ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)

ปริญญา

ผลิตภัณฑ์ประมง — **สาขา**

ผลิตภัณฑ์ประมง — **ภาควิชา**

เรื่อง การทำให้บริสุทธิ์ คุณลักษณะ และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

Purification, Characterization and Application of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

นามผู้วิจัย นางสาวจีรภา หินซุย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์วันชัย วรวัฒนเมธีกุล, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์นงนุช รักสกุลไทย, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การทำให้บริสุทธิ์ คุณลักษณะ และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน จากอวัยวะภายในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

Purification, Characterization and Application of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

โดย

นางสาวจีรภา หินซุย

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง)
พ.ศ. 2552

จีรภา หินซุย 2552: การทำให้บริสุทธิ์ คุณลักษณะ และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linneaus) ปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) สาขาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง ประธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์ วันชัย วรวัฒนเมธีกุล, Ph.D. 146 หน้า

การสกัดเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิลด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.05 M ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 M และแคลเซียมคลอไรด์ 0.02 M ในอัตราส่วน 1: 5 (w/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่า ม้ามมีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุด (1.68 U/ml) รองมาคือ ลำไส้ ตับ อวัยวะภายในรวม และกระเพาะ ขณะที่กิจกรรมสูงที่สุดของเอนไซม์ไคโมทริปซินพบที่ลำไส้ (0.17 U/ml) รองมาคือ ม้าม อวัยวะภายในรวม ตับ และกระเพาะ ลำไส้มีกิจกรรมจำเพาะ (0.17 U/ mg protein) ใกล้เคียงกับม้าม (0.19 U/ mg protein) แต่มีปริมาณมากกว่า จึงเลือกลำไส้เป็นอวัยวะที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ จึงนำเอนไซม์จากลำไส้ของปลานิลมาทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่าง ๆ พบว่า ส่วนที่ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ S711, S712, S721 และ S722 โดย S711 เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 26,000 Da มีกิจกรรมและความคงตัวอยู่ในช่วง pH 7-10 มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 °C และไม่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 °C เอนไซม์นี้ตอบสนองต่อสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซรีนโปรติเอส (PMSF และอะโพรทินิน) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (SBTI และ TLCK) และ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (TPCK) เอนไซม์นี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน นอกจากนี้พบว่าส่วนที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสมีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ S511, S512, S521 และ S522 โดย S521 เป็นเอนไซม์ที่แยกออกมาได้มากที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 51,800 Da มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 และอุณหภูมิ 70 °C มีความคงตัวที่ pH 7-10 แต่ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 °C เอนไซม์นี้ตอบสนองต่อสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซรีนโปรติเอส สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (SBTI) และ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์นี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ไคโมทริปซิน นำเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลมาสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกรามในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือที่ pH 8.0 และอุณหภูมิ 25 °C พบว่าเวลา 3 ชม. เป็นเวลาที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีโนโปรตีนที่ให้ปริมาณผลผลิต 54.02% สูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากโค (48.3%) และการไม่ใช้เอนไซม์ (45.76%)

_____ _____ / /

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่อประธานกรรมการ

Jirapa Hinsui 2009: Purification, Characterization and Application of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus). Doctor of Philosophy (Fishery Products), Major Field: Fishery Products, Department of Fishery Products. Thesis Advisor: Associate Professor Wanchai Worawattanamateekul, Ph.D. 146 pages.

Nile tilapia enzyme was extracted with 0.05 M Tris-HCl, contained 0.5 M NaCl and 0.02 M $CaCl_2$ in ratio 1:5 (w/v) at 4 °C. Spleen was found to be the best source for trypsin with the highest activity at 1.68 units/ ml, followed by intestine, liver, mixed viscera and stomach, respectively. The best source for chymotrypsin was intestine, giving the highest activity at 0.17 units/ ml, followed by spleen, mixed viscera, liver and stomach, respectively. Specific activity of intestine trypsin (0.17 U/ mg protein) is closer to spleen trypsin (0.19 U/ mg protein). The quantity of intestine is more than spleen, so intestine was selected source for enzyme extraction. The enzymes were purified by ammonium sulfate precipitation, followed by chromatography columns. There were 4 enzyme fractions in hydrochloric acid fraction, S711, S712, S721 and S722. The highest concentration of enzymes was S711. The molecular weight was estimated to be 26,000 Da by SDS-PAGE. Enzyme activity and stability were in pH range of 7.0 -10.0. The optimum temperature was 70 °C. It was unstable at the temperatures higher than 50 °C. The activity was inhibited by serine protease inhibitor (PMSF and aprotinin), trypsin inhibitor (SBTI and TLCK) and chymotrypsin inhibitor (TPCK). It showed that it should be trypsin-like enzyme. There were 4 enzyme fractions in Tris fraction, S511, S512, S521 and S522. The highest concentration of enzymes was S521. The molecular weight was estimated to be 51,800 Da. The pH and temperature optimum was 9.0 and 70 °C, respectively. It was stable in pH range of 7.0 -10.0, but it was unstable at the temperatures higher than 60 °C. The activity was inhibited by PMSF and aprotinin, SBTI and TPCK. It showed that it should be chymotrypsin-like enzyme. Nile tilapia trypsin was used to extract carotenoprotein from head of giant freshwater prawn at pH 8.0 and 25 °C, optimum condition for enzyme, then found that 3 hours was suitable time to extract, giving the highest yield (54.02%) , followed by bovine trypsin (48.3%) and no enzyme (45.76%), respectively.

_____ _____ _____ / /

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. ดร. วันชัย วรวัฒนเมธีกุล ประธานกรรมการที่ปรึกษา รศ. ดร. นงนุช รักสกุลไทย และ ผศ. ดร. จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร กรรมการที่ปรึกษา ผศ. ดร. ปรัชญา มุสิกสินธร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และเสนอแนวทางการแก้ปัญหา ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ คณบดีคณะประมง และ ดร. วรรณพ วิเศษสงวน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้คำปรึกษา ตลอดจนอนุเคราะห์อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย ขอกราบขอบพระคุณ Associate Professor Dr. Benjamin K. Simpson ที่ให้โอกาสข้าพเจ้าทำวิจัยบางส่วนที่ Department of Food Science and Agricultural Chemistry, McGill University, Macdonald Campus ประเทศแคนาดา และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และมอบกำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาของการศึกษา

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษา และวิจัยตลอดหลักสูตรการศึกษา

ขอขอบคุณจันทร์จรัส วัฒนะโชติ สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล บางแสน มหาวิทยาลัยบูรพา และสถานีวิจัยประมงศรีราชา คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ที่ให้การอนุเคราะห์เครื่องมือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมงทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการศึกษาและทำวิจัย ขอขอบคุณความมีน้ำใจความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน และกำลังใจของ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ นิสิตปริญญาโท และปริญญาเอก ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง อีกทั้งขอขอบคุณและขออภัยท่านที่ให้การสนับสนุนแต่มิได้เอ่ยนาม

ท้ายที่สุด ขอระลึกถึงพระคุณของคุณแม่ คุณพ่อ และทุกคนในครอบครัวที่มอบความรัก ความห่วงใย กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

จีรภา หินซุย

มีนาคม 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	43
อุปกรณ์	43
วิธีการ	46
ผลและวิจารณ์	53
สรุป	93
ข้อเสนอแนะ	94
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	95
ภาคผนวก	115
ภาคผนวก ก การเตรียมคอลัมน์แอฟฟินิตี (affinity column)	116
ภาคผนวก ข การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์	119
ภาคผนวก ค การตรวจวัดโปรตีนเชิงปริมาณและคุณภาพ	122
ภาคผนวก ง การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี	128
ภาคผนวก จ การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์	133
ภาคผนวก ฉ การประเมินต้นทุนการผลิต	136
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	146

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 – 2550	5
2	องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่สกัดได้จากปลา anchovy และโค	13
3	อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซิน จากสัตว์น้ำ	15
4	ปริมาณแคโรทีนอยด์ในปลากลุ่ม California rockfish (*Seabastes* sp.)	20
5	แคโรทีโนโปรตีนที่พบในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน	31
6	องค์ประกอบของแคโรทีโนโปรตีนจากสัตว์น้ำ	32
7	ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 - 2548	34
8	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยใน ปี พ.ศ. 2545 - 2550	35
9	น้ำหนักและอวัยวะภายในของปลานิล	53
10	การสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในของปลานิล	54
11	การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	55
12	ขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากลำไส้ ปลานิลบริสุทธิ์	57
13	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของ สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์	78
14	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของ สารอะโพรทินิน	79
15	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง	81
16	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของ สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน	83
17	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของ สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน	85

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
18	องค์ประกอบทางเคมีของหัวกุ้งก้ามกราม	86
19	องค์ประกอบทางเคมีของหัวกุ้งชนิดต่างๆ	87
20	ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกรามที่ไม่เติมเอนไซม์ เติมเอนไซม์ทริปซินจากโค และเอนไซม์ทริปซินจากปลานิล	89

ตารางผนวกที่

1	ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน	140
2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม	141
3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแคโรทีนอยด์ในแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม	141
4	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม	141
5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณส่วนที่เหลือจากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม	142
6	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนที่เหลือจากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม	142

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์น้ำ	21
2	โครงสร้างโปรวิตามินในรูปต่างๆ	23
3	โครงสร้างของวิตามินเอ	24
4	โครงสร้างของเบตาไอโอโนน	24
5	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส และเอนไซม์ทริปซินในสารละลายไฮโดรคลอริกที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี	56
6	แถบโปรตีนเปรียบเทียบขั้นตอนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์	58
7	แถบโปรตีนของสารมาตรฐานโปรตีนเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากตับอ่อนของโค และเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากลำไส้ของปลานิล	59
8	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ถูกชะ ออกมาจากคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution	60
9	แถบโปรตีนของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution	61
10	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution	62
11	แถบโปรตีนของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution	63
12	กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	65
13	ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อสภาวะที่มี pH ต่างๆ	65
14	กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	66
15	ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ต่อสภาวะที่มี pH ต่างๆ	66
16	กิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างๆ	68
17	ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างๆ	68

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
18	กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างๆ	69
19	ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่างๆ	69
20	กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	71
21	ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	71
22	กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	72
23	ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ในสภาวะที่มี pH ต่างๆ	72
24	กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิต่างๆ	74
25	ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินที่อุณหภูมิต่างๆ	74
26	กิจกรรมเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่างๆ	75
27	ความคงทนเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิต่างๆ	75
28	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารฟีนิลมีเทน ซัลโฟนิลฟลูโอไรด์	77
29	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารอะโพรทินิน	79
30	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง	80
31	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของ สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน	82
32	ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของ สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน	84
33	การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนละลายน้ำที่สกัดได้จากหัวกุ้งก้ามกรามโดยการไม่เติมเอนไซม์ เติมเอนไซม์ทริปซินจากโค และเอนไซม์ทริปซินจากปลานิล	91

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่		หน้า
1	วิธีการสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิล	143
2	วิธีการทำเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิลให้บริสุทธิ์	144
3	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุลและ Df ของสารมาตรฐานโปรตีน (fermentas Life Science, SM0441)	145
4	ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล และDf ของสารมาตรฐานโปรตีน (BioRad, 161-0309)	145

คำอธิบายสัญลักษณ์และอักษรย่อ

BAPNA	=	N-α-Benzoyl-DL-Argenine-p-Nitroanilide
SAAPPNA	=	N-Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Phenyl-p- Nitroanilide
PMSF	=	ฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (Phenylmethanesulfonyl fluoride)
TLCK	=	โทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน (N∝-*p*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone)
TPCK	=	โทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone)
SBTI	=	สารสกัดจากถั่วเหลืองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Soybean Trypsin Inhibitor)

การทำให้บริสุทธิ์ คุณลักษณะ และการใช้ประโยชน์เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

Purification, Characterization and Application of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus)

คำนำ

การขยายตัวของโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำทำให้มีเศษเหลือ ได้แก่ เศษเนื้อ หนัง กระดูก และอวัยวะภายในของสัตว์น้ำนั้น ๆ เกิดขึ้นมากมาย จากเดิมที่มีการจัดการกับเศษเหลือเหล่านี้ไม่ถูกต้องและไม่มีประสิทธิภาพ โดยการนำเศษเหลือเหล่านี้ไปฝังดินหรือทิ้งลงในทะเล ทำให้เป็นปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ต่อมาได้นำเศษเหลือเหล่านี้มาหมักเป็นปุ๋ยเพื่อใช้ทางการเกษตร หรือนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปลาป่น น้ำมันปลา และอาหารสัตว์

เศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน รงควัตถุ เอนไซม์ และอื่น ๆ (Shahidi, 1994) จึงมีผู้สนใจศึกษาการนำเศษเหลือดังกล่าวมาใช้ให้เกิดประโยชน์มากขึ้น และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น ได้แก่ การผลิตเจลาตินและกาวจากหนังและกระดูกปลา (Glicksman, 1969) การสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลา ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์อิลาสเตส (elastase) และเปปซิน (pepsin) เป็นต้น (Gildberg, 1992) การสกัดฮีโมโปรตีน (hemoprotein) ที่ได้จากเลือดและเนื้อปลา (Shahidi and Synowiecki, 1992a) และแคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein) จากหัวและเปลือกกุ้ง (Shahidi and Synowiecki, 1991)

เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผลิตเพื่อการค้านั้นผลิตจากอวัยวะภายในของสัตว์บก ได้แก่ โค สุกร และสัตว์น้ำในเขตอบอุ่น ซึ่งเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์แต่ละชนิดจะให้เอนไซม์ที่มีคุณลักษณะเฉพาะ ถึงแม้ว่าจะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน แต่ก็อาจมีการตอบสนองต่ออุณหภูมิและ pH ต่างกันได้ จึงทำให้มีความได้เปรียบในการใช้งานต่างกัน (Raa, 1990) เศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปปลาเป็นแหล่งวัตถุดิบขนาดใหญ่สำหรับการผลิตเอนไซม์จากอวัยวะภายในจากสัตว์น้ำ (Simpson and Haard, 1987a) ทำให้มีผู้พยายามสกัดเอนไซม์ดังกล่าวจากอวัยวะภายในของสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ได้จากโรงงานแปรรูปในแต่ละท้องถิ่น เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าให้กับเศษเหลือในท้องถิ่นและแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมไปในเวลาเดียวกัน

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่คนไทยนิยมบริโภค เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่หาง่าย ราคาไม่แพง เกษตรกรสามารถเลี้ยงปลานิลได้ตามแหล่งน้ำทั่วไปในประเทศไทย และบริโภคได้ตลอดทั้งปี (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2545) อีกทั้งยังมีการส่งออกปลานิลแปรรูปในแบบแล่และเนื้อปลาบดไปจำหน่ายในต่างประเทศ ได้แก่ ญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และอิตาลี เป็นต้น (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2551) และแนวโน้มของปริมาณการส่งออกผลิตภัณฑ์จากปลานิลเพิ่มขึ้นทุกปี จึงควรมีการศึกษาวิจัยถึงความเป็นไปได้ในการนำเอนไซม์จากปลานิลมาใช้ประโยชน์ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้ประโยชน์จากเศษเหลืออย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการสกัดและการเพิ่มความบริสุทธิ์สำหรับเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในต่าง ๆ ของปลานิล

2. เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินที่สกัดได้

3. เพื่อศึกษาการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้ ในการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกราม

การตรวจเอกสาร

1. ปลานิล

ปลานิลมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Oreochromis niloticus* Linneaus อยู่ในตระกูลซิคลิดี (Cichlidae) เป็นพันธุ์ปลาที่มีถิ่นฐานดั้งเดิมแถบบริเวณลุ่มน้ำไนล์ในแอฟริกาตะวันออก แถบลุ่มน้ำเซเนกัลและไนเจอร์ในแอฟริกาตะวันตก พบทั่วไปตามหนอง บึง และทะเลสาบในประเทศซูดาน ยูกันดา แทนแกนยีกา โดยปลาชนิดนี้เจริญเติบโตเร็วและเลี้ยงง่าย เหมาะสมที่จะนำมาเพาะเลี้ยงในบ่อได้เป็นอย่างดี จึงได้รับความนิยม และเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในภาคพื้นเอเชีย แม้แต่ในประเทศสหรัฐอเมริกาก็นิยมเลี้ยงปลาชนิดนี้ (ยุพินท์ และ พันธ์ศักดิ์, 2545)

รูปร่างลักษณะของปลานิลคล้ายกับปลาหมอเทศ แต่ลักษณะพิเศษของปลานิล คือ มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ตามลำตัวมีลายพาดขวาง 9-10 แถบ นอกจากนั้นลักษณะทั่วไปคือ ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล ลักษณะลำตัวแบนข้าง ครีบหลังเป็นครีบเดียว ประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน และก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน ก้านครีบอ่อน 9-10 อัน มีเกล็ดบนเส้นข้างลำตัว 33 เกล็ด เกล็ดข้างลำตัวจากครีบหลังถึงเส้นข้างลำตัว 5 เกล็ด และเกล็ดจากเส้นข้างลำตัวลงมาถึงส่วนหน้าของครีบก้น 13 เกล็ด ที่กระดูกแก้มมีจุดเข้ม 1 จุด บริเวณส่วนอ่อนของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางนั้นจะมีจุดสีขาว และสีดำตัดขวาง แลดูคล้ายลายข้าวตอกอยู่โดยทั่วไป (คีรี, 2542; ยุพินท์ และ พันธ์ศักดิ์, 2545)

ปลานิลเข้าสู่ประเทศไทยครั้งแรกโดยพระจักรพรรดิอากิฮิโต เมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศมกุฎราชกุมาร แห่งประเทศญี่ปุ่น ทรงจัดส่งปลานิล จำนวน 50 ตัว มาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เมื่อวันที่ 25 มีนาคม 2508 ในระยะแรกได้ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้ปล่อยลงเลี้ยงในบ่อดินในบริเวณสวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ปลาเจริญเติบโตและแพร่ขยายพันธุ์อย่างดี ต่อมาทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานชื่อปลาชนิดนี้ว่า “ปลานิล” และพระราชทานพันธุ์ปลานิลให้กรมประมง เพื่อขยายพันธุ์และแจกจ่ายให้แก่ราษฎรนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป (ยุพินท์ และ พันธ์ศักดิ์, 2545)

ปัจจุบันความต้องการบริโภคปลานิลในประเทศไทย และตลาดในต่างประเทศได้เพิ่มปริมาณมากขึ้นตามลำดับ ขนาดปลาที่ต้องการจะมีความแตกต่างกัน สำหรับตลาดในท้องถิ่นจะต้อง

การปลาที่มีขนาดไม่ใหญ่มากนัก คือ น้ำหนัก 150 – 250 กรัม แต่ตลาดในเมืองใหญ่ และตลาดต่างประเทศจะต้องการปลาขนาดใหญ่ คือน้ำหนักตัวประมาณ 500 กรัม ปลานิลขนาดใหญ่โดยทั่วไปจะมีราคาสูงกว่าปลาขนาดเล็กเกือบหนึ่งเท่าตัว (คีรี, 2542) ผลผลิตปลานิลส่วนใหญ่จะบริโภคภายในประเทศอยู่ในรูปของปลาสด 89% การแปรรูปทำเค็ม ตากแห้ง 5% ย่าง 3% และรูปอื่น ๆ 3% (ยุพินท์ และ พันธ์ศักดิ์, 2545) สำหรับปลานิลทั้งตัว และในรูปแช่แข็งก็มีจำหน่ายในประเทศโดยจำหน่ายให้ภัตตาคารหรือร้านอาหาร นอกจากนี้ประเทศไทยได้ส่งออกปลานิลสดแช่เย็น ปลานิลสดแช่แข็ง เนื้อปลานิลแล่สด/ แช่เย็น และเนื้อปลานิลแล่แช่แข็ง ไปยังประเทศญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา และอิตาลี เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 1

2. การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือของปลา

เมื่อมีการพัฒนาทางด้านอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำสูงขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการการบริโภคของประชากรที่มากขึ้น ย่อมทำให้มีปริมาณของเศษเหลือจากกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้นเช่นกัน ซึ่งนำไปสู่ปัญหาในด้านการจัดการกับเศษเหลือที่เกิดขึ้นเหล่านั้น เศษเหลือที่เกิดจากกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำแต่เดิมถูกกำจัดโดยการนำไปฝังดินหรือทิ้งในทะเล หรือเศษเหลือทั้งหมดสามารถนำไปทำเป็นปุ๋ยหมักจากเศษปลา นำไปทำเป็นส่วนผสมหรือปุ๋ยบำรุงดิน ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยกับสิ่งแวดล้อม ก้างปลาและ กระดูกปลาจะถูกบดและผลิตเป็นแคลเซียม ส่วนเกล็ดปลาสามารถนำมาผลิตคลอลาเจน นอกจากนี้เกล็ดปลา ก้างปลา และกระดูกปลา ยังนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตปลาป่น น้ำมันปลา และอาหารสัตว์ หรือนำไปผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้นได้อีกด้วย (Shahidi, 1994) เศษเหลือจากโรงงานปลาแล่แช่แข็งจะมีประมาณ 40% โดยแยกเป็นส่วนของกระดูก 15% ส่วนที่เหลือเป็นเศษเนื้อ เกล็ด หนัง และอวัยวะภายใน ประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และแร่ธาตุ (สุธาทิพพ์, 2546) โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ตามส่วนได้แก่ นำเศษเนื้อปลากะพงแดงมาผลิตซุปปลาบรรจุกระป๋อง (เนื้อน้อง, 2543) ผลิตเจลลาตินจากส่วนที่เป็นหนัง (วรรณวิมล, 2540) และกระดูก (วริศรา, 2545) ของปลากระพงแดง อีกทั้งผลิตแคลเซียม และเจลลาตินจากส่วนที่เป็นหนัง และกระดูกของปลาทรายแดง (นิติพงศ์, 2543) ผลิตไอซิงกลาสจากกระเพาะลมของปลากระพงแดง (สุธาทิพพ์, 2546) ผลิตโปรตีนจากหัวและไส้ปลา (Trirekphan, 1997) ผลิตเปปโตนจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาดุกบิ๊กอุย (พิชญา, 2539) และปลาทูนาพันธุ์โอแถบ (ตรีสินธุ์, 2546) สกัดเอนไซม์ที่สกัดจากไส้ของปลาทูนา (Prachumratana, 1998) ตลอดจนมีการศึกษาเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินที่สกัดจากไส้ของปลาทูนาพันธุ์ครีบเหลือง *Thunnus albacares* (Jantaro, 2000)

ตารางที่ 1 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกปลานิลของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 - 2550

ชนิดผลิตภัณฑ์	พ.ศ. 2545		พ.ศ. 2546		พ.ศ. 2547		พ.ศ. 2548		พ.ศ. 2549		พ.ศ. 2550	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
ปลานิล สด แช่เย็น ไม่รวมตับและไข่	3.14	0.09	0.00	0.00	0.00	0.00	3.10	0.17	139.39	7.91	69.65	3.66
ปลานิล แช่เย็นจนแข็ง ไม่รวมเนื้อปลาแบบฟิลเล ตับและไข่	2496.40	70.35	3036.46	82.63	5077.29	206.72	7623.80	329.48	12199.25	527.45	11137.54	459.94
เนื้อปลานิล แบบฟิลเล สดหรือแช่เย็น	336.74	45.45	291.41	43.18	136.52	16.69	223.65	23.08	296.13	29.52	789.89	97.21
เนื้อปลานิล แบบฟิลเล แช่เย็นจนแข็ง	408.28	65.27	1377.89	174.89	2969.01	282.34	3015.91	268.70	2277.53	219.08	410.71	65.10
เนื้อปลานิลบดหรือไม่บด แช่เย็นจนแข็ง	0.00	0.00	0.00	0.00	4.46	1.08	9.58	1.24	0.00	0.00	248.71	30.65
ปลานิลแห้ง ไม่รมควัน	0.00	0.00	0.00	0.00	171.41	9.80	127.74	3.22	0.23	0.05	89.21	12.60
รวมทั้งหมด	3244.56	181.17	4705.76	300.71	8358.69	516.62	11003.78	625.88	14912.53	784.02	12745.72	669.16

หมายเหตุ ปริมาณ (ตัน) มูลค่า (ล้านบาท)

ที่มา: กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ (2551)

ในประเทศไทยมีโรงงานแปรรูปปลานิล เนื้อปลานิลแล่แช่แข็ง เพื่อการส่งออก แต่ละโรงงานจะมีเศษเหลือจากการแปรรูป คือ ส่วนของเศษเนื้อปลาที่ เหลือจากการแล่ หนังปลาที่ผ่านการแล่เอาเนื้อออกไปจำหน่าย ก้าง และเกล็ดปลา ซึ่งสามารถนำเศษเหลือเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ได้ดังนี้

1. หนังปลา

1.1 บริโภค

หนังปลาทอดกรอบ โดยชาวบ้านนำหนังปลานิลไปตากแห้งและทอดรับประทานเป็นอาหารว่างหรือใส่ในก๋วยเตี๋ยว มีทั้งการบริโภคในครัวเรือนและจำหน่ายเป็นผลิตภัณฑ์จากชุมชน (บิสิเนสไทย, 2550)

1.2 แปรรูป

หนังปลานิลฟอกย้อม เป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ในอุตสาหกรรมเครื่องหนังโดยบริษัทเซียน หนิง ซีฟู้ด จำกัด มีลวดลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติยากต่อการลอกเลียนแบบ มีโครงสร้างเส้นใย คล้ายตาข่าย ทำให้มีความแข็งแรงทนทานกว่าหนังชนิดอื่นที่มีความหนาเท่ากัน สามารถนำมาผลิตเป็น กระเป๋า ซองแว่นตา พวงกุญแจ ที่ใส่นามบัตร และ ชุดโซฟา (บิสิเนสไทย, 2550)

การฟอกหนังปลานิลเพื่อทำเครื่องหนังโดยการนำหนังปลานิลมาปั่นหนังกับกรดอะซีติก และสารโคมบี (Combee) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด จากนั้นเติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงไป แล้วปั่นอีก 8 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นหนังมาทาสารไบนเดอร์ 293 (Binder 293) เพื่อเคลือบเงาแล้วตากให้แห้งประมาณ 12 ชั่วโมง ต่อจากนั้นนำไปเข้าเครื่องอัดลายให้เรียบและเข้าเครื่องเจียรท้องปลา เพื่อให้หนังเรียบมีความสม่ำเสมอ นำหนังที่ได้มาตีให้ฟูด้วยมือ พ่นแก้วเพื่อให้หนังขึ้นเกล็ดนูน หนังปลานิลที่ผ่านการฟอกย้อมทำสีเพื่อใช้สำหรับทำผลิตภัณฑ์เครื่องหนังต่าง ๆ ได้ ผ่านการทดสอบการใช้งาน เช่นการเสียดสี, เหงื่อไคล ความทนทานของหนัง และสภาพแผ่นหนัง ความหยาบบางของหนัง ให้ได้มาตรฐาน ทำให้หนังปลานิลมีความทนทานและ ไม่ขึ้นรา (จักรกริช, 2545)

2. เกล็ดปลานิล

นันทวันและคณะ (2551) ได้มีการศึกษาการผลิตไคโตซานจากเกล็ดปลานิล (*Tilapia nilotica*) โดยการสกัดด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 % ให้ความร้อน 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง จากนั้นสกัดไคโตซานต่อไปด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50 % เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ไคตินและไคโตซานที่ได้มีความชื้น 2.12 และ 2.98% เถ้า 6.56% และ 8.75% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าไคตินและไคโตแซนที่สกัดจาหนังปลานิลนี้มีสมบัติที่ดีที่จะนำใช้งานได้เช่นเดียวกับไคตินและไคโตแซนทั่วไป

3. เอนไซม์โปรติเอส

อวัยวะภายในและกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำมีเอนไซม์อยู่เป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเอส ดังนั้นอวัยวะภายในของสัตว์น้ำจึงเป็นแหล่งในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (An and Wisessanguan, 2000) เอนไซม์โปรติเอสที่พบในสัตว์น้ำ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

3.1 เซรีนโปรติเอส (Serine proteases)

เซรีนโปรติเอสเป็นกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสที่พบมากที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 18,000 – 35,000 ดาลตัน โดยทั่วไปจะทำงานที่ pH 7.0-11.0 (Walsh, 2002)โปรติเอสกลุ่มนี้เป็นกลุ่มของเอนโดโปรติเอส (endoprotease) ที่มีเซรีน (serine residue) อยู่ที่คะตะไลติกไซท์(catalytic site) ซึ่งนอกจากจะมีเซรีนแล้วยังมีกลุ่มอิมิดาโซล (imidazole group) และกลุ่มแอสปาทิล คาร์บอกซิล (aspartyl carboxyl group) อยู่ที่คะตะไลติกไซท์ด้วย เอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ใน EC 3.4.21 ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ไคโมทริปซิน และเอนไซม์อิลาสเตส ซึ่งสามารถพบได้ในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (digestive glands) ของสัตว์น้ำ (Simpson, 2000)

3.2 แอสปาทิลโปรติเอส (Aspartyl proteases)

แอสปาทิลโปรติเอส เป็นกลุ่มของเอนโดโปรติเอสที่ทำงานได้ดีและมีความคงตัวที่สภาวะเป็นกรด (pH 3.0-4.0) จึงทำให้มีชื่อเรียกว่า acidic protease หรือ มีอีกชื่อว่า แอสปาทิลโปรติเอส หรือคาร์บอกซิล (carboxyl)โปรติเอส เนื่องจากมีคะตะไลติกไซท์ที่ประกอบด้วยกลุ่มคาร์บอก

ซิลของกรดแอสปาติก 2 สาย เอนไซม์กลุ่มนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 30,000 – 45,000 ดาลตัน อยู่ใน EC 3.4.23 ได้แก่ เอนไซม์เปปซิน (pepsin)เอนไซม์ไคโมซิน(chymosin) และเอนไซม์แกสทริคซิน (gastricsin) ซึ่งสามารถพบได้ในกระเพาะของสัตว์น้ำ (Simpson, 2000; Walsh, 2002)

3.3 ไทออล/ ซิสเตอีน โปรติเอส (Thiol/ Cysteine proteases)

ไทออล/ ซิสเตอีน โปรติเอส เป็นกลุ่มของเอนโดโปรติเอสที่มีซิสเตอีน (cysteine residue) และฮิสติดีน (histidine residue) อยู่ที่คะตะไลติกไซท์ โดยเอนไซม์นี้ต้องการไทออล (thiol, -SH group) อยู่บริเวณ active site ของซิสเตอีน เอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ใน EC 3.4.22 ได้แก่ เอนไซม์คาทริปซิน บี (cathepsin B) ซึ่งสามารถพบได้ในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Simpson, 2000)

3.4 เมทัลโลโปรติเอส (Metalloproteases)

เมทัลโลโปรติเอส เป็นกลุ่มของไฮโดรไลติก เอนไซม์ (hydrolytic enzyme) ซึ่งการทำงานของเอนไซม์นี้จะขึ้นอยู่กับประจุบวกที่มีอยู่ในโมเลกุล เอนไซม์กลุ่มนี้อยู่ใน EC 3.4.24 ได้แก่ เอกโซเปปติเดส (exopeptidases) ซึ่งสามารถพบได้ในกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำได้แก่ปลากลุ่มปลาตะเพียนและหมึกกระดอง แต่จะไม่พบในอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารของสัตว์น้ำ (Simpson, 2000)

4. เซรีนโปรติเอส (Serine proteases)

เซรีนโปรติเอสที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารนั้นพบในเนื้อเยื่อของตับอ่อน (pancreas) กล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหาร (pyloric caeca) และลำไส้ (intestine) ของสัตว์ เซรีนโปรติเอสของสัตว์น้ำนั้นทำงานได้มีประสิทธิภาพสูงที่สภาวะ pH ที่เป็นกลางจนถึงเบส โดยที่จะไม่สามารถทำงาน และไม่มีความคงตัวที่สภาวะ pH ที่เป็นกรด (Simpson, 2000) เอนไซม์หลักที่พบในกลุ่มเซรีนโปรติเอส คือ เอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน (An and Visessanguan, 2000)

4.1 เอนไซม์ทริปซิน

เอนไซม์ทริปซินอยู่ใน EC 3.4.21.4 สามารถสกัดเอนไซม์นี้ได้จากเนื้อเยื่อของตับอ่อน กล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหาร และลำไส้ของสัตว์น้ำหลายชนิด ได้แก่ จากเครื่องในของปลา anchovy *Engraulis japonica* (Heu *et al*., 1995) และปลา anchovy *E. encrasicholus* (Martinez *et al*., 1988) กล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหารของปลา rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Kristjánsson, 1991) ปลา Atlantic salmon *Salmo salar* (Outzen *et al.*, 1996) ปลา chum salmon (Uchida *et al.*, 1984) ปลา Greenland cod *Gadus* sp.(Simpson and Haard, 1984) ปลา cunner *Tautogolabrus adspersus* (Simpson and Haard, 1985a) ปลา catfish *Parasilurus asotus* (Yoshinaka *et al*., 1984) และปลานิลลูกผสม *Tilapia nilotica/ aurea* (El-Shemy and Levin, 1997) นอกจากนี้ยังพบในกล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหารของปลาดาว *Asterias amurensis* (Kishimura and Hayashi, 2003)

4.2 เอนไซม์ไคโมทริปซิน

เอนไซม์ไคโมทริปซินอยู่ใน EC 3.4.21.1 สามารถสกัดเอนไซม์นี้ได้จากสัตว์น้ำหลายชนิด ได้แก่ จากทางเดินอาหารของหอย scallop (Chevalier *et al.*, 1995) และกุ้ง *Penaeus vannamei* (Hernández-Cortés *et al*., 1997; Tsai *et al*, 1986) และจากเครื่องในของปลา anchovy *Engraulis japonica* (Heu *et al*., 1995)

5. การทำเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำให้บริสุทธิ์

El-Beltagy *et al.* (2004b) สามารถสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากอวัยวะภายในของปลา Bolti (*Tilapia nilotica*) โดยเป็น alkaline protease และ acidic protease 79 และ 54% ของน้ำหนักตัวอย่าง ตามลำดับ จากนั้น El-Beltagy *et al.* (2004a) ได้สกัด acidic protease จากอวัยวะภายในของปลานิล (*Tilapia nilotica*) โดยกำจัดไขมันด้วยอะซิโตนเย็นก่อนทำการสกัดด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงเพิ่มความบริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 40-60% ตามด้วยการ dialyse ก่อนที่จะนำไปผ่าน gel filtration ด้วย Sephadex G-100 ได้เอนไซม์โปรติเอสที่มีน้ำหนักโมเลกุล 31.0 kDa ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส pH 2.5 และมีความคงตัวที่ อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส pH 2.0-6.0 ส่วน Bezerra *et al.* (2004) ได้สกัด alkaline protease จากลำไส้ของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.9% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วจึงนำ

สารละลายเอนไซม์มาทำบริสุทธิ์โดยการให้ความร้อน 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 30-80% ก่อนที่จะนำไปทำ gel filtration โดยผ่าน Sephadex G-75 ได้เอนไซม์โปรติเอสซึ่งได้ทดสอบแล้วว่าเป็น Trypsin-like มีน้ำหนักโมเลกุล 23.5 kDa ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส pH 8.0 และมีความคงตัวที่ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ปลานิลพันธุ์ลูกผสม *Tilapia nilotica/ aurea* ของ El-Shemy and Levin (1997)

การทำเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากอวัยวะภายในที่เกี่ยวข้องกับระบบการย่อยอาหารของสัตว์น้ำให้บริสุทธิ์ นั้นมีหลักการพื้นฐานเช่นเดียวกับการทำเอนไซม์จากเนื้อเยื่อของสัตว์ชนิดอื่น พืช และจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์ (Simpson, 2000) ดังนี้

1. การแยกด้วยหลักการละลายที่แตกต่างกัน โดยการตกตะกอนด้วยเกลือ หรือสารละลายอินทรีย์

2. การแยกด้วยขนาดโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟี หรือเยื่อเลือกผ่าน (dialysis)

3. การแยกด้วยขนาด และชนิดของประจุที่ต่างกัน โดยคอลัมน์โครมาโตกราฟีด้วยการแลกเปลี่ยนประจุหรืออิเลกโตรโฟริซิส (electrophoresis)

4. การแยกด้วยการจับกับสารประกอบจำเพาะ (specific ligands) โดยการผ่านคอลัมน์อัฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (affinity chromatography)

El-Shemy and Levin (1997) ได้ศึกษาการสกัดเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลลูกผสม *Tilapia nilotica/ aurea* เริ่มต้นโดยการทำตัวอย่างให้แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วบดตัวอย่างให้ละเอียดด้วยโถปั่น จากนั้นผสมตัวอย่างลงในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริก (0.05M Tris-HCl, 0.5M NaCl, 0.02M $CaCl_2$) pH 7.8 ในอัตราส่วนของตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1: 4 (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยใช้เวลา 4 ชั่วโมง ต่อมาจึงแยกตะกอนออกด้วยการเหวี่ยงแยกตะกอน เติม Brij 35 ลงไปในส่วนใสแล้วทิ้งไว้ข้ามคืน เหวี่ยงแยกตะกอนอีกครั้ง ก่อนที่จะเก็บตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัว 40 และ60% ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มา dialyze ข้ามคืนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดที่เจือจาง 100 เท่าจากนั้นตกตะกอนด้วยอะซิโตนแช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) แล้วจึงล้างตะกอนด้วยสารผสมระหว่างอะซิโตน และอีเทอร์ แช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส) ด้วยอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตร/ ปริมาตร) และตามด้วยอีเทอร์แช่เย็น (-20 องศาเซลเซียส)

ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดก่อนที่จะนำไปผ่านคอลัมน์ Soybean Trypsin Inhibitor Sepharose-4B เพื่อแยกเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ และชะด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านจากคอลัมน์ที่มีกิจกรรมต่อสาร BAPNA สูงที่สุด

Heu *et al*. (1995) ได้ศึกษาการสกัดเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในของปลา anchovy เริ่มต้นโดยการสับและผสมเครื่องในในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มีแคลเซียมคลอไรด์ 5 มิลลิโมลาร์และโซเดียมเอไซด์ 0.02% pH 7.0 ในอัตราส่วนของตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1: 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ต่อมาจึงแยกตะกอนออกด้วยการเหวี่ยงแยกตะกอน จากนั้นเก็บตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัว 30 และ70% ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้มา dialyze ข้ามคืนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์เดิม ก่อนที่จะนำไปผ่านคอลัมน์ benzamidine-sepharose 6B column เพื่อแยกเอนไซม์ไคโมทริปซินโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ pH 7.0 และเอนไซม์ทริปซิน โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่มี เบนซามิดิน 125 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ 1% pH 7.0 ในการชะคอลัมน์

6. สมบัติของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำ

6.1 น้ำหนักโมเลกุล

เอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำมีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คืออยู่ที่ 22,500-24,000 ดาลตัน (Simpson, 2000) เอนไซม์ทริปซินจากปลา Greenland cod มีน้ำหนักโมเลกุล 23,500 ดาลตัน ขณะที่เอนไซม์ ทริปซิน จากปลา anchovy มีน้ำหนักโมเลกุล 25,600 ดาลตัน ส่วนเอนไซม์ทริปซินจากปลา carp มีน้ำหนักโมเลกุล 25,000 ดาลตัน (An and Visessanguan, 2000; Heu *et al.*, 1995)

โดยทั่วไปเอนไซม์ไคโมทริปซินที่เป็นโมเลกุลโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 25,000-28,000 ดาลตัน ขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา anchovy มีน้ำหนักโมเลกุล 26,100 ดาลตัน (Heu *et al*., 1995)

6.2 องค์ประกอบของกรดอะมิโน

Heu *et al*. (1995) ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยเปรียบเทียบกรดอะมิโนของเอนไซม์ที่สกัดได้จากปลา anchovy *Engraulis japonica* และจากโค ซึ่งมีองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเอนไซม์ไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 2 นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบของกรดอะมิโนในเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากปลา anchovy ดังกล่าวไม่แตกต่างจากผลการศึกษาของ Martinez *et al.* (1988) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบของกรด อะมิโนในเอนไซม์ทริปซินของปลา anchovy *Engraulis encrasicholus*

7. ปัจจัยที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำ

7.1 สภาวะ pH

เอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำสามารถย่อยสารซับสเตรท (substrate) ได้ในช่วง pH 7.5-10.0 ดังตารางที่3 โดยที่เอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำมีความคงตัวที่สภาวะที่เป็นเบสมากกว่าสภาวะที่เป็นกรด ต่างจากเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มักจะมีความคงตัวที่สภาวะที่เป็นกรด (Simpson, 2000) จากการศึกษาของ El-Shemy and Levin (1997) พบว่าเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากลำไส้ของปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica/ aurea*) มีความคงตัวที่สภาวะที่เป็นเบสมากกว่าสภาวะที่เป็นกรด คือที่ระดับ pH เท่ากับ 8.0 ขณะที่เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่ระดับ pH 9.0 เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Kristjánsson (1991)ที่พบว่าเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหารของปลา rainbow trout มีความคงทนอยู่ในช่วง pH เท่ากับ 5.0-11.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในขณะที่สามารถทำงานได้ดีที่ pH 9.0-10.0 และ Simpson and Haard (1985a) ก็ได้ผลเช่นเดียวกันว่าเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากปลา cunner สามารถทำงานได้ดีที่ระดับ pH 8.5

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกรดอะมิโนของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินที่สกัดได้จากปลา anchovy และโค

	Anchovy		Bovine	
	Trypsin	Chymotrypsin	Trypsin	Chymotrypsin
Aspartic acid	32	25	21	20
Threonine	14	21	11	24
Serine	30	21	23	19
Glutamic acid	24	21	16	14
Proline	11	15	13	11
Glycine	28	17	25	23
Alanine	11	12	14	17
Valine	16	19	11	18
Methionine	3	2	1	1
Isoleucine	10	10	12	10
Leucine	15	14	13	15
Tyrosine	8	3	7	4
Phenylalanine	5	4	6	5
Histidine	9	10	4	4
Lysine	6	6	10	14
Arginine	6	9	7	7
Tryptophan	2	6	3	4
Cysteine	5	9	12	11

หมายเหตุ ปริมาณกรดอะมิโน คิดจาก residue ของกรดอะมิโน ต่อโมล

ที่มา: Heu *et al*. (1995)

โดยทั่วไปเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH 7.5-8.5 ดังตารางที่ 3 แต่มีความคงตัวที่ pH 9.0 เอนไซม์ไคโมทริปซินสามารถย่อยสลายสารซับสเตรทหลายชนิด ได้แก่ เคซีน (casein) คอลลาเจน (collagen) และ โบไวน์ เซรัม อัลบูมิน (bovine serum albumin) ที่อุณหภูมิต่ำได้ดีกว่าเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Simpson, 2000)

7.2 อุณหภูมิ

เอนไซม์ทริปซินสามารถย่อยสารซับสเตรทได้ในช่วงอุณหภูมิ 35-45 องศาเซลเซียส ดังตารางที่ 3 (Simpson, 2000) เอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากลำไส้ของปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica/ aurea*) มีความคงตัวที่อุณหภูมิระหว่าง 0-40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ขณะที่เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (El-Shemy and Levin, 1997) เอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหารของปลา rainbow trout มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่ระดับ pH 5.4 และ 8.0 (Kristjánsson, 1991) ส่วนเอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากปลา Greenland cod จะไม่ทำงานที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Simpson and Haard, 1984) เอนไซม์ ทริปซินจากปลา anchovy ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 9.0 (Heu *et al.*, 1995)

เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา anchovy ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 9.0 (Heu *et al.*, 1995)

7.3 ความจำเพาะกับสารซับสเตรท

เอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ที่สกัดได้จากลำไส้ของปลานิลลูกผสม (*Tilapia nilotica/ aurea*) มีความจำเพาะของ amidase activity ต่อสารซับสเตรท N-α - Benzoyl- arginine -*p*-nitroanilide (BAPNA) และ esterase activity ต่อสารซับสเตรท N-α - *p*-tosyl-L- arginine methyl ester (TAME) ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ pH 9.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้มี esterase activity สูงกว่า amidase activity (El-Shemy and Levin, 1997)

ตารางที่ 3 อุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำ

Enzyme	Identified species	Optimum Temperature (°C)	Optimum pH
Trypsin			
	Greenland cod	40	7.5
	Atlantic cod	40	7.5–8.0
	Atlantic cod	55	8.0
	Atlantic cod	43	8.5–9.0
	Cunner	50	8.0
	Cunner	45	8.5
	Atlantic salmon	45	8.5
	Atlantic white croaker	60	9.5
	Palometa (Parona signata)	65	8.5
	Crayfish	50	6.0
	Oyster	60	8.0
	Hybrid tilapia	40	9.0
Chymotrypsin			
	Atlantic cod	52	7.8
	Crayfish	50	6.0
	White shrimp	–	8.0

ที่มา: Shahidi and Kamil (2001a)

เอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำมีกิจกรรม catalytic และ hydrolyze กับสารซับสเตรทได้หลายชนิด เช่น เคซีน คอลลาเจน และโบไวน์ เซรัม อัลบูมิน ทำให้มีพันธะ peptide เพิ่มมากขึ้น ซึ่งเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์น้ำจะทำงานได้ดีกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Simpson, 2000) เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา dogfish สามารถทำงานได้ในโปรตีน

จากถั่วเหลือง โดยทำให้โปรตีนนั้นจับตัวเป็นก้อน (โปรตีนเสียสภาพ)ในช่วงอุณหภูมิ 5-35 องศาเซลเซียสได้ดีกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินจากโค (Ramakrishma *et al*., 1987) เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา herring และ capelin มี hydrolytic activities ต่อสารซับสเตรท N-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester (BTEE) มากกว่า เอนไซม์ไคโมทริปซินจากโค ซึ่งมีผลคล้ายกับเอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา Greenland cod (Simpson, 2000)

7.4 การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

สารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (enzyme inhibitor) เซรีนโปรติเอสหลายตัวมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำ สาร diisopropylphosphofluoridate (DFP) และสารอนุพันธ์เกิดปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินเร็วกว่าเอนไซม์ทริปซิน (Salvesen and Nagase, 2001)

เอนไซม์ทริปซินจากสัตว์น้ำมีความไวต่อสารยับยั้งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ได้แก่ aprotinin (trasylol), soybean trypsin inhibitor (SBTI), phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), diisopropylphosphofluoridate (DFP), benzamidine และ N-tosyl-L-lysinechloromethyl ketone (TLCK) (Simpson, 2000) สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง (soybean trypsin inhibitor) เป็นสารยับยั้งที่มีความไวในการจับเอนไซม์ทริปซินมากกว่าสารซับสเตรท N-α - Benzoyl- arginine –*p*- nitroanilide (BAPNA) (Overnell, 1973) ในขณะที่ 4-Amidinophenyl methylsulphonyl fluoride (APMSF) เกิดปฏิกิริยาในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินเร็วกว่า Phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) (Salvesen and Nagase, 2001)

8. การใช้ประโยชน์เอนไซม์โปรติเอส

การนำเอนไซม์ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารนั้นยังมีข้อจำกัดบางประการ ตัวอย่างเช่นการหมักปลานั้นต้องขึ้นกับปริมาณเอนไซม์ของแบคทีเรียที่มีอยู่ภายในตัวปลา และที่ปนเปื้อนจากภายนอก ถึงแม้ว่าจะมีการใช้เอนไซม์จากปลาในผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้านอยู่เดิม แต่ในประเทศแคนาดา เดนมาร์ก ไอซ์แลนด์ ญี่ปุ่น เกาหลี นอร์เวย์ และสหรัฐอเมริกาก็ยังมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อการประยุกต์ใช้งานให้กว้างขวางขึ้น เอนไซม์ที่ถูกสกัดขึ้นมาใช้งาน ได้แก่ เอนไซม์ดีออกซีไรโบนิวเคลส (deoxyribonuclease) เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดสเอ

และบี (carboxypeptidase A และ B) เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ไคโมทริปซิน และ เอนไซม์อิลาสเตส (Shahidi and Kamil, 2001a)

การนำเอนไซม์ไปใช้จะต้องคำนึงถึงต้นทุน และความเป็นไปได้ ทั้งในด้านคุณสมบัติของเอนไซม์ ที่มีความคงทน และสภาวะในการทำงาน ได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH ความจำเพาะกับสารซับสเตรทและสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Simpson and Haard, 1984) อย่างไรก็ตามการใช้เศษเหลือจากการแปรรูปสัตว์น้ำเป็นแหล่งวัตถุดิบในการสกัดเอนไซม์เป็นการใช้ประโยชน์เศษเหลืออย่างมีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง แต่จะต้องคำนึงถึงความสม่ำเสมอของวัตถุดิบที่จะให้ปริมาณเอนไซม์ที่ยังคงคุณภาพ เนื่องจากเศษเหลือจากการแปรรูปเป็นส่วนที่มีมูลค่าต่ำ ทำให้การเก็บรักษาไม่ดี (Shahidi and Kamil, 2001a)

8.1 โปรตีนไฮโดรไลเสท

การใช้เอนไซม์โปรติเอสเปลี่ยนสภาพของปลาเป็ด และเศษเหลือจากการแปรรูปปลาให้เป็นโปรตีนไฮโดรไลเสทเพื่อใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสัตว์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูงขึ้น เอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียและพืชมีประสิทธิภาพในการย่อยกล้ามเนื้อของปลาได้ดีกว่าเอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์ (Shahidi and Kamil, 2001a)

อุตสาหกรรมการผลิตโปรตีนเข้มข้นจากปลานั้นใช้วิธีการย่อยโดยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลาซึ่งจะใช้เวลามากน้อยต่างกันขึ้นกับกระบวนการผลิต Shahidi and Kamil (2001b) ศึกษาการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสทโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า 2 ชนิด คือเอนไซม์ปาเปน (papain) และเอนไซม์ทริปซินเปรียบเทียบกับเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากไส้ปลาฉลาม ซึ่งพบว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากไส้ปลาฉลามให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ 49% ขณะที่เอนไซม์ปาเปนและเอนไซม์ทริปซินให้โปรตีนที่ละลายน้ำได้ 86.9% และ 55.2% ตามลำดับ

8.2 อาหารหมัก

เอนไซม์ทริปซินเป็นส่วนประกอบสำคัญในการหมักปลา herring โดย Simpson and Haard (1987b) พบว่าการควักไส้ปลาออกก่อนทำการหมัก จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีนและเปปไทด์ที่ละลายได้ในน้ำเกลือน้อยลง นั่นแสดงว่าเอนไซม์ที่มีอยู่ในไส้ปลามีความสำคัญต่อการหมัก เมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินจากปลา Greenland cod ลงในการหมักปลา herring ที่ควักไส้ออก

แล้ว ทำให้มีปริมาณโปรตีนและเปปไทด์ที่ละลายได้ในน้ำเกลือเพิ่มมากขึ้น แต่ก็ยังน้อยกว่าการหมักปลาทั้งตัว นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของเอนไซม์มีผลต่อความสมดุลของกลิ่นรส และเนื้อสัมผัส

การเติมเอนไซม์ทริปซินจากปลา Greenland cod ลงในกระบวนการหมักปลาหมึก จะช่วยให้การหมักมีประสิทธิภาพขึ้นในระยะแรกของการหมักในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) (Vecchi and Coppes, 1996)

8.3 การสกัดแคโรทีนอยด์

การสกัดแคโรทีนอยด์ที่จับอยู่กับโปรตีนซึ่ง เรียกว่า แคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein) จากเศษเหลือจากการแปรรูปกุ้ง ปู เพื่อใช้เป็นส่วนผสมของอาหารสัตว์ทั้งสัตว์น้ำ ได้แก่ ปลาแซลมอน และปลาสวยงาม และอาหารสัตว์ปีก เพื่อให้ไข่แดงมีสีสด โดยแคโรทีนนี้สามารถเป็นสารประกอบที่ให้สี และกลิ่นรสแก่ผลิตภัณฑ์อาหาร (Shahidi and Kamil, 2001a)

เอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากกล้ามเนื้อหูรูดกระเพาะอาหารของปลา Atlantic cod สามารถสกัดแคโรทีโนโปรตีนในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส)ได้ดีกว่าเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากตับอ่อนของโค (Cano-Lopez *et al.*, 1987)

8.4 การใช้เอนไซม์ในการลอกหนังปลา

Stefansson (1988) ศึกษาการลอกหนังปลากระเบน *Raja radiata* โดยการทำลายคอลลาเจนที่หนังปลาด้วยน้ำร้อนอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะแช่ในสารผสมเอนไซม์ระหว่างเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzyme) และเอนไซม์ไกลโคไลติก (glycolytic enzyme) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง หรือที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-15 ชั่วโมง ส่วนของหนังปลาที่ไม่ละลายจะถูกล้างออกด้วยน้ำ

Gildberg (1993) ศึกษาการลอกหนังปลาออกจากตัวปลา herring โดยการแช่ปลา herring ทั้งตัวในสารละลายกรดอะซิติก (acetic acid) เข้มข้น 5% เพื่อทำให้คอลลาเจนเสื่อมสภาพก่อนที่จะนำไปแช่ในเอนไซม์โปรติเอสที่ทำงานได้ดีที่สภาวะที่เป็นกรดซึ่งสกัดได้จากไส้ปลา cod นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีการนี้กับปลา mackerel ปลา horse mackerel และปลาทูนา (Shahidi and

Kamil, 2001c) แต่เอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ฟิซิน (ficin) และเอนไซม์ปาเปน ไม่สามารถทำให้คอลลาเจนของปลาหมึกเสียสภาพได้ (Leuba *et al*., 1987)

9. แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มของรงควัตถุ (pigment) ที่มีสีเหลือง ส้ม และแดง (Simpson, 1982) สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก รา สาหร่าย พืชชั้นสูง สัตว์ และมนุษย์ เป็นสารที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตทั้งทางตรงและทางอ้อม (Haard, 1992)

แคโรทีนอยด์ละลายได้ดีในน้ำมัน และตัวทำละลายอินทรีย์ที่ไม่มีขั้ว (non-polar organic solvent) ได้แก่ อะซีโตน แอลกอฮอล์ ไดเอทิล อีเทอร์ และคลอโรฟอร์ม ส่วนแคโรทีนละลายได้ในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (apolar solvent) ได้แก่ ปิโตรเลียม อีเทอร์ และ เฮกเซน (Shahidi *et al.*, 1998g) แคโรทีนอยด์สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้ดีที่ความยาวคลื่น 430-480 นาโนเมตร (Gross, 1987)

แคโรทีนอยด์ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ๆ (Haard, 1992) ดังนี้

1. แคโรทีน (carotene) เป็นแคโรทีนอยด์ที่มีไฮโดรคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัวสูง มีสูตรเคมีเป็น $C_{40}H_{56}$ โดยอะตอมของคาร์บอนเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างจะมีอะตอมของคาร์บอนมาต่อกันเป็นวง ที่เรียกว่า ไอโอโนนริง (ionone ring) ได้แก่ แอลฟาแคโรทีน เบตาแคโรทีน และไลโคปีน (lycopene)

2. แซนโทฟิล (xanthophylls) เป็นแคโรทีนที่มีออกซิเจนอยู่ในสายโมเลกุล ซึ่งเป็นหมู่ไฮดรอกซิล หรือคีโตนจะเข้าแทนที่ในบริเวณหนึ่งของวงแหวนที่อยู่ปลายสายของสูตรโครงสร้าง ได้แก่ แอสตาแซนทีน (astaxanthin) ลูเตอีน (lutein) และซีแซนทีน (zeaxanthin) ดังภาพที่ 1

สัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลังทั้งที่อยู่บนบกและในน้ำ ได้แก่ ฟองน้ำ ทาก กุ้ง ปู และแมลง ต่างมีแคโรทีนอยด์อยู่ในตัวสูงเช่นเดียวกับปลาและนก แต่จะมีแคโรทีนอยด์ในรูปของสารอนุพันธ์ของเบตาแคโรทีน ได้แก่ แอสตาแซนทีน แคนตาแซนทีน (canthaxanthin) อิชิเนนโอน (echinenone) ลูทีน และ ซีแซนทีน ต่างกัน (Shahidi *et al.*, 1998k)

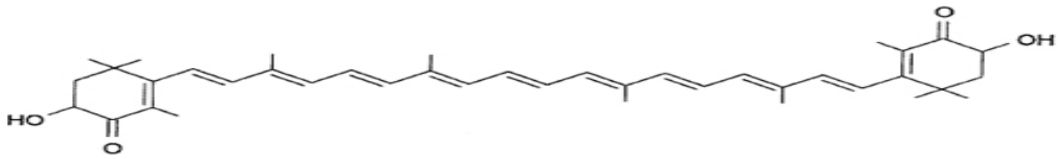
เม็ดสีในกล้ามเนื้อและหนังของปลาและสัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเชียนจะเป็นแซนโทฟิล แคโรทีนอยด์ที่พบได้ทั่วไปในปลา ได้แก่ ทูนาแซนทีน ซีแซนทีน ลูทีน และแอสตาแซนทีน โดยปลาแต่ละชนิดจะมีสัดส่วนของแซนโทฟิลต่างกัน ซึ่งจะส่งผลถึงสีของกล้ามเนื้อและหนังปลา ดังตารางที่ 4 นอกจากนี้ยังพบแคโรทีนอยด์ในไข่ สเปิร์ม ตับ ตา สมอง ลำไส้ และเมือกในปากของปลา (Haard, 1992)

แอสตาแซนทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่สำคัญที่สุดในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน ได้แก่ กุ้ง ปู และปลาแซลมอน แอสตาซีน (astacene) พบในปลา ปู และกุ้ง ส่วนทูนาแซนทีน (tunaxanthin) พบในปลาทะเล ส่วนปลาน้ำจืด ได้แก่ ปลา trout และ ปลา carp พบลูทีน (Simpson, 1982) ปลานิล (*Tilapia nilotica*) มีทูนาแซนทีน ซีแซนทีน และโรโดแซนทีน (rhodoxanthin) เป็นแคโรทีนอยด์ส่วนใหญ่ (Matsuno *et al*., 1986)

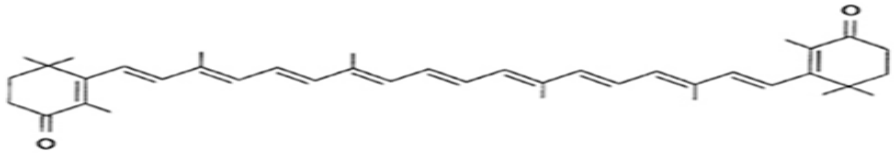
ตารางที่ 4 ปริมาณแคโรทีนอยด์ในปลากลุ่ม California rockfish (*Seabastes* sp.)

ชนิด	สี	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (%)		
		Astaxanthin	Tunaxanthin	Zeaxanthin
S. miniatus	แดงเข้ม	76.8	11.6	11.6
S. constellatus	ส้ม	55.3	24.5	20.2
S. eos Pale	ชมพู	47.5	33.8	19.3
S. umbrosus	ส้มอ่อน	28.6	38.2	33.2
S. carnatus	น้ำตาลเขียว	22.9	60.5	16.6
S. flavidius	น้ำตาลเทา	20.1	46.7	33.2
S. atrovirens	เขียว	0	87.6	12.4

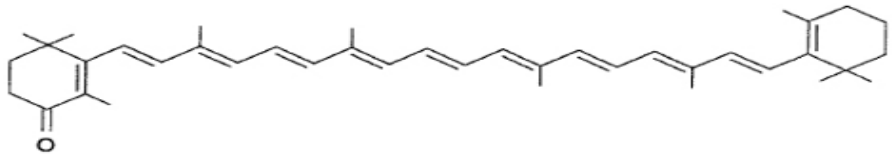
หมายเหตุ ปริมาณแคโรทีนอยด์แต่ละชนิด คิดเป็น% ของปริมาณแคโรทีนอยด์ทั้งหมด
ที่มา : Fox (1979)



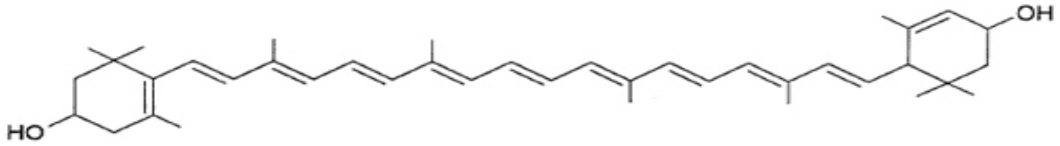
astaxanthin



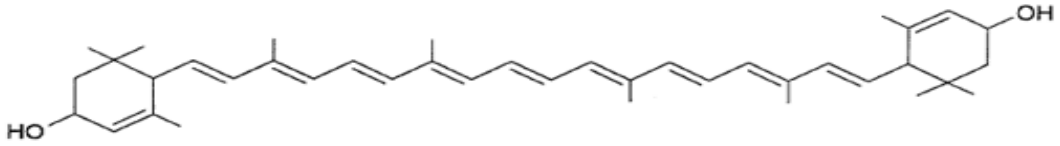
canthaxanthin



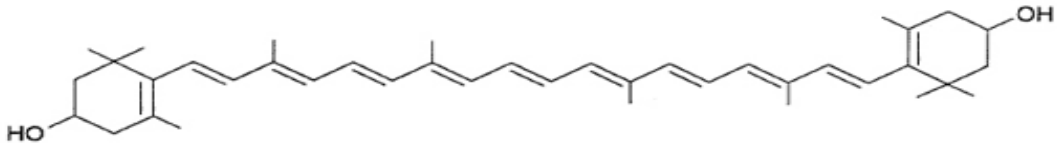
echinenone



lutein



tunaxanthin



zeaxanthin

ภาพที่ 1 โครงสร้างของแคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์น้ำ

ที่มา : International Carotenoid Society (2007)

สัตว์ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ แคโรทีนอยด์ที่พบในสัตว์จึงมาจากอาหารที่ได้รับจากพืช จากนั้นจึงเปลี่ยนรูปแคโรทีนอยด์ที่ได้รับให้เหมาะกับตัวเอง (Shahidi *et al.*, 1998i) พืชจึงเป็นแหล่งแคโรทีนอยด์ของสัตว์ (Shahidi *et al.*, 1998g) การกระจายตัวและความหลากหลายของแคโรทีนอยด์ในสัตว์ขึ้นอยู่กับความสามามารถในการดูดซึมและการนำแคโรทีนอยด์ที่ได้รับไปสังเคราะห์เพื่อใช้ ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของร่างกาย (Shahidi *et al.*, 1998k) แคโรทีนอยด์ที่สัตว์กินเข้าไปอาจจะถูกขับถ่ายออกทางอุจจาระ โดยที่โครงสร้างทางเคมีของสารไม่เปลี่ยนแปลง หรือ ถูกดูดซึมและสะสมไว้ในรูปเดิม หรือ ถูกดูดซึมและสะสมไว้ในรูปอื่น หรือ ถูกดูดซึมและเปลี่ยนรูปอย่างสมบูรณ์ นอกจากสัตว์กินพืชที่จะได้แคโรทีนอยด์จากพืชแล้ว สัตว์กินเนื้อก็จะได้รับแคโรทีนอยด์จากสัตว์กินพืชนั้น ตัวอย่างเช่น ปลา sea bass (*Lateolabrax japonicus*) ที่กินปู oyogipinno (*Tritodynamia horvathi*) เป็นอาหาร จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์ในสัตว์ทั้งสองที่สัมพันธ์กัน (Haard, 1992) อาจกล่าวได้ว่ามีการถ่ายทอดแคโรทีนอยด์กันในห่วงโซ่อาหาร สัตว์น้ำหลายชนิดสามารถใช้แคโรทีนอยด์เป็นสารตั้งต้นในการเปลี่ยนรูปเป็นแอสตาแซนทีนได้ ดังนี้

1. ปลากลุ่ม red carp ได้แก่ ปลาทอง และปลา red carp สามารถเปลี่ยนลูทีน ซีแซนทีน หรือสารอนุพันธ์ให้เป็น แอสตาแซนทีน แต่ไม่สามารถใช้เบตาแคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของแอสตาแซนทีนได้ ในขณะที่แคโรทีนอยด์ของปลากลุ่ม sea beam ได้แก่ ปลา sea beam และ ปลา red sea beam ไม่สามารถเปลี่ยนรูปได้ แต่ปลากลุ่มนี้สามารถนำรงควัตถุในอาหารเข้าไปใช้เป็นสีของเนื้อเยื่อในรูปอิสระ หรือ เอสเทอร์ของแคโรทีนอยด์นั้น (Katayama *et al*., 1973)

2. ปลากลุ่ม trout สามารถเปลี่ยนแอสตาแซนทีนไปเป็นสารอนุพันธ์ไดเอสเทอร์ หรือโมโนเอสเทอร์ และยังสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้อีกด้วย (Schiedt *et al*., 1985)

3. สัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเชียน ได้แก่ กุ้งและปู สามารถเปลี่ยนเบตาแคโรทีนหรือสารอนุพันธ์ให้เป็น แอสตาแซนทีนได้ (Katayama *et al*., 1973)

10. ประโยชน์ของแคโรทีนอยด์

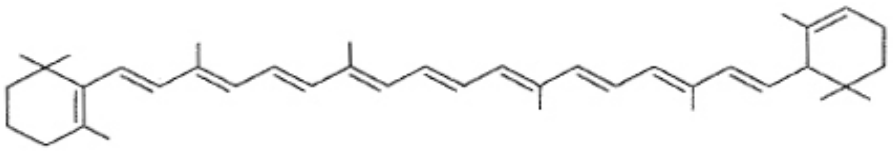
บทบาทของแคโรทีนอยด์ที่มีต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์นั้นเป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง (Baker and Günther, 2004a) แคโรทีนเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ แคโรทีนอยด์มีส่วนเกี่ยวข้องกับความหลากหลายของลักษณะทางกายภาพของสัตว์ (Shahidi *et al.*, 1998k) ส่วนปฏิกิริยาเคมี และชีวเคมีของแคโรทีนอยด์ที่มีในสัตว์ยังไม่แน่ชัดนัก แต่แคโรทีนอยด์มี

ประสิทธิภาพในการดูดซับและทำลายกัมมันตรังสี (Shahidi *et al.*, 1998j) เป็นสารแอนติออกซิแดนท์ทั้งในเนื้อเยื่อและสารประกอบอื่นที่จะป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Tacon, 1981) ปลาที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์มากเพียงพอจะมีภูมิต้านทานโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและรา Shahidi *et al.* (1998a, 1998b) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแคโรทีนอยด์ช่วยเพิ่มกิจกรรมของไซโตทอกซิก (cytotoxic activity) ของเซลล์กำจัดสิ่งแปลกปลอม (killer cell) ช่วยลดอัตราการขยายตัวของเซลล์มะเร็ง และการรักษาและฟื้นฟูด้วยตัวเองตามปกติ (Lee and Gilchrist, 1975; Simpson, 1983; Goodwin, 1986) แคโรทีนมีบทบาทในสัตว์ดังนี้

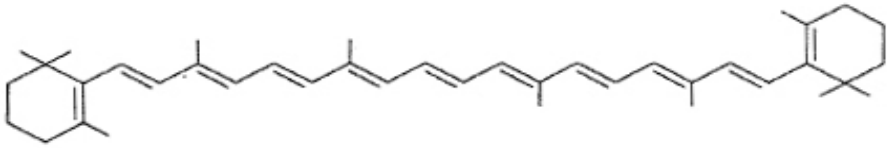
1. ประโยชน์ต่อมนุษย์

1.1 การเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ

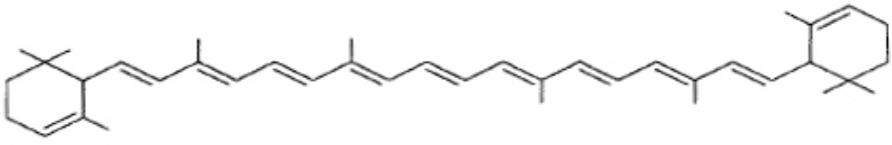
โปรวิตามินเอ (provitamin A) เป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ สารสำคัญคือเบตาแคโรทีน (Shahidi *et al*., 1998a) ดังภาพที่ 2



α-carotene



β-carotene

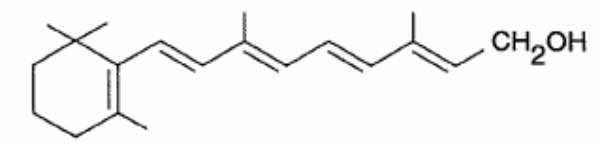


ε-carotene

ภาพที่ 2 โครงสร้างโปรวิตามินในรูปต่าง ๆ

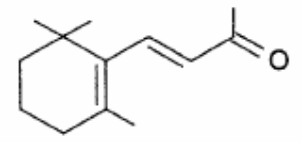
ที่มา: Shahidi *et al*. (1998a)

บทบาทสำคัญของแคโรทีนอยด์ในสัตว์ คือการเป็นสารตั้งต้นของวิตามินเอ โดยส่วนใหญ่สัตว์จะมีเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนแคโรทีนอยด์ที่ได้รับจากพืชไปเป็นวิตามินเอ (Gross and Budowski, 1966) ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของวิตามินเอ
ที่มา : Gross and Budowski (1966)

โครงสร้างทางเคมีของเบตาแคโรทีนมีวงเบตาไอโอโนน (β-ionone ring) 2 วง ดังภาพที่ 4 ที่เหมือนกันมาต่อกันด้วยสายคาร์บอน เมื่อคาร์บอนต่อกลางสายโมลุกุลถูกออกซิไดซ์ด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็กและตับแล้วจะได้เรตินอล 2 โมเลกุล ในขณะที่แอลฟาแคโรทีน และซิกมาแคโรทีนจะให้วิตามินเอเพียงโมเลกุลเดียวเท่านั้น เพราะมีวงเบตาไอโอโนนเพียงวงเดียว ในธรรมชาติมีแคโรทีนอยด์หลายรูป แต่ชนิดที่จัดเป็นโปรวิตามินเอได้นั้น จะต้องให้เรตินอลอย่างน้อยหนึ่งโมเลกุล (สมทรง, 2543) นอกจากนี้แอสตาแซนทีน แคนตาแซนทีน และซีแซนทีนในปลาและไก่สามารถเปลี่ยนไปเป็นวิตามินเอได้เช่นเดียวกัน (Schiedt *et al*., 1985)



ภาพที่ 4 โครงสร้างของเบตาไอโอโนน
ที่มา: Shahidi *et al.* (1998f)

วิตามินเอเป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อสัตว์ (Al-Khalifa and Simpson, 1988; Guillou *et al*., 1989) ในการมองเห็น การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ (Shahidi *et al.*, 1998e) ตลอดจนการต้านทานต่อโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและเชื้อรา และการสร้างผิวหนังและเมือกของปลา (Gross and Budowski, 1966; Shahidi *et al.*, 1998c)

1.2 เป็นสารแอนติออกซิแดนซ์ (antioxidants)

แคโรทีนอยด์มีบทบาทสำคัญในการเป็นสารแอนติออกซิแดนท์ทางชีวภาพในร่างกายมนุษย์ ที่จะป้องกันเซลล์และเนื้อเยื่อจากการทำลายของอนุมูลอิสระและออกซิเจนอิสระ ตลอดจนป้องกันการเกิดโรคและสภาวะที่เกิดจากอนุมูลอิสระ เบตาแคโรทีน แอลฟาโทโคฟีรอล และไลโคพีน และสามารถยับยั้งการปลดปล่อยอนุมูลอิสระได้ (Tacon, 1981) ส่วนไลโคปีนป้องกันเนื้อเยื่อจากการทำลายของออกซิเจนอิสระ(Di Mascio *et al*. 1989) ในสภาวะที่เหมาะสมแคโรทีนอยด์จะมีประสิทธิภาพดีกว่าวิตามินอี (Baker and Günther, 2004a) ส่วนแอสตาแซนทีนและแคนตาแซนทีนมีประสิทธิภาพในการชะลอการเกิดปฏิกริยาออกซิเดชันในสารละลายได้ดีกว่าเบตาแคโรทีน (Shahidi *et al.*, 1998h)

ลูทีน และซีแซนทีน มีคุณสมบัติแตกต่างจากแคโรทีนอยด์ชนิดอื่น ตรงที่ไม่สามารถเปลี่ยนเป็นวิตามินเอได้ สามารถพบได้ในเนื้อเยื่อของร่างกายมนุษย์หลายจุดได้แก่ เลนส์ตาและเรตินา จึงมีการนำแคโรทีนอยด์มาใช้เป็นยาในการักษาโรคเกี่ยวกับการรับภาพของผู้ที่มีความผิดปกติในการมองเห็น (Goodwin, 1986) เนื่องจากสารลูทีน และซีแซนทีนนี้ โดยจะช่วยกรองหรือป้องกันรังสีจากแสงแดดที่เป็นอันตรายต่อดวงตา ปกป้องเซลล์ของจอประสาทตาไม่ให้ถูกทำลายโดยการลดอนุมูลอิสระและกรองแสงสีน้ำเงินที่จะทำลายดวงตา สามารถช่วยลด ป้องกัน หรือชะลอการเกิดความเสื่อมของโรคต้อกระจกโดยตรง นอกจากนี้ก็ยังพบว่าทั้ง ลูทีน และซีแซนทีน ต่างก็มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดความเสี่ยงในโรคที่เกิดจากการมีสารอนุมูลอิสระได้ดี (ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร, 2551ข; Snodderly 1995)

1.3 เป็นสารสร้างระบบภูมิคุ้มกันและต่อต้านมะเร็ง

Baker and Günther (2004b, 2004c) ได้มีทดลองบทบาทของแอสตาแซนทีนและแคนทาแซนทีนในการยับยั้งเซลล์มะเร็งในมนุษย์ การที่แคโรทีนอยด์นี้สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้นั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนทางชีวภาพในการเปลี่ยนแคโรทีนอยด์เป็นวิตามินเอ โดยที่วิตามินเอเป็นสารที่มีความสำคัญต่อการควบคุมความแตกต่างของเซลล์ เบตาแคโรทีน ไลโคปีน และลูเทอิน ที่ได้รับการสนับสนุนให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ ในขณะที่มีการเสนอให้แคนทาแซนทีนและแอสตาแซนทีนเป็นสารที่เสริมระบบภูมิคุ้มกันและสารป้องกันมะเร็ง (Baker and Günther, 2004a) การบริโภคอาหารที่มีเบตาแคโรทีน ไลโคปีน และลูเทอิน อาจจะมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดโรคมะเร็งได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม (Peto *et al*., 1981)

1.4 สีผสมอาหาร

มีการนำแคโรทีนอยด์มาใช้ในเทคโนโลยีการผลิตอาหาร คือ สารให้สี (colorants) เนื่องจากแคโรทีนอยด์เป็นแหล่งสีผสมอาหารที่ได้จากธรรมชาติที่สำคัญ (Goodwin, 1976)

สารให้สีถูกเติมลงในอาหารหลายชนิดเพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีลักษณะดีขึ้นและน่ารับประทาน เนื่องจากสีสามารถช่วยปกปิดสีที่ซีดจาง ลักษณะทางกายภาพที่ไม่พึงประสงค์ของผลิตภัณฑ์อาหารนั้น ซึ่งจะเห็นว่าสีมีอิทธิพลต่อการตัดสินใจของผู้บริโภค ในการใช้สี สิ่งสำคัญก็คือความปลอดภัยในการบริโภค ดังนั้นการใช้แคโรทีนอยด์ที่ได้จากธรรมชาติจึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ปลอดภัย นอกจากนี้แคโรทีนอยด์นี้ยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพด้วย (Baker and Günther, 2004a)

แคโรทีนอยด์เป็นกลุ่มสีธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งที่มีการนิยมใช้เป็นสีผสมอาหาร สีในกลุ่มนี้ที่นิยมเป็นสีผสมอาหารกันมาก ได้แก่ เบตาแคโรทีน และแคนตาแซนทีน แคโรทีนอยด์เป็นสีที่ค่อนข้างคงตัว การแปรรูปอาหารด้วยวิธีการแปรรูปธรรมดา เช่น การลวก การใช้หม้อนึ่งอัดความดัน หรือการทำเยือกแข็งจะมีผลน้อยมากหรือไม่มีเลยต่อความคงตัวของสีผสมอาหารชนิดนี้ แต่ถ้าใช้สีผสมอาหารชนิดนี้ในอาหารผง จะมีความคงตัวไม่ค่อยดี นอกเสียจากจะบรรจุในภาชนะที่ไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสภาวะที่มีออกซิเจนอยู่ด้วย จะทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้น คุณสมบัติของแคโรทีนอยด์จะเปลี่ยนไป สีกลุ่มนี้เป็นรงควัตถุที่ให้สีเหลืองจนถึงสีแดง การใช้สีกลุ่มนี้จึงแตกต่างกันไปตามชนิดของผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เยือกแข็งและกุ้งกระป๋อง ที่มักจะมีสีซีดจางหลังจากได้รับความร้อน จึงได้มีการใช้สีผสมอาหาร เพื่อให้สีของผลิตภัณฑ์คล้ายธรรมชาติ ตลอดจนการผสมสีกลุ่มนี้ลงในผลิตภัณฑ์ที่ทำจากซูริมิ เพื่อให้มีสีน่ารับประทาน (ศิวาพร, 2535) ส่วนสารให้สีในเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสม เนยแข็ง และเนยเทียมที่ใช้ในอุตสาหกรรมคือเบตาแคโรทีน (Baker and Günther, 2004a) การเสื่อมเสียของแคโรทินอยด์เป็นปัญหาสำคัญที่มีผลกระทบต่อคุณภาพของอาหารทะเล โดยมีสาเหตุมาจาก แสง ความร้อน pH ออกซิเจน และเอนไซม์ ได้แก่ เอนไซม์ไลโปออกซิจิเนส (Simpson, 1982)

2. ประโยชน์ต่อสัตว์

2.1 การคงตัวของโปรตีน

ในธรรมชาติ แอสตาแซนทีนมักจะอยู่รวมกับโมเลกุลชนิดอื่น (Bernhard, 1990) ซึ่งมักจะเป็นโปรตีนที่เรียกว่าแคโรทีโนโปรตีน สารเชิงซ้อนนี้จะมีสีต่าง ๆ อยู่ในอวัยวะต่าง ๆ ของสัตว์น้ำ แคโรทีโนโปรตีนที่พบในกุ้งมักจะมีสีฟ้า เขียว และเหลือง (Bidigare *et al*. 1993) แคโรทีนอยด์มีผลต่อการคงตัวของโปรตีนในสัตว์ การแยกแคโรทีนอยด์ออกจากโปรตีนอาจจะทำให้โครงสร้างของโปรตีนเปลี่ยนไป (Shahidi *et al.*, 1998k) จึงทำให้แคโรทีโนโปรตีนมีความคงทนมากกว่าแคโรทีนอยด์ (Cano-Lopez *et al*, 1987)

2.2 พัฒนาการของสัตว์น้ำ

แอสตาแซนทีนและแคนทาแซนทีน มีผลต่อพัฒนาการของไข่ปลาแซลมอน ให้คงทนต่อการถูกทำลายจากรังสีอุลตราไวโอเลตในแสงแดด ตลอดจนอัตราการรอดของปลาและกุ้งในระยะต่าง ๆ (Baker and Günther, 2004a)

แอสตาแซนทีนเป็นรงควัตถุสีแดง พบได้ในสัตว์น้ำทั่วไป คือ ปลา และสัตว์น้ำกลุ่มครัสตาเซียน ได้แก่ กุ้ง และ ปู (Torrissen *et al.*, 1989) ปลาแซลมอนและปลาเทร้าก็เหมือนสัตว์ชนิดอื่น ๆ ที่ไม่สามารถสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ได้ ในธรรมชาติอาหารของปลาแซลมอนคือแพลงตอนสัตว์ที่ได้รับแคโรทีนอยด์มาจากสาหร่ายขนาดเล็กอีกที ดังนั้นอาหารปลาจึงต้องมีการเติมแอสตาแซนทีนลงไปเพื่อให้ปลาได้รับแอสตาแซนทีนเพียงพอ เนื่องจากแอสตาแซนทีนมีความสำคัญต่อการต่อการเจริญเติบโต และมีบทบาทคล้ายวิตามิน แอสตาแซนทีนจะถูกดูดซึมและสะสมอยู่ในกล้ามเนื้อของปลาได้มากกว่าแซนโทฟิลตัวอื่น คือ แคนตาแซนทีน ลูทีน และซีแซนทีน (Torrissen and Christiansen, 1995) การเลี้ยงปลาด้วยอาหารเสริมแอสตาแซนทีนจะทำให้เนื้อปลาเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีส้มแดง นอกจากแอสตาแซนทีนจะช่วยในเรื่องสีของเนื้อปลาแล้วยังช่วยเรื่องอัตราการรอดและการเจริญเติบโตของปลาด้วย (Torrissen and Christiansen, 1995) นอกจากนี้แอสตาแซนทีนที่มีในเนื้อปลายังช่วยป้องกันการหืนของไขมันในเนื้อปลาในขณะเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (AstaFactor division of Mera Pharmaceuticals, Inc., 2008)

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ก็มีการเติมแคโรทีนอยด์ลงในอาหารสัตว์เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสีสวยเป็นที่ยอมรับของตลาด โดยตั้งใจให้แคโรทีนอยด์นี้เข้าไปสะสมในเนื้อเยื่อของสัตว์มากกว่าจะใช้เป็นสีผสมหรือย้อมอาหาร ได้แก่ การเติมแอสตาแซนทีนและแคนทาแซนทีนลงในอาหารปลาเทร้าท์และปลาแซลมอน เพื่อให้แคโรทีนอยด์เหล่านี้เข้าไปสะสมเนื้อปลา เนื่องจากเม็ดสีเหล่านี้โดยเฉพาะแอสตาแซนทีนมีความสำคัญต่อลักษณะปรากฏของผลิตภัณฑ์จากปลาดังกล่าว การผสมแคทาแซนทีนลงในอาหารสำหรับไก่ไข่ เพื่อให้ได้ไข่ที่มีไข่แดงสีแดงสวยซึ่งน่ารับประทานกว่าสีเหลือง ส้ม หรือ แดงซีด (Baker and Günther, 2004a) นอกจากนี้เกษตรกรไทยได้เลี้ยงเป็ดไข่ด้วยหัวกุ้ง เพื่อให้ไข่แดงมีสีเข้ม เป็นที่ต้องการของผู้ผลิตไข่เค็ม (สันนิบาตสหกรณ์แห่งประเทศไทย, 2551)

การเติมแคโรทีนอยด์ลงในอาหารสัตว์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพดีนั้นเป็นเพียงผลพลอยได้ เพราะผู้ที่ได้รับผลประโยชน์หลักคือมนุษย์ผู้บริโภคผลิตภัณฑ์จากสัตว์เหล่านั้น ถึงแม้ว่าจุดประสงค์แรกจะเป็นสีของผลิตภัณฑ์ แต่จากการที่ใช้สีมีคุณภาพ เราจึงได้ประโยชน์จากสีเหล่านั้นต่อสุขภาพของเรา (Baker and Günther, 2004a)

11. แคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein)

แคโรทีโนโปรตีนเป็นสารเชิงซ้อนของโมเลกุลแคโรทีนอยด์ที่รวมตัวกับโปรตีน สามารถพบได้ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน ได้แก่ กุ้ง และปู สารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความคงตัว แต่มีได้หลายสี ได้แก่ สีม่วง น้ำเงิน เขียว และน้ำตาล (Zagalsky *et al*., 1990) โดย แคโรทีโนโปรตีน สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

1. แคโรทีโนไลโปโปรตีน (carotenolipoproteins) คือ สารเชิงซ้อนแคโรทีโนโปรตีนที่โครงสร้างถูกแทรกด้วยไขมัน สารผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีน้ำเงิน เขียว และม่วง ส่วนมากจะพบในรังไข่และไข่ของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน เรียกว่า ไลโปวิเทลลิน (lipovitellins) แต่อาจจะพบได้ในเลือด ผิวหนังชั้นในและนอก

2. ไคติโนแคโรทีนอยด์ (Chitinocarotenoids) คือ สารเชิงซ้อนที่เกิดจากการรวมตัวของไคตินกับแคโรทีนอยด์ พบได้ในเปลือกนอกของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

3. แคโรทีโนโปรตีน คือ สารเชิงซ้อนของโมเลกุลแคโรทีนอยด์ที่รวมตัวกับโปรตีนเท่านั้น พบได้ที่ผิวด้านนอกของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียนทำให้เห็นสีได้ชัดเจน ได้แก่ ครัสตาไซยานิน (crustacyanin) เกิดจากแคโรทีนอยด์ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอสตาแซนทีนรวมตัวกับไกลโคโปรตีน (glycoprotein)

ครัสตาไซยานินในเปลือกของกุ้ง lobster ที่เกิดจากการรวมตัวกันของแอสตาแซนทีนสีน้ำเงินกับโปรตีน สามารถดูดกลืนแสงได้เป็นช่วงกว้างในช่วงความยาวคลื่นสูงสุด 625 นาโนเมตร (Shahidi *et al.*, 1998e) แต่ Zagalsky and Cheesman (1963) พบว่าครัสตาไซยานินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ ความยาวคลื่น 278 และ 632 นาโนเมตร นอกจากนี้ Jencks and Buten (1964) ยังพบว่าการที่ครัสตาไซยานินละลายในตัวทำละลายต่างกันจะทำให้ความสามารถในการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่นเดียวกันต่างกัน โดยในคลอโรฟอร์มครัสตาไซยานินสามารถดูดกลืนแสงได้สูงสุดที่ ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร เอทานอล (ethanol) ได้สูงสุดที่ 479 นาโนเมตร และบิวทานอล (butanol) 482 นาโนเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเกิดการเสียสภาพ (denaturation) ทำให้สีน้ำเงินเปลี่ยนไปเป็นสีม่วง สีเหลือง หรือสีแดง เนื่องจากสภาวะที่เป็นกรด มีตัวทำละลายอินทรีย์ และได้รับความร้อนที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส

โอโวเวอดิน (Ovoverdin) ในไข่ของกุ้ง lobster ที่เกิดจากการรวมตัวกันของแอสตาแซนทีนสีเขียวกับโปรตีน ก็เช่นเดียวกันที่ในสภาวะที่มีตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสภาวะเป็นกรดหรือเบส สามารถเกิดการเสียสภาพทำให้เปลี่ยนเป็นสีแดงอย่างถาวร หากอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ได้รับความร้อน 65-70 องศาเซลเซียส การเกิดการเสียสภาพนั้นจะทำให้เปลี่ยนเป็นสีแดงชั่วคราว (Stern and Salomon, 1938)

แคโรทีโนโปรตีนของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังมีหลายสี ตัวอย่างเช่น ปู shore crab (*Carcinus maenas*) มีแคโรทีโนโปรตีนสีเขียว หรือสีส้มแดง กุ้ง *Pandalus borealis* มีแคโรทีโนโปรตีนสีแดง ส่วนในกุ้งก้ามกราม *Macrobrachium rosenbergi* มีแคโรทีโนโปรตีนสีน้ำเงิน สีที่เปลี่ยนไปของกุ้งสุกนั้นเป็นสีของแอสตาซีน (astacene) การเสียสภาพเนื่องจากความร้อนและการปลดปล่อยแอสตาแซนทีนออกจากโปรตีน ซึ่งแคโรทีนอยด์นี้จะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นแอสตาซีน (Shahidi *et al.*, 1998f) เปลือกของสัตว์กลุ่มครัสตาเชียนเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยแคโรทีโนโปรตีน (Milicua *et al*., 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าไข่และรังไข่ของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ มักจะมีเม็ดสี ได้แก่ เหลือง ส้ม แดง เขียว น้ำเงิน หรือม่วง เนื่องมาจากมีแคโรทีนอยด์ และ/หรือ แคโรทีโนโปรตีน (Miki *et al*., 1982)

การที่โมเลกุลแคโรทีนอยด์จับอยู่กับโปรตีนช่วยให้ความคงตัวของโมเลกุลแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้น (Shahidi *et al.*, 1998d) แอสตาแซนทีนที่อยู่อิสระในอีเทอร์ (ether) จะมีความไวต่อแสงและออกซิเจนมากกว่าแอสตาแซนทีนที่จับอยู่กับโปรตีน เนื่องจากแคโรทีนอยด์นั้นมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยออกซิเจน แสง ความร้อน กรด และเบส และจะยิ่งรุนแรงหากได้รับมากกว่าหนึ่งปัจจัยพร้อมกัน (Britton, 1985) แอสตาแซนทีน และแคนตาแซนทีน เป็นคาร์โรทีนอยด์ที่พบได้ทั่วไปในแคโรทีโนโปรตีนจากส่วนต่าง ๆ ของสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยจะมีองค์ประกอบต่างกันไปดังตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6

เนื่องจากสีเป็นปัจจัยหนึ่งในการตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภท ได้แก่ สีของเนื้อปลาแซลมอนที่จะต้องเป็นสีส้มแดง (Simpson, 1982) โดยแอสตาแซนทีนเป็นเม็ดสีที่เป็นที่ยอมรับว่าเป็นเม็ดสีที่ให้สีที่แท้จริงของเนื้อปลาแซลมอน (Spinelli *et al.*, 1974) จึงทำให้มีการนำแคโรทีโนโปรตีนไปใช้เป็นอาหารเสริมของสัตว์น้ำและในฟาร์มเลี้ยงปลา ได้แก่ ปลาแซลมอน (Shahidi *et al*, 1998a) เพื่อให้เนื้อปลามีคุณภาพดีขึ้น และมีสีตามต้องการ และยังมีการนำแคโรทีโนโปรตีนไปใช้เป็นสี และกลิ่นรสที่ผสมในผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้การสกัดแคโรทีโนโปรตีนยังช่วยให้กระบวนการผลิตไคติน ไคโตแซนง่ายขึ้น และมีคุณภาพดีอีกด้วย เนื่องจากในการกระบวนการผลิตไคตินนั้นจะต้องมีการใช้สารเคมี ความร้อน และเวลานาน เพื่อกำจัดโปรตีน และไขมันที่มีอยู่จำนวนมาก การสกัดแคโรทีโนโปรตีนเป็นการกำจัดโปรตีนวิธีหนึ่งที่ยังได้โปรตีนและแคโรทีนอยด์มาเป็นผลพลอยได้ ที่จะช่วยให้การสกัดไคตินสะดวก รวดเร็วขึ้น และดีต่อสิ่งแวดล้อม (Chakrabarti, 2002a)

แคโรทีนอยด์ของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียน ได้แก่ กุ้ง และปูมีสีแดง น้ำตาล น้ำเงิน เขียว นั้นเกิดจากการที่แคโรทีนอยด์รวมตัวกับโปรตีนได้เป็นแคโรทีโนโปรตีน การที่ให้ความร้อนกับแคโรทีโนโปรตีน หรือ ใช้ตัวทำละลาย ได้แก่ แอลกอฮอล์ และฟอร์มัลดีไฮด์ ทำให้โปรตีนเสียสภาพเป็นการปลดปล่อยรงควัตถุที่เป็นอิสระ (Haard, 1992) สารแคโรทีนอยด์เป็นสารที่มีประโยชน์ต่อมนุษย์มาก การที่จะนำแคโรทีโนโปรตีนมาใช้เป็นอาหารเสริมจึงน่าจะเป็นประโยชน์ทางด้านโภชนาการแก่มนุษย์ได้

ตารางที่ 5 แคโรทีโนโปรตีนที่พบในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

Organ/ Species	Color of pigment	Prosthetic carotenoid group
Ovaries/ Eggs		
Artemia salina	Orange/ red	Canthaxanthin
Branchipus stagnalis	Blue	Canthaxanthin
Cancer pagurus	Orange	Astaxanthin + other xanthophylls
Emerita analoga	Orange	Astaxanthin
Eupagurus bernhardus	Purple	Astaxanthin ester
Homarus americanus	Green	Astaxanthin
Homarus gammarus	Green	Astaxanthin
Idothea montereyensis	Green	Canthaxanthin
Idothea granulose	Green	Canthaxanthin
Palinurus vulgaris	Red (blue)	Astaxanthin
Exoskeleton		
Astacus astacus	Green	Astaxanthin
Carcinas maenas	Green	Astaxanthin
Eriphia spinifrons	Red/ purple	Astaxanthin
Homarus vulgaris	Blue	Astaxanthin
Idothea granulose	Green	Astaxanthin
Idothea montereyensis	Green	Astaxanthin
Labidocera acutifrons	Blue	Astaxanthin
Palinurus vulgris	Red (blue)	Astaxanthin
Hemolymph		
Chirocephalus diaphanous	Blue	Canthaxanthin
Emerita analoga	Orange	Astaxanthin + β-carotene
Idothea granulose	Green	Canthaxanthin
Idothea montereyensis	Green	Canthaxanthin
Tanymastix lacunae	Blue/ purple	Canthaxanthin

ที่มา : Shahidi *et al*. (1998a)

ตารางที่ 6 องค์ประกอบของแคโรทีโนโปรตีนจากสัตว์น้ำ

Species	Organ	Description	Carotenoid
Crustacea (Arthropoda)			
Procambarus clarkia	Carapace	Simple protein	Astaxanthin
	Carapace	Lipoprotein	Astaxanthin/ Astaxanthin esters
Galathea strigosa	Carapace	Simple protein	Astaxanthin
Macropipus puber	Carapace	Glycolipoprotein	Astaxanthin
Carcinas maenas	Carapace	Simple protein	Astaxanthin
Astacus leptodactylus	Carapace/ Hypodermis	Simple protein	Astaxanthin
Upogebia pusilla	Hypodermis/ exoskeleton		Astaxanthin
Asteroidea (Echinodermata)			
Linckia laevigata	Skin	Glycoprotein	Astaxanthin/ Canthaxanthin
Echinaster sepositus	Skin		Canthaxanthin/ Zeaxanthin
Astropecten spinulosus	Skin		Zeaxanthin/ Canthaxanthin
Lysasterias perrieri	Skin		Astaxanthin
Echinoldea (Echinodemata)			
Paracentrotus lividus	Body		Isozeaxanthin
Demosponglae (porifera)			
Sorgalilla lacustris	Body		Astaxanthin
Anthozoa (Coelentrata)			
Anemonia sulcata	Body		Canthanthin/ Astaxanthin
Bivalvia (Mollusca)			
Unio pictorium	Body		Canthanthin
Osteichthyes (Chordata)			
Oncorhynchus keta	Serum	Lipoprotein	Astaxanthin

ที่มา : Shahidi *et al*. (1998a)

12. กุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม *Macrobrachium roesenbergii* เป็นกุ้งน้ำจืดที่มีขนาดใหญ่มากชนิดหนึ่งมีขนาด 13-31 เซนติเมตร ส่วนหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดใหญ่ และน้ำหนักมากกว่าลำตัว ลักษณะสำคัญของกุ้งชนิดนี้คือ บนเปลือกกุ้งบริเวณส่วนหน้าใกล้กับเบ้าตามีหนามเล็ก ๆ ด้านละ 2 อัน กรีค่อนข้างยาว แบนด้านข้าง โคนกรีหนาและนูน ตรงกลางโค้งแอ่นลง ส่วนปลายงอนขึ้นมีหนามคล้ายฟันเลื่อยทั้งด้านบนและด้านล่าง กุ้งก้ามกรามมีลักษณะพิเศษตามชื่อของมันคือ เพศผู้จะมีขาเดินคู่ที่2 ขนาดใหญ่และยาวกว่าคู่อื่น ๆ มาก ซึ่งเราเรียกว่าก้าม (สมโภชน์, 2540)

ปัจจุบันการเลี้ยงกุ้งก้ามกรามมีแหล่งเลี้ยงที่สำคัญอยู่ในจังหวัดต่าง ๆ แถบภาคกลางของประเทศไทย เช่น นครปฐม ราชบุรี สุพรรณบุรี และกาญจนบุรี นอกจากนั้นยังมีการเลี้ยงมากในภาคตะวันออกบางจังหวัด เช่น สมุทรปราการ และฉะเชิงเทรา แต่โดยธรรมชาติจะพบอยู่ในแม่น้ำลำคลองแทบทุกจังหวัดในภาคกลาง และภาคใต้ ทั้งในน้ำจืดและน้ำกร่อย กุ้งก้ามกรามชอบกินไส้เดือน ตัวอ่อนของแมลง ลูกไร ซากของสัตว์ และบางครั้งก็กินพวกเดียวกันเอง (สมโภชน์, 2540)

เนื้อของกุ้งก้ามกรามมีรสอร่อย ไม่ว่าจะนำไปต้มยำ ทอด หรือเผา มันกุ้งคือตับและตับอ่อน ส่วนแก้วกุ้งคือรังไข่ ซึ่งมีไข่อ่อนอยู่เต็ม (สมโภชน์, 2540) นิยมนำเนื้อไปทำขนมจีบซาลาเปา เพราะรสชาติดีกว่ากุ้งกุลาดำ (นิรนาม, 2544)

ผลผลิตกุ้งก้ามกรามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและการจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ มีปริมาณมากขึ้นทุกปี จากพ.ศ. 2544 ผลผลิตเพิ่มสูงขึ้นจาก 13,300 ตัน เป็น 32,600 ตันใน พ.ศ. 2547 ดังตารางที่ 7 ยกเว้นในบางปีที่แหล่งเพาะเลี้ยงประสบปัญหาภัยน้ำท่วม และโรคระบาด จึงมีผลผลิตลดลง ถึงแม้ว่าผลผลิตกุ้งก้ามกรามมีเพียง 4 -8 % โดยประมาณของปริมาณสัตว์น้ำจืดทั้งหมด แต่กุ้งก้ามกรามก็เป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2548)

ตารางที่ 7 ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 - 2548

พ.ศ.	ปริมาณสัตว์น้ำจืดทั้งหมด (ตัน)	ปริมาณกุ้งก้ามกรามทั้งหมด	
		ตัน	% ปริมาณสัตว์น้ำจืดทั้งหมด
2544	279,700	13,300	4.75
2545	294,500	15,400	5.23
2546	361,100	28,100	7.78
2547	523,700	32,600	6.22
2548	539,400	28,700	5.32

ที่มา : กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง (2548)

ประเทศไทยมีฟาร์มเพาะเลี้ยงกุ้งจำนวน 35,000 ฟาร์ม ส่วนใหญ่เป็นฟาร์มขนาดเล็กที่มีบ่อเลี้ยงอยู่ระหว่าง 1-4 บ่อ โดยกุ้งขาวมีปริมาณผลผลิตมากที่สุด รองมาเป็นกุ้งกุลาดำ และกุ้งก้ามกราม โดยผลผลิตกุ้งก้ามกรามที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใช้บริโภคภายในประเทศประมาณ 77 - 90 % และส่งออกไปต่างประเทศ 10-22 % พ.ศ. 2545 ไทยส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกรามไปขายในตลาดต่างประเทศเป็นปริมาณรวม 2,099.48 ตัน เป็นมูลค่า 513.93 ล้านบาท ปริมาณและมูลค่าการส่งออกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสูงที่สุดในพ.ศ. 2549 ที่ส่งออก 8,086.83 ตัน เป็นมูลค่า 1,712.41 ล้านบาท ดังตารางที่ 8 แต่ในระยะหลังผู้ส่งออกประสบปัญหาเรื่องสารตกค้างและสารปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกราม จึงทำให้สินค้าถูกส่งกลับจำนวนมาก จึงทำให้ปริมาณและมูลค่าการส่งออกลดลง เมื่อมีการแก้ปัญหาและปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์กุ้งก้ามกรามแล้วปริมาณและมูลค่าการส่งออกควรจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเช่นเดิม ผลิตภัณฑ์ที่ส่งออกนั้นมีทั้งสดแช่เย็น แช่เย็นจนแข็ง และปรุงแต่งบรรจุและไม่บรรจุภาชนะอัดลม ตลาดส่งออกที่สำคัญ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย จีน สิงคโปร์ และเกาหลี เป็นต้น (กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ, 2551)

ตารางที่ 8 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งก้ามกรามของประเทศไทยในปี พ.ศ. 2545 - 2550

ชนิดผลิตภัณฑ์	พ.ศ. 2545		พ.ศ. 2546		พ.ศ. 2547		พ.ศ. 2548		พ.ศ. 2549		พ.ศ. 2550	
	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า	ปริมาณ	มูลค่า
กุ้งก้ามกราม สดหรือแช่เย็น	91.68	14.07	455.97	73.59	1,102.71	149.51	1,299.81	290.35	1,176.48	273.76	259.00	46.84
กุ้งก้ามกราม แช่เย็นจนแข็ง	1,961.11	480.09	2,098.76	529.69	3,235.79	729.82	5,119.44	1,065.42	6,902.77	1,437.46	1,697.41	407.18
กุ้งก้ามกราม บรรจุภาชนะอัดลม	0.00	0.00	0.89	0.30	1.06	0.49	8.26	3.35	7.03	1.03	5.33	1.37
กุ้งก้ามกราม ไม่บรรจุภาชนะอัดลม	46.69	19.77	94.44	42.12	19.23	7.04	18.04	4.03	0.55	0.16	137.73	30.39
รวมทั้งหมด	2,099.48	513.93	2,650.06	645.7	4,358.79	886.86	6,445.55	1,363.15	8,086.83	1,712.41	2,099.12	485.78

หมายเหตุ ปริมาณ (ตัน) มูลค่า (ล้านบาท)

ที่มา: กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ (2551)

ความต้องการกุ้งก้ามกรามในตลาดต่างประเทศมีแนวโน้มขยายตัวมากขึ้นเรื่อย ๆ แต่ขยายตัวช้าเนื่องจากน้ำหนักกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่จะอยู่ที่หัว สายพันธุ์กุ้งก้ามกรามเดิมมีเนื้อ 40% หัวจะโตประมาณ 60% และ ก้ามใหญ่ สำหรับตลาดในประเทศ เรื่องหัวโตไม่มีปัญหา เพราะคนไทยชอบรับประทานมันกุ้ง แต่เป็นปัญหาตลาดส่งออก เพราะเวลาส่งออกไม่ได้ส่งกุ้งออกทั้งตัว ต้องเด็ดหัวออกเหลือแต่เนื้อ ตลาดต่างประเทศไม่นิยมกินหัวกุ้งก้ามกราม ห้องเย็นที่ซื้อกุ้งก้ามกรามสายพันธุ์เดิมมา พอเด็ดหัวออก 60% เหลือเนื้อเพียง 40% ทำให้ต้นทุนเพิ่มเกือบ 3 เท่าตัว ส่งผลให้การส่งออกลำบาก เพราะต้นทุนสูง ขณะนี้ได้มีการพัฒนาสายพันธุ์กุ้งก้ามกรามขึ้นใหม่ให้ดีขึ้น คือ ทำให้หัว และก้ามเล็กลง เพื่อให้ตรงกับความต้องการของตลาด คนเลี้ยงเลี้ยงง่าย โตเร็ว แข็งแรง อัตรารอดจะสูงกว่าสายพันธุ์เดิมที่เกษตรกรเคยเลี้ยงมา ใช้เวลาเลี้ยงทั้งหมด 6 เดือน จับได้หมดบ่อ ซึ่งสามารถกำหนดปริมาณและขนาดกุ้งในระยะเวลาที่เลี้ยงได้จึงมีโอกาสในการเปิดตลาดต่างประเทศมากขึ้น (นิรนาม, 2544)

12. การใช้ประโยชน์จากเศษเหลือจากการแปรรูปกุ้ง

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิต และส่งออกกุ้งรายใหญ่ของโลกด้วยมูลค่าส่งออกสูงถึงเกือบ 1 แสนล้านบาทในแต่ละปี ผลิตภัณฑ์กุ้งส่งออกของไทยมีทั้งกุ้งแปรรูปขั้นต้น เช่น กุ้งสดแช่เย็นแช่แข็ง ไปจนถึงกุ้งแปรรูปในลักษณะพร้อมรับประทาน เช่น กุ้งกระป๋อง กุ้งชุบแป้งทอด ฯลฯ การแปรรูปกุ้งแช่เยือกแข็ง มีทั้งแบบ กุ้งทั้งตัว กุ้งหักหัว และกุ้งหักหัวและแกะเปลือก การผลิตและส่งออกผลิตภัณฑ์กุ้งแปรรูป ในลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวที่ ขยายตัวอย่างรวดเร็ว จึงทำให้มีเศษเหลือได้แก่ หัวและเปลือกกุ้ง จากการแปรรูปนี้เกิดขึ้นจำนวนมาก เนื่องจากในกระบวนการแปรรูปกุ้ง มีส่วนเหลือทิ้งที่เป็นเปลือกกุ้งและหัวกุ้ง สูงถึง 40-50% ของน้ำหนักกุ้งทั้งหมด เศษเหลือทิ้งจากกุ้งจำนวนมาก ในแต่ละปี ก่อให้เกิดปัญหาต่อสภาวะแวดล้อม และเป็นภาระในการกำจัดเป็นอย่างยิ่ง จึงเกิดความพยายามที่จะนำ เศษเหลือทิ้งจากกุ้ง มาใช้ให้เกิดประโยชน์มากที่สุด เพื่อลดปริมาณขยะที่เกิดจากโรงงานแปรรูปกุ้งลง (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2543; Chakrabarti, 2002a) โดยองค์ประกอบหลักของเศษเหลือของกุ้งนั้นเป็นโปรตีน 35-50% ไคติน 15-50% แร่ธาตุ 10-15% และแคโรทีนอยด์ ส่วนใหญ่เศษเหลือเหล่านี้ได้ถูกปล่อยทิ้งให้สูญเปล่า ไม่เพียงแต่ไม่ได้ใช้ประโยชน์จากองค์ประกอบดังกล่าว และยังเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม มีเพียงส่วนน้อยที่นำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตปลาป่นเป็นส่วนผสมในอาหารสัตว์ หมักเป็นปุ๋ย และผลิตไคติน ไคโตซาน (*Sachindra et al*., 2006 a)

ในประเทศไทยมีผู้บริโภคหัวกุ้งกุลาดำ โดยนำมาปรุงอาหารหลายชนิด ได้แก่ การย่าง และทอด อาจจะผสมส่วนผสมอื่นหรือไม่ก็ได้ หัวกุ้งกุลาดำป่นแห้งมีโปรตีนที่ร่างกายนำไปใช้ประโยชน์ได้ปริมาณ 70-80% เมื่อเทียบกับโปรตีนอาหารมาตรฐาน เคซีน (จิราวรรณ และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังมีการให้หัวกุ้งเป็นอาหารเสริมแก่เป็ดไข่ ซึ่งหัวกุ้ง ถือว่าเป็นอาหารเสริมที่มีคุณค่าสูง โดยเฉพาะแคลเซียม ไข่เป็ดที่เลี้ยงด้วยหัวกุ้งและเปลือกกุ้งจะได้ไข่แดงที่มีสีแดงเข้ม (สันนิบาตสหกรณ์แห่งประเทศไทย, 2551) ถึงแม้ว่ากุ้งก้ามกรามจะไม่ใช่วัตถุดิบหลักในการแปรรูปเพื่อการส่งออก แต่กุ้งก้ามกรามก็เป็นกุ้งที่ได้รับความนิยมสูงในการบริโภคภายในประเทศ และกำลังจะมีปริมาณการส่งออกเพิ่มขึ้น เนื่องจากส่วนหัวและอกอยู่รวมกันมีขนาดใหญ่ ซึ่งไม่นำมาบริโภค จึงน่าจะนำมาทำประโยชน์อย่างอื่นได้

เมื่อได้รวบรวมงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากวัสดุจากเศษเหลือจากกุ้ง พบว่ามีการสกัดกลิ่นรสจากหัวกุ้ง (Harnwanichsak, 1997) ผลิตเปปโตน (Stephens *et al.*, 1976) ผลิตข้าวเกรียบ (Burkholder *et al*., 1966) ผลิตไคตินและไคโตแซน (Jolls and Muzzarelli,1999) และผลิตแคโรทีโนโปรตีน (Simpson and Haard, 1985b) การใช้ประโยชน์จากเศษหัวกุ้ง และเปลือกกุ้งในรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่

1. การสกัดสารโปรตีนจากหัวกุ้ง

โปรตีนที่สกัดได้มี 2 ลักษณะ คือ โปรตีนผงและโปรตีนน้ำเข้มข้น นำไปใช้ประโยชน์ในการผสมในอาหารหรือขนม เพื่อเสริมคุณค่าทางอาหาร หรือใช้ในการแต่งรสและกลิ่นอาหาร เช่น แต่งรส ข้าวเกรียบ น้ำพริก ขนมขบเคี้ยว และบะหมี่กึ่งสำเร็จรูป เป็นต้น (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2543)

จิราวรรณ และคณะ (2539) ได้มีการศึกษาการผลิตอาหารขบเคี้ยวกรอบพองเสริมโปรตีน โดยใช้โปรตีนจากหัวกุ้งกุลาดำ ซึ่งเป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค ในด้านสี ลักษณะปรากฏ และเนื้อสัมผัส

การเพิ่มมูลค่าให้แก่หัวกุ้งที่เหลือจากโรงงานแช่เยือกแข็ง โรงงานกุ้งกระป๋องต่าง ๆ นอกจากจะนำมาผลิตไคติน ไคโตแซนแล้ว ยังสามารถนำหัวกุ้งเหล่านี้มาเข้าสู่กระบวนการหมักในถังหมัก แล้วจึงใส่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์ ส่วนที่เป็นกากคือวัตถุดิบที่นำไปทำไคติน ไคโตซาน และในส่วนของน้ำหมัก (Hydrolysate) ที่แยกได้จะนำเข้าสู่เครื่องระเหยจนได้น้ำโปรตีนเข้มข้น

โปรตีนเข้มข้นที่ผลิตได้นี้สามารถนำไปผสมเป็นอาหารเลี้ยงกุ้งในสัดส่วนที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับประเภทของอาหาร เช่น อาหารของกุ้งวัยอ่อน กุ้งอนุบาล โดยสามารถใช้ทดแทนอาหารเลี้ยงกุ้งวัยอ่อน คือ อาร์ทีเมีย ที่มีราคาแพงทั้งยังต้องนำเข้าจากต่างประเทศ มูลค่าปีละนับพันล้านบาท (ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร. 2551ก)

2. การสกัดสารไคติน และไคโตซานจากหัวและเปลือกกุ้ง

โดยทั่วไปสารไคตินและสารไคโตซาน เป็นองค์ประกอบทางธรรมชาติ ที่มีอยู่ในโครงสร้างของสิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิด เช่น ปีกแมลง เปลือกปู เปลือกหอย เป็นต้น

ประโยชน์ของสารไคตินและสารไคโตซาน

1) ด้านการเกษตร ใช้ในการผลิตปุ๋ยชีวภาพ และสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช และป้องกันโรคพืช

2) ด้านอุตสาหกรรมอาหาร สารไคตินและสารไคโตซาน มีคุณสมบัติที่สามารถต่อต้านจุลินทรีย์ และเชื้อราบางชนิดได้ จึงใช้เป็นส่วนประกอบของสารกันบูด สารปรุงแต่งเพื่อคงรูปและสีของอาหารประเภทต่าง ๆ

3) ด้านการแพทย์และเภสัชกรรม ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ลดไขมัน และน้ำหนักส่วนเกิน ใช้เป็นส่วนผสมในการทำผิวหนังเทียม รวมถึงเป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมเพื่อสร้างกระดูกอ่อนและฟัน

4) เครื่องสำอางและผลิตภัณฑ์บำรุงผิว สารไคติน และสารไคโตซานมีคุณสมบัติเป็นตาข่ายคลุมผิวหนัง ช่วยให้ผิวหนังมีความชุ่มชื้น และช่วยป้องกันเชื้อโรค จึงใช้เป็นสารเติมแต่ง และสารพื้นฐานของเครื่องสำอางหลายประเภท เช่น แชมพู

5) ด้านอุตสาหกรรมสิ่งทอ และกระดาษ ใช้ในการเพิ่มคุณสมบัติด้านความเหนียว และความทนทานแก่เส้นใยสิ่งทอและกระดาษ

6) ด้านสิ่งแวดล้อม สารไคติน และสารไคโตซานมีคุณสมบัติในการดูดซับ และจับตะกอนต่าง ๆ ในสารละลาย จึงสามารถนำมาใช้ดูดซับโลหะหนักในน้ำทิ้งของโรงงานอุตสาหกรรมได้ นอกจากนี้ ยังนำมาใช้ในกระบวนการแยกสารประกอบทางชีวภาพ โดยสารที่แยกได้จะไม่ก่อให้เกิดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมแต่อย่างใด (ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย, 2543)

3. สกัดสารจากหัวกุ้งกุลาดำเพื่อใช้เป็นวัตถุกันหืนธรรมชาติในผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองและมายองเนส (พรรณทิพา, 2546)

14. การสกัดแคโรทีโนโปรตีน

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตไคติน ไคโตซาน จากเดิมที่กำจัดโปรตีนออก (Deproteinate) ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2% คนสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างน้ำ แล้วจึงกำจัดแร่ธาตุออก (Demineralize) โดยการใช้สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1% คนสม่ำเสมอที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างน้ำแล้วจึงได้ไคติน ซึ่งกระบวนการนี้จะต้องใช้สารเคมีจำนวนมากในการกำจัดโปรตีนและแร่ธาตุ และผลผลิตที่ได้มีเพียงไคตินเท่านั้น เนื่องจากแอสตาแซนทีนจะเปลี่ยนไปเป็นแอสตาซีนในสภาวะที่เป็นเบส แอสตาซีนที่ได้จะไม่สามารถเป็นสารให้สีที่ทำให้เนื้อของปลาแซลมอนมีสีเข้มขึ้นได้ ดังนั้นถ้าคำนึงถึงปริมาณและคุณภาพของสารแคโรทีนอยด์ จึงมีการพัฒนาวิธีการผลิตไคตินเพื่อให้ได้ผลประโยชน์สูงสุดให้ได้สารแคโรทีนอยด์ และแคโรทีโนโปรตีนจากกระบวนการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้ง (Johnson, 1992a)

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนโดยใช้วิธีทางชีวภาพเพื่อให้ได้โปรตีนที่มีคุณภาพจากหัวและเปลือกกุ้งโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสและแบคทีเรียในกระบวนการสกัดไคติน (Chakrabarti, 2002b; Simpson *et al*., 1994) Simpson and Haard (1985b) สกัดแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งต้มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสโดยใช้เอนไซม์โปรติเอส Hale (1969) เสนอว่าเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ปาเปน เปปซิน และ ทริปซินสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิห้อง Cano-Lopez *et al*. (1987) พบว่าการสกัดแคโรทีโนโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากปลา cod นั้นได้ปริมาณแอสตาแซนทีน และโปรตีนสูงกว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินจากโค EDTA ช่วยให้การสกัดแคโรทีโนโปรตีนมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น เนื่องจาก EDTA ช่วยกำจัดแร่ธาตุในวัตถุดิบ การใช้ EDTA ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณโปรตีน และแคโรทีนอยด์สูง (Simpson and Haard, 1985b)

Simpson and Haard (1985b) สกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งในสารละลาย trisodium EDTA (pH7.7) ด้วยเอนไซม์โปรติเอส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กรองแล้วนำสารละลายไปตกตะกอนโปรตีนให้อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 45% แล้วจึงเหวี่ยงแยกตะกอนโปรตีน

เสาวลักษณ์ (2543) สกัดแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งกุลาดำ โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1.5 นอร์แมล ใช้เวลาในการสกัดนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส

15. การสกัดแคโรทีนอยด์

การสกัดแคโรทีนอยด์มี 2 วิธี คือ การสกัดด้วยตัวทำละลาย และน้ำมันพืช

1. การสกัดด้วยตัวทำละลาย

ตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์จากเศษเหลือของกุ้งได้แก่ อะซีโตน (Sachindra *et al.*, 2006c) และ แอลกอฮอล์ (Sachindra *et al.*, 2006b) โดยตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการสกัดแคโรทีนอยด์ คือ ปิโตรเลียมอีเทอร์ และอะซีโตน (Chen and Meyers, 1982)

การสกัดด้วยตัวทำละลายอินทรีย์นั้นเหมาะสำหรับใช้เป็นวิธีวิเคราะห์ทางเคมีเท่านั้น (Britton, 1985; Meyers and Bligh, 1981) ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิดได้รับอนุญาตให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการเป็นสารที่ใช้ในการสกัดหรือเป็นสารช่วยในการขนส่ง ได้แก่ อะซีโตน เบนซิลแอลกอฮอล์ เอทิลอะซีเตต เฮกเซน ไอโซโพรพานอล เมทานอล เมทิลเอทิลคีโตน และเอทานอล โดยปริมาณในการใช้ขึ้นกับชนิดของอาหารนั้น ๆ (Food and Drug Regulation, 2005)

2. การสกัดด้วยน้ำมันพืช

น้ำมันเป็นสารสกัดแคโรทีนอยด์ที่มีประสิทธิภาพ การใช้น้ำมันพืช เช่นน้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันปาล์ม (Sachindra and Mahendrakar, 2005) ในการสกัดแคโรทีนอยด์ เช่น แอสตาแซนทีน มีผลให้การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของแคโรทีนอยด์ลดลง เนื่องจากน้ำมันจะเป็นตัวป้องกันออกซิเจนทำปฏิกริยากับแคโรทีนอยด์ (Bauernfeind, 1981)

Chen and Meyers (1982), Shahidi and Synowiecki (1991) และ Sachindra and Mahendrakar (2005) ได้ใช้น้ำมันพืชในการสกัดแคโรทีนอยด์ออกจากเศษเหลือของกุ้ง

Johnson (1992b) ได้ทำการสกัดแคโรทีนอยด์ออกมาจากหัวและเปลือกกุ้งก่อนที่จะกำจัดแร่ธาตุออกจากตัวอย่าง โดยใช้น้ำมันถั่วเหลือง น้ำมันมะพร้าว และน้ำมันมะกอก พบว่าน้ำมันมะพร้าวให้ผลดีที่สุด แต่วิธีนี้จะต้องใช้เวลาในการแยกน้ำมันจากแอสตาแซนทีน

ปัจจัยในการตัดสินใจในการเลือกสภาวะในการสกัดแคโรทีโนโปรตีนโดยใช้เอนไซม์

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนนั้นต้องการให้ได้ผลผลิตในปริมาณมากที่สุดและยังต้องคำนึงคุณภาพของแคโรทีนอยด์และโปรตีนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของแคโรทีโนโปรตีน

ปัจจัยที่มีผลต่อการเสื่อมคุณภาพของแคโรทีนอยด์ คือ ออกซิเจน โลหะเปอร์ออกไซด์ แสง อุณหภูมิ เอนไซม์ ค่า water activity (Aw) และส่วนประกอบของอาหาร (ศิวาพร, 2535; Simpson, 1982) การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจึงต้องพิจารณาถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

1. อุณหภูมิ

เอนไซม์อัลคาเลสมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนจากเปลือกกุ้งในช่วงอุณหภูมิสูงและมีกิจกรรมลดลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 องศาเซลเซียส (เสาวลักษณ์, 2543) เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกิน 70 องศาเซลเซียส มีผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อัลคาเลสลดลงและความร้อนสูงมีผลให้เอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ (Adler-Nissen, 1986) แคโรทีโนโปรตีนเป็นสารประกอบแคโรทีนอยด์ซึ่งอยู่ร่วมกับโปรตีนโดยพันธะนอนโควาเลนท์ (Zagalsky *et al*., 1990) เมื่อเอนไซม์สามารถย่อยสลายโปรตีนให้เป็นเป็ปไทด์ขนาดเล็กที่สามารถละลายได้เพิ่มขึ้นจึงมีผลให้แคโรทีนอยด์ซึ่งจับตัวกับโปรตีนละลายออกมาได้มากขึ้นเช่นกัน (เสาวลักษณ์, 2543) เบตาแคโรทีนมีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส (Kearsley and Rodriguez, 1981) เอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ปลานิลทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และดีที่สุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Hinsui *et al.*, 2006) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีโนโปรตีน

2. pH

เอนไซม์อัลคาเลส (alcalase) จัดเป็นเอนไซม์ในกลุ่มอัลคาไลโปรติเอส (alkali protease) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีในช่วงที่เป็นเบส (Adler-Nissen, 1986) สามารถย่อยสลายโปรตีนจากเปลือกกุ้งได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง และสูญเสียกิจกรรมการย่อยสลายอย่างชัดเจนในสภาวะที่เป็นกรด สภาวะที่เป็นกรดหรือด่างมากเกินไปมีผลต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ ส่งผลให้

กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนลดลง pH ที่เหมาะสมในการย่อยสลายเปปไทด์ของเอนไซม์อัลคาเลส คือ pH 8.0 (เสาวลักษณ์, 2543) ซึ่งสอดคล้องกับ pH ที่ใช้ในการทดลองที่เป็น pH ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ปลานิล

3. ระยะเวลาในการสกัด

อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณแคโรทีนอยด์จะเพิ่มขึ้นค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนสูงสุดในช่วง 3 ชั่วโมงแรกของการสกัด แต่จะลดลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการสกัดมากกว่า 3 ชั่วโมง (เสาวลักษณ์, 2543) เนื่องจากการสกัดที่อุณหภูมิสูง ภายใต้สภาวะที่เป็นด่าง อาจมีผลต่อการสูญเสียสภาพธรรมชาติของแคโรทีนอยด์ (Schwartz and Von Elbe, 1996) เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง แคโรทีนอยด์จะเปลี่ยนสภาพ โดยแคโรทีนอยด์ที่มีสีแดงจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน และการดูดกลืนคลื่นแสงจะเปลี่ยนไป (Bauernfeind, 1981)

4. การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการรวบรวมตะกอนของโปรตีนที่สะดวกวิธีหนึ่ง เสาวลักษณ์ (2543) พบว่าการตกตะกอนแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งกุลาดำด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัว 45% จะให้ปริมาณผลผลิตสูงกว่า 85% นอกจากนี้ David and Donald (1995) แนะนำว่า ถ้าในสารละลายมีโปรตีนน้อย ไม่ควรตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวสูงกว่า 50% เพราะจะเป็นการทำให้ปริมาตรสารละลายโดยรวมเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการทำให้โปรตีนเจือจางลงนั่นเอง

5. สารกันหืน

แคโรทีโนโปรตีนที่สกัดได้ในสภาวะที่เติมสารกันหืนอีทอกซีควิน (Ethoxyquin)จะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่เติมสารกันหืน (เสาวลักษณ์, 2543) โดยอีทอกซีควินมีผลเพิ่มความคงตัวของแคโรทีนอยด์ที่สกัดจากเปลือกกุ้ง (Chen and Meyers, 1982) นอกจากนี้ยังมีสารกันหืนตัวอื่น คือ BHT (Simpson and Haard, 1985b) และ BHA (Meyers and Bligh, 1981a) ที่มีผลต่อความคงตัวของแคโรทีนอยด์การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1. ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linneaus) สายพันธุ์จิตรลดา จากบุญยังฟาร์ม ตำบลโพนทอง อำเภอพนัสนิคม จังหวัดชลบุรี โดยปลาจะถูกดองน้ำแข็งตั้งแต่จับ และขนย้ายมายังห้องปฏิบัติการสถานีวิจัยประมงศรีราชาในเวลา 6 ชั่วโมง

2. หัวกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium roesenbergii*) จากบริษัทห้องเย็นท่าข้าม จำกัด เขตบางขุนเทียน กรุงเทพฯ

2. เอนไซม์ เอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของโค (Analytical grade, BDH)

3. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Analytical grade, Sigma)

1. อะโพรทินิน (Aprotinin)
2. ฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)
3. โทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน (N∝-*p*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK)
4. โทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, TPCK)
5. สารสกัดจากถั่วเหลืองยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Soybean Trypsin Inhibitor; SBTI)

4. สารเคมี

1. อะซิโตน (Acetone) (Analytical grade, BDH)
2. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) (Analytical grade, Merck)
3. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Fluka)

4. ไดโซเดียมอีดีทีเอ (EDTA disodium salt) (Analytical grade, Merck)

5. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Analytical grade, Merck)

6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Schalar)

7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Analytical grade, Merck)

8. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Trizma base) (Analytical grade, Merck)

9. สารเคมีอื่น ๆ ดังภาคผนวก

5. วัสดุอุปกรณ์

1. ใยแก้ว (glass wool)

2. เยื่อเลือกผ่าน (Spectra/Por 1 Dialysis Membrane) ที่มีช่องให้สารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 6,000-8,000 ดาลตันผ่านได้

3.ผ้าขาวบาง

4. Superose 12 Chromatography HR 10/30 (Amersham Biosciences)

5. HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution (Amersham Biosciences)

6. Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filter Devices ขนาด 15 ml สำหรับเก็บสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5,000 และ 10,000 ดาลตัน

7. Centrifuge Tube Oak Ridge FEP (Nalgene)

8. Nylon membrane filter สำหรับกรองสารขนาดเล็กกว่า 0.2 μm (Whatman)

9. อุปกรณ์เครื่องแก้วที่จำเป็นอื่น ๆ

6. เครื่องมือและอุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorious BP 3100 S

2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง AND GR-200

3. เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส Methrom 410 pH meter

4. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Shimadzu UV-1700 Spectrophotometer

5. เครื่องเหวี่ยงแยกอุณหภูมิต่ำ Universal 32R Hettich Zentrifugen

6. เครื่องเหวี่ยงแยกอุณหภูมิต่ำ BHG Hermle ZK 365

7. เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า Corning Stirrer/ Hotplate

8. เครื่องปั่นผสมของเหลว Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc.)

9. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง Heto 2.5 Lyophilizer
10. เครื่องเขย่าในแนวนอน GFL 3005 shaker
11. เครื่องโฮโมจิไนเซอร์ IKA T10 Basic homogenizer workcenter
12. เครื่องดูดสารเคมีอัตโนมัติ BioRad transfer pipette ขนาด 50-200 และ1000 μl
13. เครื่องดูดสารเคมีเข้าคอลัมน์อัตโนมัติ EYELA peristaltic pump
14. เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ Water fraction collector
15. เครื่องระเหยตัวทำละลาย Büchi Rotavapor R-124
16. คอลัมน์ขนาด 0.5 เซนติเมตรx 10 เซนติเมตร BioRad Econo-column chromatography
17. เครื่องหาไขมัน Soxtec System HT 1043 Extraction Unit
18. ชุดย่อยโปรตีน Büchi 435
19. ชุดกลั่นไนโตรเจน Büchi 323
20. ชุดกรองสารละลายที่มีแท่นวางกระดาษกรองเป็นหัวทราย (Sintered glass filter)
21. ชุดอิเล็กโตรโฟริซีส BioRad Mini-Protein®II Electrophoresis Cell
22. ตู้อบไฟฟ้า UNB Memert Oven
23. โถดูดความชื้น Wertheim Desiccator
24. โถปั่น Stainless Waring Commercial Blender
25. ตู้ควบคุมอุณหภูมิ Sanyo Growth Cabinet
26. ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
27. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส
28. ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส
29. อ่างควบคุมอุณหภูมิ Brookfiled TC 200

วิธีการ

ส่วนที่ 1 การสกัดและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1. การสกัดเอนไซม์

สกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิลตามขั้นตอนดังนี้

1.1 นำปลานิล 10 ตัวมาชั่งน้ำหนักทั้งตัว แล้วตัดแยกและชั่งน้ำหนักเครื่องในรวม ลำไส้ ตับ ม้าม และกระเพาะ) ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ บรรจุถุงพลาสติกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส

1.2 สกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิล ได้แก่ อวัยวะภายในรวม ตับ กระเพาะ ม้าม และลำไส้ ดัดแปลงจากวิธีของ Simpson and Haard (1985a) และทำการทดลองภายใต้ภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยผสมตัวอย่างกับสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ในอัตราส่วน 1: 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า กวนเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ และไม่ให้เกิดฟองอากาศ เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 g เป็นเวลา 30 นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใส (crude extract) ออกจากตะกอน (ส่วนที่ไม่ละลาย) แล้วจึงกรองสารละลายส่วนใสผ่านใยแก้วเพื่อดักจับไขมันและสารแขวนลอยที่ติดมากับสารละลาย ตรวจวัดปริมาณโปรตีนดังภาคผนวก ค1 และกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข วิธีการสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิล แสดงดังภาพผนวกที่ 1

2. การเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์

2.1 การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายส่วนใสตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40%, 30-70%, 40-60% และ 60-80% โดยแบ่งเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสองช่วง ดังตารางผนวก 1 ช่วงแรกเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 20, 30, 40 และ 60% กวนเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ และไม่ให้เกิดฟองอากาศ โดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า เป็นเวลานาน 90 นาที จึงนำสารละลายไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 5,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30

นาที เพื่อแยกสารละลายส่วนใส ออกจากตะกอน เติมแอมโมเนียมซัลเฟตช่วงที่ 2 ลงไป 40, 70, 60 และ 80% ลงในสารละลายส่วนใส กวนเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ และไม่ให้เกิดฟองอากาศ เป็นเวลา 90 นาที นำสารละลายไปเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ในปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้หมด (NH_4SO_4 fraction) ตรวจวัดปริมาณโปรตีน ดังภาคผนวก ค1 และกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข

2.2 การทำ Dialysis

นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.1 มากำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตที่ปนอยู่ในสารละลายเอนไซม์ด้วยการทำ Dialyze ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ในอัตราส่วนของสารละลายเอนไซม์ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1 ต่อ 100 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง กวนสารละลายบัฟเฟอร์เบา ๆ อย่างสม่ำเสมอโดยใช้เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้าและเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง นำสารละลายที่ผ่านการ dialyzed (dialysis fraction) ตรวจวัดปริมาณโปรตีน ดังภาคผนวก ค1 และกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข

2.3 การตกตะกอนด้วยอะซิโตน

นำสารละลายจากข้อ 2.2 มาตกตะกอนด้วยอะซิโตนเข้มข้น 95 % ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 3 ชั่วโมง ในอัตราส่วนสารละลายเอนไซม์ต่ออะซิโตน เท่ากับ 1 ต่อ 3 ตั้งสารผสมทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วจึงเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็วรอบ 6,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ ในปริมาตรน้อยที่สุดที่สามารถละลายตะกอนได้หมด นำสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากการตกตะกอนด้วยอะซิโตน (acetone fraction) ตรวจวัดปริมาณโปรตีน ดังภาคผนวก ค1 และกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข วิธีการทำเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิลให้บริสุทธิ์แสดง ดังภาพผนวกที่ 2

2.4 วิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (Affinity chromatography)

การเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์โดยการผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์ Soybean Trypsin Inhibitor Sepharose-4B ขนาด 1 x 10 เซนติเมตร ชะคอลัมน์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ชะด้วยอัตราเร็ว 0.25 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายที่ผ่านจากคอลัมน์หลอดละ 3 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วเก็บสารละลายจากหลอดที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุดจากการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (Tris fraction) ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงต่อไปจนกระทั่งสารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเป็นต่ำสุด และคงที่ จึงเปลี่ยนสารละลายที่ชะคอลัมน์เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เก็บสารละลายที่ผ่านจากคอลัมน์หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยให้สารละลายหยดลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์อยู่ 2 มิลลิลิตรเพื่อให้เอนไซม์อยู่ในสภาวะเป็นกลางตลอดการทดลอง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร แล้วเก็บสารละลายจากหลอดที่มีค่าการดูดกลืนสูงสุดจากการชะด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl fraction) จนกระทั่งสารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเป็นต่ำสุดและคงที่ จึงเปลี่ยนเป็นชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ อีกครั้งประมาณ 100 มิลลิลิตร เพื่อเตรียมคอลัมน์ให้พร้อมสำหรับสารละลายเอนไซม์ตัวอย่างต่อไป จากนั้นนำสารละลายเอนไซม์ (Tris fraction และ HCl fraction) ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข และปริมาณโปรตีนดังภาคผนวก ค1

2.5 วิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี (Gel filtration chromatography)

การเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์โดยการผ่านสารละลายเอนไซม์ที่ได้จากข้อ 2.4 ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นด้วยวิธี ultra filtration เหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 4,000 g 2 ครั้ง ๆ ละ 20 นาที จนได้สารละลายเอนไซม์ที่มีปริมาณโปรตีนเข้มข้น 8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบรรจุสารละลายเอนไซม์ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในคอลัมน์ดังนี้

1) Superose 12 Chromatography HR 10/30 ชะตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยอัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

2) HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution ชะตัวอย่างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ด้วยอัตราเร็ว 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที

แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์ทุก ๆ 3 มิลลิลิตรในหลอดทดลองแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วัดค่าการดูดกลืนแสงจนกระทั่งสารละลายมีค่าการดูดกลืนแสงเป็นต่ำสุดและคงที่ ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข และปริมาณโปรตีน ดังภาคผนวก ค1

3. การวิเคราะห์คุณสมบัติของสารละลายเอนไซม์

3.1 การตรวจวัดสมบัติของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al*. (1961) และ Rungruangsak-Torrisen and Sundby (2000) ดังภาคผนวก ข2

3.2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al.* (1961) ดังภาคผนวก ข1

3.3 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดปริมาณโปรตีน ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry *et al*. (1951) และ Peterson (1977) โดยใช้โบไวน์เซรัมอัลบูมินเป็นสารมาตรฐาน (Heu *et al.*, 1995) ภาคผนวก ค1

3.4 การตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุล และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่าง

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุล และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างด้วยเจลอิเล็กโตรโฟริซีส (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) ดังภาคผนวก ค2

4. ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์

ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ของสารละลายเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่สกัดได้ดังนี้

4.1 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Hjelmeland and Raa, 1982; Simpson and Haard, 1985a; Amiza *et al*., 1997)

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0และ 11.0 ที่อุณหภูมิห้อง

4.2 ผลของ pH ที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ (Hjelmeland and Raa, 1982; Simpson and Haard, 1985a; Amiza *et al.*, 1997)

บ่มสารละลายเอนไซม์ 200 ไมโครลิตรในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 2.0, 4.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข

4.3 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (Hjelmeland and Raa, 1982; Simpson and Haard, 1985a; Amiza *et al*., 1997)

วัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ทริส pH 8.2 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์อยู่ 0.02 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส

4.4 ผลของอุณหภูมิ ที่มีต่อความคงตัวของเอนไซม์ (Hjelmeland and Raa, 1982; Simpson and Haard, 1985 a; Amiza *et al.*, 1997)

บ่มสารละลายเอนไซม์ 200 ไมโครลิตรในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาแช่ในน้ำแข็งทันทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงวัดกิจกรรมของเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข ในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส pH 8.2 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์อยู่ 0.02 โมลาร์

5. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

ตรวจวัดกิจกรรมเอนไซม์ ดังภาคผนวก ข หลังจากบ่มสารผสมของสารละลายเอนไซม์ 200 ไมโครลิตรกับสารละลายยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 200 ไมโครลิตรไว้ในอ่างน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริสซับสเตรท (pH 8.2) คือ BAPNA สำหรับเอนไซม์ทริปซิน หรือ SAAPPNA สำหรับเอนไซม์ไคโมทริปซิน

สารละลายยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้

5.1 สารละลายฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) เข้มข้น 0, 0.0001, 0.001, 0.01 และ 0.1 โมลาร์

5.2 สารละลายอะโพรทินิน (Aprotinin) เข้มข้น 0, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 และ 10 %

5.3 สารละลายยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง (Soybean Trypsin Inhibitor) เข้มข้น 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.4 สารละลายโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน (N∝-*p*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK) เข้มข้น 0, 0.001, 0.005, 0.01, 0.05 และ 0.1 โมลาร์

5.5 สารละลายโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, TPCK) เข้มข้น 0, 0.0001, 0.0005, 0.001 และ 0.005 โมลาร์

ส่วนที่ 2 การสกัดแคโรทีโนโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ของปลานิล

1. การตรวจวัดปริมาณองค์ประกอบทางเคมี

ตรวจวัดปริมาณองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ของตัวอย่างหัวกุ้งก้ามกรามที่บดละเอียด ตามวิธีมาตรฐานของ MFRD (1987) และ AOAC (2000) ดังภาคผนวก ง

2. การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้ง

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้ง ดัดแปลงมาจากวิธีของ Simpson and Haard (1985b) และ Chakrabarti (2002a)

เติมสารละลายไดโซเดียมอีดีทีเอ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 8.0 ที่แช่เย็น ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างหัวกุ้งบด 25 กรัม และเอนไซม์ทริปซินจากวัวและปลานิลที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน 2 หน่วย/มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องโฮโมจิไนเซอร์ที่ความเร็วระดับ 4 เป็นเวลา 2 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงเขย่าสารละลายตัวอย่างด้วยความเร็ว 200 รอบ/ นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างหลังจากเขย่าทุก ๆ 0, 3, 6, 15 และ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนตามวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Saito and Regier (1971) และ Sachindra *et al.* (2006a) และตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ได้จากส่วนของแคโรทีโนโปรตีน และส่วนที่เป็นของแข็ง (ส่วนที่เหลืออยู่บนผ้าขาวบาง) ตามวิธีของ MFRD (1987) ดังภาคผนวก ง

จัดชุดการทดลองแบบแฟคทอเรียล และวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และความแตกต่างโดย Duncan multiple range test คัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแคโรทีโนโปรตีน โดยพิจารณาจากชุดการทดลองที่มีปริมาณแคโรทีนอยด์มากที่สุด

ศึกษาองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างแคโรทีโนโปรตีนที่สกัดจากเปลือกกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้สารละลายผสม เบนซีน : ปิโตรเลียมอีเทอร์ : อะซีโตน ในอัตราส่วน 10: 3: 2 เป็นตัวชะ ตามวิธีของ Simpson and Haard (1985b)

ผล และวิจารณ์

ส่วนที่ 1 การสกัดและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

1. การสกัดเอนไซม์

1.1 น้ำหนักปลานิล

จากการชั่งน้ำหนักปลาจำนวน 10 ตัว พบว่าน้ำหนักปลาทั้งตัวอยู่ในระหว่าง 282-338 กรัม มีน้ำหนักเฉลี่ย 307.60±19.43 กรัม มีน้ำหนักอวัยวะภายในรวมเฉลี่ย 18.65±1.75 กรัม (6.06% ของน้ำหนักปลาทั้งตัว) โดยแบ่งเป็น กระเพาะ 2.50±0.71 กรัม ตับ 4.27±1.25 กรัม ม้าม 0.24±013 กรัม และลำไส้ 7.65±1.53 กรัม คิดเป็น 0.81% 1.39% 0.08% และ2.49% ของน้ำหนักปลาทั้งตัว ตามลำดับ ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 น้ำหนักและอวัยวะภายในของปลานิล

ลำดับ	น้ำหนัก (กรัม)					
	ปลาทั้งตัว	อวัยวะภายในรวม	กระเพาะ	ตับ	ม้าม	ลำไส้
1	300	17.23	4.71	4.79	0.45	7.02
2	298	20.65	4.76	3.91	0.18	8.81
3	340	18.11	2.15	3.50	0.20	7.24
4	282	17.07	1.64	4.62	0.19	8.20
5	320	22.42	1.50	5.84	0.21	9.00
6	298	17.53	3.04	4.15	0.10	9.50
7	300	18.14	2.00	3.83	0.07	9.30
8	338	18.00	1.63	4.63	0.30	5.86
9	310	19.81	1.91	3.76	0.48	6.44
10	290	17.49	1.70	3.70	0.22	5.17
เฉลี่ย	307.60±19.43	18.65±1.75	2.50±0.71	4.27±1.25	0.24±013	7.65±1.53
%	100.00	6.06	0.81	1.39	0.08	2.49

1.2 การสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิล

การสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิลแบ่งเป็น 5 ส่วน ได้แก่ อวัยวะภายในรวม ตับ กระเพาะ ม้าม และลำไส้ ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ พบว่า ม้าม มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุด (1.68 หน่วยต่อมิลลิลิตร) รองมาคือ ลำไส้ ตับ อวัยวะภายในรวม และกระเพาะ ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินมีสูงที่สุดในลำไส้ (0.17 หน่วยต่อมิลลิลิตร) รองมาคือ ม้าม อวัยวะภายในรวม ตับ และกระเพาะ ตามลำดับ ดังตารางที่ 10 จากการทดลองได้ผลใกล้เคียงกับการสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลาทูน่าครีบเหลือง *Thunnus albacares* (Jantaro, 2000) ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินสูงสุดในม้าม รองมาคือ อวัยวะภายในรวม ลำไส้ กระเพาะ ตับ และตับอ่อน ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซิน มีกิจกรรมของสูงสุดที่ ตับอ่อน ม้าม กระเพาะ อวัยวะภายในรวม ตับ และลำไส้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่มีรายงานว่าสามารถสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินได้จากอวัยวะภายในและท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) ของปลา anchovy (Heu *et al*., 1995; Matinez and Serra, 1989) กล้ามเนื้อหู รูดกระเพาะอาหารของปลา Greenland Cod (Simpson and Haard, 1984) ปลา Atlantic cod (Simpson and Haard, 1990) ปลาซาร์ดีน (Castillo-Yáñez *et al*., 2005) และปลา tambaqui ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดในลุ่มแม่น้ำอะเมซอล (Bezerra *et al*., 2001) ม้ามของปลาทูน่า (Klomklao *et al*., 2004)

ตารางที่ 10 การสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในของปลานิล

อวัยวะภายใน	เอนไซม์ทริปซิน				เอนไซม์ไคโมทริปซิน			
	กิจกรรม (U/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (U/mg protein)	กิจกรรม/นน.อวัยวะ (U/g)	กิจกรรม/นน.ปลา (U/g)	กิจกรรม (U/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (U/mg protein)	กิจกรรม/นน.อวัยวะ (U/g)	กิจกรรม/นน.ปลา (U/g)
กระเพาะ	0.03	0.01	0.004	0.06	0.07	0.01	0.006	0.0001
ตับ	0.58	0.08	0.004	0.98	0.07	0.01	0.007	0.0020
ม้าม	1.68	0.19	0.202	0.27	0.15	0.01	0.170	0.0010
ลำไส้	0.77	0.17	0.006	7.76	0.17	0.03	0.007	0.1070
อวัยวะรวม	0.14	0.03	0.015	2.28	0.15	0.03	0.015	0.0110

และตับอ่อนของปลา cunner (Simpson and Haard, 1985a) และปลา carp (Cohen *et al*., 1981) เนื่องจากลำไส้เป็นอวัยวะที่มีปริมาณมากที่สุด และมีกิจกรรมจำเพาะสูง ดังนั้นลำไส้จึงเป็นอวัยวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์

2. การเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์

เนื่องจากตัวอย่างมีปริมาณโปรตีนสูงจึงทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าไม่สูงนัก ดังนั้นเพื่อให้เอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงขึ้น จึงต้องมีการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์ โดยการกำจัดโปรตีนส่วนเกินและสิ่งปนเปื้อนอื่นออกไป ดังขั้นตอนต่อไปนี้

2.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนเอนไซม์ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ช่วงความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 20-40%, 30-70%, 40-60% และ 60-80% ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เพิ่มขึ้น ดังตารางที่ 11 พบว่า การตกตะกอนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 30-70 % ให้เอนไซม์ที่มีค่าของกิจกรรม และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินสูงที่สุด (0.94 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 0.113 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) โดยที่ระดับความเข้มข้น 30-70 % ให้เอนไซม์ที่มีค่าของกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินใกล้เคียงกับที่ระดับความเข้มข้น 40-60 % แต่มีปริมาณโปรตีนต่ำกว่า จึงทำให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงกว่า ซึ่งเป็น

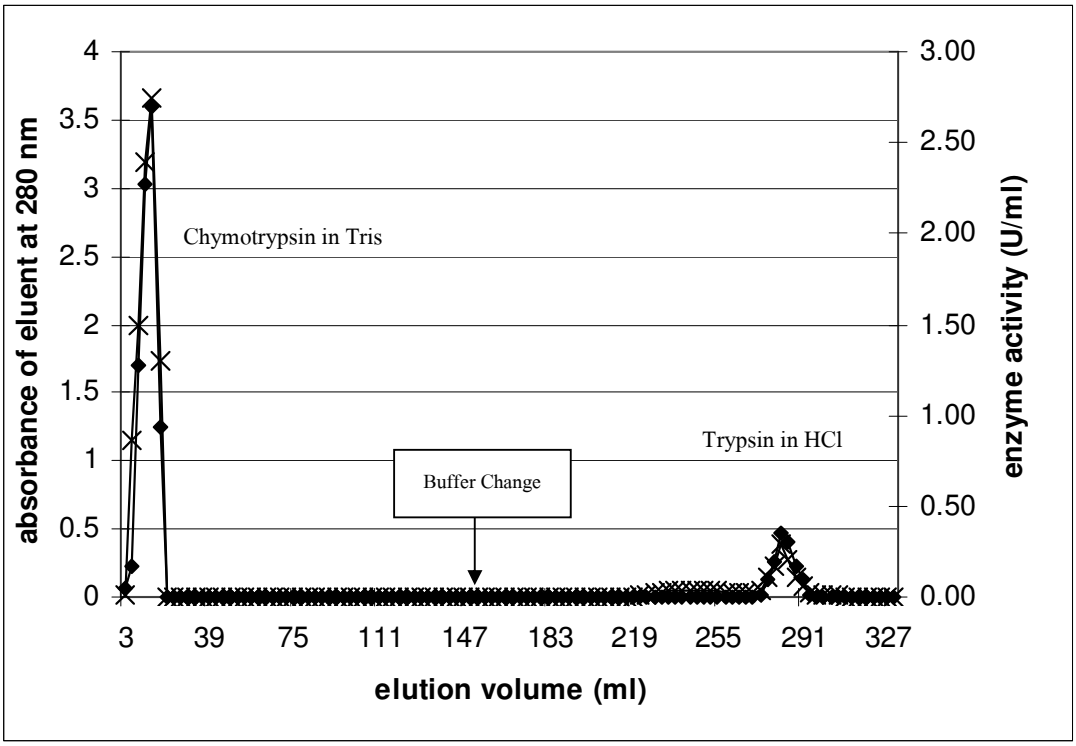
ตารางที่ 11 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต	ปริมาณโปรตีน	กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซิน
	(mg/ml)	(units/ml)	(units/mg protein)
20-40%	5.08	0.32	0.063
30-70%	8.32	0.94	0.113
40-60%	9.90	0.97	0.098
60-80%	4.58	0.27	0.059

สภาวะเดียวกับการสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากอวัยวะภายในของปลา anchovy (Heu *et al*., 1995) โดยตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความเข้มข้น 30-70 % แล้วให้กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด

2.2 วิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

จากนั้นการเพิ่มความบริสุทธิ์ให้เอนไซม์โดยการผ่านวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี เพื่อแยกกลุ่มเอนไซม์ทริปซินออกจากกลุ่มเอนไซม์ไคโมทริปซิน ได้ผล ดังภาพที่ 5 เมื่อวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (pH7.0) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ แคลเซียมคลอไรด์ 0.02 โมลาร์ที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี พบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์และค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้น และสูงสุดที่ 13 – 15 มิลลิลิตร



ภาพที่ 5 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร(◆—◆) และค่ากิจกรรม (×—×) ของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสารละลายบัฟเฟอร์ทริส และเอนไซม์ทริปซินในสารละลายไฮโดรคลอริกที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

จากนั้นจึงลดลงจนกระทั่งสารละลายมีกิจกรรมของเอนไซม์และค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำจนเท่ากับหรือใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น จึงเปลี่ยนสารละลายที่ชะคอลัมน์เป็นสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์แล้ววัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินจากสารละลายกรดไฮโดรคลอริกที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีพบว่าให้ผลที่สอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร โดยกิจกรรมของเอนไซม์และค่าการดูดกลืนแสงจะสูงขึ้น และสูงสุดที่ 280 – 282 มิลลิลิตร จากนั้นจึงลดลงจนกระทั่งสารละลายมีกิจกรรมของเอนไซม์และค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำจนเท่ากับหรือใกล้เคียงกับตอนเริ่มต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าในแต่ละขั้นตอนของการทำให้บริสุทธิ์ ดังตารางที่ 12 มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคโมทริปซินและเอนไซม์ทริปซินสูงขึ้น แสดงว่าในแต่ละขั้นตอนสามารถทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้น โดยเอนไซม์ไคโมทริปซินในสารละลายที่ผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีจากการชะด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ทริส (Tris fraction) ที่มีกิจกรรมจำเพาะ 0.380 unit/mg protein ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 3.62 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น (crude extract)

ตารางที่ 12 ขั้นตอนในการทำให้เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากลำไส้ปลานิลบริสุทธิ์

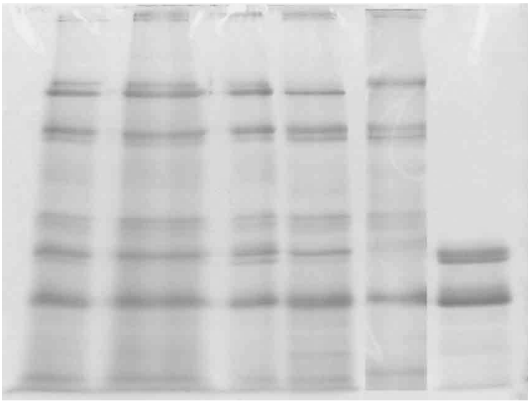
ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	โปรตีนทั้งหมด (mg/ml)	เอนไซม์ทริปซิน				เอนไซม์ไคโมทริปซิน			
		กิจกรรม (U/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (U/mg protein)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)	กิจกรรม (unit/ml)	กิจกรรมจำเพาะ (U/mg protein)	ผลผลิต (%)	ความบริสุทธิ์ (เท่า)
Crude extract	6.66	0.63	0.095	100.00	1.00	0.70	0.105	100.00	1.00
$(NH_4)_2SO_4$ fraction	6.22	0.60	0.096	95.24	1.02	0.67	0.108	95.71	1.03
Dialysis	5.51	0.58	0.105	92.06	1.11	0.60	0.109	85.71	1.04
Acetone fraction	4.77	0.54	0.113	85.71	1.19	0.53	0.111	75.71	1.06
Tris fraction	1.06	-	-	-	-	0.41	0.380	58.57	3.62
HCl fraction	0.21	0.111	0.529	17.62	5.56	-	-	-	-

หมายเหตุ ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ทริปซินใน Tris fraction

ไม่พบกิจกรรมเอนไซม์ไคทริปซินใน HCl fraction

ในขณะที่เอนไซม์ทริปซินในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl fraction) ที่มีกิจกรรมจำเพาะ 0.529 unit/mg protein ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 5.56 เท่าของสารละลายเอนไซม์เริ่มต้น (crude extract) แสดงว่าวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี เหมาะสมกับการใช้งาน โดยสามารถแยกเอนไซม์ไคโมทริปซินและเอนไซม์ทริปซินออกจากกันได้

จากนั้นได้นำสารละลายเอนไซม์ในแต่ละขั้นตอนของการสกัด ดังตารางที่ 12 มาเปรียบเทียบความบริสุทธิ์โดยการทำ SDS-PAGE ดังภาพที่ 6 พบว่าจำนวนแถบโปรตีนของขั้นตอนก่อนการผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีนั้นไม่แตกต่างกัน คือมีแถบโปรตีนจำนวนมากและเป็นแถบยาวไม่แยกออกจากกัน แต่เมื่อผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีแล้วสารละลายเอนไซม์ทริปซินจะมีจำนวนแถบโปรตีนน้อยลง แสดงว่าการผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีจะช่วยทำให้สารละลายทริปซินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น



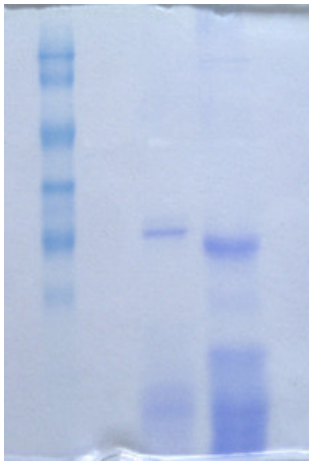
S1 P3 S4 P4 S5 S7

ภาพที่ 6 แถบโปรตีนเปรียบเทียบขั้นตอนในการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์

Lane 1: S1 (crude extract), 2: P3 ($(NH_4)_2SO_4$ fraction), 3: S4 (dialysis fraction), 4:P4 (acetone fraction), 5: S5 (Tris fraction), 6: S7 (HCl fraction)

เมื่อเปรียบเทียบความบริสุทธิ์ของสารละลายเอนไซม์ที่ชะด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (S7) กับเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากตับอ่อนของโคที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (BDH; 39041CU) ที่ระดับความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย SDS-PAGE พบว่าตัวอย่างทั้งสองมีแถบสีมากกว่า 2 แถบเช่นเดียวกัน ดังภาพที่ 7 แสดงว่าการผ่านคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีนั้นทำให้เอนไซม์บริสุทธิ์บางส่วนเท่านั้น

ถ้าต้องการให้เอนไซม์บริสุทธิ์มากขึ้นจะต้องผ่านขั้นตอนอื่น ๆ ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Heu *et al.* (1995) และ Bezerra *et al.* (2004) ที่ทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในการกำจัดโปรตีนส่วนเกิน ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำ Dialysis และการผ่านเอนไซม์ในคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี แต่เอนไซม์ก็ยังบริสุทธิ์เป็นบางส่วน จึงต้องผ่านเอนไซม์ในคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี อีกครั้งหนึ่ง เพื่อทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มากขึ้น



BM BT TT

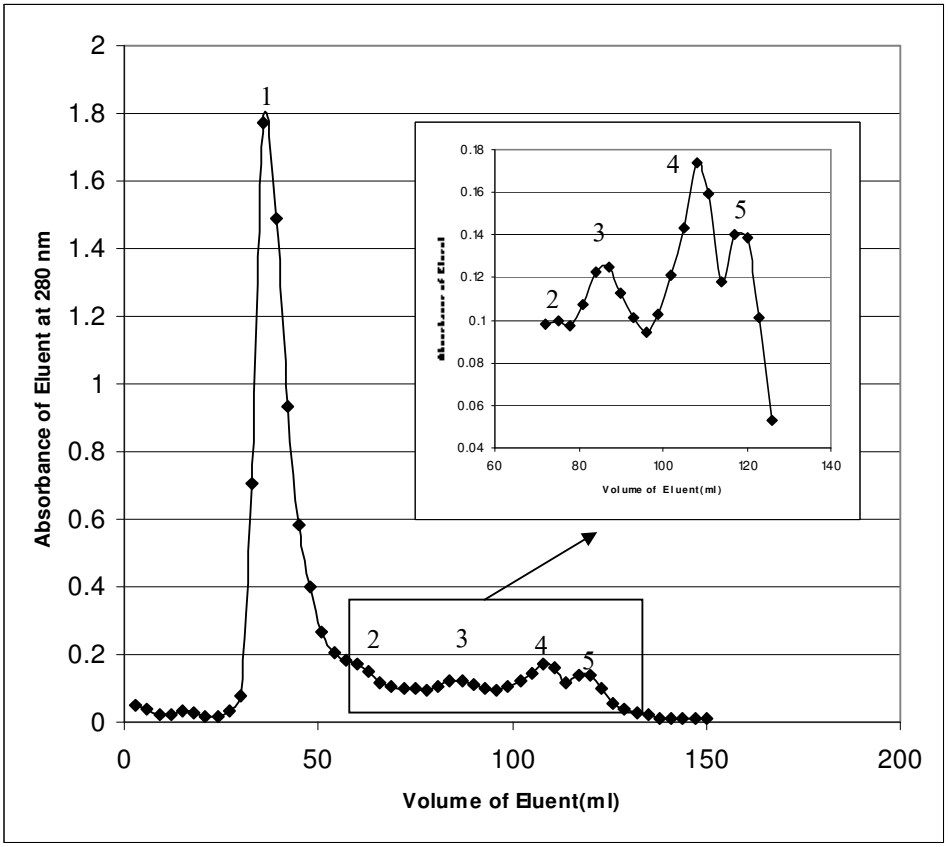
ภาพที่ 7 แถบโปรตีนของสารมาตรฐานโปรตีน (BM) เปรียบเทียบกับเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากตับอ่อนของโค (BT) และเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากลำไส้ของปลานิล (TT)

2.3 วิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี

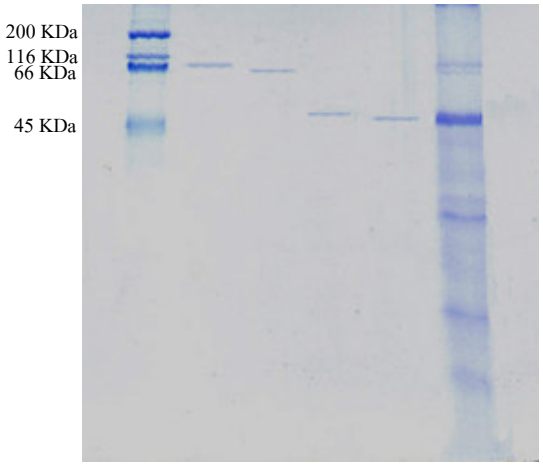
2.3.1 เอนไซม์ไคโมทริปซิน

นำสารละลายของเอนไซม์ไคโมริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีมาผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี Sephacryl S-100 High Resolution แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น 5 จุด (peak) ดังภาพที่ 8 จึงนำสารละลายของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีมาทำให้เข้มข้น 10 เท่าแล้วทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซิน พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซิน 4 จุด จาก 5 จุด คือ S511 (จุดที่2), S512 (จุดที่3), S521 (จุดที่4) และ S522 (จุดที่5) โดย S521 มีความเข้มข้นสูงที่สุด ต่อจากนั้นจึงนำเอนไซม์ทั้ง 4 จุดไป

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส (SDS-PAGE) พบว่าได้แถบโปรตีนเดี่ยวทั้งหมด โดย S511, S512, S521 และ S522 ที่มีแถบโปรตีนอยู่ในระดับใกล้เคียงกันกับน้ำหนักโมเลกุล 88,800 ดาลตัน 77,600 ดาลตัน 51,800 ดาลตัน และ 45,300 ดาลตัน ตามลำดับ (ภาพที่ 9) ซึ่งขัดแย้งกับน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสัตว์น้ำที่มีอยู่ระหว่าง 22,000 – 30,000 ดาลตัน (Shahidi and Kamil, 2001a) แต่เอนไซม์นี้ตอบสนองต่อสารซับเสตรทของเอนไซม์ไคโมทริปซิน จึงจัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin-like)



ภาพที่ 8 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution



ภาพที่ 9 แถบโปรตีนของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution

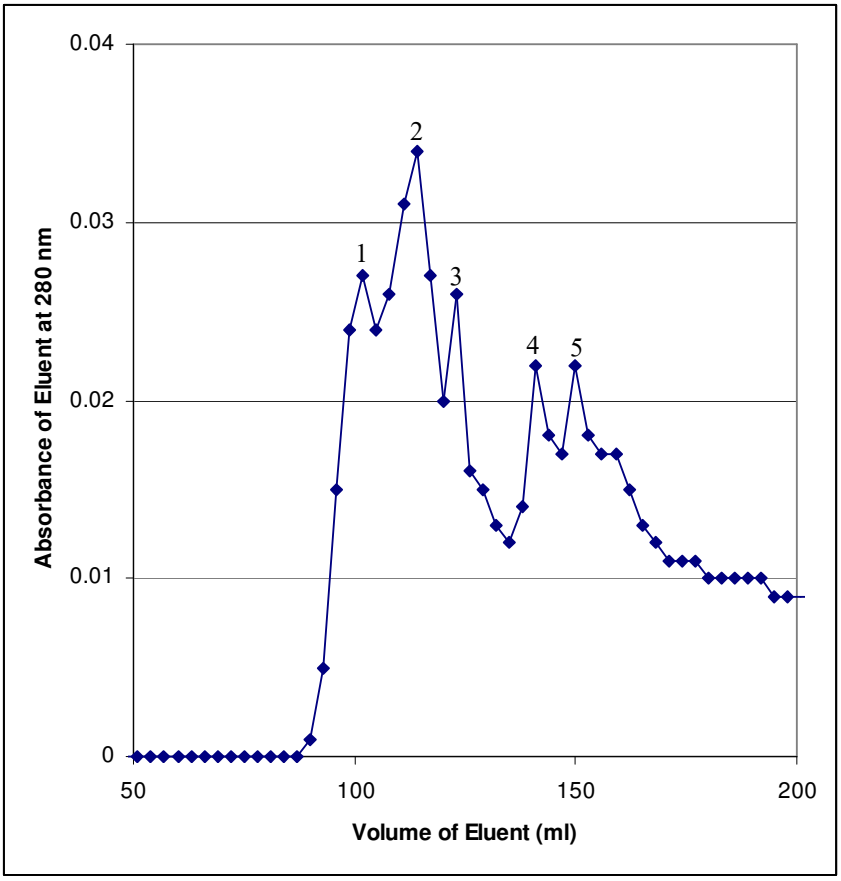
Lane 1: Protein marker

Lane 2 - 5: เอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ S511, S512, S521, S522

Lane 6: เอนไซม์ไคโมทริปซินจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (TC)

2.3.2 เอนไซม์ทริปซิน

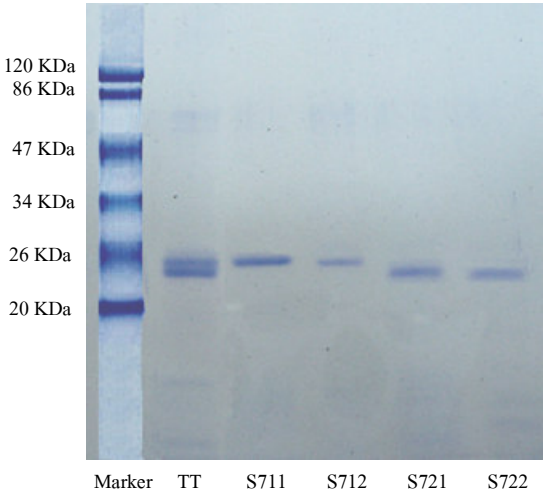
เมื่อนำสารละลายของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีมาผ่านลงในคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution แล้วเก็บสารละลายที่ผ่านออกจากคอลัมน์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงที่โดดเด่น 5 จุด (peak) ดังภาพที่ 10 จึงนำสารละลายของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี มาทำให้เข้มข้น 10 เท่าแล้วทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน พบว่า มีกิจกรรมเอนไซม์ทริปซิน 4 จุด จาก 5 จุด คือ S711 (จุดที่ 2), S712 (จุดที่ 3), S721 (จุดที่ 4) และ S722 (จุดที่ 5) โดย S711 มีความเข้มข้นสูงที่สุด ต่อจากนั้นจึงนำเอนไซม์ทั้ง 4 จุดไปตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าได้แถบโปรตีนเดี่ยวทั้งหมด โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 คือ S711 และ S712 ให้แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26,000 ดาลตัน ส่วนกลุ่มที่ 2 คือ S721 และ S722 ให้แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24,700 ดาลตัน (ภาพที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานเอนไซม์ทริปซินในสัตว์น้ำ ได้แก่ ปลา carp (Cohen *et al*., 1981) ปลา capelin (Hjelmeland and Raa, 1982) และปลาทูนาครีบเหลือง (Jantaro, 2000) และตรงกับคำกล่าวของ Shahidi and Kamil (2001a) ที่ว่าเอนไซม์ทริปซินของสัตว์น้ำมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 22,000 – 30,000 ดาลตัน



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 nm กับปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่ถูกชะ ออกมาจากคอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution

ในการทำเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลให้บริสุทธิ์เบื้องต้นได้ทดลองใช้คอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี 3 ชนิด คือ คอลัมน์ Sephadex G-75, คอลัมน์ Superose 12 และคอลัมน์ Sephacryl S-100 High Resolution ซึ่งพบว่า คอลัมน์ Sephacryl S-100 สามารถทำให้เอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์ได้แถบโปรตีนเดี่ยว 4 แถบ ส่วนคอลัมน์ Sephadex G-75จะให้แถบโปรตีน 2 แถบใหญ่อยู่ด้วยกันในจุด (peak) เดียว ซึ่งต่างจากการทดลองของ Bezerra *et al.* (2004) ที่ได้สกัดเอนไซม์ทริปซินจากปลานิล *O. niloticus* ของประเทศบราซิลและทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี Sephadex G-75 แล้วสามารถแยกแถบโปรตีนเดี่ยวของเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 23,500 ดาลตัน ในขณะที่คอลัมน์ Superose 12 แยกได้ 2 จุด และในแต่ละจุดจะให้แถบโปรตีน 2 แถบ แสดงว่า คอลัมน์เจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution มีความเหมาะสมในการทำเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลใน

ประเทศไทยให้บริสุทธิ์ และยังพบว่าเอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยและบราซิลนั้นมีความซับซ้อนของโปรตีนต่างกัน คือเอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่เลี้ยงในประเทศไทยมีเอนไซม์ทริปซินทำงานร่วมกัน 4 ชนิด (พิจารณาจากแถบโปรตีน) ในขณะที่เอนไซม์ทริปซินของปลานิลที่เลี้ยงในบราซิลนั้นทำงานเพียงชนิดเดียว (พิจารณาจากแถบโปรตีน) ความแตกต่างดังกล่าวนั้น อาจเกิดจากอิทธิพลของสภาพภูมิอากาศและภูมิประเทศ ตลอดจนอาหาร การอนุบาลและเลี้ยงดูที่แตกต่างกัน (Shahidi and Kamil, 2001a) และสายพันธุ์ปลาที่เลี้ยงต่างกัน เนื่องจากปลานิลนำมาใช้ในการทดลองเป็นปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา ซึ่งกรมประมงพัฒนาและปรับปรุงสายพันธุ์ให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย และส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงในประเทศไทย (ยุพินท์ และ พันธ์ศักดิ์, 2545)



ภาพที่ 11 แถบโปรตีนของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution

Lane 1: Protein marker

Lane 2: เอนไซม์ทริปซินจากคอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี (TT)

Lane 3 – 6 : เอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ S711, S712, S721,S722

3. ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์

นำสารละลายของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซิน ที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์มาศึกษาความคงตัวและสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ ดังนี้

3.1 การทดสอบ pH และอุณหภูมิที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

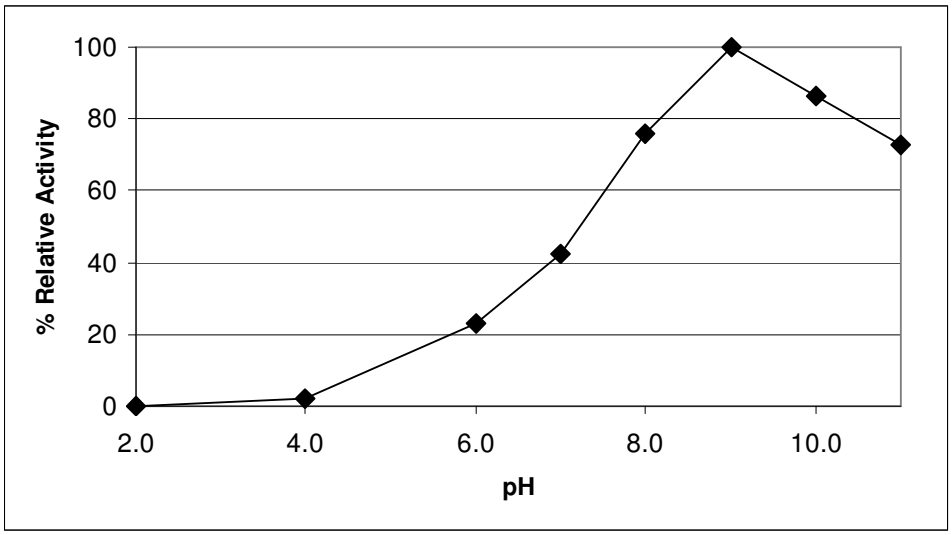
3.1.1 การทดสอบ pH ที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

เอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีนั้นจะไม่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 2.0) แต่จะทำงานได้ดีขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น pH ที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินอยู่ที่ pH 9.0 ดังภาพที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลา anchovy *Engraulis japonica* (Heu *et al.*, 1995) ที่ทำงานได้ดีที่สภาวะที่มี pH เป็นเบส และทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 9.0 ในขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลือง (Jantaro, 2000) ทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 8.0 และมีประสิทธิภาพการทำงานลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสมากขึ้นจนไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ pH 11.0 นอกจากนี้เอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลืองยังสามารถทำงานในสภาวะที่เป็นกรดสูงได้ดีกว่าเบสสูง

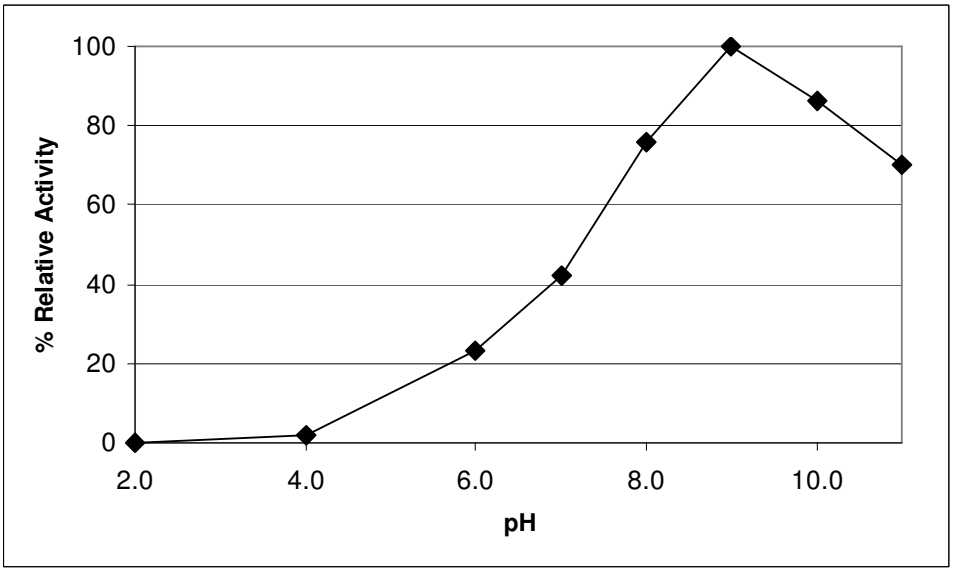
เอนไซม์ไคโมทริปซินนี้มีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นเบส (pH 8.0-11.0) ได้ดี โดยจะทนต่อสภาวะที่มี pH 9.0 ได้ดีที่สุด แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 2.0) ความสามารถในการทนต่อค่า pH จะเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่มีค่า pH สูงขึ้น ดังภาพที่ 13 ซึ่งแตกต่างจากเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลือง (Jantaro, 2000) ซึ่งคงทนในสภาวะที่มี pH 8.0 ได้ดีที่สุด และลดความคงทนลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสมากขึ้นจนไม่คงทนที่ pH 11.0 นอกจากนี้เอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลืองยังสามารถทนอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดสูงได้ดีกว่าเบสสูง

เอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521 และ S522 จากขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีจะไม่ทำงานที่สภาวะที่เป็นกรด (pH 4.0) แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น ในสภาวะที่มีค่า pH ต่าง ๆ พบว่า S511 และ S512 ทำงานได้ดีกว่า S521 และ S522 โดยเอนไซม์ไคโมทริปซินทั้งหมดจะทำงานได้ดีที่สุดที่สภาวะที่มี pH 9.0 แต่ S511 และ S512 จะมีช่วงทำงานได้ดีในสภาวะที่มี pH 8.0-9.0 ดังภาพที่ 14

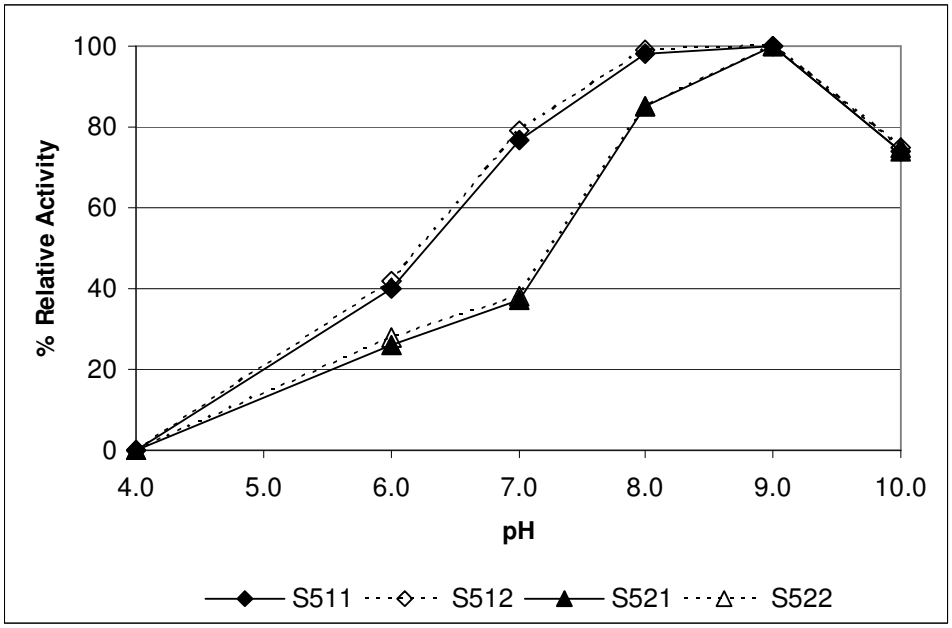
เอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521 และ S522 ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นเบสได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 4.0) ดังภาพที่ 15 ความสามารถในการทนต่อสภาวะที่มีค่า pH ต่าง ๆ ของเอนไซม์ไคโมทริปซินทั้งสี่ไม่ต่างกัน คือมีความสามารถในการทนต่อค่า pH ที่สูงขึ้นได้ดี



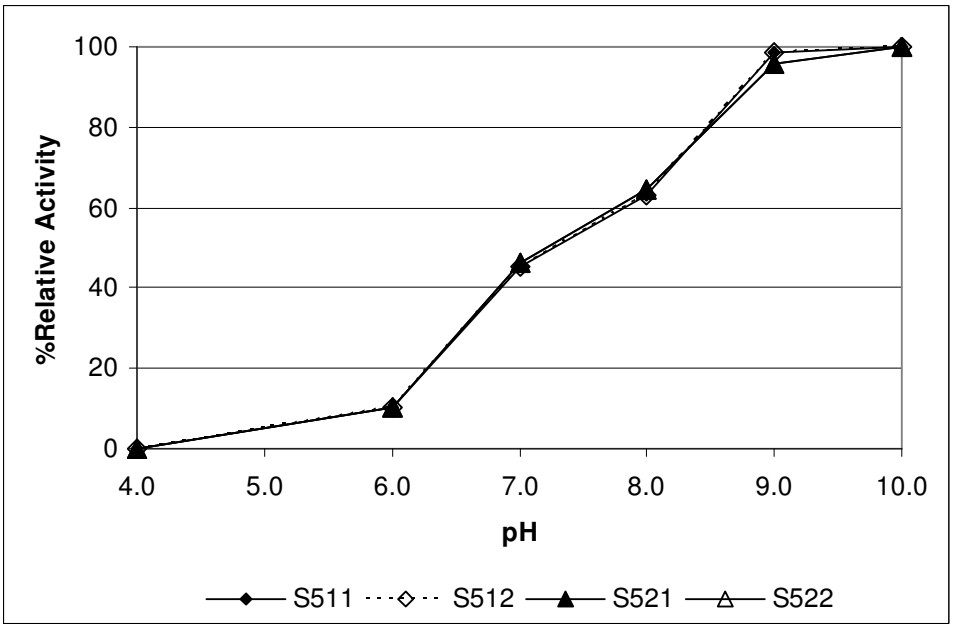
ภาพที่ 12 กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 13 ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ (S511, S512, S521 และ S522) ในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 15 ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ (S511, S512, S521 และ S522) ในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ

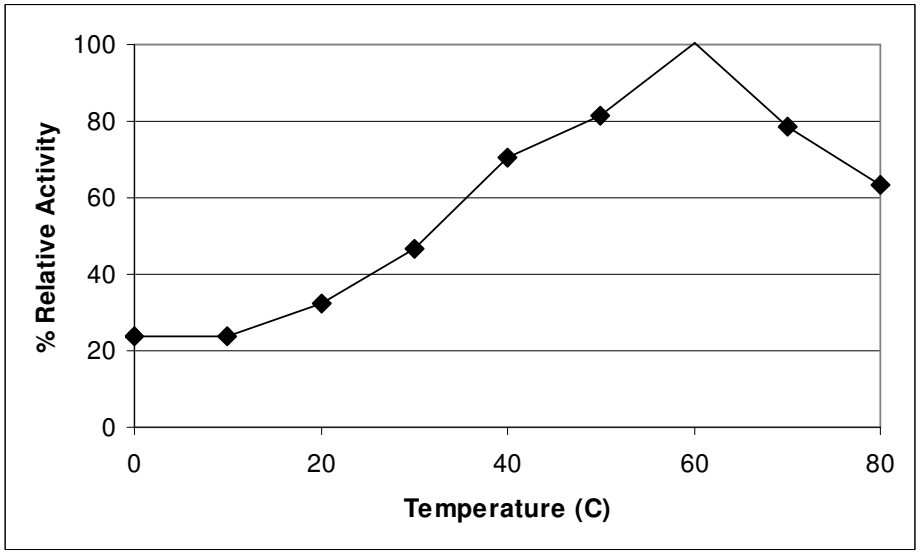
จากการศึกษาสภาวะในการทำงานและความคงทนต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี และขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีนั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ เอนไซม์จะไม่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น และเอนไซม์นี้ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นเบสได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลา anchovy *E. japonica* (Heu *et al.*, 1995) แต่ต่างจากเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลือง (Jantaro, 2000) ตรงที่เอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูนาครีบเหลืองจะทำงานในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าสภาวะที่เป็นเบส

3.1.2 การทดสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

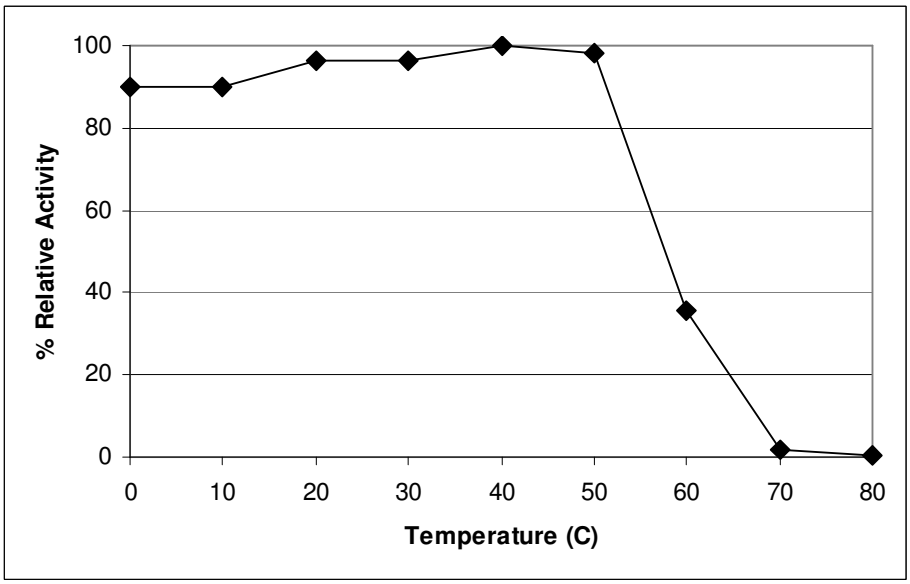
เอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีนั้นจะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์มากที่สุด ดังภาพที่ 16 ซึ่งสอดคล้องกับการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลือง (Jantaro, 2000) ที่ทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ถึงแม้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์มากที่สุดเป็น 50 องศาเซลเซียส แต่ที่ 60 องศาเซลเซียส ก็ยังทำงานได้ดี ในขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินของปลา anchovy *E. japonica* (Heu *et al.*, 1995) ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และทำงานได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นและหยุดการทำงานที่ 70 องศาเซลเซียส

เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลานิลนี้มีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 0-50 องศาเซลเซียสได้ดี แต่จะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส และหยุดทำงานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 70 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ดังภาพที่ 17 ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลา anchovy *E. japonica* (Heu *et al.*, 1995) และเอนไซม์ไคโมทริปซินของปลาทูน่าครีบเหลือง (Jantaro, 2000) ที่เอนไซม์ไม่สามารถทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ขึ้นไป

เอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 นั้นจะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น S511 และ S512 จะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 20-50 องศาเซลเซียส ส่วน S521 และ S522 จะทำงานได้ไม่ค่อยดีที่อุณหภูมิต่ำ (0-20 องศาเซลเซียส) แต่จะทำงานได้ดีเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้นจนมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 18

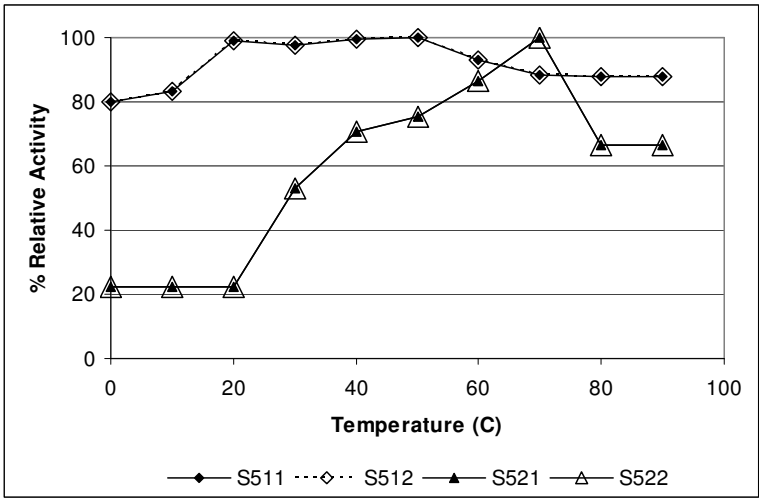


ภาพที่ 16 กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ

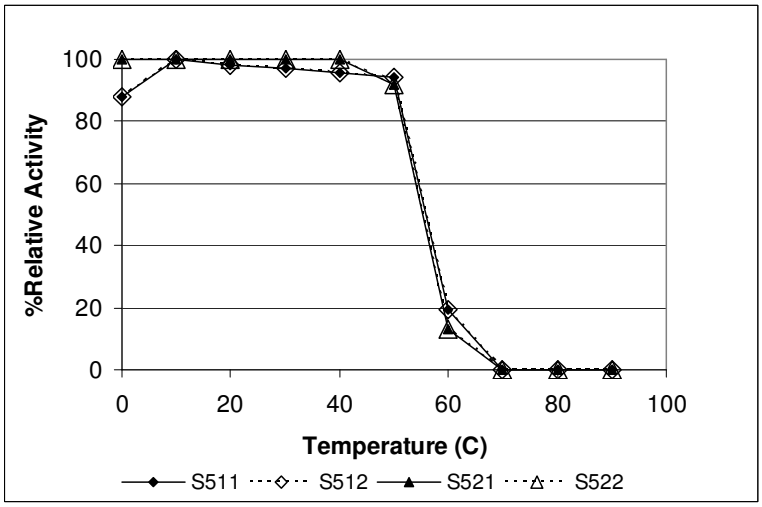


ภาพที่ 17 ความคงทนของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ

เอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิ 0 -50 องศาเซลเซียส และไม่คงทนต่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ดังภาพที่ 19 สอดคล้องกับเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997)



ภาพที่ 18 กิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ (S511, S512, S521 และ S522) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 19 กราฟความคงทนเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ (S511, S512, S521 และ S522) ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

จากการศึกษาสภาวะในการทำงานและความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ ของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี และเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีนั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือ เอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น แต่จะมีความคงทนอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 0 -50 องศาเซลเซียส และไม่คงทนต่ออุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ขึ้นไป

3.2 การทดสอบ pH และอุณหภูมิที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ทริปซิน

3.2.1 การทดสอบ pH ที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ทริปซิน

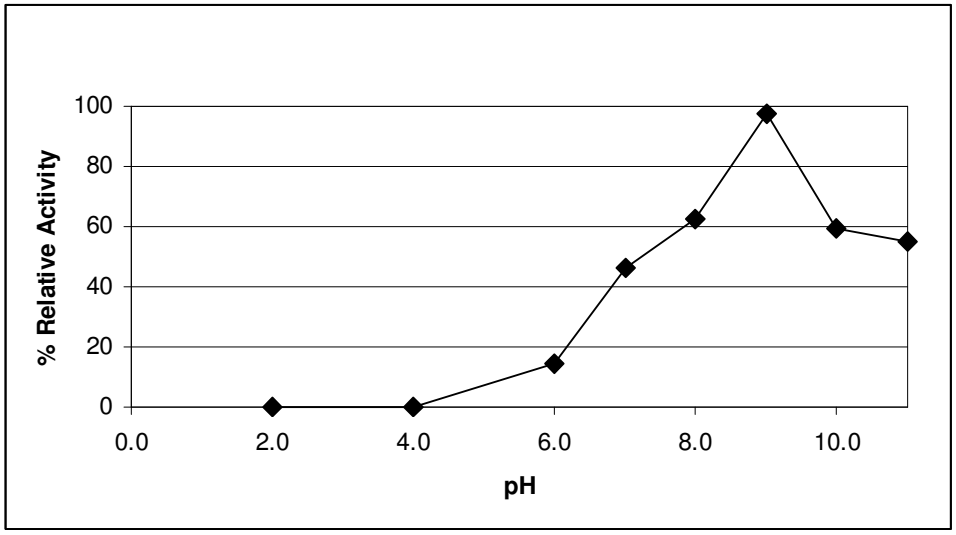
สารละลายของเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี นั้นจะไม่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด (pH 2.0 และ 4.0) แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น (pH 7.0-11.0) และดีที่สุดที่ pH 9.0 ดังภาพที่ 20 ซึ่งสอดคล้องกับเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997) ที่จะทำงานได้ดีที่สุดที่ pH 9.0 แต่เมื่อ pH สูงขึ้นประสิทธิภาพในการทำงานจะลดลง

สารละลายของเอนไซม์ทริปซินนี้ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกลางจนถึงเบส (pH 7.0-10.0) ได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 2.0 และ 4.0) ดังภาพที่ 21 สอดคล้องกับเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997)

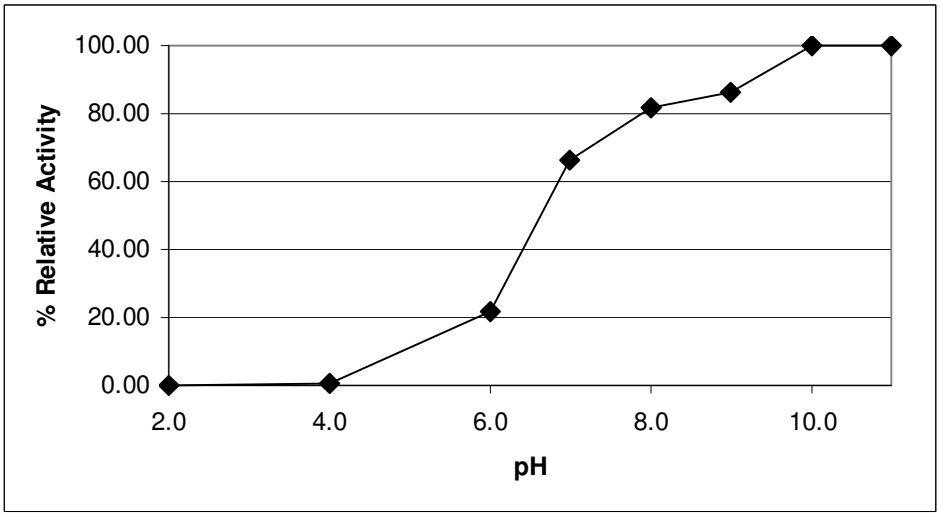
เอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 ที่ได้จากขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี พบว่า เอนไซม์ทริปซินทั้งหมดจะไม่ทำงานที่ pH ต่ำกว่า 4.0 แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น (pH 7.0-11.0) ดังภาพที่ 22 ซึ่งสอดคล้องกับคุณสมบัติของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศบราซิล (Bezerra *et al.*, 2004) ที่เอนไซม์ทำงานได้ดีที่ pH 7.0-10.0

เอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกลางจนถึงเบส (pH 7.0-11.0) ได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 4.0) ดังภาพที่ 23

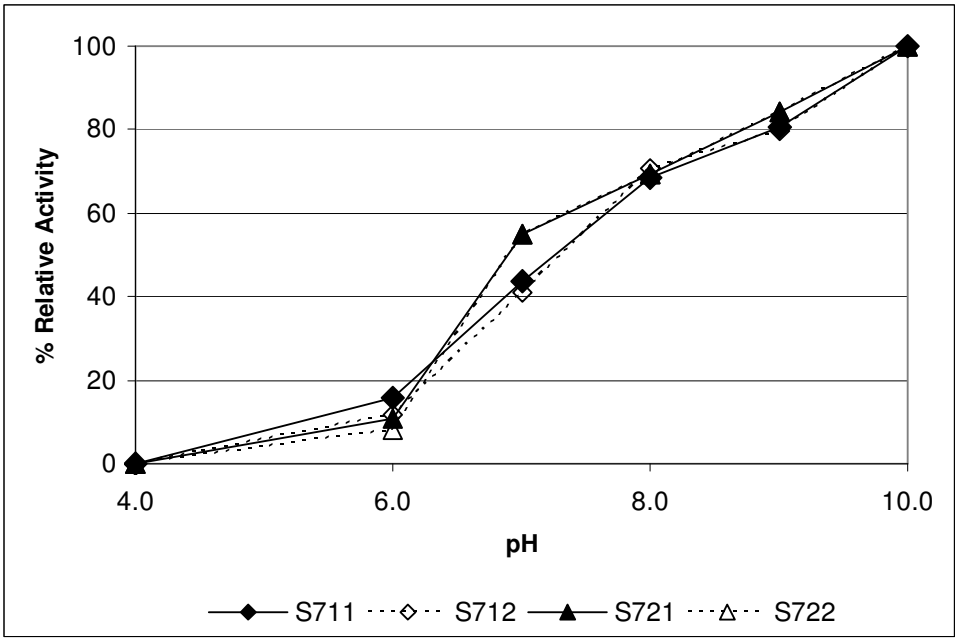
จากการศึกษาสภาวะในการทำงานและความคงทนต่อสภาวะความเป็นกรด-เบสของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี และขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี นั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือเอนไซม์จะไม่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด (pH 2.0 และ4.0) แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น (pH 7.0-11.0) และเอนไซม์นี้ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกลางจนถึงเบส (pH 7.0-11.0) ได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 2.0 และ4.0)



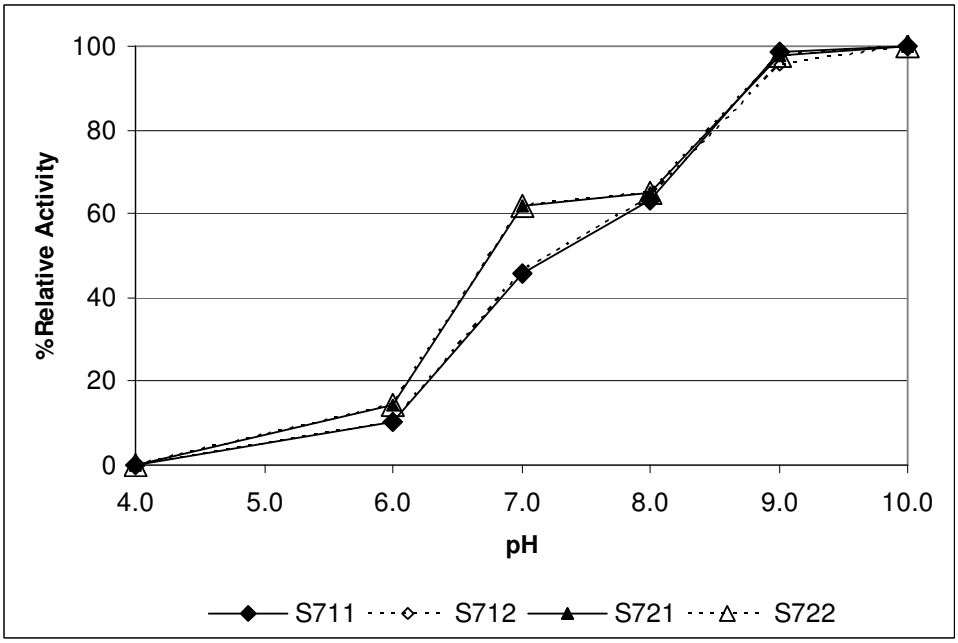
ภาพที่ 20 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 21 ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินต่อสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 22 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ (S711, S712, S721 และ S722) ในสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ



ภาพที่ 23 ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ (S711, S712, S721 และ S722) ต่อสภาวะที่มี pH ต่าง ๆ

3.2.2 การทดสอบอุณหภูมิที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ทริปซิน

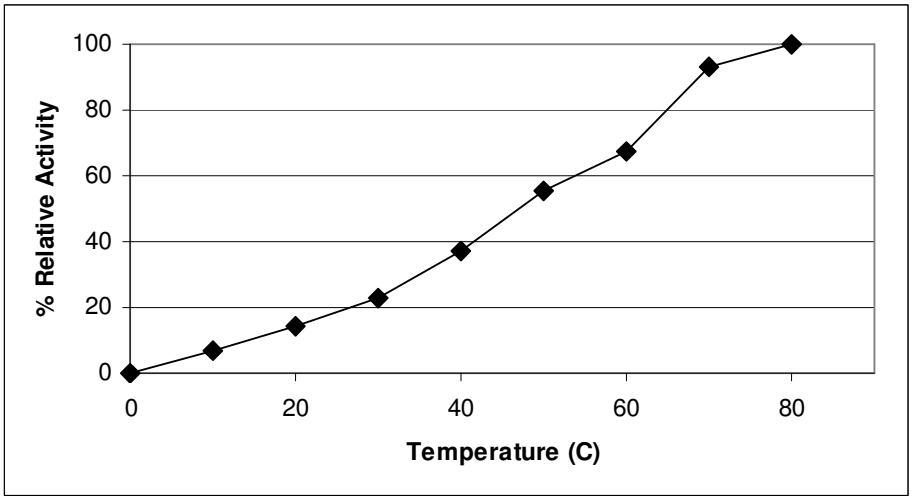
เอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟีนั้นจะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น ดังภาพที่ 24 ซึ่งคล้ายกับเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997) ที่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นและดีที่สุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอนไซม์ทริปซินมีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียสได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิตั้งแต่ 70 องศาเซลเซียส ขึ้นไป ดังภาพที่ 25 เช่นเดียวกับความคงทนของเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997)

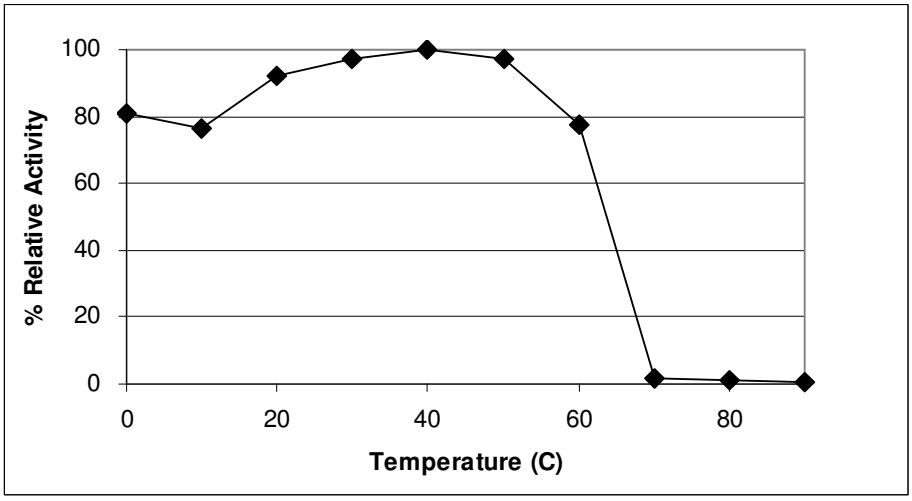
เอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 นั้น จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่ S711 และ S712 ทำงานได้ดีสูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ส่วน S721 และ S722 ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส S721 และ S722 จะทำงานในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงได้ดีกว่า S711 และ S712 ดังภาพที่ 26

เอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 นั้นมีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ ได้ต่างกัน คือ เอนไซม์ทริปซินทั้งหมดมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 0-40 องศาเซลเซียส ได้ดี เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป เอนไซม์ทริปซินทั้งหมดจะมีความคงทนลดลง โดย S721 และ S722 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า S711 และ S712 ซึ่งพบว่า S711 และ S712 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 80 องศาเซลเซียส เป็นต้นไป ในขณะที่ S721 และ S722 ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 27

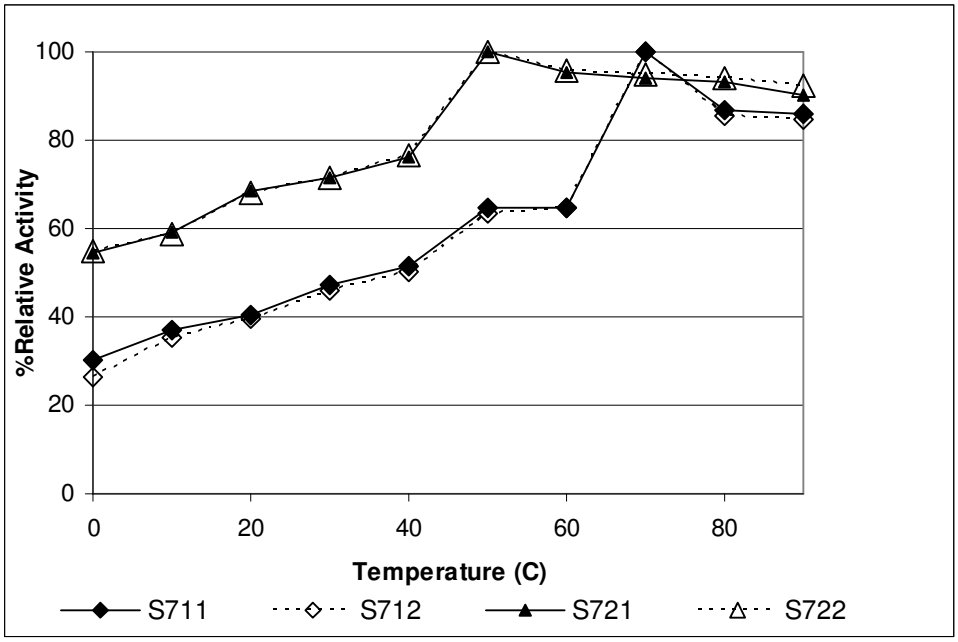
จากการศึกษาสภาวะในการทำงานและความคงทนต่อสภาวะที่อุณหภูมิต่าง ๆ ของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี และขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีนั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกันคือเอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น และมีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิ0-40 องศาเซลเซียส ได้ดี



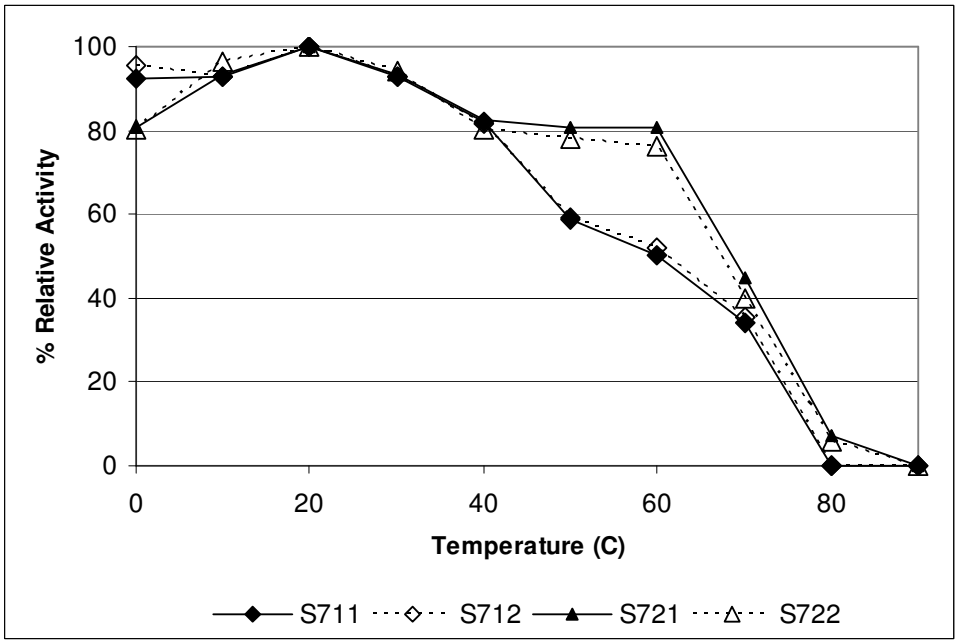
ภาพที่ 24 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 25 ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 26 กิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ (S711, S712, S721 และ S722) ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ



ภาพที่ 27 ความคงทนของเอนไซม์ทริปซินบริสุทธิ์ (S711, S712, S721 และ S722) ต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิต่าง ๆ

นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ที่แยกบริสุทธิ์แล้วจะมีสมบัติที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิเฉพาะตัว การทำงานของเอนไซม์ทริปซิน S721 และ S722 สอดคล้องกับเอนไซม์ทริปซินของปลานิลจากประเทศบราซิล (Bezerra *et al.*, 2004) ที่ทำงานได้ดีเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส อีกทั้งเอนไซม์นี้ยังคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 50 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน S711 และS712 อยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ส่วน S721 และ S722 อยู่ที่ 70 องศาเซลเซียส ส่วนปลาน้ำจืดชนิดอื่น ได้แก่ ปลานิลพันธุ์ลูกผสมจากประเทศสหรัฐอเมริกา (El-Shemy and Levin, 1997) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส ปลานิลจากประเทศบราซิล (Bezerra *et al.*, 2004) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส และปลา tambaqui *Colossoma macropomum* (Bezerra *et al.*, 2001) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส จึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ทริปซินจากปลาในเขตร้อน ทำงานได้ดีในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากปลาในเขตหนาวที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเฉลี่ย 45 องศาเซลเซียส (De Vecchi and Coppes, 1996)

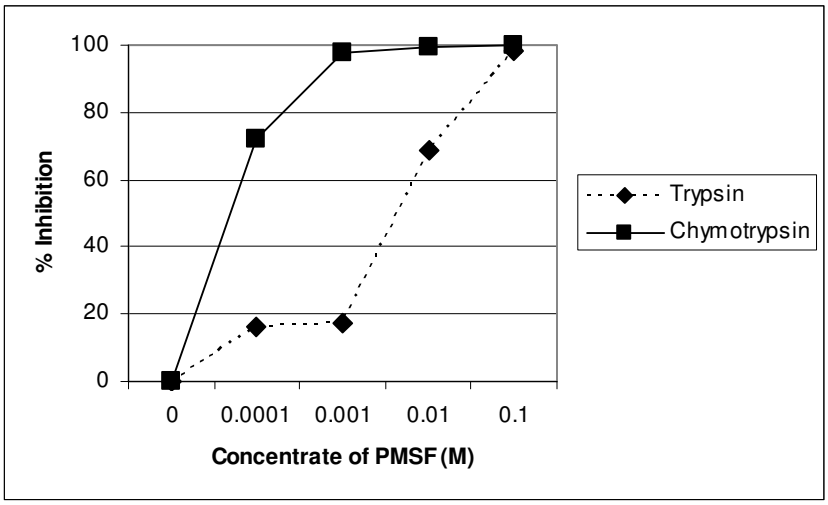
4. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

นำเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี และขั้นตอนเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟีที่มาทดสอบการทำงานกับสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ได้ผลดังนี้

4.1 สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ (Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)

สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส ซึ่งพบว่า สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ ดังภาพที่ 28 ความสามารถในการยับยั้งของสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ จะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ดีกว่าเอนไซม์ทริปซิน สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 โมลาร์ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินได้สูงถึง 98.02% ในขณะที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้เพียง 17.45% เท่านั้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารฟีนิลมีเทน

ซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ขึ้น ความสามารถในการยับยั้งที่มีต่อเอนไซม์ทริปซินจะเพิ่มขึ้น และที่ระดับความเข้มข้น 0.1 โมลาร์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ 98.15% แสดงว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินมีความไวต่อสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์มากกว่าเอนไซม์ทริปซิน โดยเอนไซม์ทริปซินจะต้องใช้สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แต่เอนไซม์ไคโมทริปซินใช้สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ที่มีความเข้มข้นเพียง 0.01โมลาร์



ภาพที่ 28 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์

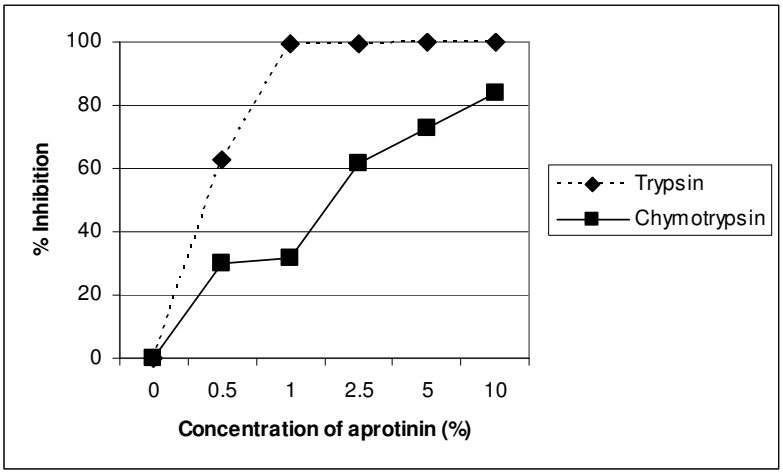
เมื่อนำเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มาทดสอบกับสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ พบว่าเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินดังกล่าวตอบสนองต่อสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์เช่นเดิม คือ เอนไซม์ทริปซินจะต้องใช้สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ แต่เอนไซม์ไคโมทริปซินใช้สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ที่มีความเข้มข้นเพียง 0.01 โมลาร์ ดังตารางที่ 13 ต่างจากเอนไซม์โปรติเอสจากหูรูดกระเพาะอาหารของปลา tambaqui ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานถึง 98.03% ด้วยสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ที่มีความเข้มข้นเพียง 0.001 โมลาร์ (Bezerra, 2001)

ตารางที่ 13 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์

เอนไซม์	ความเข้มข้นของ PMSF (M)	
	0.001	0.1
S711	41.0	98.1
S712	40.7	98.0
S721	35.0	95.6
S722	34.8	95.2
S511	80.9	98.7
S512	81.0	98.8
S521	91.5	99.9
S522	91.0	100.0

4.2 สารอะโพรทินิน (Aprotinin)

สารอะโพรทินิน เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ ดังภาพที่ 29 ความสามารถในการยับยั้งของสารอะโพรทินินจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารอะโพรทินินมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซิน สารอะโพรทินินที่ความเข้มข้น 1% (v/v) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ 99.29% แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโม ทริปซินได้เพียง 31.58% เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารอะโพรทินินขึ้น ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซินเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้น 10% (v/v) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ 83.91% แสดงว่าเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินมีความไวต่อสารอะโพรทินินต่างกัน โดยการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินจะใช้สารอะโพรทินินที่มีความเข้มข้นเพียง 1% (v/v) แต่เอนไซม์ไคโมทริปซินจะต้องใช้สารอะโพรทินินที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v)



ภาพที่ 29 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารอะโพรทินิน

การนำเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และS722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มาทดสอบกับสารอะโพรทินินพบว่าเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินดังกล่าวตอบสนองต่อสารอะโพรทินินเช่นเดิม คือ เอนไซม์ทริปซินจะถูกยับยั้งด้วยสารอะโพรทินินที่มีความเข้มข้นเพียง 1% (v/v) แต่การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินจะต้องใช้สารอะโพรทินินที่มีความเข้มข้นสูงถึง 10% (v/v) ดังตารางที่ 14

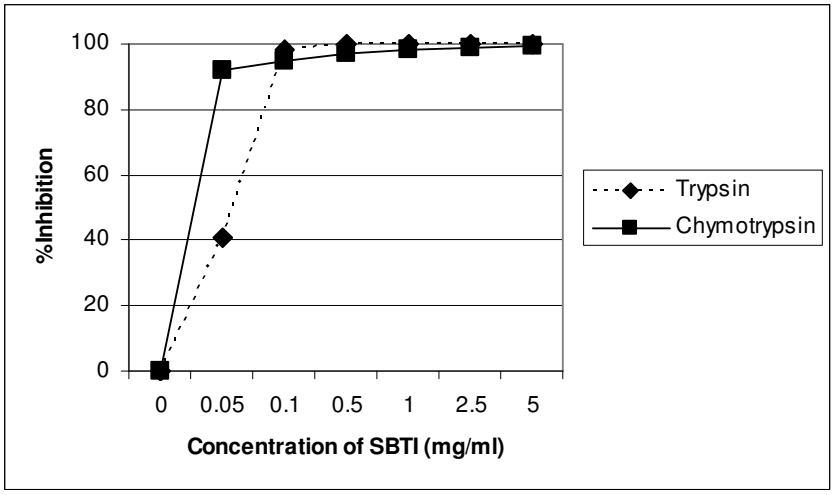
ตารางที่ 14 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของสารอะโพรทินิน

เอนไซม์	ความเข้มข้นของAprotinin	
	1%	10%
S711	99.3	100.0
S712	99.1	100.0
S721	99.1	100.0
S722	99.0	100.0
S511	31.6	75.9
S512	31.8	76.2
S521	45.5	96.0
S522	46.4	96.6

เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินถูกยับยั้งด้วยสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ และสารอะโพรทินินซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส แต่ตอบสนองต่อสารทั้งสองต่างกัน คือ สารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ ใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ในขณะที่สารอะโพรทินินใช้ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน

4.3 สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง (SBTI)

สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ ดังภาพที่ 30 สาร SBTI ที่มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ 92.17 % ซึ่งสูงกว่าเอนไซม์ทริปซินที่ถูกยับยั้งเพียง 41.08 % เมื่อความเข้มข้นของสาร SBTI เพิ่มขึ้น ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ก็สูงขึ้น คือที่ระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สาร SBTI สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ 98.08% และเอนไซม์ไคโม ทริปซินได้ 94.73%



ภาพที่ 30 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง

ผลของการนำเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721และ S722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มาทดสอบกับสาร SBTI พบว่าเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินดังกล่าวตอบสนองต่อสาร SBTI เช่นเดิม คือ เอนไซม์ไคโมทริปซินจะถูกยับยั้งด้วย

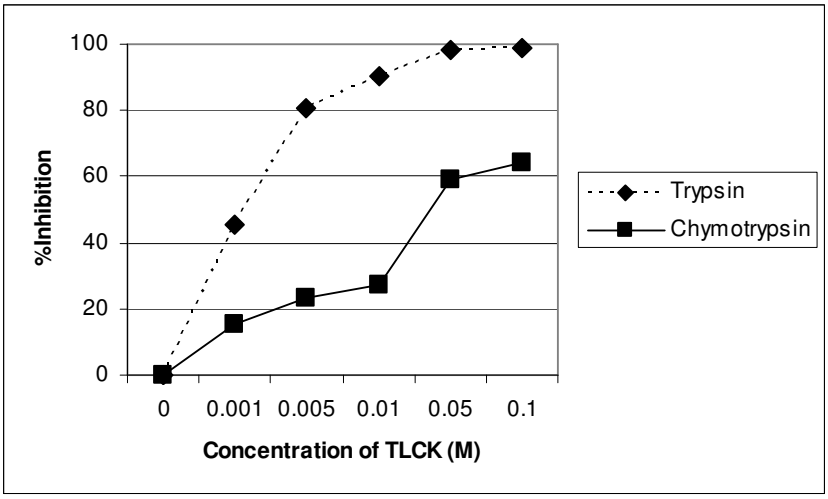
สาร SBTI ที่มีความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรได้ดีกว่าเอนไซม์ทริปซิน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร SBTI เป็น0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สารSBTI สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ 100% และเอนไซม์ไคโมทริปซินได้มากกว่า 85 % ดังตารางที่ 15

ตารางที่ 15 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ริสุทธิ์ของสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลือง

เอนไซม์	ความเข้มข้นของ SBTI (mg/ml)	
	0.05	0.1
S711	41.0	100.0
S712	40.7	100.0
S721	35.0	100.0
S722	34.8	100.0
S511	87.0	89.0
S512	87.8	90.0
S521	96.5	99.0
S522	97.0	100.0

4.4 สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน (N∝-*p*-Tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK)

สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Chong *et al*., 2002) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ ดังภาพที่ 31 ความสามารถในการยับยั้งของสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซิน โดยที่เอนไซม์ทริปซินถูกยับยั้งโดยสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนที่ระดับความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ได้ 98.52% ขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินถูกยับยั้งเพียง 59.17% ถึงแม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนเป็น 0.1 โมลาร์ ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ไคโมทริปซินได้น้อยกว่า 70%



ภาพที่ 31 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน

การนำเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721และ S722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มาทดสอบกับสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนพบว่า สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนที่ระดับความเข้มข้น 0.1 M สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ดี แต่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินได้เพียง 60% ซึ่งต่างจากเอนไซม์โปรติเอสจากหูรูดกระเพาะอาหารของปลา tambaqui ถูกยับยั้งการทำงาน (94.86%) ด้วยสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนที่มีความเข้มข้นเพียง 0.001โมลาร์ (Bezerra, 2001) ดังตารางที่ 16

ทั้งสาร SBTI และ สารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน โดยสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินมากกว่า SBTI ขณะที่ SBTI มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินมากกว่าสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตน

ตารางที่ 16 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บริสุทธิ์ของสารโทซิลไลซีน คลอโรเมททิลคีโตน

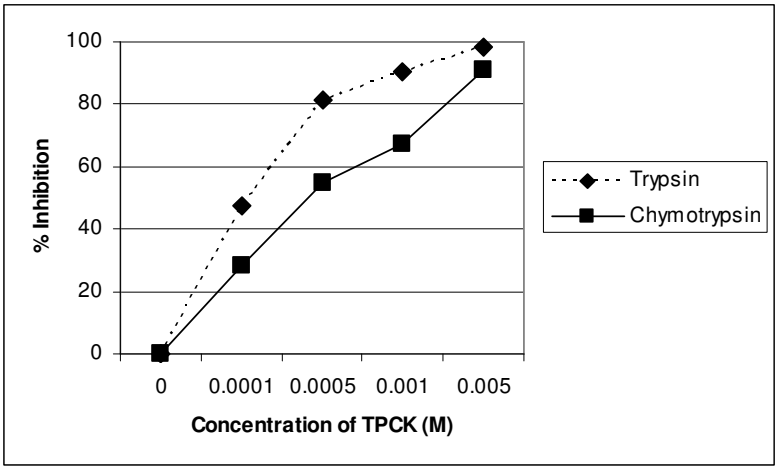
เอนไซม์	ความเข้มข้นของ TLCK (M)	
	0.05	0.1
S711	93.8	100.0
S712	94.0	100.0
S721	100.0	100.0
S722	100.0	100.0
S511	28.0	55.0
S512	29.0	56.0
S521	30.0	59.0
S522	31.0	60.0

4.5 สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน (N-*p*-Tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone, TPCK)

สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน เป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (synthetic chymotrypsin inhibitor) (Bezerra, 2001; Chong *et al*., 2002) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินได้ดังภาพที่ 32 ความสามารถในการยับยั้งของสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตนจะเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร เมื่อเปรียบเทียบในระดับความเข้มข้นเดียวกัน สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตนมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินได้ดีกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซิน ซึ่งขัดแย้งกับการเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chong *et al*., 2002) โดยที่เอนไซม์ทริปซินถูกยับยั้งการทำงานโดยสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนที่ระดับความเข้มข้น 0.005 โมลาร์ ได้ 98.56% ขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินถูกยับยั้งการทำงานได้ 91.2%

การนำเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721และ S722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 มาทดสอบกับ สารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน พบว่าเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินดังกล่าวตอบสนองต่อสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโร

เมททิลคีโตนเช่นเดิม คือ เอนไซม์ทริปซินจะถูกยับยั้งด้วยสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตนได้ดีกว่ากว่าเอนไซม์ไคโมทริปซิน ดังตารางที่ 17



ภาพที่ 32 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน

จากการทดสอบการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินด้วยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ พบว่า เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินที่สกัดได้จากปลานิล (*O. niloticus* Linn.) เป็นเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอส เพราะเอนไซม์ทั้งสองถูกยับยั้งการทำงานโดยสารฟีนิลมีเทนซัลโฟนิลฟลูโอไรด์ และสารอะโพรทินิน ซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลุ่มเซรีนโปรติเอสโดยที่เอนไซม์ทริปซินถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากถั่วเหลืองและสารโทซิลไลซีนคลอโรเมททิลคีโตนซึ่งเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน แต่เอนไซม์นี้ยังถูกสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตนยับยั้งการทำงานด้วย ดังนั้นเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลนี้ จึงควรเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin-like) เนื่องจากถูกสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน ในขณะที่เอนไซม์ไคโมทริปซินถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินและตอบสนองต่อสารยับยั้งของเอนไซม์ไคโมทริปซินน้อยกว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลานิลนี้ จึงควรเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ไคโมทริปซิน (Chymotrypsin-like) โดยที่เอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721และ S722 และเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521และ S522 ก็ให้ผลตอบสนองต่อสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเช่นเดียวกับเอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินที่ผ่านจากขั้นตอนแอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี

ตารางที่ 17 ความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ของสารโทซิลฟีนิลอะลานินคลอโรเมททิลคีโตน

เอนไซม์	ความเข้มข้นของ TPCK (M)	
	0.001	0.005
S711	80.5	90.0
S712	80.0	89.0
S721	78.0	85.0
S722	77.0	84.0
S511	67.0	85.0
S512	68.0	86.0
S521	72.0	88.0
S522	73.0	89.0

จากการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีต่าง ๆ พบว่า ส่วนที่ละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสมีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ S511, S512, S521 และ S522 โดย S521 เป็นเอนไซม์ที่แยกออกมาได้มากที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 51,800 ดาลตัน มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 9.0 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีความคงตัวที่ pH 7-10 แต่ไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ตอบสนองต่อสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซรีน โปรติเอส สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (SBTI) และ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซิน เอนไซม์นี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ไคโมทริปซิน ขณะที่ส่วนที่ละลายในสารละลายกรดไฮโดรคลอริกมีเอนไซม์ 4 ชนิด คือ S711, S712, S721 และ S722 โดย S711 เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุด มีน้ำหนักโมเลกุล 26,000 ดาลตัน มีกิจกรรมและความคงตัวอยู่ในช่วง pH 7-10 มีกิจกรรมสูงสุดที่ 70 องศาเซลเซียส และไม่มีความคงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส เอนไซม์นี้ตอบสนองต่อสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เซรีนโปรติเอส (PMSF และอะโพรทินิน) สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (SBTI และ TLCK) และ สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไคโม ทริปซิน (TPCK) เอนไซม์นี้จึงเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน

ส่วนที่ 2 การสกัดแคโรทีโนโปรตีนโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากลำไส้ของปลานิล

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของหัวกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium roesenbergii*) ประกอบด้วย โปรตีน ไขมัน เถ้า และความชื้น 15.16, 4.74, 5.44 และ 73.12% ตามลำดับ และมีแคโรทีนอยด์ 1.51 มิลลิกรัม/ ตัวอย่าง 100 กรัม ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 องค์ประกอบทางเคมีของหัวกุ้งก้ามกราม

องค์ประกอบทางเคมี* (%)	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบน
ความชื้น	73.12 ± 1.20
โปรตีน	15.16 (0.17
ไขมัน	4.74 (0.12
เถ้า	5.44 (0.24
คาร์โบไฮเดรต**	1.54
แคโรทีนอยด์ (mg/ 100g)	1.51 (0.15

หมายเหตุ * องค์ประกอบทางเคมี คำนวณจากน้ำหนักสด
ได้ค่าเฉลี่ย (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ
** ค่าคาร์โบไฮเดรตได้จากการคำนวณจากค่าองค์ประกอบทางเคมี

แต่เนื่องจากตัวอย่างเริ่มต้นของกุ้งแต่ละชนิดมีค่าความชื้นต่างกัน คือ กุ้ง pink shrimp *Pandulus borealis* (Simpson and Harrd, 1985b) และกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* (เสาวลักษณ์, 2543) ซึ่งเป็นกุ้งที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze dry) จึงมีความชื้นเพียง 4.4% และ 9.41% ตามลำดับ ในขณะที่ หัวกุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นตัวอย่างสดซึ่งมีความชื้นใกล้เคียงกับตัวอย่าง brown shrimp Metapenaeus monoceros (Chakrabarti, 2002a) และ pink shrimp *P. borealis* (Johnson, 1992) มีความชื้น 74% และ 71%ตามลำดับเพื่อให้สะดวกต่อการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นจึงแปลงค่าจากการวิเคราะห์น้ำหนักสดให้เป็นค่าจากการคำนวณน้ำหนักแห้ง ดังตารางที่ 19

ตารางที่ 19 องค์ประกอบทางเคมีของหัวกุ้งชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่าง	องค์ประกอบทางเคมี (%)			
	โปรตีน	ไขมัน	เถ้า	แคโรทีนอยด์
กุ้งก้ามกราม	56.15	17.68	20.23	5.62
กุ้งกุลาดำ (เสาวลักษณ์, 2543)	19.16	1.18	45.01	3.71
กุ้ง pink shrimp (Simpson and Harrd, 1985b)	45.11	26.35	27.20	12.45
กุ้ง pink shrimp (Johnson, 1992)	23.50	14.70	33.90	17.37
กุ้ง brown shrimp (Chakrabarti, 2002a)	34.62	9.62	30.77	13.46

หมายเหตุ คำนวณองค์ประกอบทางเคมีเป็นร้อยละของน้ำหนักแห้งของตัวอย่าง

เมื่อพิจารณากุ้ง pink shrimp ของ Simpson and Harrd (1985b) และ Johnson (1992) พบว่ากุ้ง pink shrimp ของ Johnson (1992) มีโปรตีนและไขมันน้อยกว่ากุ้ง pink shrimp ของ Simpson and Harrd (1985b) แต่มีเถ้าและแคโรทีนอยด์สูงกว่า ซึ่งเถ้าเป็นตัวแทนของปริมาณไคตินและแร่ธาตุอื่น ๆ (Simpson and Harrd, 1985b) ซึ่งทำให้คาดเดาว่าในตัวอย่างของ Johnson (1992) น่าจะมีส่วนของเนื้อกุ้งน้อยกว่าและมีส่วนของเปลือกกุ้งมากกว่าตัวอย่างของ Simpson and Harrd (1985b) แคโรทีโนโปรตีนเป็นสารประกอบแคโรทีนอยด์ซึ่งอยู่ร่วมกับโปรตีนโดยพันธะนอนโควาเลนท์ (Zagalsky *et al*., 1990) และ Simpson and Harrd (1985) กล่าวว่า แคโรทีโนโปรตีนส่วนใหญ่จะพบในโปรตีน การตรวจวัดปริมาณโปรตีนจึงน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณแคโรทีนอยด์ที่สกัดออกจากแคโรทีโนโปรตีนที่มีอยู่ในตัวอย่างได้ ถ้าปริมาณโปรตีนสูง จึงน่าจะมีปริมาณแคโรทีนอยด์สูงด้วย แต่โปรตีนที่อยู่ในตัวอย่างมี 2 ประเภท คือ โปรตีนที่เป็นเศษเนื้อกุ้งและโปรตีนที่เป็น

ส่วนหนึ่งของแคโรทีโนโปรตีน ดังนั้นการตรวจปริมาณโปรตีนในตัวอย่างหัวกุ้งจึงเป็นเพียงค่าหนึ่งที่ใช้พิจารณาประกอบการตัดสินใจเลือกวัตถุดิบ แต่ไม่สามารถยืนยันปริมาณแคโรทีโนโปรตีนที่มีอยู่ได้ กุ้งก้ามกรามมีปริมาณโปรตีนและไขมันสูง แต่มีปริมาณเถ้าและแคโรทีนอยด์น้อยกว่ากุ้ง pink shrimp ของ Johnson (1992) แสดงว่าในส่วนหัวของกุ้งก้ามกรามนี้มีเศษเนื้อกุ้งและไขมันมากกว่าเปลือกกุ้งและแคโรทีนอยด์ ซึ่งเป็นไปตามลักษณะเด่นของกุ้งก้ามกรามที่มีมันกุ้งสูงเป็นที่นิยมบริโภค (ยุพินท์ และพันธ์ศักดิ์, 2545) เมื่อเปรียบเทียบกับหัวกุ้งกุลาดำที่มีโปรตีนและไขมันน้อยกว่ากุ้งก้ามกราม แต่มีเถ้าสูงกว่ากุ้งชนิดอื่น จึงเหมาะที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไคติน ไคโตซานมากที่สุด ส่วนปริมาณแคโรทีนอยด์นั้นกุ้งก้ามกรามมีมากกว่ากุ้งกุลาดำเล็กน้อย แสดงว่าสามารถใช้หัวกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกรามเป็นวัตถุดิบในการผลิตแคโรทีนอยด์ได้

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกรามได้ผลผลิต คือส่วนที่เป็นของเหลวที่เป็นแคโรทีโนโปรตีน และส่วนที่เป็นของแข็ง ประกอบด้วยเศษเปลือกกุ้ง และเนื้อกุ้งที่ไม่แยกออกจากเปลือกกุ้ง จากการทดลองจะเห็นว่าถ้าได้ปริมาณแคโรทีโนโปรตีนสูงขึ้น จะทำให้ได้ปริมาณส่วนที่เป็นของแข็งน้อยลง เนื่องจากการใช้เอนไซม์ และเวลาในการทำปฏิกิริยาจะช่วยให้โปรตีนจากหัวกุ้งหลุดออกจากเปลือกกุ้งมาอยู่ในส่วนที่เป็นของเหลวมากขึ้น ซึ่งจะเป็นผลดีต่อการเตรียมวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตไคติน ไคโตซาน เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์ คือ เฮกเซนและไอโซโพพานอลในสัดส่วนเดียวกับที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณแคโรทีนอยด์ที่ได้จากปฏิกิริยานั้น พบว่าได้ปริมาณแคโรทีนอยด์ 55 % แต่ส่วนที่เป็นเปลือกและเนื้อกุ้งนั้นแยกออกจากกันได้ยาก ดังนั้นการใช้ประโยชน์สูงสุดจากเปลือกกุ้งควรจะสกัดแคโรทีโนโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง และให้โปรตีนออกจากเปลือกกุ้งมากที่สุด เพื่อจะได้ลดปริมาณสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดโปรตีนจากเปลือกกุ้งก่อนที่จะนำไปผลิตไคติน ไคโตซาน ส่วนแคโรทีโนโปรตีนนั้นสามารถนำมาสกัดแยกแคโรทีนอยด์ออกจากโปรตีนเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ตามต้องการได้ โดยปริมาณแคโรทีนอยด์และโปรตีนในแคโรทีโนโปรตีนที่ได้นั้นจะแปรผันตามปริมาณแคโรทีโนโปรตีนที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ทำปฏิกิริยา และการเติมเอนไซม์ช่วยให้การสกัดโปรตีนออกจากเปลือกกุ้งมีประสิทธิภาพดีขึ้น ส่วนปริมาณโปรตีนในส่วนที่กรองแยกได้จะแปรผกผันกับปริมาณแคโรทีโนโปรตีน ซึ่งค่าดังกล่าวจะใช้ในการยืนยันประสิทธิภาพในการสกัดแคโรทีโนโปรทีน ที่สามารถแยกโปรตีนออกจากเปลือกกุ้ง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Chakrabarti (2002a)

หัวกุ้งก้ามกรามมีโปรตีนเพียง 15.16% จึงทำให้สกัดปริมาณแคโรทีโนโปรตีนได้ไม่มากนัก หากไม่เติมเอนไซม์ลงไปจะสามารถสกัดสารแคโรทีนอยด์ได้ 44.58 % แต่เมื่อเติมเอนไซม์ลงไปจะทำให้สกัดสารแคโรทีนอยด์ได้มากขึ้น โดยเวลาในการสกัดที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นด้วยและการไม่เติมเอนไซม์ลงไปจะทำให้การสกัดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินจากโคและปลานิลที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินเท่ากัน ลงไปย่อยตัวอย่างหัวกุ้งพบว่าเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลช่วยให้สกัดสารแคโรทีนอยด์ได้สูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากโคอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) โดยเอนไซม์ทริปซินที่ใช้เวลาในการย่อยหัวกุ้ง 24 ชั่วโมงจะให้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์สูงที่สุด (58.15%) ดังตารางที่ 20

ถึงแม้ว่าปริมาณแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยตัวอย่างหัวกุ้งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) ทั้งที่ไม่ใส่เอนไซม์ และใส่เอนไซม์ แต่อัตราส่วนการเพิ่มขึ้นของปริมาณแคโรทีนอยด์จะลดลงตั้งแต่ใช้เวลาในการสกัด 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป ดังนั้น เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมงจึงควรจะเป็นเวลาที่เหมาะสมที่จะสามารถผลิตแคโรทีโนโปรตีน และเมื่อทดลองสกัดเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างจากการสกัดเป็นเวลา 0 ชั่วโมง ในขณะที่การทดลองสกัดเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ให้ปริมาณแคโรทีนอยด์ไม่แตกต่างจากการสกัดเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการย่อยหัวกุ้ง *P. borealis* ของ Simpson and Harrd (1985a) ที่ได้ปริมาณสารแคโรทีนอยด์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการย่อย และอัตราเร็วในการย่อยจะค่อย ๆ ลดลงหลังจากใช้เวลาย่อย 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป นอกจากนี้เวลาในการสกัด 3 ชั่วโมงยังเป็นเวลาที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตในเชิงการค้าเพื่อให้กระบวนการสกัดแคโรทีโนโปรตีนเสร็จสิ้นในหนึ่งวัน

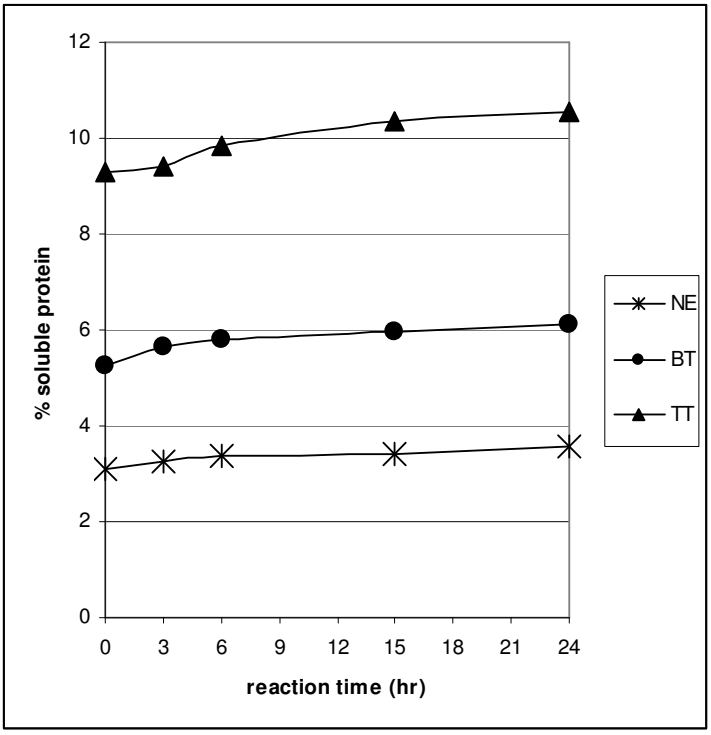
เมื่อตรวจวัดปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของแคโรทีโนโปรตีน พบว่าปริมาณโปรตีนของแต่ละช่วงเวลาการย่อยของเอนไซม์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ทริปซินจากปลานิลช่วยให้มีปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำสูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากโค และการไม่เติมเอนไซม์ ดังภาพที่ 33 แสดงว่าประสิทธิภาพในการย่อยดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับผลการย่อยหัวกุ้งของ Simpson and Harrd (1985a) ที่ได้ปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการย่อย

แคโรทีนอยด์ที่ได้จากหัวกุ้งก้ามกรามนี้สามารถดูดกลืนคลื่นแสงได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 464 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วงของการดูดกลืนคลื่นแสงของแคโรทีนอยด์ที่ 430-480 นาโนเมตร (Gross, 1987)

ตารางที่ 20 ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกรามที่ไม่เติมเอนไซม์ เติมเอนไซม์ทริปซินจากโค และเอนไซม์ทริปซินจากปลานิล

การทดลอง	เวลาที่ใช้ในการทำปฏิกริยา (ชั่วโมง)	แคโรทีโนโปรตีน			ส่วนกาก	
		ผลผลิตทั้งหมด (%)	ปริมาณแคโรทีนอยด์ (mg%)	ปริมาณโปรตีน (%)	ผลผลิตทั้งหมด (%)	ปริมาณโปรตีน (%)
ไม่เติม	0	44.58±0.39	18.27±0.04	1.24±0.05	54.42±0.45	1.57±0.02
เอนไซม์	3	45.76±0.51	20.15±0.06	1.72±0.01	53.23±0.17	1.44±0.03
	6	46.64±0.58	21.83±0.04	1.94±0.05	52.36±0.31	1.33±0.04
	15	47.46±0.58	23.06±0.06	2.13±0.04	51.54±0.42	1.24±0.02
	24	47.98±0.23	23.96±0.06	2.32±0.02	51.02±0.20	1.16±0.01
เติม						
เอนไซม์	0	46.50±0.39	22.56±0.06	2.27±0.04	53.12±0.16	0.97±0.01
ทริปซิน	3	48.30±0.23	25.85±0.03	3.05±0.11	51.37±0.23	0.87±0.01
จากโค	6	49.95±0.23	28.39±0.06	3.58±0.04	49.87±0.20	0.77±0.03
	15	51.15±0.15	30.48±0.06	4.04±0.09	48.37±0.20	0.70±0.02
	24	52.13±0.23	32.14±0.02	4.44±0.06	47.43±0.17	0.64±0.01
เติม						
เอนไซม์	0	47.18±0.35	31.41±0.08	4.38±0.04	51.56±0.41	0.95±0.01
ทริปซิน	3	54.02±0.20	39.35±0.07	6.15±0.07	44.88±0.17	0.62±0.02
จากปลานิล	6	55.88±0.50	40.46±0.06	7.13±0.04	42.87±0.35	0.42±0.02
	15	57.52±0.50	43.06±0.08	7.52±0.06	41.0±0.32	0.34±0.02
	24	58.15±0.54	45.88±0.04	8.09±0.06	40.72±0.40	0.29±0.01

หมายเหตุ ปริมาณผลผลิตที่ได้จากการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ



ภาพที่ 33 ปริมาณโปรตีนละลายน้ำที่สกัดได้จากการไม่เติมเอนไซม์ (NE) เติมเอนไซม์ทริปซินจากโค (BT) และเอนไซม์ทริปซินจากปลานิล (TT)

เมื่อศึกษาองค์ประกอบของแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างแคโรทีโนโปรตีนที่สกัดจากเปลือกกุ้งก้ามกรามด้วยวิธี Thin Layer Chromatography (TLC) โดยใช้สารละลายผสม เบนซีน : ปิโตรเลียมอีเทอร์ : อะซีโตน ในอัตราส่วน 10: 3: 2 เป็นตัวชะ พบว่าแคโรทีนอยด์จากเปลือกกุ้งก้ามกรามมีแถบปรากฏถึง 3 แถบ ที่ระยะ Rf เท่ากับ 0.55, 0.84 และ 0.95 โดยระยะ 0.55 นั้นใกล้เคียงแอสตาซีน (astacene) ที่มีระยะ Rf เท่ากับ 0.65 ของแคโรทีนอยด์จาก crawfish (Meyers and Bligh, 1981a) และแอสตาซีนของกุ้ง *P. borealis* (Simpson and Haard, 1985b) ก็พบที่ระยะ Rf 0.29-0.32 ซึ่งแอสตาซีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่สามารถแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์หลายแบบ(Meyers and Bligh, 1981b) จึงทำให้เข้าใจได้ว่าแถบในระยะ 0.55 นี้ อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งจากแอสตาซีน ส่วนระยะ Rf 0.84 และ 0.95 ตรงกับแอสตาแซนทีนอิสระ (free astaxanthin) และแอสตาแซนทีน เอสเทอร์ของแคโรทีนอยด์จาก crawfish (Meyers and Bligh, 1981a)

Meyers and Bligh (1981b) รายงานว่าในเปลือกของ crawfish *P. clarkii* ประกอบด้วยแคโรทีนอยด์ 12 ชนิด โดยที่แอสตาแซนทีน แอสตาแซนทีน เอสเทอร์ และแอสตาซีน เป็นแคโรทีนอยด์

หลักที่มีอยู่ 62%ของแคโรทีนอยด์ทั้งหมด แคโรทีนอยด์ชนิดอื่นแต่ละชนิดมีปริมาณน้อยกว่า10% หรือถูกออกซิไดซ์ไประหว่างกระบวนการสกัด แอสตาซีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่สามารถแตกตัวได้ผลิตภัณฑ์หลายแบบ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบแคโรทีนอยด์ในเศษเหลือของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียนด้วยวิธี TLC โดยใช้สารละลายผสม เบนซีน : ปิโตรเลียมอีเทอร์ : อะซีโตน ในอัตราส่วน 10: 3: 2 เป็นตัวชะ พบว่าแคโรทีนอยด์ในเปลือกกุ้ง pink shrimp *P. borealis* ที่ศึกษาโดย Simpson and Haard (1985b) มีองค์ประกอบของแอสตาซีน แอสตาแซนทีน และแอสตาแซนทีน เอสเทอร์ แต่ Shahidi and Synowiecki (1991) พบแคโรทีนอยด์ที่มีองค์ประกอบของแอสตาแซนทีน แอสตาแซนทีนโมโนเอสเทอร์ แอสตาแซนทีนไดเอสเทอร์ และซีแซนทีน ส่วนแคโรทีนอยด์ในตัวอย่างแคโรทีโนโปรตีนที่สกัดจากเปลือกกุ้งกุลาดำ (เสาวลักษณ์, 2543) มีองค์ประกอบของแอสตาแซนทีน และแอสตาแซนทีน เอสเทอร์ เช่นเดียวกับกุ้งก้ามกรามที่มีองค์ประกอบของแอสตาซีน แอสตาแซนทีน และแอสตาแซนทีน เอสเทอร์ ชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่แตกต่างกันของสัตว์ในกลุ่มครัสตาเชียนเกิดจากชนิดและปริมาณของแคโรทีนอยด์ที่สัตว์น้ำได้รับจากอาหารแตกต่างกัน (Storebakken and No, 1992) จากผลการทดลองเป็นการยืนยันตามที่ Simpson (1982) กล่าวว่าแอสตาแซนทีนเป็นแคโรทีนอยด์ที่สำคัญที่สุดในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองครั้งนี้สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. ลำไส้เป็นอวัยวะที่เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์ เนื่องจากมีน้ำหนักอวัยวะต่อน้ำหนักตัว 2.49 % มีกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซินต่อน้ำหนักตัวสูงที่สุด (7.76%) และกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินต่อน้ำหนักตัวสูงที่สุด (0.107%)

2. วิธีเจลฟิลเตรชันโครมาโตกราฟี โดยใช้คอลัมน์ HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution สามารถทำให้เอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินบริสุทธิ์ โดยเอนไซม์ทริปซิน S711, S712, S721 และ S722 จะมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซิน S511, S512, S521 และ S522 จะมีคุณสมบัติคล้ายไคโมทริปซินที่ทำงานได้ดีที่pH เป็นเบส และอุณหภูมิสูง

3. เอนไซม์ที่สกัดได้มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซินจะไม่ทำงานในสภาวะที่เป็นกรด (pH 2.0 และ4.0) แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น (pH 7.0-11.0) และเอนไซม์นี้ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นกลางจนถึงเบส (pH 7.0-11.0) ได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง (pH 2.0 และ 4.0) นอกจากนี้เอนไซม์จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น และมีความคงทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

4. เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ไคโมทริปซินจะไม่ทำงานที่เป็นกรด แต่จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเบสสูงขึ้น และเอนไซม์นี้ยังมีความคงทนต่อสภาวะที่เป็นเบสได้ดี แต่ไม่คงทนต่อสภาวะที่เป็นกรดสูง นอกจากนี้เอนไซม์นี้จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น โดยที่ S511 และ S512 จะทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 0-80 องศาเซลเซียส ขณะที่ S521 และ S522 จะทำงานได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และเอนไซม์มีความคงทนจนถึง50องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

5. สภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งโดยใช้เอนไซม์ทริปซินจากปลานิล คือ ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) pH 8.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้ผลผลิตแคโรทีโนโปรตีนทั้งหมด 54.2% ซึ่งมีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้เอนไซม์ทริปซินจากโค (48.3%) และการไม่เติมเอนไซม์ (45.76%)

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษา pH และอุณหภูมิที่มีผลต่อสมบัติของเอนไซม์ทริปซินและ เอนไซม์ไคโมทริปซิน นอกเหนือจากการทดลอง เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำเอนไซม์ไปใช้งาน

2. ควรมีการศึกษาการสกัดเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลาชนิดอื่นๆ ที่มีการแปรรูปเป็นจำนวนมาก เช่น ปลากะพง และปลาทับทิม เพื่อเป็นการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือจากโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำให้คุ้มค่า

3. ควรมีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำแคโรทีโนโปรตีนที่สกัดได้จากวิธีนี้ไปใช้กับการผลิตอาหารสัตว์ โดยมีการตรวจสอบคุณค่าทางโภชนาการ และความเป็นพิษต่อสุขภาพสัตว์ เพื่อนำไปทดแทนแคโรทีโนโปรตีนที่นำเข้าจากต่างประเทศ

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มวิเคราะห์การค้าสินค้าประมงระหว่างประเทศ. 2551. **สถิติการนำเข้า-ส่งออกสินค้าประมง ปี พ.ศ.2545 - พ.ศ.2550**. กองประมงต่างประเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2548. **สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ.2548**. ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

คีรี กออนันตกุล. 2542. **การเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศ**. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

จักรกริช พิมลชีวิน. 2545. **กรรมวิธีการฟอก ย้อมสี และเคลือบเงาหนังจากหนังปลานิล.** สิทธิบัตรไทย เลขที่ 1802.

จิราวรรณ แย้มประยูร, อมรรัตน์ สุขโข และ กรกช สรรเพ็ชร. 2539. **การผลิตอาหารขบเคี้ยวเสริมโปรตีนจากหัวกุ้งกุลาดำโดยใช้เครื่องเอ็กทรูดเดอร์**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 8, สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง. ฐานข้อมูลงานวิจัยกุ้งทะเลของประเทศไทย(2530-2546). แหล่งที่มา: http://shrimpbase.fish.ku.ac.th/display_abs_t.php?id=627, 22 กุมภาพันธ์ 2551.

ตรีสินธุ์ โพธารส. 2546. **การสกัดเปปโตนจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นันทวัน เอื้อวงศ์กูล, ไชยวัฒน์ รักสกุลพิวัฒน์ และ ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย. 2551. การศึกษาอันตรกิริยาของการดูดซับระหว่างสีกับไคโตซานที่ได้จากเกล็ดปลานิล. *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยครั้งที่ 28.** สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: www.scisoc.or.th/stt/28/web/content/C_03/C14.htm

นิติพงศ์ จิตรีโภชน์. 2543. **การผลิตแคลเซียมและเจลาตินจากเศษเหลือของโรงงานซูริมิ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิรนาม. 2544. **เกาะสถานการณ์:** กุ้งก้ามกราม อัศวินม้าขาว กู้ชีวิตชาวนากุ้ง "ความฝัน" หรือ "ความจริง". ประมงธุรกิจ 2(24). แหล่งที่มา: http://www.geocities.com/takaidow/pm24/ks24a.htm, 22 กุมภาพันธ์ 2551.

เนื้อน้อง บำราบพาล. 2543. การผลิตซุปปลาบรรจุกระป๋องโดยใช้เศษเหลือจากกระบวนการปลาแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บิสิเนสไทย. 2550. **จีราด้า กรุยทางหนังปลานิล เชื่อมต่อกลุ่มเครื่องหนังชูนวัตกรรมถิ่นไทย**. แหล่งที่มา: http://www.businessthai.co.th/content.php?data=411818_Smart%20SMEs, 22 กุมภาพันธ์ 2551.

ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551ก. **การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากหัวกุ้ง**. แหล่งที่มา: http://www.tistr-foodprocess.net/project_machine/Shrimp_Concentrated_th.htm, 22 กุมภาพันธ์ 2551.

_____. 2551ข. **ความสำคัญของ Carotenoid ในอุตสาหกรรมอาหาร**. แหล่งที่มา: http://www.tistr-foodprocess.net/food_world/food_world_th11.htm, 19 มิถุนายน 2551.

พรรณทิพา เจริญไทยกิจ. 2546. **การใช้ประโยชน์สารสกัดจากหัวกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) เพื่อใช้เป็นวัตถุกันหืนธรรมชาติในผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลือง และมายองเนส.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พิชญา ชินอุปราวัฒน์. 2539. **การผลิตเปปโตนจากปลาดุกบิ๊กอุยและจากเศษเหลือจากการแปรรูปปลาดุกบิ๊กอุย**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551ก. **การผลิตโปรตีนเข้มข้นจากหัวกุ้ง**. แหล่งที่มา: http://www.tistr-foodprocess.net/project_machine/Shrimp_Concentrated_th.htm, 22 กุมภาพันธ์ 2551.

_____. 2551ข. **ความสำคัญของ Carotenoid ในอุตสาหกรรมอาหาร**. แหล่งที่มา: http://www.tistr-foodprocess.net/food_world/food_world_th11.htm, 19 มิถุนายน 2551.

ธนาคารเพื่อการส่งออกและนำเข้าแห่งประเทศไทย. 16 พฤศจิกายน 2543. **เศษเหลือทิ้งของกุ้งยังมีประโยชน์**. แหล่งที่มา: http://www.foodmarketexchange.com/datacenter/industry/article_th/4_fish/detail_th_43_11_2.htm, 23 ธันวาคม 2545.

ยุพินท์ วิวัฒนชัยเศรษฐ์ และพันธ์ศักดิ์ ใครบุตร. 2545. **เอกสารแนะนำ การเพาะเลี้ยงปลานิล**. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

วรรณวิมล คล้ายประดิษฐ์. 2540. **การผลิตเจลาตินจากหนังปลากะพงแดง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วริศรา สุวรรณ. 2545. **การผลิตเจลาตินจากกระดูกปลากะพงแดง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศิวาพร ศิวเวชช. 2535. **วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมทรง เลขะกุล. 2543. **ชีวเคมีของวิตามิน**. ศุภวนิชการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. 2540. **ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สันนิบาตสหกรณ์แห่งประเทศไทย. 2551. สาคู เปลือกกุ้ง อาหารของเป็ดไข่ สูตรลดต้นทุน ที่กลุ่มเขาตูม. เทคโนฯปศุสัตว์. แหล่งที่มา: http://www.clt.or.th/webboard/viewthread.php?fid=5&tid=486&action=printable, 4 พฤษภาคม 2551.

เสาวลักษณ์ วนิชสุวรรณ. 2543. **การสกัดและสมบัติบางประการของแคโรทีโนโปรตีนจากวัสดุเศษเหลือจากกุ้ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุธาทิพพ์ บำรุงดี. 2546. **การผลิตไอซิงกลาสจากกระเพาะลมของปลากะพงแดง**. วิทยานิพนธ์ปริญญา โท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymic Hydrolysis of Food Protein**. Elsevier Applied Science, London.

Al-Khalifa, A.S. and K.L. Simpson. 1988. Metabolism of astaxanthin in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). **Comp. Biochem. Physiol.** 91B: 563-568.

Amiza, M.A., D. Galani and R.K. Owusu-Apenten. 1997. Cod (*Gadus morhua*) trypsin heat inactivation: a reaction kinetics study. **J. Food. Biochem.** 21: 273-288.

An H. and W. Visessanguan. 2000. Recovery of enzyme from seafood-processing wastes, pp. 641-664. *In* N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality.** Marcel Dekker, Inc., New York.

AOAC. 2000. **Official Methods of Analysis.** 27th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.

AstaFactor division of Mera Pharmaceuticals, Inc. 2008. **Astaxanthin**. Available Source: http://www.astaxanthin.org, May 7, 2008. *Cited* C. Jensen, E. Birk, A. Jokumsen, L. H. Skibsted and G. Bertelsen. 1998. Effect of dietary levels of fat, alpha-tocopherol and astaxanthin on colour and lipid oxidation during storage of frozen rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and during chill storage of smoked trout. **Zeitschrift f. Lebensmittel-Untersuchung u. Forschung A**. 207(3):189-196.

Baker, R. and C. Günther. 2004a. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trend Food Sci. Technol.** 15: 484–488.

_____. 2004b. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trend Food Sci. Technol.** 15: 484-488. *Cited* P. Palozza, N. Maggiano, G. Calviello, P. Lanza, E. Piccioni, F.O. Ranelletti, and G.M. Batoli. 1998. Canthaxanthin induces apoptosis in human cancer cell lines. **Carcinogenesis** 19: 373-376

_____. 2004c. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. **Trend Food Sci. Technol.** 15: 484-488. *Cited* S. Gradelet, A.-M. Le Bon, R. Bergès, M. Suschetet, and P. Astorg. (1998). Dietary carotenoids inhibit aflatoxin B1-induced liver preneoplastic foci and DNA damage in the rat: role of the modulation of aflatoxin B1 metabolism. **Carcinogenesis** 19: 403-411.

Bauernfeind, J.C. 1981. **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors: technological and nutritional applications**. Academic Press, New York.

Bernhard, K. 1990. Synthetic astaxanthin. The route of a carotenoid from research to commercialisation, pp. 337-363. *In* N. I. Krinsky, M. M. Mathews-Roth and R. F. Taylor, eds. **Carotenoids: Chemistry and Biology**. Plenum Press, New York.

Bezerra, R.S., E.J.F. Lins, R.B. Alencar, P.M.G. Paiva, M.E.C. Chaves, L.C.B.B. Coelho and L.B.Carvalho, Jr. 2004. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem.** 40(5): 1829-1834.

Bezerra, R.S., J.F. Santos, P.M.G. Paiva, M.T.S. Correia, L.C.B.B. Coelho, V.L.A. Vieira and L.B.Carvalho, JR. 2001. Partial purification and characterization of a thermostable trypsin from pyloric caeca of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **J. Food Biochem.** 25: 199-210.

Bidigare, R.R., M.E. Ondrusek , M.C. Kennicutt, R. Iturriaga, H.R. Harvey, R.W. Hoham and S.A. Macko. 1993. Evidence for a photoprotective function for secondary carotenoids of snow algae. **J. Phycol.** 29: 427-434.

Britton, G. 1985. General carotenoids methods. **Method. Enzymol.** 111: 113-149.

Burkholder, P.R., L.M. and P. Centeno. 1966. Nutritive values of shrimp flour. **Nature** 211(5051):860-1.

Cano-Lopez, A., B.K. Simpson, and N.F. Haard. 1987. Extraction of carotenoprotein from shrimp wastes with the aid of trypsin Atlantic cod. **J. Food Sci.** 52 (2): 503-506.

Castillo-Yáñez, F.J., R. Pacheco-Aguilarb, F.L. García-Carreño, M.L. Navarrete-Del Toro. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine *Sardinops sagax caerulea*. **Comp. Biochem. Physiol.** 140B: 91-98.

Chakrabarti, R. 2002a. Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. **Food Biotech.** 16(1): 81-90.

Chakrabarti, R. 2002b. Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. **Food Biotech.** 16(1): 81-90. *Cited* K. Shimahara, K. Ohkouchi, and M. Ikeda. 1982. A new isolation method of crustacean chitin using proteolytic bacterium. (*P. maltophilia*), pp.10-11. *In* S. Hirano and S. Tokura, eds. **The Proceedings of the Second International Conference of Japanese Society of Chitin & Chitosan**, Sapporo, Japan.

Chen, Huei-Mei and S.P. Meyers. 1982. Extraction of astaxanthin pigment from crawfish waste using a soy oil process. **J. Food Sci.** 47: 892-896, 900.

Chevalier, P.L., D. Sellos and A.V. Wormhoudt. 1995. Purification and partial characterization of chymotrypsin-like proteases from the digestive gland of the scallop *Pecten maximus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 110B(4): 777-784.

Chong, A.S.C., R. Hashim, L. Chow-Yang and A.B. Ali. 2002. Partial characterization and activities of proteases from the digestive tract of discus fish (*Symphysodon aequifasciata*). **Aquaculture**. 203: 321-333.

Cohen, T., A. Gertler and Y. Birk. 1981. Pancreatic proteolytic enzymes from carp (*Cyprinus carpio*)-I. Purification and physical properties of trypsin, chymotrypsin, elastase and carboxypeptidase B. **Comp. Biochem. Physiol.** 69B: 639-646.

David, W.B. and B.W. Donald. 1995. **Biotechnology: Proteins to PCR a Course in Strategies and Lab Techniques**. Birkhauser, Boston.

De Vecchi, S.and Z. Coppes. 1996. Marine fish digestive proteases-relevance to food industry and the South-West Atlantic region-a review. **J. Food Biochem.** 20: 193-214.

Di Mascio, P., S. Kaiser, and H. Sies. 1989. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274:532-538.

El-Beltagy, A.E., T.A. El-Adawy, E.H. Rahma and A.A. El-Bedawey. 2004a. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). **Food Chem.** 86: 33-39.

_____. 2004b. Purification and characterization of an acidic protease from the viscera of bolti fish (*Tilapia nilotica*). **Food Chem.** 86: 33-39. *Cited* M.H Ibrahim. 1994. **Utilization of Some Food Processing Wastes**. Ph.D. Thesis, Ain Shams University, Cairo, Egypt.

El-Shemy, M.G. and R.E. Levin. 1997. Characterization of affinity-purified trypsin from hybrid tilapia (*Tilapia nilotica/ aurea*). **J. Food Biochem.** 21: 163-175.

Erlanger, B.F., N. Kokowsky and W. Cohen. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.** 95: 271-278.

Food and Drug Regulation. 2005. Available from: http://laws.justice.gc.ca/en/F-27/C.R.C.-c.870/124366.html#rid-12437, Department of Justice, Canada, 2005.

Fox, D.L. 1979. **Biochromy: Natural Colorant of Living Things**. University of California Press, Berkeley, CA.

Gildberg, A. 1992. Recovery of proteinase and protein hydrolysate from fish viscera. **Bioresource Technol.** 39: 271-276.

_____. 1993. Review: Enzymatic processing of marine raw materials. **Process Biochem.** 28:1-15.

Glicksman, M. 1969. **Gum Technology in the Food Industry, Food Science and Technology**. Academic Press, New York.

Goodwin, T.W. 1976. Distribution of carotnoids, pp. 225-261. *In* T.W. Goodwin, ed. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. Academic Press, London.

Goodwin, T.W. 1986. Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. **Ann. Rev. Nutri.** 6: 273-293.

Gross, J. 1987. **Carotenoids Pigment in Fruit**. Academic Press, Inc., London.

Gross, J. and P. Budowski. 1966. Conversion of carotenoids into vitamin A_1 and A_2 in two species of freshwater fish. **Biochem. J.** 101: 747-754.

Guillou, A., G. Choubert, J.D. Storebakken Noue, and S. Kaushil. 1989. Bioconversion pathway of astaxanthin into retinol 2 in mature rainbow trout (*Salmo gairdneri* Rich.) **Comp. Biochem. Physiol.** 94B: 481-485.

Hale, M.B. 1969. Relative activities of commercially available enzymes in the hydrolysis of fish protein. **Food Tech.** 23: 107-110.

Haard, N.F. 1992. Biochemistry and chemistry of color and color change in seafoods. *In* G.J. Flick, R.E. Martin, Jr., eds. **Advances in Seafood Biochemistry : Composition and Quality :Papers from the American Chemical Society Annual Meeting, New Orleans**. Technomic Publishing Co., Lancaster.

Harnwanichsak, R. 1997. **Preliminary design of chitin and shrimp flavor production process from shrimp waste**. Master thesis, Chulalongkorn University.

Hernández-Cortés, P., J.R. Whitaker and F.L. Gracía-Carreño. 1997. Purification and charaterization of chymotrypsin from *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). **J. Food Biochem.** 21: 497-514.

Heu, M. S., H. R. Kim and J. H. Pyeun. 1995. Comparison of trypsin and chymotrypsin from the viscera of anchovy, *Engraulis japonica*. **Comp. Biochem. Physiol.** 112B(3): 557-567.

Hinsui, J., W. Worawattanamateekul, N. Raksakulthai, and J. Runglerdkriangkrai. 2006. Characterization of partial purified trypsin and chymotrypsin from viscera of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* Linneaus). **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 40 (5): 242-248.

Hjelmeland, K. and J. Raa. 1982. Charateristics of two trypsin type isozymes isolated from the Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 71B(4): 557-562.

International Carotenoid Society. 2007. **Carotenoids**. Available Source: http://www.carotenoidsociety.org/index.html, July 2, 2007.

Jantaro, S. 2000. **Purification and Characterization of Trypsin and Chymotrypsin from Viscera of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) and Application.** M.S. thesis, Prince of Songkla University.

Jencks, W.P. and B. Buten. 1964. The denaturation of crustacyanin. **Arch. Biochem. Biophys.** 107: 511-520.

Johnson, L. 1992a. Recovery of pigments and chitin from pink shrimp peeling wastes. *In* G.J. Flick, R.E. Martin, Jr., eds. **Advances in Seafood Biochemistry : Composition and Quality :Papers from the American Chemical Society Annual Meeting, New Orleans**. Technomic Publishing Co., Lancaster.

_____. 1992b. Recovery of pigments and chitin from pink shrimp peeling wastes. *In* G.J. Flick, R.E. Martin, Jr., eds. **Advances in Seafood Biochemistry : Composition and Quality :Papers from the American Chemical Society Annual Meeting, New Orleans**. Technomic Publishing Co., Lancaster. *Cited* J. Spinelli, L.Lehman and D. Wieg. 1974. **J. Fish. Research Board Canada** 31: 1025-1029.

Jolls, P. and R.A.A. Muzzarelli**.** 1999. **Chitin and Chitinases**. BirkhaÈuseer Verlag, Basel

Katayama, T., T. Kunisaki, M. Shiyama, K.L. Simpson and C.O. Chichester. 1973. The biosynthesis of astaxanthin—XIV. The conversion of labelled β-carotene-15,15′-$^{3}H_2$ into astaxanthin in the crab, *Portunus trituberculatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 46B: 269-272.

Kearsley, M.W. and N. Rodriguez. 1981. The stability and use of natural colours in food: anthocyanin, carotene and riboflavin. **J. Food Technol.** 16: 421-431.

Kishimura, H. and K. Hayashi. 2003. Short paper: N-terminal amino acid sequence of trypsin from the pyloric caeca of starfish *Asterias amurensis*. **Fish. Sci.** 69: 867-869.

Klomklao, S., S. Benjakul and W. Visessanguan. 2004. Comparative studies on proteolytic activity of splenic extract from three tuna species commonly used in Thailand. **J. Food Biochem.** 28: 355-372.

Kristjánsson M. M. 1991. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **J. Agr. Food Chem.** 39: 1738-1742.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature.** 227: 680-685.

Lee, W.L. and B.M. Gilchrist. 1975. Monohydroxy carotenoids in idotea (Crustacea: Isopoda). **Comp. Biochem. Physiol.** 51B: 247-253.

Leuba, J. L., I. Meyer, and E.M. Andersen. 1987. **Method for dissolving squid membranes**. US Patent 4,701,339

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

Martinez, A., R. L. Olsen and J.L. Serra. 1988. Purification and characterization of two trypsin-like enzymes from the digestive tract of anchovy *Engraulis encrasicholus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 91B(4): 677-684.

Martinez, A. and J.L. Serra. 1989. Proteolytic activities in the digestive tract of anchovy *Enngraulis encrasicholus*. **Comp. Biochem. Physiol.** 93B(1): 61-66.

Matsuno, T., T. Maoka, and Y. Ikuno. 1986. Comparative biochemical studies of carotenoids in fish. XXVII. Carotenoids in the eggs of three species of cyprinidae. **Comp. Biochem. Physiol.** 83B: 335-337.

Meyers, S.P. and D. Bligh. 1981a. Characterization of astaxanthin pigments from heat-processed crawfish waste. **J. Agri. Food Chem.** 29: 505-508.

_____. 1981b. Characterization of astaxanthin pigments from heat processed crawfish waste. **J. Agri. Food Chem.** 29: 505-508. *Cited* H. Nakagawa, M. Kayama, H. Yamada and S. Asakawa. 1974. **Hiroshima Daigaku Suichikusangakubu Kiyo**. 13(1): 1.

MFRD. 1987. **Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedures for Fish and Fish Products.** Marine Fisheries Research Department. SEAFDEC, Singapore.

Miki, W., K. Yamaguchi and S. Konosu. 1982. Comparison of carotenoids in the ovaries of marine fish and shellfish. **Comp. Biochem. Physiol.** 71B: 7-11.

Milicua, J.C.G., A.M. Garate and R. Gomez. 1990. Borohydride reduction of the blue carotenoid-protein complex from *Procambarus clarkia*. **Comp. Biochem. Physiol.** 95B: 119-123.

Outzen, H., G.I. Berglund, A.O. Smalås and N.P. Willassen. 1996. Temperature and pH sensitivity of trypsins from Atlantic salmon (*Salmo salar*) in comparison with bovine and porcine trypsin. **Comp. Biochem. Physiol.** 115B(1): 33-45.

Overnell, J. 1973. Degestive enzymes of the pyloric caeca and of their associated mesentery in the cod (*Gadus morhua*). **Comp. Biochem. Physiol.** 46B: 519-531.

Peterson, G.L. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry et al which is more generally applicable. **Anal. Biochem.** 83: 346-356.

Peto, R., R. Doll, J. D. Buckley, and M. B. Sporn. 1981. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? **Nature** 290: 201–208.

Prachumratana, P. 1998. **Types and Properties of Enzymes from Viscera of Tuna**. M.S. Thesis, Prince of Songkla University.

Raa, J. 1990. Biotechnology in aquaculture and the fish processing industry: A success story in Norway, pp. 509-524. *In* M.N.Voigt and J.R. Botta, eds. **Advance in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability**. Technomic Publishing Co., Lancaster.

Ramakrishna, M., H.O. Hultin and M.T. Atallah. 1987. A comparison of dogfish and bovine chymotrypsins in relation to protein hydrolysis. **J. Food Sci.** 52(5): 1198-1202.

Rungruangsak-Torrisen, K. and A. Sundby. 2000. Protease activities, plasma free amino acids and insulin at different ages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with genetically different trypsin isozymes. **Fish Physiol. Biochem.** 22: 337-347.

Sachindra, N.M.and N.S. Mahendrakar. 2005. Process optimization for extraction of carotenoids from shrimp waste with vegetable oils. **Bioresource Technology** 96: 1195–1200.

Sachindra, N.M., N. Bhaskar and N.S. Mahendrakar. 2006a. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Man.** 26: 1092-1098.

_____. 2006b. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Man.** 26: 1092-1098. *Cited* F. Kozo. 1997. **Extraction of Astaxanthin from Shell of Lobster or Shrimp or Crab and Apparatus.** Japanese Patent No. JP 9301950A.

_____. 2006c. Recovery of carotenoids from shrimp waste in organic solvents. **Waste Man.** 26: 1092-1098. *Cited* S. Mandeville, V. Yaylayan, B.K. Simpson, H. Ramaswamy. 1991. Isolation and purification of carotenoid pigments, lipids and flavor active components from raw commercial shrimp waste. **Food Biotechnol.** 5: 185–195.

Saito, A. and L.W. Regier. 1971. Pigmentation of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding dried crustacean waste. **J. Fish. Res. Board Can.** 28: 509-512.

Salvesen, G.S. and H. Nagase. 2001. Inhibition of proteolytic enzyme, pp. 105-130. *In* R. Beynon and J.S. Bond, eds. **Proteolytic Enzymes: Practical Approach**, 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.

Schiedt, K., F.J. Leuenberger, M. Vecchi, and E. Glinz. 1985. Absorption, retention, and metabolic transformations of carotenoids in Rainow trout, salmon and chicken. **Pure Appl. Chem.** 57: 685-692.

Schwartz, S.J. and J.H. Von Elbe. 1996. Colorants, 673-681. *In* O.R. Fennema, ed. **Food Chemistry**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Shahidi, F. 1994. Proteins from seafood processing discards, pp. 171-193. *In* E. Z. Sikorski, B. S. Pan and F. Shahidi, eds. **Seafood Proteins**. Chapman & Hall, New York.

Shahidi, F. and J. Synowiecki. 1991. Isolation and characterization of nutrients and value-added products from snow crab (*Chinoecetes opilio*) and shrimp (*Pandalus borealis*) processing discards. **J. Agri. Food Chem.** 39: 1527-1532.

_____. 1992a. Nutrient composition of mechanically separated and surimi-like seal meat. **Food Chem.** 47: 41-46.

_____. 1992b. Quality and compositional charistics of Newfoundland shellfish processing discard, pp.617-632. *In* C.J. Brine, P.A. Sandford and J.P. Zikakis, eds. **Advances in Chitin and Chitosan**. Elsevier Applied Science, London.

Shahidi, F. and Y.Y.A. J. Kamil. 2001a. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends Food Sci. Tech.** 12: 435–464.

_____. 2001b. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends Food Sci. Tech.** 12: 435–464. *Cited* I. Batista and M.L. Nunes. 1997. Preparation of enzymatic hydrolysis from fish wastes. pp. 59–70 *In* J. B. Luten, T. Borresen, & J. Oehlenschlager, eds. **Seafood from producer to consumer, integrated approach to quality**. Elsevier Applied Science, Amsterdam.

_____. 2001c. Enzymes from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry. **Trends Food Sci. Tech.** 12: 435–464. *Cited* T. Borresen. 1992. Biotechnology, by-products and aquaculture, pp. 278–287. *In* E. G. Bligh, ed. **Seafood Science and Technology**. Maston Book Services Ltd., Oxford, UK.

Shahidi. F., Metusalach and J.A. Brown. 1998a. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67.

Shahidi. F., Metusalach and J.A. Brown. 1998b. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* B. Czeczuga. 1979a. Carotenoid in fish. XIX. Carotenoids in the eggs of *Oncorhynchus keta* (Walbaum). **Hydrobiologia** 63: 45-47.

_____. 1998c. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* B. Czeczuga. 1979b. Carotenoid in fish. XX. Carotenoids in *Salmo gairdneri* Rich. and *Salmo trutt*a *morpha fario* L. **Hydrobiologia** 64: 251-259.

_____. 1998d. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* D.F. Cheesman, W.L. Lee and Zagalsky. 1967. Carotenoproteins in invertebrates. **Biol. Rev.** 42: 131-160.

_____. 1998e. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* G. Wald, N. Nathanson and W.P. Jencks. 1948. Crustacyanin, the blue carotenoid-protein of the lobster shell. **Biol. Bull.** 95: 249-250.

_____. 1998f. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* H.M. Fox and G. Vevers. 1960. **The Nature of Animal Colors**, 62 p.

_____. 1998g. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* J. Gross. 1991. **Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids**. Van Nostrand Reinhold, New York.

_____. 1998h. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* J. Terao. 1989. Antioxidant activity of β-carotene-related carotenoids in solution. **Lipids** 24: 659-661.

Shahidi. F., Metusalach and J.A. Brown. 1998i. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* R. Buchecker. 1982. A chemist's view of animal carotenoids, p. 175. *In* G. Britton and T.W. Goodwin, eds. **Carotenoid Chemistry and Biochemistry**. Pergamon Press, Oxford.

_____. 1998j. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* R.K. Muller, K. Bernhard, H. Mayer, A. Rutimann, and M. Vecchi. 1980. **Helv. Chim. Acta.** 63: 1654-1664.

_____. 1998k. Carotenoid pigments in seafoods and aquaculture. **Cri. Rev. Food Sci.** 38(1): 1-67. *Cited* T. Latscha. 1990. Carotenoids: **Their Nature and Significance in Animal Feeds**. Department of Animal Nutrition and Health, Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland.

Simpson, B.K. 2000. Digestive proteinases from marine animals, pp. 191-213. *In* N.F. Haard and B.K. Simpson, eds. **Seafood Enzymes: Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality.** Marcel Dekker, Inc., New York.

_____. 2002. **Seafood Enzyme Workshop.** Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Kasetsart University, Bangkok.

Simpson, B.K. and N.F. Haard. 1984. Purification and characterization of trypsin from the Greenland cod (*Gadus* sp.) 1 Kinetic and thermodynamic characteristics. **Can. J. Biochem. Cell Biol.** 62: 894-900.

_____. 1985 a. Characterization of the trypsin fraction from cunner (*Tautogolabrus adspersus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 80B(3): 475-480.

_____. 1985 b. The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. **J. Appl. Biochem.** 7: 212-222.

Simpson, B.K. and N.F. Haard. 1987 a. Cold adapted enzymes from fish, pp. 495-527. *In* D. Knorr, ed. **Food Biotechnology**. Marcel Dekker, New York.

_____. 1987 b. Trypsin and a trypsin-like enzymes from the stomachless cunner. **J. Agr. Food Chem.** 35: 652-654.

_____. 1990. Properties of trypsin from the pyloric ceca of Greenland cod (*Gadus morhua*). **J. Food Sci.** 55(4): 959-961, 971.

Simpson, B.K., N. Gogne, and M. Simpson. 1994. Bio-processing of chitin and chitosan, 155-175. *In* A.M. Martin, ed. **Fisheries Processing : Biotechnological Applications.** Chapman and Hall, London

Simpson, K.L. 1982. Carotenoid Pigments in Seafood, *pp*.115-136. *In* R.E. Martin, G.J. Flick, C.E. Hebard and D.R. Ward, eds. **Chemistry and Biochemistry of Marine Food Products**. AVI Publishing Company, Connecticut.

_____. 1983. Relative value of carotenoids as precursor of vitamin A. **Proc. Nutri. Soc.** 42: 7-17.

Snodderly, D.M. 1995. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **Am. J. Clin. Nutr.** 62(suppl): 1448S-1461S.

Spinelli, J., L. Lehman and D. Weig. 1974. Composition, processing and utilization of red crab (*Pleuroncodes planipes*) as an aquacultural feed ingredient. **J. Fish. Res. Bd. Can.** 31: 1025-1029.

Stefansson, G. 1988. Enzymes in the fishing industry. **Food Tech.** 42(3): 64-65.

Stepens, N.L., W.A. Bough, L.R. Beuchat and E.K. Heaton. 1976. Preparation and evaluation of two microbiological media from shrimp heads and hulls. **Appl. Environ. Microbiol.** 31: 1-6.

Stern, K.G. and K. Salomon. 1938. On ovoverdin, the carotenoid-protein pigment of the egg of lobster. **J. Biol. Chem.** 122: 461-475.

Stoll, V.S. and J.S.Blanchard. 1990. Buffer: principles and practice, pp. 24-38. *In* M.P. Deutscher, ed. **Guide to Protein Purification: Method in Enzymology**. Academic Press, Sandiego.

Storebakken, T. and H.K. No. 1992 Pigment of rainbow trout. **J. Aqua.** 100: 209-299.

Tacon, A.G.J. 1981. Speculative review of possible carotenoid function in fish. **Prog. Fish-Cult.** 43: 205-207.

Torrissen, O. J. and R. Christiansen. 1995. Requirements for carotenoids in fish diets. **J. Appl. Ichthyol.** 11:225-230.

Torrissen, O.J., R.W. Hardy and K.D. Shearer. 1989. Pigmentation of salmonids-carotenoid deposition and metabolism. **CRC Crit. Rev. Aquat. Sci.** 1: 209-225.

Trirekphan, C. 1997. **Production of Fish Protein Isolates from Fish Heads and Viscera**. M.S.Thesis, Prince of Songkla University.

Tsai, I.H., K.L. Chuang and J.L. Chuang. 1986. Chymotrypsin in digestive tracts of crustacean decapods (shrimps). **Comp. Biochem. Physiol.** 85B(1): 235-239.

Uchida, N., K. Tsukayama and E. Nishide. 1984. Purification and some properties of trypsins from the pyloric caeca of chum salmon. **Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.** 50(1): 129-138.

Vecchi, S.D. and Z. Coppes. 1996. Marine fish digestive proteases-relevance to food industry and the South-West Atlantic region-a review. **J. Food Biochem.** 20: 193-214.

Walsh, G. 2002. **Proteins: Biochemistry and Biotechnology**. John Wiley and Sons, Ltd. , Chichester, England.

Yoshinaka, R., M. Sato, T. Suzuki and S. Ikeda. 1984. Enzymatic characterization of anionic trypsin of the catfish (*Parasilurus asotus*). **Comp. Biochem. Physiol.** 77B(1): 1-6.

Zagalsky, P.F. and D.F. Cheesman. 1963. Purification and properties of crustacyanin. **Biochem. J.** 89: 1-21.

Zagalsky, P.F., E. E. Eliopoulos and J.B.C. Findlay. 1990. The architecture of invertebrate carotenoproteins. **Comp. Biochem. Physiol.** 97B: 1-18.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมคอลัมน์แอฟฟินิตี (affinity column)

ภาคผนวก ก

การเตรียมคอลัมน์แอฟฟินิตี (affinity column)

สารเคมี

1. Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B (Sigma C-9142)

2. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Analytical grade, Merck)

3. โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) (Analytical grade, Carlo)

4. สารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (Soybean Trypsin Inhibitor; SBTI) (Analytical grade, Sigma T-9128)

5. ไกลซีน (Glycine) (Analytical grade, Merck)

6. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (Analytical grade, Schalar)

3. โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) (Analytical grade, Merck)

วิธีการ

เตรียมคอลัมน์แอฟฟินิตีตามวิธีของ Simpson (2002) ดังนี้

1. แช่ Cyanogen Bromide Activated Sepharose 4B 2.5 กรัม ในสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 600 มิลลิลิตร ทิ้งให้เจลพองตัวเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นเทสารละลายไฮโดรคลอริกที่มีเจลอยู่ลงบนชุดกรองหัวทราย (sinter glass) โดยไม่ต้องใช้กระดาษกรอง เพื่อกรองเจลไว้

2. ล้างเจลในข้อ1 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (pH 8.3) ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร เพื่อปรับสภาพเจล โดยการเทสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตลงบนเจลที่อยู่บนชุดกรองหัวทราย ครั้งละ20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ คนเบา ๆ ให้สารละลายไหลผ่านลงไป ทำซ้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองเจลไว้

3. เตรียมสารละลาย SBTI โดยละลายสาร SBTI 80 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตรในหลอดเซนติฟิวขนาด 60 มิลลิลิตร เมื่อ SBTI ละลายดีแล้วจึงตักเจลมาใส่ในสารละลาย SBTI ปิดฝาแล้ววางลงบนเครื่องเขย่าแนวนอน เขย่าเบา ๆ ในเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อเคลือบเจลด้วย SBTI จากนั้นเทสารละลาย SBTI ที่มีเจลอยู่ลงบนชุดกรองหัวทรายโดยไม่ต้องใช้กระดาษกรอง เพื่อกรองเจลไว้

4. ล้างเจล ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร เพื่อล้าง SBTI ที่ไม่ได้จับอยู่กับเจลออกไป โดยการเทสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตลงบนเจลที่อยู่บนชุดกรองหัวทรายครั้งละ20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ คนเบา ๆ ให้สารละลายไหลผ่านลงไป ทำซ้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองเจลไว้

5. นำเจลมาใส่ในสารละลายสารไกลซีนเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (pH 8.0) 10 มิลลิลิตรในหลอดเซนตริฟิวขนาด 60 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ในแนวนอนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ไกลซีนจับกับ SBTI จากนั้นเทสารละลาย SBTI ที่มีเจลอยู่ลงบนชุดกรองหัวทรายโดยไม่ต้องใช้กระดาษกรอง เพื่อกรองเจลไว้

6. ล้างเจล ด้วยสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร เพื่อล้าง SBTI ที่ไม่ได้จับกับไกลซีนออกไป โดยการเทสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตลงบนเจลที่อยู่บนชุดกรองหัวทรายครั้งละ20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ คนเบา ๆ ให้สารละลายไหลผ่านลงไป ทำซ้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองเจลไว้

7. ล้างเจลด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.0 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ 100 มิลลิลิตร เพื่อล้างไกลซีนที่จับอยู่กับ SBTI ออกไป โดยการเทสารละลายโซเดียมอะซิเตต ลงบนเจลที่อยู่บนชุดกรองหัวทรายครั้งละ 20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ คนเบา ๆ ให้สารละลายไหลผ่านลงไป ทำซ้ำจนครบ 100 มิลลิลิตร แล้วกรองเจลไว้

8. ล้างเจลตามข้อ 6 และ 7 อีก 3 ครั้ง เพื่อให้เจลที่ได้เป็นเจลที่มีเพียง SBTI จับอยู่ และทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แล้วจึงเก็บเจลในสารละลายโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 8.3 ที่มี โซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ หรือบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 0.5 เซนติเมตร x 10 เซนติเมตร เพื่อเตรียมใช้งานต่อไป

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ภาคผนวก ข

การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ภาคผนวก ข1 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน

สารเคมี

1. N-α-Benzoyl-DL-Argenine-p-Nitroanilide (BAPNA) (Sigma B-4875)
2. Dimethyl Sulfoxfide (DMSO) (Analytical grade, Sigma)
3. Tris-(hydroxymethy)-aminomethane (Trizma base) (Analytical grade, Merck)
4. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Fluka)

วิธีการ

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทริปซิน ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al.* (1961)

1. เตรียมสารละลาย BAPNA ใน DMSO เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ โดยการละลาย BAPNA 0.0435 กรัม ใน DMSO 1 มิลลิลิตร

2. เติมสารละลาย BAPNA ใน DMSO เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตรลงในสารละลายบัฟเฟอร์ทริสเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 8.2 ที่มีแคลเซียมคลอไรด์อยู่ 0.02 โมลาร์ ปริมาตร 2.77 มิลลิลิตร บ่มสารละลายซับสเตรทไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 10 นาที

3. เติมสารละลายตัวอย่างเอนไซม์ที่แช่เย็นไว้ 200 ไมโครลิตร ลงในเซลบรรจุตัวอย่างควอตซ์ (quart cuvette) ซึ่งวางไว้ในช่องวัดตัวอย่างของเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ แล้วเติมสารละลายซับสเตรทที่บ่มไว้แล้วลงไปในเซลบรรจุตัวอย่างดังกล่าว วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรที่เปลี่ยนไปในเวลา 1 นาที คำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์ดังสมการ (Erlanger *et al*., 1961)

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์ (units/ml)} = \frac{(\Delta A410/\text{min} \times 3 \times 1000)}{8800 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)}}$$

$\Delta A410/\text{min}$ = ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตรที่เปลี่ยนไปในเวลา 1 นาที

8800 = ค่าคงที่ในการปลดปล่อย *p*-Nitroanilide

$$\text{กิจกรรมเฉพาะของเอนไซม์ (units/mg protein)} = \frac{\text{กิจกรรมของเอนไซม์(units/ml)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (mg/ml)}}$$

ภาคผนวก ข2 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน

สารเคมี

1. N-Succinyl-Alanine-Alanine-Proline-Phenyl-p- Nitroanilide (SAAPPNA) (Analytical grade, Sigma S-7388)
2. Dimethyl Sulfoxfide (Analytical grade, Sigma)
3. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Trizma base) (Analytical grade, Merck)
4. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) (Analytical grade, Fluka)

วิธีการ

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดัดแปลงจากวิธีของ Erlanger *et al* (1961) และ Rungruangsak-Torrisen and Sundby (2000)

1. เตรียมสารละลาย SAAPPNA ใน DMSO เข้มข้น 0.2 มิลลิโมลาร์ โดยการละลาย SAAPPNA 0.0124 กรัม ใน DMSO 1 มิลลิลิตร

2. ทำการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซิน และคำนวณค่ากิจกรรมของเอนไซม์เช่นเดียวกับในภาคผนวก ข1

ภาคผนวก ค

การตรวจวัดโปรตีนเชิงปริมาณและคุณภาพ

ภาคผนวก ค

การตรวจวัดโปรตีนเชิงปริมาณและคุณภาพ

ภาคผนวก ค1 การตรวจวัดปริมาณโปรตีน

สารเคมี

1. โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) (Analytical grade, Carlo)
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Analytical grade, Merck)
3. คอปเปอร์ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต ($CuSO_4 . 5 H_2O$) (Analytical grade, BDH)
4. โซเดียมซิเตรต (Sodium citrate)(Analytical grade, Merck)
5. Folin-Ciocaltey's phenol reagent (Analytical grade, Merck)
6. โบไวน์เซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin) (Analytical grade, Sigma) ใช้เป็นสารมาตรฐานโปรตีน (Heu *et al*., 1995)

วิธีการ

นำสารละลายเอนไซม์มาตรวจวัดปริมาณโปรตีนของเอนไซม์ ดัดแปลงจากวิธีของ Lowry *et al*. (1951) และ Peterson (1977)

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน ดังนี้

สารละลาย A ประกอบด้วย โซเดียมคาร์บอเนต 2 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล 100 มิลลิลิตร

สารละลาย B ประกอบด้วย คอปเปอร์ซัลเฟต เพนตะไฮเดรต 0.5 กรัม และ โซเดียมซิเตรต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

สารละลาย C ประกอบด้วย ส่วนผสมของสารละลาย A และ สารละลาย B ในอัตราส่วน 50 : 1 เตรียมใหม่ให้พอใช้ในแต่ละครั้ง สารละลายผสมที่ได้จะต้องใสและไม่มีตะกอน

สารละลาย D เตรียมโดยเติมน้ำกลั่นลงใน Folin-Ciocaltey's phenol reagent ในอัตราส่วน 1: 1 จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1 โมลาร์ เตรียมใหม่ให้พอใช้ในแต่ละครั้ง

ขั้นตอนในการตรวจวัดปริมาณโปรตีน

1. เติมสารละลาย C 3 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่าง 300 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

2. เติมสารละลาย D ลงไปในสารละลายข้อที่ 1 ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมของเหลว (vortex) แล้วตั้งทิ้งไว้ 20 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

3. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร และคำนวณปริมาณโปรตีนจากกราฟมาตรฐานของค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายโบไวน์เซรัมอัลบูมิน

ภาคผนวก ค2 การตรวจวัดโปรตีนเชิงคุณภาพ

การตรวจวัดโปรตีนเชิงคุณภาพโดยการการตรวจวัดน้ำหนักโมเลกุล และตรวจสอบความบริสุทธิ์ของตัวอย่างด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) และคู่มือการใช้ Mini-Protein®II Electrophoresis Cell ของ บริษัทไบโอ-ราด แลบบอราทอรี่ส์ จำกัด

สารมาตรฐานโปรตีน

1. สารมาตรฐานโปรตีน (Prestained SDS-PAGE Standards, high range, BioRad)

2. สารมาตรฐานโปรตีน (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas Life Science)

3. สารมาตรฐานโปรตีน (Sigma marker, low range, Sigma)

สารเคมี

1. Tris-(hydroxymethy)-aminomethane (Trizma base) (Analytical grade, Merck)

2. โซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) (Analytical grade, Biorad)

3. กลีเซอรอล (Glycerol) (Analytical grade, BDH)

4. ไกลซีน (glycine) (Analytical grade, Merck)

5. เมอแคบโตเอทานอล (2-Mercaptoethanol) (Analytical grade, Sigma)

6. 30% Acrylamide/ Bis Solution 37.5:1 (26%C) (Electrophoresis grade, BioRad)

7. N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Electrophoresis grade, BioRad)

8. แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) (Electrophoresis grade, BioRad)

9. โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol Blue) (Analytical grade, BDH)

10. Coomassie Brilliant Blue R-250 (Analytical grade, BDH)

11. เมทานอล (methanol) (Analytical grade, BDH)

12. กรดอะซีติก (acetic acid) (Analytical grade, Merck)

วิธีการ

เตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำอิเล็กโตรโฟริซีส ดังนี้

1. สารละลาย Stock Sample buffer ประกอบด้วย

Distilled deionized water	4.8	ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	1.2	ml
10% SDS	2.0	ml
Glycerol	1.0	ml
0.5% Bromophenol Blue	0.5	ml
2-Mercaptoethanol	0.5	ml

ผสมส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน สารละลาย Stock Sample buffer ที่เตรียมได้ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจวัดด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส โดยการผสมสารละลายตัวอย่างกับ Stock Sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงนำไปต้มเป็นเวลา 4 นาที

2. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ pH 6.8

ละลายทริส 6.06 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 6.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. สารละลายบัฟเฟอร์ทริสความเข้มข้น 1.5 โมลาร์ pH 8.8

ละลายทริส 18.17 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 8.8 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วจึงปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลาย 10% SDS

ละลาย SDS 10 กรัม ในน้ำ 100 มิลลิลิตร

5. สารละลาย Electrode buffer, pH 8.3

ละลายทริส 3.03 กรัม และไกลซีน 14.4 กรัม ในน้ำ 900 มิลลิลิตร คนให้สารละลาย และเข้ากัน แล้วจึงเติม10% SDS 10 มิลลิลิตร ลงไปอย่างเบามือ เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศ แล้วจึงปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ไม่ต้องวัด pH เนื่องจากสารละลายที่ได้จะมี pH 8.3 โดยประมาณ

6. สารละลาย Dye stain

ละลาย Coomassie Brilliant Blue R-250 0.1 กรัม ในเมทานอล400 มิลลิลิตร แล้วจึงผสมกับ กรดอะซีติก 100 มิลลิลิตร และน้ำ 500 มิลลิลิตร

7. สารละลาย Destain

ผสมเมทานอล 400 มิลลิลิตร กับ กรดอะซีติก 100 มิลลิลิตร และน้ำ 500 มิลลิลิตร

ขั้นตอนในการตรวจวัดโปรตีนเชิงคุณภาพด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส (SDS-PAGE)

1. ประกอบชุดกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟริซีส โดยให้กระจกทั้งสองแผ่นอยู่ห่างกัน 1 มิลลิเมตร จึงได้เจลมีความหนา 1 มิลลิเมตร

2. บรรจุสารละลายผสมของ Separating gel ในชุดกระจกของชุดอิเล็กโตรโฟริซีส ให้ผิวหน้าเจลอยู่ต่ำกว่าขอบกระจกประมาณ 1 เซนติเมตร (ประมาณ 4 .2 มิลลิเมตร) เททับหน้าเจลด้วยน้ำกลั่นเพื่อช่วยให้ผิวหน้าเรียบ รอจนเจลแข็งตัวใช้เวลาประมาณ 20 นาที แล้วจึงซับน้ำออกหมด

Stock solution	Final acrylamide concentration	
	Separating gel (12.5%)	Stacking gel (4%)
30% Acrylamide/ Bis	4.166 ml	0.33 ml
0.5 M Tris-HCl, pH 6.8	-	0.63 ml
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	-
10% Sodium Dodecyl Sulfate	100 µl	25 µl
Distilled Deionized Water	3.183 ml	1.5 ml
TEMED	10 µl	10 µl
10% Ammonium Persulfate	50 µl	25 µl

3. วาง comb ลงไประหว่างแผ่นกระจก และให้ดึง comb ขึ้นมาเล็กน้อยเพื่อให้สะดวกต่อการบรรจุเจล บรรจุสารละลายผสมของ Stacking gel ลงบนชั้นของ Separating gel (ประมาณ 0.75 มิลลิเมตร) เมื่อบรรจุเจลลงไปแล้วจึงจัด comb ให้วางให้เรียบร้อยอย่างรวดเร็วเนื่องจากเจลจะแข็งตัวเร็วมาก การวาง comb จะต้องวางให้ชั้นของ Separating gel อยู่ห่างจากปลาย comb อย่างน้อย 1 มิลลิเมตร เพื่อให้มีพื้นที่ให้เจลทั้งสองชั้นติดกัน

4. นำชุดกระจกที่มีเจลที่แข็งตัวแล้วมาประกอบกับชุดอิเล็กโตรโฟริซีสแล้ววางลงในอ่างบัฟเฟอร์ เทสารละลาย Electrode buffer ลงไปในอ่างบัฟเฟอร์ให้ท่วมแผ่นกระจกทั้งภายในและภายนอกระหว่างแผ่นกระจกทั้งสอง โดยจะใช้สารละลาย Electrode buffer ครั้งละประมาณ 800 มิลลิเมตร

5. ดึง comb ออก แล้วจึงบรรจุสารมาตรฐานและตัวอย่างสำหรับการทำอิเล็กโตรโฟริซีสลงในช่อง (well) ช่องละ 7 และ10 ไมโครลิตร ตามลำดับ

6. นำชุดอิเล็กโตรโฟริซีสมาประกอบกับชุดกระแสไฟ และให้ทำงานที่ 120 โวลต์ จนกระทั่งสีน้ำเงินของ Bromophenol Blue เคลื่อนที่มาที่ปลายกระจก เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที จึงหยุดการทำงาน

7. นำแผ่นเจลออกมาจากแผ่นกระจกและย้อมในสารละลาย dye stain หมั่นเขย่าในแนวนอนเบา ๆ เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง แล้วจึงล้างด้วย สารละลาย destain โดยแช่แผ่นเจลในสารละลาย 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที หมั่นเขย่าในแนวนอนเบา ๆ จนกระทั่งแผ่นเจลใสและเห็นแถบโปรตีนชัดเจน จึงล้างแผ่นเจลด้วยน้ำประปา 4 – 5 ครั้ง เพื่อหยุดปฏิกริยา แล้วทำเจลให้แห้ง เพื่อเก็บไว้ได้นาน

คำนวณการเคลื่อนที่ของโปรตีน (Relative mobility, R_f) จากสมการ

$$R_f = \frac{\text{ระยะทางที่โปรตีนเคลื่อนที่}}{\text{ระยะทางที่ Bromophenol Blue เคลื่อนที่}}$$

สร้างสมการและกราฟเส้นตรงจากความสัมพันธ์ของค่า R_f ของสารมาตรฐานโปรตีนต่อลอการิทึมของน้ำหนักโมเลกุลของสารมาตรฐานโปรตีน แล้วจึงนำค่า R_f ของตัวอย่างมาแทนค่าในสมการเพื่อหาค่าน้ำหนักโมเลกุล

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

ภาคผนวก ง1 การวิเคราะห์ความชื้น (MFRD, 1987)

วิธีการ

1. อบ aluminium can ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนัก นำไปอบต่ออีก 60 นาที ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักเพื่อให้น้ำหนักคงที่ ถ้าไม่คงที่ให้อบซ้ำอีกครั้ง
2. ชั่งตัวอย่างประมาณ 2-10 กรัม ลงใน aluminium can แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
3. นำไปอบอีกครั้งที่สภาวะเดิม ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

การคำนวณร้อยละของความชื้น

$$\text{ร้อยละของความชื้น} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}) \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ (กรัม)}}$$

ภาคผนวก ง2 การวิเคราะห์โปรตีน (MFRD, 1987)

สารเคมี

1. สารละลายกรดซัลฟุริกเข้มข้น (H_2SO_4) (Analytical grade, Merck)
2. สารเร่งปฏิกิริยา selenium reagent mixture (Analytical grade, Merck)
3. กรดบอริก (boric acid) (Analytical grade, Merck)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Analytical grade, Merck)
5. เมทิลเรด (methylred) (Analytical grade, BDH)
6. โบร โมครีซอลกรีน (bromocesol green) (Analytical grade, BDH)
7. เอทานอล (Ethanol) (Analytical grade, BDH)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 2 กรัม หรือสารละลายตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร และ Selenium reagent mixture ประมาณ 1 กรัมใส่ในขวดย่อย (Kjeldahl flask)

2. เติมกรดซัลฟุริกเข้มข้น 25 มิลลิลิตร นำไปย่อยโดยให้ความร้อนอ่อน ๆ ในระยะแรก แล้วค่อยเพิ่มความร้อนให้สูงขึ้น ย่อยจนได้สารละลายใสแล้วย่อยต่อไปอีก 30 นาที จึงยุติการย่อย

3. ปล่อยให้เย็นลงแล้วจึงนำไปกลั่นโดยใช้ ปริมาตรน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นร้อยละ 40 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดักจับไอกรดโดยใช้สารละลายกรดบอริคเข้มข้น 2 % ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่เติมอินดิเคเตอร์ผสม 2-3 หยด เป็นสารที่ใช้จับแอมโมเนียที่กลั่นได้ จนกระทั่งมีปริมาตรประมาณ 200 มิลลิลิตร สารละลายจะเปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีเขียวอ่อนหรือใสไม่มีสี

5. นำไปไตเตรทกับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ สารละลายจะเปลี่ยนจากสีเขียวอ่อนหรือใสไม่มีสีเป็นสีชมพู

การคำนวณร้อยละของโปรตีน

$$\text{ร้อยละของโปรตีน} = \frac{(B-C) \times A \times 0.014 \times 100 \times 6.25}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

เมื่อ A คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริก

B คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริกที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง

C คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟุริกที่ใช้ในการไตเตรต blank

ภาคผนวก ง3 การวิเคราะห์ไขมัน (AOAC, 2000)

สารเคมี

ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) (Analytical grade, BDH)

วิธีทำ

1. ชั่งน้ำหนักตัวอย่างที่แน่นอน (ตัวอย่างสด 5 กรัม) ใส่กระดาษกรอง นำไปอบให้แห้งแล้วพับใส่ใน thimble

2. อบและชั่งน้ำหนักของถ้วยสกัด (Cup) ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอน

3. เติมตัวทำละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ลงในถ้วยสกัด 50 มิลลิลิตร แล้วต่อเข้ากับเครื่องสกัด จากนั้นทำการสกัดไขมัน ประมาณ 15 นาที

4. นำถ้วยสกัดที่มีไขมันและตัวทำละลายที่ติดมาเล็กน้อยไประเหยตัวทำละลายออกให้หมด โดยใช้อุณหภูมิต่ำ ๆ จากนั้นปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วนำไปชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณร้อยละของไขมัน

$$\text{ร้อยละของไขมัน} = \frac{\text{น้ำหนักของไขมัน}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \times 100$$

ภาคผนวก ง4 การวิเคราะห์เถ้า (AOAC, 2000)

วิธีทำ

1. เผา crucible ในเตาเผาที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง นำออกจากเตาทิ้งไว้สักครู่ นำเข้าโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนกว่าน้ำหนักจะคงที่

2. ชั่งตัวอย่างให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน (ตัวอย่างสด 8-12 กรัม) ใส่ใน crucible ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน

3. เผา crucible จนกระทั่งหมดควัน จึงนำเข้าเตาเผา เผาที่อุณหภูมิ 500-550 องศาเซลเซียส จนกระทั่งตัวอย่างเปลี่ยนเป็นสีเทาทั้งหมด สีมีความเสมอกัน ใช้ประมาณ 6 ชั่วโมง ปิดเตาเผา แล้วรอให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 100 องศาเซลเซียส จึงนำออกจากเตาแล้ว นำเข้าโถดูดความชื้น ปล่อยให้เย็น ชั่งน้ำหนัก ทำซ้ำจนได้น้ำหนักคงที่

การคำนวณร้อยละของเถ้า

$$\text{ร้อยละของเถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างสด}} \times 100$$

ภาคผนวก ง5 การตรวจวัดปริมาณแคโรทีน ดัดแปลงมาจากวิธีของ Saito and Regier (1971) และ Sachindra *et al.* (2006a)

สารเคมี

1. เฮกเซน (Hexane) (Analytical grade, BDH)
2. ไอโซโพพานอล (Isopropanol) (Analytical grade, BDH)
3. ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether) (Analytical grade, BDH)

วิธีการ

เก็บตัวอย่างมาวัดปริมาณแคโรทีนโนโปรตีน โดยการนำสารละลายตัวอย่างมากรองผ่านผ้าขาวบาง จากนั้นนำสารละลายมาตกตะกอนโปรตีนโดยการทำให้อิ่มตัวด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 45 % กวนเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงแยกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 30 นาที นำตะกอนมาสกัดสารแคโรทีนด้วยสารผสมของเฮกเซนและไอโซโพพานอลในอัตราส่วน 2: 3 ในกรวยแยก เปลี่ยนสารสกัดและทำการสกัดไปจนกระทั่งสารละลายใสไม่มีสี รวมสารละลายที่ได้จากการสกัดที่มีสีส้มทั้งหมดมาระเหยสารสกัดออกให้หมดภายใต้ระบบสุญญากาศ ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แล้วจึงละลายสารที่เหลืออยู่ด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ 10 มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ที่สกัดได้ดังสมการ

$$C = \frac{\Delta A_{468nm} \times V \times D}{0.2 \times W}$$

โดยที่ ΔA_{468nm} คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร

C คือ ความเข้มข้นของสารแคโรทีนอยด์ (ไมโครกรัม/ กรัมตัวอย่าง)

V คือ ปริมาตรของปิโตรเลียมอีเทอร์ที่ใช้ละลายตัวอย่าง

D คือ dilution W คือ น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)

0.2 คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 468 นาโนเมตร ของสารมาตรฐานแอสตาแซนทีน (astaxanthin) เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/ มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

ภาคผนวก จ

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลอง (Stoll and Blanchard, 1990)

สารเคมี

1. กรดซิตริก (Citric acid) (Analytical grade, BDH)
2. โซเดียมซิเตรท (Sodium citrate) (Analytical grade, BDH)
3. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) (Analytical grade, BDH)
4. Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Trizma base) (Analytical grade, Merck)
5. ไกลซีน (Glycine) (Analytical grade, Merck)
6. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) (Analytical grade, Merck)
7. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) (Analytical grade, Merck)

1. Citrate-HCl buffer pH 2.0

เตรียม Stock solutions

A: สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลายกรดซิตริก 19.21 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

B: สารละลายโซเดียมซิเตรทเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลายโซเดียมซิเตรท 21.4 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A 60 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย B 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 2.0

2. Citrate-phosphate buffer

เตรียม Stock solutions

A: สารละลายกรดซิตริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์

B: สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 71.7 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

นำสารละลาย A และ B มาผสมกันตามอัตราส่วนให้ได้ pH ที่ต้องการ แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ปริมาณ A (ml)	ปริมาณ B (ml)	pH
30.7	19.3	4.0
17.9	32.1	6.0
6.5	43.6	7.0

3. Tris-HCl buffer pH 8.0

เตรียม Stock solutions

A: สารละลายทริสเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลาย Trizma base 12.1 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

B: สารละลายกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยเจือจางกรดไฮโรคลอริกเข้มข้น 8.28 มิลลิลิตรในน้ำ 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร เข้ากับสารละลาย B 26.8 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มี pH 8.0

4. Glycine-NaOH buffer

เตรียม Stock solutions

A: สารละลายไกลซีนเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลายไกลซีน 7.5 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

B: สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัมในน้ำ 1 ลิตร

นำสารละลาย A และ B มาผสมกันตามอัตราส่วนให้ได้ pH ที่ต้องการ แล้วเติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร

ปริมาณ A (ml)	ปริมาณ B (ml)	pH
50	8.8	9.0
50	32.0	10.0
50	50.0	11.0

ภาคผนวก ฉ

การประเมินต้นทุนการผลิต

ภาคผนวก ฉ

การประเมินต้นทุนการผลิต

การประเมินต้นทุนการผลิตครั้งนี้ประกอบด้วยต้นทุนทางตรง และต้นทุนทางอ้อม ต้นทุนทางตรงได้แก่ มูลค่าของ สารเคมี และวัสดุสิ้นเปลืองที่ใช้ในการทดลอง ส่วนต้นทุนทางอ้อมได้แก่ ค่าแรง ค่าไฟฟ้า ค่าน้ำ และมูลค่าเครื่องมือและอุปกรณ์ แต่เนื่องจากการคำนวณค่าแรง ค่าไฟฟ้า ค่าน้ำ และมูลค่าเครื่องมืออุปกรณ์ทำได้ยาก เนื่องจากไม่มีมิเตอร์วัดไฟฟ้า และน้ำที่ใช้เฉพาะอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง จึงรายงานเฉพาะรายการอุปกรณ์ และเครื่องมือซึ่งเป็นครุภัณฑ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

การประเมินต้นทุนการผลิตจะคำนวณตามขั้นตอนในการทำการทดลองดังนี้

1. การสกัดเอนไซม์จากไส้ปลานิล 1 กิโลกรัม	205	บาท
2. การทำเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินให้บริสุทธิ์	52,887	บาท
3. การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกราม 1 กิโลกรัม	382	บาท
รวมเป็นเงินทั้งหมด	53,474	บาท

1. การสกัดเอนไซม์

1.1 ต้นทุนทางตรง

สารเคมีในการเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ทริส 1 ลิตร

1) Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Trizma base)	6.06 กรัม	เป็นเงิน 39 บาท
2) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2.92 กรัม	เป็นเงิน 1 บาท
3) แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$)	2.22 กรัม	เป็นเงิน 1 บาท

1.2 ต้นทุนทางอ้อม

ค่าไฟฟ้าจากการใช้เครื่องมือ ดังนี้

1) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorious BP 3100 S

2) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส Methrom 410 pH meter

3) เครื่องเหวี่ยงแยกอุณหภูมิต่ำ Universal 32R Hettich Zentrifugen

4) เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า Corning Stirrer/ Hotplate

5) ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ดังนั้นต้นทุนในการสกัดเอนไซม์ (crude extract) จากลำไส้ปลานิล 1 กิโลกรัม จะใช้บัฟเฟอร์ 5 ลิตร คิดเป็นเงิน 205 บาท

2. การทำเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์ไคโมทริปซินให้บริสุทธิ์

2.1 ต้นทุนทางตรง

2.1.1 สารเคมีในการทำสารละลายเอนไซม์ (crude extract) 1 ลิตรให้บริสุทธิ์

1) สารละลายบัฟเฟอร์ทริส	20 ลิตร	เป็นเงิน	820 บาท
2) แอมโมเนียมซัลเฟต	412 กรัม	เป็นเงิน	265 บาท
3) อะซิโตน	1 ลิตร	เป็นเงิน	600 บาท
4) กรดไฮโดรคลอริก (HCl)		เป็นเงิน	350 บาท

2.1.2 วัสดุสิ้นเปลือง

1) เยื่อเลือกผ่าน (Spectra/Por 1 Dialysis Membrane)	เป็นเงิน	11,556 บาท
2) คอลัมน์แอฟฟินิตีโครมาโตกราฟี	เป็นเงิน	14,686 บาท
3) คอลัมน์เจลฟิลเตรชัน	เป็นเงิน	20,544 บาท
4) Amicon Ultra – 15 Centrifugal Filter Devices	เป็นเงิน	4,066 บาท

2.2 ต้นทุนทางอ้อม

ค่าไฟฟ้าจากการใช้เครื่องมือ ดังนี้

1) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorious BP 3100 S

2) เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง AND GR-200

3) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส Methrom 410 pH meter

4) เครื่องเหวี่ยงแยกอุณหภูมิต่ำ Universal 32R Hettich Zentrifugen

5) เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า Corning Stirrer/ Hotplate

6) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Shimadzu UV-1700 Spectrophotometer

7) เครื่องดูดสารเคมีอัตโนมัติ BioRad transfer pipette ขนาด 50-200 และ1000 μl

8) เครื่องดูดสารเคมีเข้าคอลัมน์อัตโนมัติ EYELA peristaltic pump

9) เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ Water fraction collector

10) ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

11) ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

ดังนั้นต้นทุนในการทำเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ไคโมทริปซินจากลำไส้ปลานิล 1 กิโลกรัม ให้บริสุทธิ์ คิดเป็นเงิน 52,887 บาท

3. การสกัดแคโรทีโนโปรตีน

3.1 ต้นทุนทางตรง

1) ไดโซเดียมอีดีทีเอ (EDTA disodium salt)	558.6 กรัม	เป็นเงิน 195 บาท
2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	60 กรัม	เป็นเงิน 21 บาท
3) แอมโมเนียมซัลเฟต	258 กรัม	เป็นเงิน 166 บาท

3.2 ต้นทุนทางอ้อม

ค่าไฟฟ้าจากการใช้เครื่องมือ ดังนี้

1) เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง Sartorious BP 3100 S

2) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส Methrom 410 pH meter

3) เครื่องเหวี่ยงแยกอุณหภูมิต่ำ Universal 32R Hettich Zentrifugen

4) เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า Corning Stirrer/ Hotplate

6) โถปั่น Stainless Waring Commercial Blender

8) เครื่องเขย่าในแนวนอน GFL 3005 shaker

9) ตู้ควบคุมอุณหภูมิ Sanyo Growth Cabinet

10) ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ดังนั้นต้นทุนในการสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากหัวกุ้งก้ามกราม 1 กิโลกรัม จะใช้สารสกัด 3 ลิตร คิดเป็นเงิน 382 บาท

ตารางผนวกที่ 1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตตัว ที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

Initial concentration of ammonium sulfate (percentage	Final concentration of Ammonium Sulfate : Percentage Saturation at 0 °C Percentage saturation at o°C																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
	Solid ammonium sulfate (grams) to be added to 1 liter of solution																
0	106	134	164	194	226	258	291	326	361	398	436	476	516	559	603	650	697
5	79	108	137	166	197	229	262	296	331	368	405	444	484	526	570	615	662
10	53	81	109	139	169	200	233	266	301	337	374	412	452	493	536	581	627
15	26	54	82	111	141	172	204	237	271	306	343	381	420	460	503	547	592
20	0	27	55	83	113	143	175	207	241	276	312	349	387	427	469	512	557
25		0	27	56	84	115	146	179	211	245	280	317	355	395	436	478	522
30			0	28	56	86	117	148	181	214	249	285	323	362	402	445	488
35				0	28	57	87	118	151	184	218	254	291	329	369	410	453
40					0	29	58	89	120	153	187	222	258	296	335	376	418
45						0	29	59	90	123	156	190	226	263	302	342	383
50							0	30	60	92	125	159	194	230	268	308	348
55								0	30	61	93	127	161	197	235	273	313
60									0	31	62	95	129	164	201	239	279
65										0	31	63	97	132	168	205	244
70											0	32	65	99	134	171	209
75												0	32	66	101	137	174
80													0	33	67	103	139
85														0	34	68	105
90															0	34	70
95																0	35
100																	0

ที่มา : Englard and Seifter (1990)

ตารางผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	2	165.42	82.71	30.13**
TIME	4	83.78	20.94	7.63**
ERROR	8	21.96	2.74	
TOTAL	14	271.16		

CV = 3.30 %

** มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณแคโรทีนอยด์ในแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	2	890.10	445.05	157.61**
TIME	4	174.20	43.55	15.42**
ERROR	8	22.59	2.82	
TOTAL	14	1086.89		

CV = 5.64%

** มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในแคโรทีโนโปรตีนที่ได้จากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	2	59.27	29.635	105.84**
TIME	4	9.82	2.455	8.77**
ERROR	8	2.24	0.28	
TOTAL	14	71.33		

CV = 13.25% ** มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณส่วนที่เหลือจากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	2	181.87	90.93	32.71**
TIME	4	84.75	21.19	7.62**
ERROR	8	22.24	2.78	
TOTAL	14	288.86		

CV = 3.41%

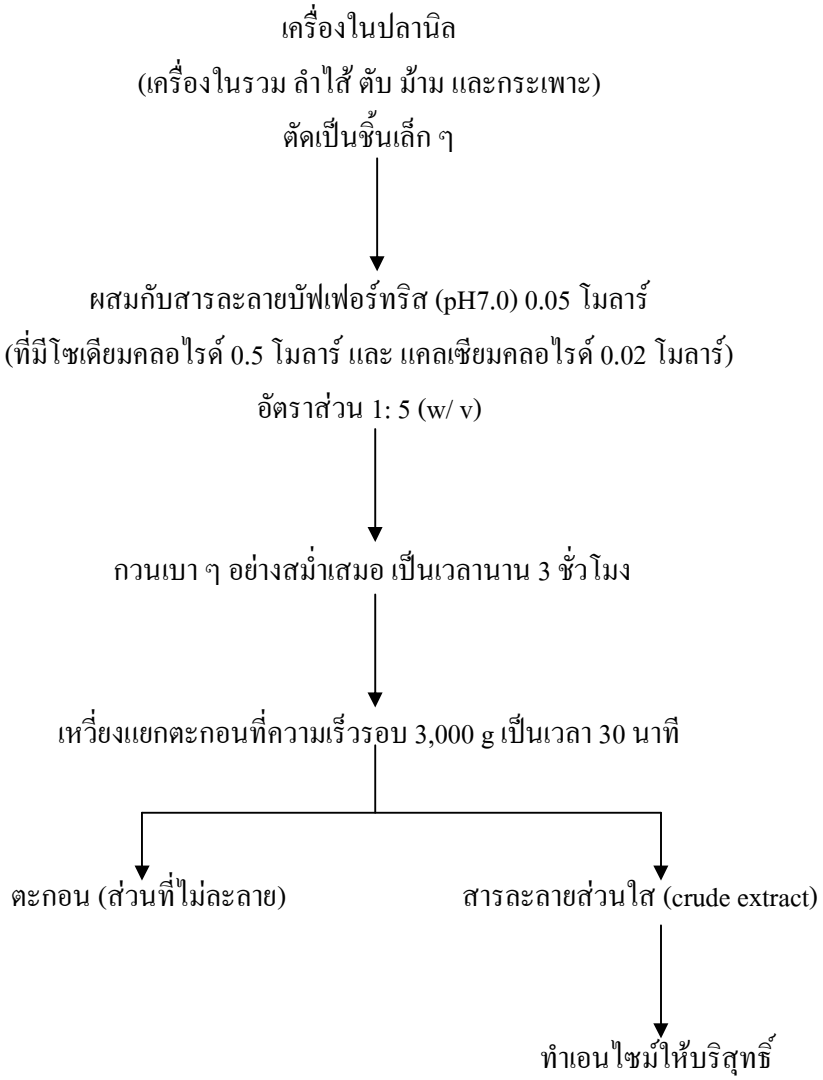
** มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณโปรตีนในส่วนที่เหลือจากการย่อยหัวกุ้งก้ามกราม

SV	DF	SS	MS	F
TREATMENT	2	1.76	0.88	117.33**
TIME	4	0.41	0.10	13.67**
ERROR	8	0.06	0.01	
TOTAL	14	2.23		

CV = 9.80%

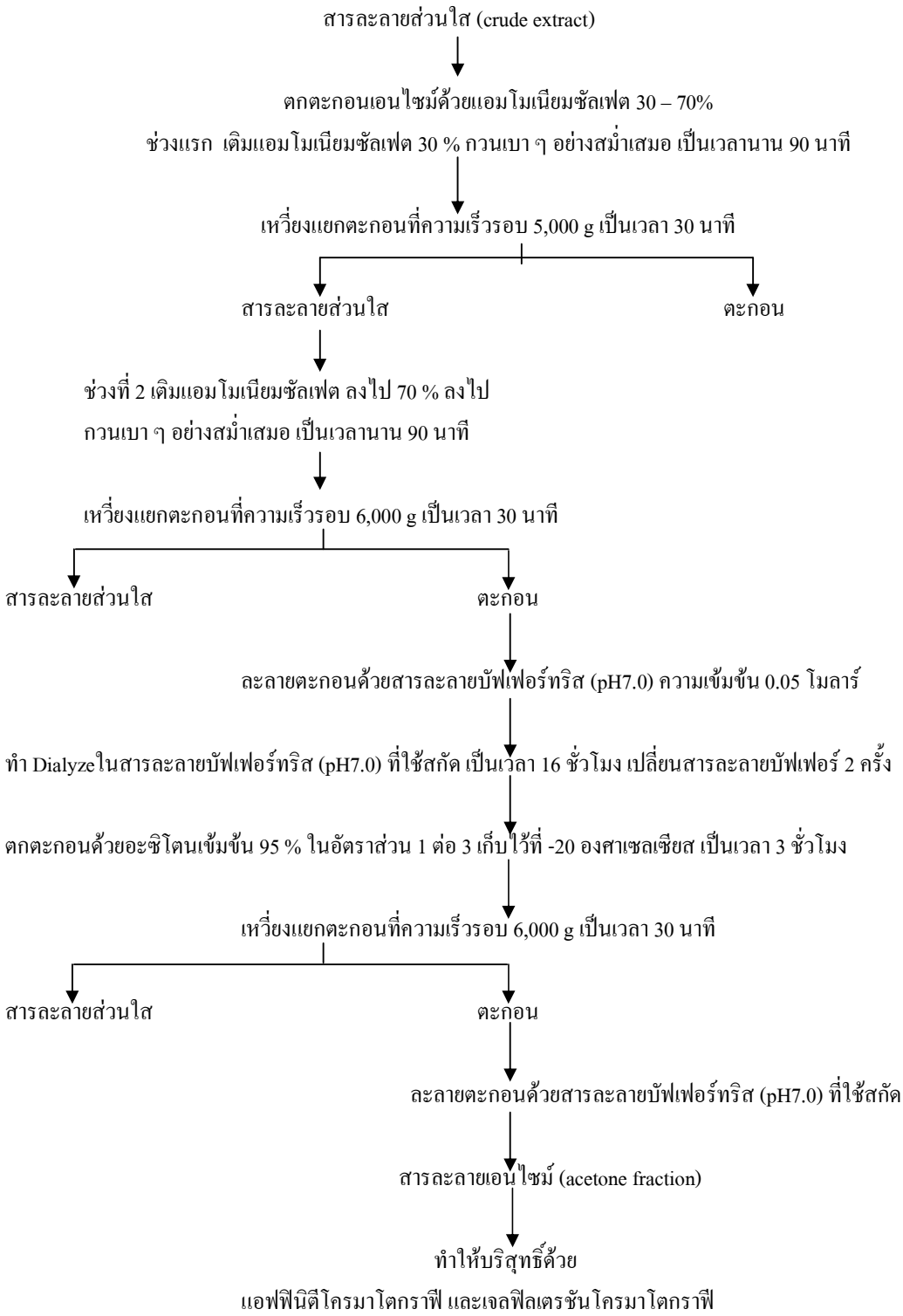
** มีความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.01$)



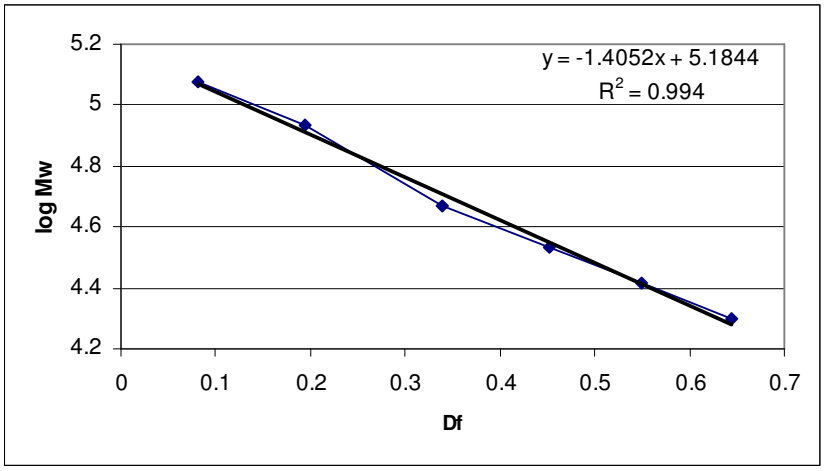
ภาพผนวกที่ 1 วิธีการสกัดเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิล

หมายเหตุ ทำการทดลองภายใต้ภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส

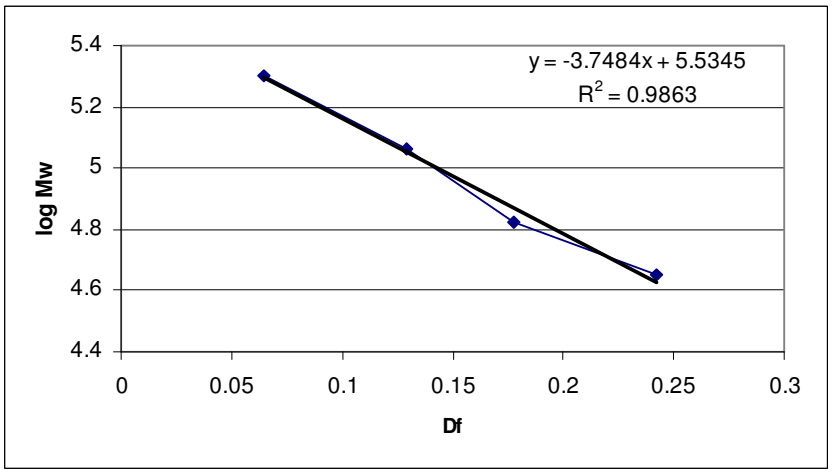
ที่มา: ดัดแปลงจากวิธีของ Simpson and Haard (1985a)



ภาพผนวกที่ 2 วิธีการทำเอนไซม์จากอวัยวะภายในของปลานิลให้บริสุทธิ์



ภาพผนวกที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล และ Df ของสารมาตรฐานโปรตีน(fermentas Life Science, SM0441)



ภาพผนวกที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างค่า log ของน้ำหนักโมเลกุล และ Df ของสารมาตรฐานโปรตีน (BioRad, 161-0309)

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวจีรภา หินซุย
วัน เดือน ปี ที่เกิด	28 กรกฎาคม 2516
สถานที่เกิด	กรุงเทพฯ
ประวัติการศึกษา	2539 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เคมีการเกษตร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2545 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนพัฒนาอาจารย์วิทยาเขตสารสนเทศกระบี่ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์