomklao, S.** 2012. Physicochemical instability of muscles from two species of scad during iced storage. International Conference on Food and Applied Bioscience, February 6-7, 2012. Kantary Hills Hotel, Chiang Mai, Thailand.

27. **Klomklao, S.,** Chaijan, M. and Benjakul, S. 2012. Purification and biochemical characteristics of trypsin from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). International Conference on Food and Applied Bioscience, February 6-7, 2012. Kantary Hills Hotel, Chiang Mai, Thailand.

28. **Klomklao, S**.and Benjakul, S. 2012. Production and characterization of protein hydrolysate from tooth ponyfish (*Gazza minuta*) muscle using hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepnus*) viscera extract. Food Innovation ASIA Conference 2012, June 14-15, 2012. BITEC, Bangkok, Thailand.

29. Wongwichian, C., Chaijan, M. and **Klomklao, S**.2012. Characteristics and gel-forming ability of surimi from oxeye scad (*Selar boops*) and shrimp scad (*Alepes djedaba*). Food Innovation ASIA Conference 2012, June 14-15, 2012. BITEC, Bangkok, Thailand.

30. **Klomklao, S**., Benjakul, S., and Kishimura, H. 2012. 24 kDa Trypsin: A predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias*

gariepinus). 12th the Annual Thailand Research Fund Meeting, October 10-12, 2012. Holiday Inn Resort Reagent Beach, Cha-Am, Petchburi, Thailand.

31. Chaijan, M., Panpipat, W., Wongwichian, C., Riebroy, S., **Klomklao, S.** and Benjakul, S. Prooxidative activity of catfish myoglobin on lipid oxidation. Eurofoodchem XVII, May 7-10, 2013. Istanbul, Turkey.
32. **Klomklao, S**.and Benjakul, S. 2013. Functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates from toothed ponyfish muscle treated with hybrid catfish viscera extract. The 15th Food Innovation ASIA Conference 2013, June 13-14, 2013. BITEC, Bangkok, Thailand.
33. **Klomklao, S**.Pinyo, P. and Heemlah, S. 2013. Recovery and biochemical characteristics of trypsin inhibitor from sangyod rice. The 15th Food Innovation ASIA Conference 2013, June 13-14, 2013. BITEC, Bangkok, Thailand.
34. **Klomklao, S.** 2014. Study on chemical composition and functional properties of protein hydrolysate from toothed ponyfish muscle treated with hybrid catfish viscera extract. The Second Higher Education Research Promotion Congress (HERP CONGRESS II), January 22-24, 2014. Miracle Grand Convention Hotel, Bangkok, Thailand.
35. **Klomklao, S**. 2014. Optimum extraction and recovery of trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe and its biochemical characteristics. The 16th Food Innovation ASIA Conference 2014, June 12-13, 2014. BITEC, Bangkok, Thailand.
36. Sripokar, P., **Klomklao, S.,** Chaijan, M. 2014. Extraction and biochemical properties of proteinases from liver of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). The 16th Food Innovation ASIA Conference 2014, June 12-13, 2014. BITEC, Bangkok, Thailand.
37. Chamsai, P., Panpipat, W., **Klomklao, S.,** Chaijan, M. 2014. Cross-linking of Maillard reaction products towards porcine myofibrillar proteins. The 16th Food Innovation ASIA Conference 2014, June 12-13, 2014. BITEC, Bangkok, Thailand.
38. Wongwichian, C., Chaijan, M., Panpipat, W. and **Klomklao, S.,** 2014. Negative effect of alkaline-saline and sodium hypochlorite washing on the physicochemical properties and gel-forming ability of oxeye scad (*Selar boops*) surimi. The 2nd International Conference on Food and Applied Bioscience, February 6-7, 2014. The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand.

39. Wongwichian, C., Chaijan, M., Panpipat, W. and Klomklao, S. 2014. Physicochemical and gelling properties of surimi from oxeye scad (*Selar boops*) and shrimp scad (*Alepes djedaba*). The 6th Walailak Research National Conference, July 3-4, 2014. Walailuk University, Nakhon Si Thammarat, Thaialnd.

40. Sripokar, P., **Klomklao, S.,** Chaijan, M. 2014. Proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) liver: Characterization and effect of extraction media. The 3rd International Symposium 2014, August 23-25, 2014. Thaksin University, Phatthalung, Thailand.

41. **Klomklao, S.** 2015. Trypsin inhibitor from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) roe : Autolysis inhibition and inhibitory effect on modori inducing proteinases of bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) muscle. The Third Higher Education Research Promotion Congress (HERP CONGRESS III), March 9-11, 2015. Nakhon Si Thammarat Rajabhat University, Nakhon Si Thammarat, Thailand.

42. Sripoka, P., Chaijan, M., and **Klomklao, S**. (2015). Biochemicals properties of proteinase from liver of albacore tuna (*Thunnus alalunga*) partitioned by Aqueous two-phase system. The 25th Thaksin University National Conference, June 10-12, 2015. Thaksin University, Songkhla, Thailand.

43. Kuepethkaew, S., Sangkharak, K. and **Klomklao, S.** (2015). Effect of extraction media on the recovery of lipase from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamai*). The 25th Thaksin University National Conference, June 10-12, 2015. Thaksin University, Songkhla, Thailand.

44. Sripokar, P., Chaijan, M. and **Klomklao, S.** (2015). Use of aqueous two-phase system for partitioning and recovery of proteinases from liver of albacore tuna (*Thunnus alalunga*). The 17th Food Innovation ASIA Conference 2015, June 18-19, 2015. BITEC, Bangkok, Thailand.

45. Poonsin, T., Kishimura, H., Simpson, B.K. and **Klomklao, S.** (2015). Biochemical characteristics of proteinases from albacore tuna (*Thunnus alalunga*) spleen. The 17th Food Innovation ASIA Conference 2015, June 18-19, 2015. BITEC, Bangkok, Thailand.

46. Kuepethkaew, S., Sangkharak, K. and **Klomklao, S.** (2015). Characterization of lipase from hepatopancreas of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamai*). The 17th Food Innovation ASIA Conference 2015, June 18-19, 2015. BITEC, Bangkok, Thailand.

6.3 บทความเชิงวิชาการ

Klomklao, S. 2008. Digestive proteinases from marine organisms and their applications. Songklanakarin J. Sci. Technol. 30: 37-46.

6.4 Book Chapter

1. Benjakul, S., **Klomklao, S.** and Simpson, B.K. 2010. Enzyme in Fish Processing. In Enzyme in Food Technology, (R.J. Whitehurst and M.V.,Oort, eds.). pp.211-235, UK: Blackwell Publishing.
2. Simpson, B.K., Rui, X. and **Klomklao, S.** 2012. Enzymes in Food Processing. In Food Biochemistry and Food Processing, (B.K. Simpson, ed). pp. 181-206, UK: John Wiley & Sons, Inc.
3. **Klomklao, S.**, Benjakul, S. and Simpson, B.K. 2012. Seafood Enzymes: Biochemical Properties and Their Impact on Quality. In Food Biochemistry and Food Processing, (B.K. Simpson, ed). pp. 207-284, UK: John Wiley & Sons, Inc.
4. Simpson, B.K., Benjakul, S. and **Klomklao, S.** 2012. Natural Food Pigment. In Food Biochemistry and Food Processing, (B.K. Simpson, ed). pp. 704-722, UK: John Wiley & Sons, Inc.

6.5 การทำวิจัยและการฝึกอบรม

- Participated in workshop on “Quality and Functionality of Meat” at Faculty of Agriculture Technology, King Mongkut’s Institute of Technology Ladkrabang. Bangkok, Thailand (April 2-8, 2004).

- Participated in Seminar on “Optimization techniques and strategic design for biomolecules purification” at Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Thailand (October, 2004).

- Participated in international seminar on “Effective utilization of marine food resources” at Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand (December, 2003).

- Received Scholarship from Commission on Higher Education to conduct the research on ‘Purification and Characterization of Proteinases from Tuna Spleen' at Hokkaido University, Hokkaido, Japan (April, 2005 – March, 2006).

- Received Scholarship from Thailand Research Fund under the Royal Golden Jubilee Ph. D. Program (PHD/0216/2546) to conduct the research on ‘Purification and Characterization of Trypsin from the Pyloric Caeca of Bluefish and Bonito and Recovery and Characterization of Carotenoprotein from Shrimp Waste by Bluefish trypsin’ at McGill University, Macdonald Campus, Quebec, Canada (May – November, 2006).

- Received Scholarship from Commission on Higher Education under UMAP Program to conduct the research on ‘Heat Stable Trypsin Inhibitor in Adzuki Bean: Isolation and Characterization’ at Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, Japan (April – May, 2008).

6.6 รางวัล

- Recipient of 3rd place in the 1st FoSTAT Quiz Bowl, 2001

- The excellent poster presentation in The Poster Competition at the 9th Agro-Industrial Conference, June 14-15, 2007. BITEC, Bangkok, Thailand

- Faculty Outstanding Thesis Award, Prince of Songkla University, Year 2007

- University Outstanding Thesis Award, Prince of Songkla University, Year 2007

- The Best Ph.D. Thesis Award, Agro-Industry Academic Council Association (AIAC), Year 2008.

-The best poster presentation in The Poster Competition at the 11th Agro-Industrial Conference, June 18-19, 2009. BITEC, Bangkok, Thailand

- TSU Top Publication Award, Year 2009

- Recipient of 2nd place in The Poster Competition at the 2nd Chiang Mai University Agro-Industrial Conference, November 22-23, 2010. Chiang Mai, Thailand

- TSU Top Publication Award, Year 2010

- Faculty Top Beloved Lecturer Award, Thaksin University, Year 2010

- Outstanding TRF Research Project Year 2011

- Faculty Top Beloved Lecturer Award, Thaksin University Year 2011

- Recipient of 2nd place in The Poster Competition at the International Conference on Food and Applied Bioscience, February 6-7, 2012. Kantary Hills Hotel, Chiang Mai, Thailand.

- Recipient of 2nd place in TSU Best Science and Technology Research Award, Year 2012

- Recipient of 2nd place in TSU Top Citation Research Award, Year 2012

- PSU Outstanding Young Alumni Award, Year 2012

- อาจารย์ตัวอย่างด้านการเรียนการสอน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2555

- อาจารย์รุ่นใหม่ด้านการเรียนการสอน สาขาการเกษตร ระดับดีเด่น สภาคณบดีสาขาการเกษตรแห่งประเทศไทย ประจำปีการศึกษา 2556

- อาจารย์รุ่นใหม่ด้านการวิจัย สาขาการเกษตร ระดับดีเด่น สภาคณบดีสาขาการเกษตรแห่งประเทศไทย ประจำปีการศึกษา 2557

- ผลงานวิจัยพื้นฐานดีเด่น ระดับดีเด่น มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2557

- ผู้นำชื่อเสียงเกียรติภูมิสู่มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2558

6.7 Ad hoc Reviewer for:

Journal of Food Biochemistry

Journal of the Science of Food and Agriculture

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

Journal of Food Science

Food Hydrocolloids

Food Chemistry

Journal of Agricultural and Food Chemistry

International Journal of Food Science and Technology

Journal of Food and Nutritional Research

Biotechnology and Bioprocess Engineering

Journal of Medicinal Food

Process Biochemistry

Journal of Aquatic Food Product Technology

Fisheries Science

International Aquatic Research

Cereal Chemistry

African Journal of Agricultural Research

African Journal of Biotechnology

Fish Physiology and Biochemistry

International Food Research Journal

Preparative Biochemistry and Biotechnology

Phytochemistry

Marine Drugs

Walailak Journal of Science and Technology

Songklanakarin Journal of Science and Technology

Chiang Mai Journal of Science

6.8 Invited speaker:

Klomklao, S., Benjakul, S. and Simpson, B.K. 2006. Useful enzymes from seafood processing discards. Fishery & Aquaculture By-Products Workshop. Oct 22-24, 2006. Fisheries and Marine Institute, Memorial University of Newfoundland, St. John's, Newfoundland, Canada.

6.9 Collaborative universities/institutions

1. Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of SongklaUniversity, Hat Yai, Thailand
2. Department of Food Technology, School of Agricultural Technology, WalailakUniversity, Nakhon Si Thammarat, Thailand
3. Laboratory of Marine Products and Food Science, Research Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan
4. Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Canada.
5. Department of Food Science and Technology, TokyoUniversity of Marine Science and Technology, Japan.