ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์การอาหาร | วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดเพื่อผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

Application of Crude Proteolytic Enzyme Extract from Duck Intestine and Pancreas for Production of Egg White Protein Hydrolysate

นามผู้วิจัย นางสาวโสภิดา ปัญญานวล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์สายพิณ ทานัชฌาสัย, D.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณี จิรภาคย์กุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

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

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดเพื่อผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

Application of Crude Proteolytic Enzyme Extract from Duck Intestine and Pancreas for Production of Egg White Protein Hydrolysate

โดย

นางสาวโสภิดา ปัญญานวล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โสภิดา ปัญญานวล 2556: การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดเพื่อผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร, Ph.D. 122 หน้า

ในการทดลองนี้ศึกษาการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดในการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต เปรียบเทียบกับปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีการใช้ในการย่อยไข่ขาว โดยสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูง และคงตัวดีที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (°ซ) ที่สภาวะนี้สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีค่ากิจกรรม 0.20±0.01 หน่วย/มก.เอนไซม์ จึงเลือกเป็นสภาวะเพื่อใช้ผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต สำหรับปาเปนใช้สภาวะการย่อยโปรตีนไข่ขาวที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 40°ซ โดยการย่อยจะเตรียมสารละลายโปรตีนไข่ขาว 5.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปศึกษาการให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาที พบว่าความหนืดของสารละลายโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และมีการเกิดเจลโปรตีนเมื่อให้ความร้อนนาน 25 นาที จึงเลือกการให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 20 นาที โดยสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ผ่านความร้อนจะนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปนมาผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตโดยศึกษาระยะเวลาการย่อยที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง และเติมเอนไซม์ดังกล่าวในอัตราส่วน 1 หน่วยต่อ 50 มก.โปรตีน พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ให้ผลได้ของของแข็ง และปริมาณไนโตรเจนคืนกลับในไฮโดรไลเสตสูงกว่าการใช้ปาเปน ($p \leq 0.05$) ทุกระยะเวลาการย่อย ซึ่งการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์จะได้ไฮโดรไลเสตที่มีปริมาณเปปไทด์ขนาดโมเลกุลใหญ่ (45-200 กิโลดาล-ตัน) ลดลง และมีเปปไทด์โมเลกุลขนาดเล็ก (14-21 กิโลดาลตัน) เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น (1-8 ชั่วโมง) ขณะที่การใช้ปาเปนจะได้ไฮโดรไลเสตที่ประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 31 กิโลดาลตัน โดยระยะเวลาการย่อยไม่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของโปรตีน ทั้งนี้โปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาว คือ ไลโซไซม์ โอโวมิว-คอยด์ โอวัลบูมิน และโอโวทรานส์เฟอร์ริน มีขนาดโมเลกุล 14.3, 28, 45 และ 78 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งโปรตีนเหล่านี้มีปริมาณลดลงหลังการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน สำหรับการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์และปาเปนร่วมกันในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต เปรียบเทียบกับการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ หรือปาเปนเพียงอย่างเดียวพบความแตกต่างของระดับการย่อยสลาย ดังนี้ 9.52 เปอร์เซ็นต์ (เอนไซม์ 2 ชนิดร่วมกัน) 3.06 เปอร์เซ็นต์ (เอนไซม์จากไส้และตับอ่อน) และ18.77 เปอร์เซ็นต์ (ปาเปน) การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนไข่ขาวทำให้ได้เปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กซึ่งทำให้ลดปริมาณโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาว จึงนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสำหรับผู้บริโภคบางกลุ่มได้ โดยปาเปนเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการลดขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาว อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบของเอนไซม์ก็สามารถใช้ผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตได้แต่ต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยเพิ่มเติมต่อไป

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต **ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Sopida Panyanuan 2013: Application of Crude Proteolytic Enzyme Extract from Duck Intestine and Pancreas for Production of Egg White Protein Hydrolysate. Master of Science (Food Science), Major Field: Food Science, Department of Food Science and Technology. Thesis Advisor: Associate Professor Wunwiboon Garnjanagoonchorn, Ph.D. 122 pages.

In this study, proteolytic enzyme from duck intestine and pancreas were extracted and used to hydrolyze chicken egg white protein. The hydrolysis results were compared with commercial papain. The crude enzyme powder showing high proteolytic activity and stability at pH 8.0 and 50°C with activity of 0.20±0.01 unit/mg enzyme. Therefore, this condition was used for egg white proteins digestion. Moreover, pH 7.0 and 40°C was provided for papain digestion. Heating time (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 minutes) at 75°C were studied to unfold egg white proteins concentration of 5.5% prior to digestion. Significant increases ($P \leq 0.05$) in viscosity of protein solutions with increasing heating time and gel formation were observed after 25 minutes. Therefore, heating at 75°C for 20 minutes was carried then the solution was diluted to a protein concentration of 2%. Hydrolysis of egg white proteins with crude enzyme and papain (1unit/50mg egg white proteins) at various hydrolysis times of 1, 2, 4, 6 and 8 hours were carried out at optimum conditions of individual enzyme. The results showed that yield (%) and nitrogen recovery (%) of crude enzyme digested hydrolysate were higher than those from papain digestion ($p \leq 0.05$). Moreover, both crude enzyme and papain could produce hydrolysates containing small peptides. Hydrolysis of egg white protein with crude enzyme produced a decrease in high molecular weight peptides (45-200 kDa) composition with an increase in low molecular weight peptides (14-21 kDa) when increasing hydrolysis time (1-8 hours). Papain digestion produced hydrolysate containing peptides with molecular weight less than 31 kDa and showed no change with time of hydrolysis. Molecular weight pattern of egg white hydrolysate prepared either with crude enzyme or papain showed reduction of protein bands intensity at 14.3, 28, 45 and 78 kDa (presuming lysozyme, ovomucoid, ovalbumin and ovotransferrin, respectively) which indicated the reduction of allergenic proteins. Hydrolysis of egg white proteins using crude enzyme followed by papain showed difference of degree of hydrolysis (DH) when compared with either crude enzyme or papain (9.52% crude enzyme followed by papain; 3.06% crude enzyme; 18.77% papain). Produced hydrolysates, which composed of small amount of allergenic egg white proteins, could be used as a food ingredient for hypersensitive consumer. Thus papain showed high efficiency in reducing molecular weight of egg white protein in to small peptides. However, crude enzyme from duck intestine and pancreas could also be used but required further study.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ดร.สายพิณ ทานัชฌาสัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาช่วยเหลือให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการทำการวิจัย ตลอดจนสละเวลาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณี จิรภาคย์กุล ประธานการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ตรวจแก้ไขให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บริษัท ซีพีเอฟ ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ไส้และตับอ่อนของเป็ดสำหรับการทำวิจัย รวมถึงขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ของทางบริษัท คุณกาญจนา พันสนิท ที่ได้อำนวยความสะดวกและเป็นธุระในการติดต่อประสานงาน ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร เจ้าหน้าที่อาคารแปรรูป ที่อำนวยความสะดวก ให้ความรู้ และแนะนำในการใช้เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการศึกษางานวิจัย

ขอบคุณ เจี๊ยบ พี่เอก พี่จา นุ่น น้องแป้ง น้องฝน แหม่ม ฟาง พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ สมาชิกห้องปฏิบัติการ 2314 รวมถึงนิสิตปริญญาโทและเอก สาขาวิทยาศาสตร์การอาหารทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือในการทำงานวิจัย และเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณป๊า แม่ และสมาชิกในครอบครัวทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ให้การสนับสนุนกำลังทรัพย์ และเป็นกำลังใจที่สำคัญตลอดระยะเวลาในการศึกษาจนงานวิจัยได้สำเร็จลุล่วง

โสภิดา ปัญญานวล

มกราคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	43
อุปกรณ์	43
วิธีการ	49
ผลและวิจารณ์	60
สรุปและข้อเสนอแนะ	92
สรุป	92
ข้อเสนอแนะ	93
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	94
ภาคผนวก	107
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	122

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	วัสดุเศษเหลือจากสัตว์ปีกและแนวทางการใช้ประโยชน์	5
2	ค่าพีเอชของระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีก	7
3	กิจกรรมของเอนไซม์สำคัญในระบบย่อยอาหาร	9
4	ความยาวของลำไส้ และน้ำหนักของอวัยวะภายในของเป็ดป่าน้ำหนักตัว 2.56 กิโลกรัม (Mallard ducks) อายุ 42 วัน	11
5	กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในส่วนต่างๆของลำไส้ไก่	13
6	กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารบางส่วนของเป็ด	13
7	สมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิด	27
8	องค์ประกอบ สมบัติทางเคมี และกายภาพของโปรตีนไข่ขาว	29
9	สมบัติเชิงหน้าที่และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต	37
10	ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดในรูปของสารละลาย และผงแห้ง	62
11	องค์ประกอบทางเคมีของไข่ขาวสด	71
12	ลักษณะปรากฏ อุณหภูมิ และค่าความหนืด ของสารละลายไข่ขาวเมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิ 75°ซ ที่ระยะเวลาต่างๆ	76
13	ผลของระยะเวลาต่อปริมาณไนโตรเจนคืนกลับของโปรตีนไข่ขาวไฮโดร-ไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน	81
14	ผลได้ของของแข็ง ไนโตรเจนคืนกลับ และระดับการย่อยสลายของไฮโดร-ไลสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปน	89

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	อัตราส่วนสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating gel และ Stacking gel	121

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีก	6
2	โครงสร้างของลำไส้เล็ก	12
3	ลักษณะของเนื้อเยื่อใต้เยื่อบุเมือก (submucosa) และเยื่อบุเมือกลำไส้ (mucosa)	12
4	การย่อยพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอสแบบเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส	23
5	กระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์	36
6	กระบวนการทั่วไปในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต	38
7	ขั้นตอนการเกิดเจลของโปรตีนไข่ขาวด้วยความร้อน	40
8	ไส้และตับอ่อนของเป็ดพันธุ์เชอร์รี่วัลเล่ย์อายุ 42-43 วัน ก่อนและหลังทำความสะอาด	60
9	สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลายและผงแห้งที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ด	61
10	ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิ 37°ซ	63
11	ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่พีเอช 8	65
12	ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิ 60°ซ	66
13	ความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่พีเอชต่างๆ	68
14	ความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิต่างๆ	69
15	ไข่ขาวสดและสารละลายไข่ขาวความเข้มข้นโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อนให้ความร้อน	71

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
16	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในไข่ขาวสด	72
17	สารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°ซ ที่ระยะเวลาต่างๆ	75
18	ผลของระยะเวลาต่อผลได้ของของแข็งในโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน	80
19	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเมื่อผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่ระยะเวลาต่างๆ	84
20	แผ่นเจลแบบ SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดร-ไลเสต เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆ	85
21	โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเมื่อผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่เวลาต่างๆ	87
22	โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่เวลาต่างๆ	87
23	แผ่นเจล SDS-PAGE แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปน	90

ภาพผนวกที่

1	กราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน	110
2	กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน	112

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดเพื่อผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

Application of Crude Proteolytic Enzyme Extract from Duck Intestine and Pancreas for Production of Egg White Protein Hydrolysate

คำนำ

การย่อยสลายโปรตีน (protein hydrolysis) เป็นวิธีในการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนโดยการสลายพันธะเปปไทด์ด้วยกรด เบส หรือเอนไซม์เพื่อให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้เป็นกรดแอมิโน และเปปไทด์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้เรียกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต (Howell, 1996) ซึ่งจะมีสมบัติเชิงหน้าที่ (functional properties) และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive properties) ที่ดีขึ้น ไฮโดรไลเสตมีการใช้ประโยชน์โดยนำไปผสมในอาหารสัตว์ (Raju *et al*., 1997) หรือใช้เติมในอาหารเพื่อปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหาร เนื่องจากไข่ขาวเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง ไขมันต่ำ และประกอบด้วยกรดแอมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด แต่ไข่ขาวมีความหนืดสูง และไม่เสถียรเมื่อโดนความร้อนจากกระบวนการแปรรูป (Yujie *et al*., 2006) การย่อยไข่ขาวเพื่อให้ได้กรดแอมิโน เปปไทด์ และโปรตีนโมเลกุลเล็ก ทำให้ไข่ขาวทนต่อการแปรรูปที่อุณหภูมิสูงได้ และเมื่อบริโภคจะสามารถดูดซึมได้ดีในระบบย่อยอาหารของคนและสัตว์ นอกจากนี้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตยังมีสมบัติการต้านออกซิเดชันสูง (Kovacs-Nolan *et al*., 2005; Graszkiewicz *et al*., 2007) มีผลในการป้องกันและยับยั้งเบาหวานชนิดที่ 2 (Amerongen *et al*., 2009) ลดอาการแพ้ไข่ขาว (López-Expósito *et al*., 2008; Cho *et al*., 2009) สำหรับการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตนิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อย โดยเฉพาะปาเปนเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้มากเนื่องจากให้ไฮโดรไลเสตที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ และการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี (Lee and Chen, 2002; Chen and Chi, 2011; Chen *et al*., 2012ab) อย่างไรก็ตามข้อเสียของการใช้เอนไซม์โปรติเอสทางการค้าซึ่งมักมีความบริสุทธิ์สูงคือค่าใช้จ่าย เนื่องจากเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มักมีราคาสูงจึงเป็นแรงจูงใจในการหาแหล่งเอนไซม์ที่มีราคาถูก

โดยทั่วไปไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกเป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสหลายชนิด คือ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) อีลาสเตส (elastase) และแอมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) (Guyonnet *et al*., 1999; Jamdar and Harikumar, 2005; Zhao *et al*.,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2007; Han *et al*., 2008) ทั้งนี้เอนไซม์โปรติเอสมีการใช้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสต มีนักวิจัยหลายท่านนำเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่มาใช้ประโยชน์ เช่น ใช้ในการไฮโดรไลซ์โปรตีนถั่วเหลือง (Jamdar and Harikumar, 2005) และลดรสขมในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (Damle *et al*., 2010a) เป็นต้น แต่สำหรับในไส้และตับอ่อนของเป็ดยังไม่พบรายงานการนำเอนไซม์ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ ในประเทศไทยไส้และตับอ่อนของเป็ดใช้เป็นอาหารสัตว์ และบางส่วนเป็นอาหารคนซึ่งเห็นว่าการใช้ประโยชน์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดยังไม่กว้างขวาง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำไส้และตับอ่อนของเป็ดมาเตรียมเอนไซม์โปรติเอส และทำการเปรียบเทียบกับเอนไซม์ทางการค้าในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากไข่ขาว โดยศึกษาคุณภาพทางเคมี และกายภาพของไฮโดรไลเสตที่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. ศึกษากิจกรรมการทำงาน และความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

2. ศึกษาระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาวสำหรับใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

3. ศึกษาผลของการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

เป็ด

ปัจจุบันเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียตะวันออกไกล ได้แก่ ประเทศจีนตอนใต้ อินโดนีเซีย ไทย บังคลาเทศ ฟิลิปปินส์ และไต้หวัน มีการเลี้ยงเป็ดหนาแน่นที่สุดของโลก โดยเป็ดที่เลี้ยงแบ่งตามแหล่งกำเนิดได้เป็น 2 กลุ่ม คือ เป็ดบ้านหรือกลุ่มที่สืบเชื้อสายมาจากเป็ดป่า (Mallard; *Anas platyrhynchos*) ได้แก่ พันธุ์ปักกิ่ง กากีแคมเบลล์ และเชอรี่วัลเลย์ และกลุ่มที่เรียกว่าเป็ดเทศ (Muscovy; *Cairina moshata*) ซึ่งเป็นเป็ดพันธุ์พื้นเมืองของอเมริกาใต้ (พินิจ, 2530; ไพโรจน์, 2531) จากสถิติ ณ วันที่ 1 มกราคม 2550 ประเทศไทยมีประชากรเป็ดเนื้อและเป็ดไข่รวม 24.95 ล้านตัว โดยเลี้ยงกันมากในเขตจังหวัดนครปฐม ชลบุรี สุพรรณบุรี และนครราชสีมา (กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2551) โดยเป็ดเชอรี่วัลเลย์เป็นเป็ดที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีการเจริญเติบโตเร็ว เพื่อตอบสนองความต้องการของตลาด ในประเทศไทยนิยมเลี้ยงเพื่อการค้าและการส่งออก (สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร, 2546) โดยเป็ด 1 ตัว ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.2 กิโลกรัม เมื่อฆ่าและชำแหละแล้วจะได้น้ำหนักซาก 2.46 กิโลกรัม หรือ 76.9 เปอร์เซ็นต์ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2546)

1. แนวทางการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของสัตว์ปีก (Utilization of poultry by-products)

วัตถุดิบที่เหลือภายหลังจากการจำหน่ายเนื้อสัตว์ปีกส่วนที่บริโภคได้ ได้แก่ มูลสัตว์ ขน กระดูก เลือด เครื่องใน หัว และเท้า (Barbut, 2002; Jayathilakan *et al*., 2012) สำหรับเป็ดจะมีวัสดุเศษเหลือ 58 เปอร์เซ็นต์ (Ockerman and Hansen, 2000) ซึ่งเป็นเครื่องใน 8.7 เปอร์เซ็นต์ต่อตัว (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2546) โดยวัสดุเศษเหลือมักก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม ควรต้องมีวิธีจัดการอย่างถูกต้อง ตัวอย่างการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือของสัตว์ปีกดังตารางที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 วัสดุเศษเหลือจากสัตว์ปีกและแนวทางการใช้ประโยชน์

ชนิดของวัสดุเศษเหลือ	ปริมาณเทียบกับน้ำหนักขณะมีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	การใช้ประโยชน์
ขน	7-8	ใช้เป็นไส้ที่นอน หมอน ทำปุ๋ย และอาหารสัตว์
หัว	2.5-3.0	รับประทาน
เลือด	3.2-3.7	รับประทาน
กึ๋น และ โปรเวนตริคูลัส	3.5-4.2	รับประทาน เป็นแหล่งของเอนไซม์ chitinolytic
เท้า	3.5-4.0	ทำซุป Poultry grease
ลำไส้ และต่อมต่างๆ (glands)	8.5-9.0	แหล่งสกัดฮอร์โมน และเอนไซม์

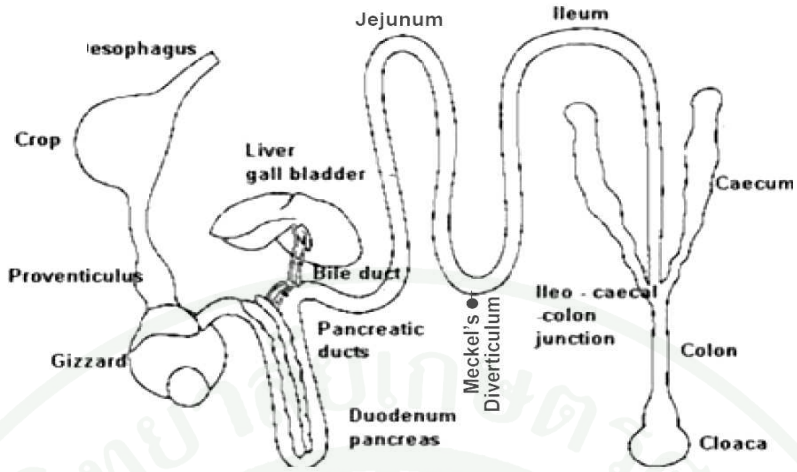
ที่มา: ดัดแปลงจาก Jayathilakan *et al*. (2012)

ลำไส้ กึ๋น โปรเวนตริคูลัส และตับอ่อนของสัตว์ปีก ประกอบด้วยสารสำคัญได้แก่ ฮอร์โมน และเอนไซม์ที่ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ ทั้งนี้ได้มีการนำส่วนดังกล่าวมาใช้ประโยชน์ โดย Damle *et al*. (2010a) นำเยื่อบุเมือก (mucosa) ของไส้ไก่มาตรึงรูป (immobilized) ด้วยอัลจิเนท เพื่อใช้ในการเตรียมโปรตีนไฮโดรไลเสตของเคซีนและโปรตีนถั่วเหลือง ขณะที่ Raju *et al*. (1997) ใช้ประโยชน์จากเอนไซม์โปรติเอสในไส้ไก่ โดยนำมาย่อยวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง ซึ่งโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้สามารถใช้เป็นส่วนผสมในอาหารของสัตว์ปีกและปลา

2. ระบบย่อยอาหารและเอนไซม์ในสัตว์ปีก

หน้าที่หลักของระบบย่อยอาหาร คือการเปลี่ยนอาหารที่กินเข้าไปให้กลายเป็นสารอาหาร เพื่อซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ เจริญเติบโต และขยายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการย่อยอาหารประกอบด้วยกระบวนการทางกายภาพ คือ การกลืน การย่อย และการบด ส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่กระเพาะอาหาร และกระบวนการทางชีวเคมี คือ การย่อยด้วยเอนไซม์ ส่วนใหญ่เกิดขึ้นภายในลำไส้เล็ก (Santos Junior, 2005; Lüüs, 2009) ระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีกแสดงดังภาพที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 ระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีก

ที่มา: Santos Junior (2005)

Randall *et al*. (2001) กล่าวว่าระบบย่อยอาหารประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ดังนี้

การกินอาหาร (Headgut) คือการรับอาหารผ่านทางช่องเปิด ซึ่งขั้นตอนนี้มีการเคี้ยวและกลืน โดยสัตว์ปีกใช้ลิ้นและจงอยปากในการนำอาหารเข้าปาก ในปากจะมีต่อมน้ำลาย (salivary gland) ทำหน้าที่ขับเอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลส (α-amylase) และเมือก (mucus) สำหรับช่วยหล่อลื่นในการกลืน อย่างไรก็ตามสัตว์ปีกไม่มีฟันจึงมีหลอดอาหาร (esophagus) เพื่อรองรับอาหารที่ยังไม่ได้เคี้ยว (เพทาย, 2538)

การกลืน การเก็บ และการย่อยอาหาร (Foregut) ส่วนนี้คือส่วนที่ต่อจากปากประกอบด้วยหลอดอาหาร ทางเดินอาหาร และกระเพาะอาหาร เมื่ออาหารเดินทางจากปากมายังหลอดอาหาร เอนไซม์แอลฟ่าอะไมเลสที่ผลิตจากต่อมน้ำลายจะเริ่มทำการย่อยคาร์โบไฮเดรตในส่วนนี้ (Lüüs, 2009) หลอดอาหารของสัตว์ปีกที่โตเต็มวัยมีความยาว 6-8 นิ้ว ขณะที่สัตว์ปีกบางชนิดจะมีกระเพาะพักหรือเหนียง (crop) (Sturkie, 1965) เพื่อเก็บอาหารไว้สำหรับย่อย (Randall *et al*., 2001) ซึ่งหลอดอาหารและเหนียงมีการขับเมือก เพื่อส่งอาหารโดยอาศัยการหล่อลื่นของเมือกและการหดตัวของกล้ามเนื้อภายใน (inner) และภายนอก (outer) ของหลอดอาหารเข้าสู่กระเพาะแท้ (glandular stomach) หรือโปรเวนตริคูลัส (proventriculus) ภายในโปรเวนตริคูลัสเกิดการย่อยทางชีวเคมีด้วยน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารที่ประกอบด้วยสารเมือกที่ขับมาจากเซลล์เยื่อบุ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(mucosal cells) กรดไฮโดรคลอริก และเปปซิโนเจน ซึ่งสภาวะภายในโปรเวนตริคูลัสจะมีความเป็นกรดสูง สำหรับโปรเวนตริคูลัสของเป็ดมีค่าพีเอช 3.41 ขณะที่ไก่มีพีเอช 4.40 (ตารางที่ 2) ทำให้เปปซิโนเจนเปลี่ยนเป็นเปปซิน ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (เพทาย, 2538; Sturkie, 1965; Lüüs, 2009) โดยเปปซินทำการย่อยโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดเล็กลง จากนั้นอาหารจะถูกส่งมายังกระเพาะบด (muscular stomach or gizzard) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยด้วยกระบวนการทางกายภาพ โดยการยืดหดของกล้ามเนื้อเพื่อทำการบดผสมอาหารเข้ากับน้ำย่อย โดยการทำงานของเปปซินส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่กระเพาะบด (เพทาย, 2538; Lüüs, 2009)

ตารางที่ 2 ค่าพีเอชของระบบย่อยอาหารของสัตว์ปีก

อวัยวะ	เป็ด	ไก่	ไก่งวง
เหนียง	4.92	4.51	6.07
โปรเวนตริคูลัส	3.41	4.40	4.72
กึ๋น	2.33	2.60	2.19
ลำไส้เล็กส่วนต้น	6.01-6.19	5.76-6.01	5.82-6.52
ลำไส้เล็กส่วนกลาง	6.11-6.69	5.78-5.90	6.71-6.95
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	6.87	6.27-6.42	6.85
ไส้ตรง	6.73	6.26	6.46
ไส้ตัน	5.88	5.71	5.86
น้ำดี	6.41	5.88	6.01

ที่มา: ดัดแปลงจาก Sturkie (1965)

การย่อยทางชีวเคมี และการดูดซึม (Midgut) การย่อยอาหารในส่วนนี้เกิดขึ้นภายในลำไส้เล็กซึ่งส่วนใหญ่เป็นการย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตด้วยกระบวนการทางชีวเคมี โดยภายในลำไส้เล็กมีสภาวะเป็นกลางถึงเบสอ่อน (Randall *et al*., 2001) Sturkie (1965) รายงานว่าภายในลำไส้เล็กของเป็ดมีค่าพีเอช 6.01-6.87 (ตารางที่ 2) นอกจากนี้สารอาหารส่วนใหญ่ยังถูกดูดซึมภายในลำไส้เล็ก โดยลำไส้เล็กแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ส่วนกลาง (jejunum) และส่วนปลาย (ileum) ดังภาพที่ 1 ในสัตว์ปีกลำไส้เล็กส่วนต้นเป็นส่วนที่ต่อมาจากกระเพาะบดยาวไปจนถึงตับอ่อนและท่อน้ำดี โดยลำไส้เล็กส่วนต้นมีรูปร่างคล้ายตัวยู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(เพทาย, 2538) ซึ่งโอบรอบตับอ่อน (pancreas) เรียกว่า duodenal loop ลำไส้เล็กส่วนต้นมีหน้าที่หลั่งของเหลวสำหรับย่อย และรับน้ำย่อยที่หลั่งจากตับและตับอ่อน ขณะที่ลำไส้เล็กส่วนกลางเป็นส่วนที่ต่อจากท่อตับอ่อนไปจนถึง Meckel's Diverticulum โดยทำหน้าที่หลั่งของเหลวสำหรับย่อยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังเกิดการย่อยและดูดซึมสารอาหารภายในลำไส้ส่วนนี้ และสุดท้ายลำไส้เล็กส่วนปลาย คือส่วนที่ต่อจาก Meckel's Diverticulum จนถึงส่วนลำไส้ใหญ่ โดยหน้าที่สำคัญของลำไส้เล็กส่วนนี้คือการดูดซึมสารอาหารที่ผ่านการย่อยจากลำไส้เล็กทั้งสองส่วนข้างต้น (Randall, 2001; Santos Junior, 2005)

การดูดซึมน้ำ และแร่ธาตุ และการขับถ่าย (Hindgut) ขั้นตอนนี้เกิดขึ้นในส่วนสุดท้ายของลำไส้เล็กและในลำไส้ใหญ่ (rectum หรือ colon) โดยลำไส้ใหญ่คือส่วนที่ต่อมาจากลำไส้เล็ก ประกอบด้วยลำไส้ใหญ่ ไส้ตัน (ceca) และส้วงทวาร (cloaca) หน้าที่ของลำไส้ใหญ่ คือการดูดซึมน้ำ ขณะที่ส้วงทวาร มีหน้าที่ดูดซึมไอออน และน้ำ (Denbow, 2000; Randall, 2001) นอกจากนี้ระบบย่อยอาหารส่วนนี้ยังมีกิจกรรมการย่อยที่เกิดจากจุลินทรีย์ภายในร่างกาย (microflora) ซึ่งพบในไส้ติ่ง และลำไส้ใหญ่ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ย่อยอาหารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพคติน เป็นต้น นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังสามารถสังเคราะห์กรดแอมิโนและวิตามินที่จำเป็นแก่สัตว์ที่อาศัย (host) ด้วย (Lüüs, 2009; Santos Junior, 2005)

จากกระบวนการย่อยอาหารทั้งหมดพบว่าส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ ดังนั้นในตารางที่ 3 จึงแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในระบบย่อยอาหาร สำหรับการย่อยอาหารประเภทโปรตีนจะประกอบด้วยกิจกรรมของเอนไซม์หลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่ผลิตจากตับอ่อนและลำไส้เล็ก ดังนั้นในหัวข้อต่อไปจึงกล่าวถึงโครงสร้าง และหน้าที่ของตับอ่อน และลำไส้เล็กเพื่อชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของอวัยวะดังกล่าวสำหรับเป็นแนวทางการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 3 กิจกรรมของเอนไซม์สำคัญในระบบย่อยอาหาร

เอนไซม์	ตำแหน่งของการทำงาน	สับสเตรท	ผลิตภัณฑ์
ปาก			
แอลฟาอะไมเลสในน้ำลาย	ปาก	แป้ง	ไดแซคคาไรด์ (ปริมาณเล็กน้อย)
กระเพาะอาหาร			
เปปซิโนเจน:เปปซิน	กระเพาะอาหาร	โปรตีน	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่
ตับอ่อน			
แอลฟาอะไมเลสในตับอ่อน	ลำไส้เล็ก	แป้ง	ไดแซคคาไรด์
ทริปซิโนเจน:ทริปซิน	ลำไส้เล็ก	โปรตีน	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่
ไคโมทริปซิน	ลำไส้เล็ก	โปรตีน	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่
อีลาสเตส	ลำไส้เล็ก	อีลาสติน	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่
คาร์บอกซีเปปติเดส	ลำไส้เล็ก	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่	เปปไทด์โมเลกุลเล็ก (โอลิโกเปปไทด์)
แอมิโนเปปติเดส	ลำไส้เล็ก	เปปไทด์โมเลกุลใหญ่	โอลิโกเปปไทด์
ไลเปส	ลำไส้เล็ก	ไตรกลีเซอไรด์	กรดไขมัน กลีเซอรอล โมโนกลีเซอไรด์
นิวคลีเอส	ลำไส้เล็ก	กรดนิวคลีอิก	นิวคลีโอไทด์
ลำไส้เล็ก			
เอนเทอโรไคเนส	ลำไส้เล็ก	ทริปซิโนเจน	ทริปซิน
ไดแซคคาไรเดส	ลำไส้เล็ก*	ไดแซคคาไรด์	โมโนแซคคาไรด์
เปปติเดส	ลำไส้เล็ก*	โอลิโกเปปไทด์	กรดแอมิโน
นิวคลีโอติเดส	ลำไส้เล็ก*	นิวคลีโอไทด์	นิวคลีโอซิเดส, กรดฟอส-ฟอริก
นิวคลีโอซิเดส	ลำไส้เล็ก*	นิวคลีโอไซด์	น้ำตาล พิวรีน ไพริมิดีน

* เกิดขึ้นภายในเซลล์

ที่มา: Randall *et al*. (2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1 โครงสร้าง และหน้าที่ของตับอ่อน และลำไส้เล็ก

2.1.1 ตับอ่อน

ตับอ่อนคือต่อมมีท่อ มีลักษณะสีเหลืองซีดหรือสีแดง ล้อมรอบด้วย duodenal loop ของลำไส้เล็กส่วนต้น (Denbow, 2000) โดยเป็ดน้ำหนักตัว 2.56 กิโลกรัมมีตับอ่อนขนาด 8.6 กรัม (ตารางที่ 4) ตับอ่อนมีหน้าที่หลั่งฮอร์โมน และเอนไซม์สำหรับย่อยอาหาร (Lüüs, 2009) โดยตับอ่อนจะผลิตน้ำย่อยซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์สำหรับย่อยหลายชนิด จากนั้นน้ำย่อยจะหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น การหลั่งน้ำย่อยในตับอ่อนควบคุมโดยสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่ผลิตในเส้นประสาท หรือฮอร์โมน (hormone) ที่ผลิตในลำไส้เล็กส่วนต้น ทั้งนี้การย่อยอาหารในลำไส้เล็กส่วนใหญ่เป็นผลของเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อน (Sklan and Noy, 2000) สำหรับเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อนประกอบด้วย แอลฟาอะไมเลส โปรติเอส ไลเปส และนิวคลีเอส (Randall, 2001; Lüüs, 2009) โดยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะย่อยแป้งให้อยู่ในรูปของไดแซคคาไรด์ เอนไซม์โปรติเอส เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน อีลาสเตส คาร์บอกซีเปปติเดส และแอมิโนเปปติเดสจะย่อยโปรตีนและเปปไทด์ขนาดใหญ่ให้อยู่ในรูปของเปปไทด์ขนาดเล็ก ขณะที่เอนไซม์ไลเปสจะทำการย่อยไขมัน นอกจากนี้น้ำย่อยจากตับอ่อนยังประกอบด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนตเพื่อป้องกันลำไส้จากกรดที่มาจากกระเพาะอาหารทำให้ภายในลำไส้มีสภาวะเป็นกลาง (Lüüs, 2009) เพทาย (2538) กล่าวว่าส่วนประกอบของอาหารมีผลต่อปริมาณการหลั่งเอนไซม์ของตับอ่อน เช่น เมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตมากจะมีการหลั่งเอนไซม์อะไมเลสมาก นอกจากนี้อายุและสายพันธุ์ของสัตว์ก็มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบในตับอ่อน (Kadhim *et al*., 2011)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 ความยาวของลำไส้ และน้ำหนักของอวัยวะภายในของเป็ดป่าน้ำหนักตัว 2.56 กิโลกรัม (Mallard ducks) อายุ 42 วัน

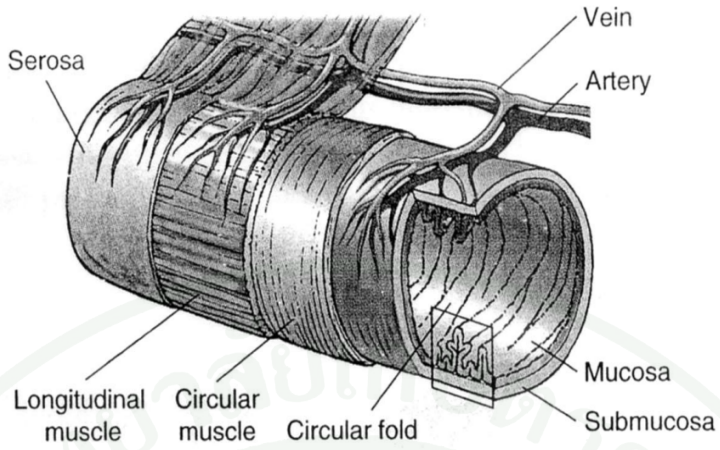
อวัยวะ	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กรัม)
ลำไส้เล็ก	195	49
ไส้ติ่ง (Caeca)	37	5.0
ลำไส้ใหญ่หรือลำไส้ตรง (Colon)	12	5.2
ตับอ่อน	-	8.6
รวม (ยกเว้นตับอ่อนและตับ)	244	59

ที่มา: ดัดแปลงจาก Jamroz *et al*. (2001)

2.1.2 ลำไส้เล็ก

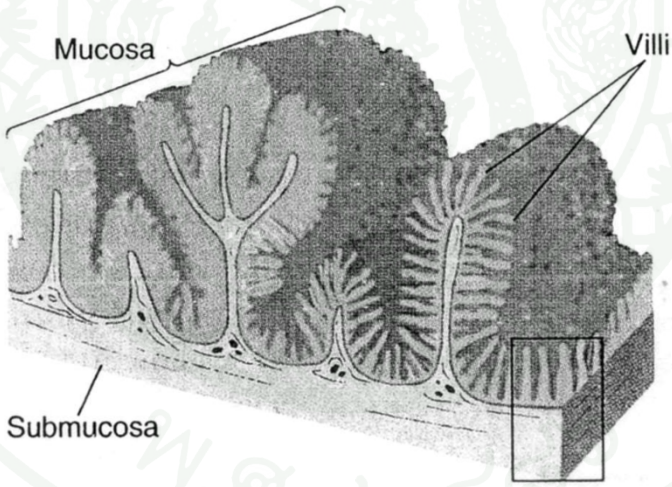
จากภาพที่ 2 เป็นลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็ก Randall *et al*. (2001) กล่าวว่าชั้นนอกสุดของลำไส้เล็ก คือ serosa ซึ่งจะห่อหุ้มชั้นกล้ามเนื้อ (muscle tunic) ที่ประกอบด้วยกล้ามเนื้อตามยาวของลำไส้ (longitudinal) ที่เป็นกล้ามเนื้อเรียบ และกล้ามเนื้อตามขวาง (circular) ของลำไส้ โดยชั้นกล้ามเนื้อจะห่อหุ้มชั้นเยื่อบุผิว (epithelial) ที่ประกอบด้วยส่วนของเนื้อเยื่อใต้เยื่อบุเมือกหรือ submucosa (เป็นชั้นของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน) และเยื่อบุเมือกลำไส้ (mucosa หรือ mucous membrane) ขณะที่ผนังข้างในของลำไส้เล็กจะมีลักษณะเป็นรอยย่นยื่นเข้าไปในช่องว่างด้านในของลำไส้ เพื่อเพิ่มพื้นผิวในการดูดซึมสารอาหารเรียกว่าวิลไล (villi) (ภาพที่ 3) (เพทาย, 2538) โดยจากลำไส้เล็กส่วนต้นไปยังส่วนปลายชั้นเยื่อบุเมือกจะมีความหนาแน่นน้อยลงขณะที่วิลไลมีขนาดสั้นลง (Santos Junior, 2005)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 โครงสร้างของลำไส้เล็ก

ที่มา: Randall *et al*. (2001)



ภาพที่ 3 ลักษณะของเนื้อเยื่อใต้เยื่อบุเมือก (submucosa) และเยื่อบุเมือกลำไส้ (mucosa)

ที่มา: Randall *et al*. (2001)

จากการศึกษาของ Raju *et al*. (1997) พบว่าชั้นเยื่อบุเมือกของไส้ไก่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในไส้ทั้งหมด โดยเอนไซม์มีกิจกรรม 95 หน่วยต่อกรัมของเนื้อเยื่อ (ตารางที่ 5) Damle *et al*.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(2010a) กล่าวว่าเอนไซม์โปรติเอสในไส้ไก่ส่วนใหญ่กระจายอยู่ระหว่างเยื่อบุเมือกและผนัง (wall tissue) ของลำไส้โดยจะพบกิจกรรมของเอนไซม์แอมิโนเปปติเดส 70-89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อบุเมือกทั้งหมด (mucosal tissue)

ตารางที่ 5 กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในส่วนต่างๆของลำไส้ไก่

ตัวอย่าง*	**กิจกรรม (หน่วย/มล.)**	**ปริมาณโปรตีน (มก.โปรตีน/มล.)**	**กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)**
ลำไส้ที่ไม่มีเยื่อบุเมือก (0.5 กรัม)	21.9	13.78	1.59
เยื่อบุเมือกลำไส้ (0.5 กรัม)	73.13	17.32	4.22

*ไม่มีตับอ่อนในตัวอย่างที่ใช้ทดลอง

ที่มา: Raju *et al*. (1997)

ในตารางที่ 6 แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ต่างๆ ในลำไส้เล็กส่วนต้น ของเหลวในลำไส้เล็กส่วนกลาง และตับอ่อนของเป็ด โดยพบกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส อะไมเลส และโปรติเอส ซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการเตรียมสารสกัดเอนไซม์สำหรับประยุกต์ใช้ในการแปรรูปอาหาร เพื่อเป็นแนวทางการใช้ประโยชน์และเพิ่มมูลค่าให้แก่วัตถุดิบดังกล่าวต่อไป

ตารางที่ 6 กิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารบางส่วนของเป็ด

เอนไซม์	**กิจกรรม (หน่วย/กรัม)**[1]	**กิจกรรม (หน่วย/มล.)**[2]	**กิจกรรม (หน่วย/มก.โปรตีน)**[3]
โปรติเอส	6.74	-	-
ไคโมทริปซิน	5.35	70.60	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 (ต่อ)

เอนไซม์	กิจกรรม (หน่วย/กรัม)[1]	กิจกรรม (หน่วย/มล.)[2]	กิจกรรม (หน่วย/มก.โปรตีน)[3]
ทริปซิน	4.22	140.45	-
อะไมเลส	496.10	394.79	13
ไลเปส	-	-	1.96

[1] ศึกษาในลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) ของเป็ดเชอรี่วัลเลย์อายุ 6 สัปดาห์ (ดัดแปลงจาก Han *et al*., 2008)

[2] ศึกษาในของเหลวจากลำไส้เล็กส่วนกลาง (jejunal fluid) ของเป็ดปักกิ่งอายุ 146 วัน (ดัดแปลงจาก Zhao *et al*., 2007)

[3] ศึกษาในตับอ่อน (pancreas) ของเป็ดป่าอายุ 42 วัน (ดัดแปลงจาก Jamroz *et al*., 2001)

เอนไซม์

Whitaker (1994) กล่าวว่าเอนไซม์คือโปรตีนที่มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยา(catalytic activity) อย่างมีความจำเพาะหรืออาจเรียกเอนไซม์ว่าเป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (biocatalyst) เพราะเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาในสิ่งมีชีวิตได้อย่างมีประสิทธิภาพ ใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยและไม่สูญหายไปกับปฏิกิริยา นอกจากนี้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ภายใต้สภาวะไม่รุนแรงซึ่งเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูงมาก และการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ไม่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น โดยเอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ด้วยการลดพลังงานการกระตุ้นปฏิกิริยาอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงเพิ่มขึ้น (ปราณี, 2547; ดาวัลย์, 2548) โดยเอนไซม์มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การเปลี่ยนแปลงของวัตถุดิบ การแปรรูป การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นต้น ในอดีตมีการใช้เอนไซม์ในรูปของ endogeneous enzyme โดยการควบคุมสภาวะต่างๆ เพื่อให้เอนไซม์ในตัววัตถุดิบเกิดการย่อยตัวเอง (autolysis) ต่อมาได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีในการสกัดเอนไซม์จากวัตถุดิบชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงมีการใช้เอนไซม์มากขึ้นในการปรับปรุงและพัฒนาอาหารเพื่อการบริโภค (Whitaker, 1994; Shahidi and Kamil, 2001)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การผลิตเอนไซม์

การผลิตเอนไซม์โดยทั่วไปประกอบด้วยขั้นตอนสำคัญดังต่อไปนี้ (Reed, 1966)

1.1 การเลือกวัตถุดิบ

1.1.1 แหล่งของเอนไซม์ (Sources of enzymes) เซลล์ทุกชนิดจะมีการผลิตเอนไซม์เพื่อใช้ในการดำรงชีวิตทั้งใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในอดีตการผลิตเอนไซม์ทางการค้าจะใช้วัตถุดิบจากพืช และสัตว์เป็นส่วนใหญ่ โดยการผลิตเอนไซม์จากพืชต้องใช้วัตถุดิบจำนวนมากแต่ได้ผลผลิตน้อย และเอนไซม์ที่ได้มีประสิทธิภาพต่ำ ส่วนเอนไซม์จากสัตว์มักใช้ของเหลือจากอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ในการผลิตเอนไซม์ สำหรับจุลินทรีย์เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่สำคัญเนื่องจากไม่มีปัญหาเรื่องวัตถุดิบ ผลิตได้ปริมาณมาก และได้เอนไซม์ที่เหมาะสมในการใช้งาน อย่างไรก็ตามการใช้จุลินทรีย์ในการผลิตเอนไซม์ควรคำนึงถึงความปลอดภัย และการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ดังนั้นยังต้องมีการหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ๆ สำหรับผลิตเอนไซม์เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีลักษณะตามที่ต้องการ เหมาะสมต่อการใช้งานต่อไป (Reed, 1966) ทั้งนี้วัตถุดิบที่ใช้สกัดควรเลือกเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์มาก เพราะจะทำให้ได้เอนไซม์ปริมาณมาก ช่วยลดขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ (Dixon and Webb, 1979)

ไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์ปีกเป็นแหล่งของเอนไซม์หลายชนิด (Mahagna *et al*., 1995; Adeola, 2006; Zhao *et al*., 2007; Kadhim *et al*., 2011) จึงมีการนำวัตถุดิบดังกล่าวมาสกัดเอนไซม์เพื่อใช้งาน โดย Damle *et al*. (2010a) ใช้เอนไซม์แอมิโนเปปติเดสที่เตรียมจากเยื่อบุเมือกของไส้ไก่ไปกำจัดรสขมในเคซีนและโปรตีนถั่วเหลืองไฮโดรไลเสต ขณะที่ Mane *et al*. (2010) นำไส้ไก่มาใช้สกัดเอนไซม์แอมิโนเปปติเดส เอ็น (aminopeptidase N) และนำมาผ่านขั้นตอนการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ซึ่งเอนไซม์ที่เตรียมได้สามารถใช้ในการกำจัดรสขมในโปรตีนไฮโดรไลเสต

1.1.2 ตำแหน่งของเอนไซม์ (Enzyme location) ในการสกัดเอนไซม์ควรทราบตำแหน่งที่อยู่ของเอนไซม์ภายในเซลล์แล้วจึงเลือกวิธีที่เหมาะสมในการสกัด เซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะผลิตเอนไซม์ปล่อยออกมานอกเซลล์ (extracellular) หรือเก็บรักษาไว้ในเซลล์ (intracellular) ส่วนใหญ่เอนไซม์ที่ผลิตทางการค้าจะเป็นเอนไซม์ที่ผลิตภายในเซลล์และปล่อยออกมานอกเซลล์เพื่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ย่อยสารอาหารที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์ (Reed, 1966) ทำให้สกัดออกมาได้ง่ายกว่าเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ โดยทั่วไปเซลล์ของพืชและจุลินทรีย์ห่อหุ้มด้วยผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งมีความแข็งแรงทำให้สกัดเอนไซม์ออกจากเซลล์ได้ยากกว่าในกรณีที่เอนไซม์อยู่ภายในเซลล์ สำหรับเซลล์ของสัตว์ซึ่งห่อหุ้มด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) จะสกัดเอนไซม์ได้ง่ายกว่า

หลังเลือกวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับสกัดเอนไซม์ ในขั้นตอนต่อจากนี้คือการสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อและทำให้บริสุทธิ์

1.2 วิธีการเตรียมเอนไซม์ (General Methods for Preparing Enzymes)

1.2.1 การสกัด และการแยก (Extraction and Fractionation) เมื่อเลือกแหล่งของเอนไซม์ที่เหมาะสมแล้ว ต้องทำให้เอนไซม์อยู่ในรูปของสารละลายก่อน (Reed, 1966; Dixon and Webb, 1979) โดยวัตถุดิบแห้งต้องมีการบดเพื่อลดขนาดอนุภาคแต่ถ้าเป็นวัตถุดิบสดและเอนไซม์อยู่ในส่วนของเหลวที่ปล่อยออกมานอกเซลล์จะใช้การหมุนเหวี่ยงเพื่อกำจัดเซลล์และนำส่วนของเหลวไปทำให้บริสุทธิ์ ถ้าเอนไซม์อยู่ภายในเซลล์ควรทำให้เซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์แตกจากนั้นจึงสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อ ในกรณีที่เป็นเนื้อเยื่อสัตว์การทำให้เซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์แตกสามารถทำได้โดยการบดด้วยเครื่องบด (blender) โฮโมจิไนเซอร์ (homogenizer) อัลตราโซนิกส์ (ultrasonic) หรือการย่อยด้วยเอนไซม์ร่วมกับสารละลายที่ใช้สกัด ซึ่งทั่วไปแล้วจะใช้บัฟเฟอร์(Reed, 1966; Dixon and Webb, 1979)

ปัจจัยที่ควรคำนึงถึงในการเลือกสารสกัดเอนไซม์ขึ้นอยู่กับลักษณะหรือสมบัติของเอนไซม์ เช่น ละลายหรือยึดเกาะกับเยื่อหุ้มเซลล์ ชนิดของเนื้อเยื่อ เป็นต้น ปริมาตรโดยทั่วไปของสารที่ใช้สกัดควรประมาณ 2-3 เท่าของปริมาตรเนื้อเยื่อ ส่วนใหญ่จะเลือกใช้บัฟเฟอร์ที่มีค่า ionic strength ที่เหมาะสม นอกจากนี้ในสารสกัดอาจมีการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสเนื่องจากวัตถุดิบหลายชนิดประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสจึงทำให้เกิดการย่อยตัวเอง (Whitaker, 1994) Rathinaraj *et al*. (2010) ได้สกัดเอนไซม์จากไส้ไก่โดยนำวัตถุดิบมาโฮโมจิไนซ์ร่วมกับสารสกัด คือ น้ำกลั่นพีเอช 6.8, ฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7, โพแทสเซียมคลอไรด์ พีเอช 6.7 และโพแทสเซียมคลอไรด์กับ EDTA พีเอช 5.3 พบว่าสารละลายเอนไซม์มีปริมาณโปรตีนสูงสุดเมื่อสกัดด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ขณะที่การสกัดด้วยน้ำกลั่นเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสที่สกัดได้มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมสูงสุด ทั้งนี้ Whitaker (1994) แนะนำว่าควรใช้อุณหภูมิต่ำในการสารสกัดเอนไซม์ เนื่องจากเอนไซม์ส่วนใหญ่จะมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิต่ำ

หลังจากสกัดเอนไซม์จากเนื้อเยื่อแล้ว สารสกัดเอนไซม์ประกอบด้วยสารประกอบหลายชนิด การแยกเป็นการกำจัดสารประกอบอื่นที่ไม่ต้องการโดยเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์มีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น ซึ่งสารละลายเอนไซม์ถูกแยกส่วนตะกอนโดยการกรองหรือหมุนเหวี่ยงภายใต้อุณหภูมิต่ำเพื่อกำจัดเซลล์ที่เหลือ (Whitaker, 1994)

1.3 การทำให้เข้มข้นและการเพิ่มความบริสุทธิ์ (Concentration and Purification)

ส่วนใหญ่เอนไซม์ที่จำหน่ายทางการค้าเป็นเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นแต่ไม่ใช่เอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง การทำให้เข้มข้นเอนไซม์จะมีปริมาตรลดลง (Dixon and Webb, 1979) ด้วยวิธีการระเหยภายใต้สภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิต่ำ หรือแยกเอนไซม์โดยการตกตะกอนด้วยสารละลายอินทรีย์ หรือเกลืออนินทรีย์ ซึ่งการตกตะกอนควรทำที่อุณหภูมิต่ำและใช้เวลาให้น้อยที่สุดเพื่อป้องกันการเสียสภาพและสูญเสียกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ที่ผ่านการตกตะกอนจะแยกออกโดยการกรองหรือหมุนเหวี่ยงและทำให้แห้งในบรรยากาศหรือภายใต้สุญญากาศ (Reed, 1966) สำหรับทางการค้าจะนิยมใช้อัลตราฟิลเตรชันในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์โดยกรองสารละลายเอนไซม์ผ่านแผ่นเยื่อที่มีขนาดโมเลกุลตามที่ต้องการ นอกจากนี้การนำสารละลายเอนไซม์ไปทำให้อยู่ในรูปผงโดยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งก็เป็นวิธีการหนึ่งในการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979) ซึ่งเอนไซม์ที่ถูกทำให้เข้มข้นอาจยังคงมีองค์ประกอบอื่นอยู่ เช่น โปรตีน เถ้า คาร์โบไฮเดรต เป็นต้น (Reed, 1966)

สำหรับการผลิตเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูง จะมีขั้นตอนที่ยุ่งยากและใช้หลายกระบวนการร่วมกัน เช่น การแยกโดยอาศัยการตกตะกอน (fractional precipitation) ความสามารถในการชะ (elution) ความแตกต่างในการดูดซับ (differential adsorption) โครมาโทรกราฟี (chromatography) อิเล็คโทรโฟริซิส (electrophoresis) การตกผลึก (crystallization) ไดอะไลซิส (dialysis) และการไลโอฟิไลซ์ (lyophilization) ซึ่งเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีขั้นตอนเพิ่มความบริสุทธิ์ที่แตกต่างกัน ในการผลิตเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์สูงมากจะต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมหาศาลส่งผลให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นขั้นตอนนี้อาจไม่มีความจำเป็นขึ้นอยู่กับการใช้งานและความพึงพอใจของผู้ใช้ (Reed, 1966)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.4 การรักษาความคงตัว และการปรับมาตรฐาน (Stabilization and Standardization)

การรักษาความคงตัวของเอนไซม์มีวัตถุประสงค์เพื่อป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์หรือสูญเสียกิจกรรมระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปของแข็งหรือของเหลวขึ้นอยู่กับความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวมักมีการเติมสารรักษาความคงตัว ได้แก่ โซเดียมเบนโซเอท อนุพันธ์ของกรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิก กลีเซอรอล โพรพิลีนไกล-คอล ซอร์บิทอล และโซเดียมคลอไรด์ สำหรับเอนไซม์ที่อยู่ในรูปของแข็งมักเติมตัวช่วยละลาย (diluents) เช่น สตาร์ช แลคโตส แป้ง และเคซีน เป็นต้น นอกจากนี้อาจมีการเติมบัฟเฟอร์และเกลือในเอนไซม์บางชนิด เพื่อรักษาพีเอช กิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์ (Reed, 1966)

การสกัดเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกมีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาไว้ ต่อไปนี้คือตัวอย่างวิธีการสกัดเอนไซม์จากแหล่งดังกล่าว

Osman (1982) สกัดเอนไซม์อะไมเลสจากไส้และตับอ่อนของไก่ โดยนำวัตถุดิบมาทำความสะอาดและตัดเป็นชิ้นเล็กๆ จากนั้นนำไปปั่นผสมกับน้ำกลั่นเย็นนาน 3 นาทีด้วยโฮโมจิไน-เซอร์ สารละลายที่ได้นำมาปรับอัตราส่วนให้มีเนื้อเยื่อต่อน้ำเท่ากับ 1 ต่อ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำสารสกัดที่ได้ไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งพบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในทุกส่วนของลำไส้และตับอ่อนแต่กิจกรรมส่วนใหญ่จะพบในลำไส้เล็กส่วนกลางขณะที่ลำไส้ใหญ่พบเพียงเล็กน้อย

Jamadar *et al*. (2003) เตรียมเอนไซม์แอมิโนเปปติเดสโดยนำไส้ไก่ที่ทำความสะอาดแล้วมาปั่นผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ในสัดส่วน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ 17,300×g นาน 30 นาที นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 2 รอบ สารละลายที่ได้นำไปให้ความร้อนที่ 50°ซ นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้งและกรองผ่านผ้าขาวบาง นำสารสกัดที่ได้ไปเพิ่มความบริสุทธิ์โดยใช้โครมาโตรกราฟฟีแบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion-exchange) กรองด้วยเจล (gel filtration) ปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) และโครมาโตรกราฟีแบบสัมภัคภาพ (affinity) ตามลำดับ โดยเอนไซม์ที่เตรียมมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6 และอุณหภูมิ 40 ถึง 50°ซ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Damle *et al*. (2010a) สกัดเอนไซม์แอมิโนเปปติเดสจากเยื่อบุเมือกของไส้ไก่โดยทำความสะอาดไส้ไก่จากนั้นผ่าตามยาว และขูดเอาเฉพาะเยื่อบุเมือก บรรจุใส่ถุงพลาสติกสำหรับฉายรังสีเพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วจึงนำมาผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนท จากนั้นหยดลงไปในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เย็น ตั้งทิ้งไว้จนเม็ดบีทแข็งตัวแล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นจะได้เอนไซม์ในรูปที่ถูกห่อหุ้มเพื่อนำไปใช้กำจัดรสขมในผลิตภัณฑ์ไฮโดรไลเสต

Rathina Raj and Mahendrakar (2010) สกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่โดยทำความสะอาดวัตถุดิบ จากนั้นนำมาปั่นผสมกับน้ำกลั่นเย็นด้วยโฮโมจิไนเซอร์นาน 5 นาที เหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ นำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 41 นำส่วนใสมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้สารละลาย 250 มล. และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยเอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่พีเอช 10.6 (26.3 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที) และต่ำสุดที่พีเอช 6.8 (7.2 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที) เมื่อศึกษากิจกรรมที่อุณหภูมิ 37°ซ

2. ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

อัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ ความเข้มข้นของสับสเตรท ความเข้มข้นของเอนไซม์ พีเอช อุณหภูมิ ตัวเร่งและตัวยับยั้งปฏิกิริยา ความดัน ค่าคงที่ไดอิเล็กทริก (dielectric constant) และค่า ionic strength ของสารละลาย ฯลฯ (Whitaker, 1994; Fullbrook, 1996; ดาวัลย์, 2548) ซึ่งในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงรายละเอียดเฉพาะบางปัจจัยที่มีผลต่องานวิจัยในครั้งนี้

2.1 ความเข้มข้นของสับสเตรท

ความเข้มข้นของสับสเตรทเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญในการวัดอัตราเร็วการทำงานของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979) ถ้าให้ปริมาณเอนไซม์คงที่ และความเข้มข้นของสับสเตรทน้อยพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาเริ่มต้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกจนกระทั่งเพิ่มสับสเตรทขึ้นจนถึงระดับหนึ่ง (Reed, 1966; ดาวัลย์, 2548) จากนั้นไม่ว่าจะเพิ่มสับสเตรทมากขึ้นเท่าไหร่อัตราความเร็วของปฏิกิริยาจะไม่เพิ่มขึ้นเนื่องจากโมเลกุลของเอนไซม์จับกับสับสเตรททั้งหมดอัตราเร็วของปฏิกิริยาจึงไม่เพิ่มขึ้น (Whitaker, 1994) ความเข้มข้นของสับสเตรทที่ให้อัตราเร็ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สูงสุด (V_{max}) เรียกว่าความเข้มข้นอิ่มตัวของสับสเตรท สำหรับค่าคงที่ไมเคลิส (K_m) มีค่าเท่ากับครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วสูงสุด (V_{max}1/2) โดยถ้าค่า K_m น้อยแสดงว่าเอนไซม์จับกับสับสเตรทได้ดี ทั้งนี้ค่า V_{max} บอกถึงอัตราเร็วในการสลายตัวของเอนไซม์สับสเตรทคอมเพลกซ์ (Reed, 1966; ดาวัลย์, 2548)

2.2 ความเข้มข้นของเอนไซม์

ความเข้มข้นของเอนไซม์มีผลต่อความไวในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของเอนไซม์ คือการใช้เอนไซม์น้อยที่สุดโดยที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้เร็วที่สุด (Reed, 1966) โดยความเข้มข้นของเอนไซม์และอัตราเร็วของปฏิกิริยามีความสัมพันธ์เป็นเส้นตรง ถ้าให้ปริมาณสับสเตรทคงที่ ที่ความเข้มข้นอิ่มตัวของสับสเตรทพบว่าความเข้มข้นของเอนไซม์เพิ่มขึ้นอัตราเร็วของปฏิกิริยาจะสูงขึ้น (Dixon and Webb, 1979; Whitaker, 1994) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ดังกล่าวอาจเกิดการเบี่ยงเบนจากเส้นตรง อย่างในกรณีที่มีสิ่งเจือปน เช่น โคเอนไซม์ (coenzyme) ตัวเร่ง (activator) และตัวยับยั้ง (inhibitor) ของเอนไซม์ในระบบ เป็นต้น (Dixon and Webb, 1979)

2.3 อุณหภูมิ

เอนไซม์เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งและความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเนื่องจากโครงสร้างของเอนไซม์มีการจัดเรียงตัวอย่างมีระเบียบในทิศทางที่จับกับบริเวณจับและบริเวณเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ (Reed, 1966; Whitaker, 1994) เมื่ออุณหภูมิของการทำปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ก็สูงขึ้นทำให้อัตราเร็วเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันก็เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979; Fullbrook, 1996) เนื่องจากเกิดการเสียสภาพของโปรตีนในเอนไซม์ เพราะเกิดการสลายของพันธะที่มีแรงยึดเหนี่ยวต่ำ ได้แก่ พันธะเชิงไอออน (electrostatic) ไฮโดรโฟบิก (hydrophobic) ไฮโดรเจน (hydrogen) และแรงแวนเดอวาวล์ (Van der Waals) โมเลกุลของโปรตีนจึงเกิดการคลายเกลียว (unfolding) ของสายเปปไทด์ (Dixon and Webb, 1979; Whitaker, 1994) ซึ่งการเสียสภาพของเอนไซม์เกิดขึ้นได้ 2 ลักษณะคือเอนไซม์เปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่ไม่ทำงานซึ่งอาจเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูปที่ทำงานได้ (reversible) หรือไม่ได้ (irreversible) ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและระยะเวลาที่ได้รับ เมื่อได้รับอุณหภูมิสูงระดับหนึ่งเอนไซม์ทุกชนิดจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่เสียสภาพแบบคืนกลับไม่ได้ โดยเอนไซม์ส่วนใหญ่เสียสภาพที่อุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

มากกว่า 60°ซ และเสียสภาพอย่างสมบรูณ์เมื่อได้รับอุณหภูมิ 80-100°ซ (Neilands and Stumpf, 1958)

สำหรับอุณหภูมิที่ให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเรียกว่า optimum temperature ซึ่งอุณหภูมินี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาการทำปฏิกิริยาถ้าระยะเวลาเกิดปฏิกิริยาสั้นจะมี optimum temperature สูงกว่าเกิดปฏิกิริยานาน (Reed, 1966) การเลือก optimum temperature ควรคำนึงถึงอัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์และอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จึงจะได้ optimum temperature ที่แท้จริง (Dixon and Webb, 1979; Fullbrook, 1996) สำหรับอัตราการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จะแสดงเป็นข้อมูลความคงตัวของเอนไซม์ซึ่งสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ (Fullbrook, 1996) โดยข้อมูลความคงตัวของเอนไซม์นิยมแสดงเป็นข้อมูลระหว่างค่ากิจกรรมที่เหลือ (% residual enzyme activity) โดยการศึกษาเริ่มจากบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ตามระยะเวลาที่กำหนดและให้พีเอชคงที่ซึ่งอาจมีหรือไม่มีสับเสตรท จากนั้นทำให้เย็นและวิเคราะห์หากิจกรรมที่เหลือของเอนไซม์ (Reed, 1966; Whitaker, 1994; Fullbrook, 1996) เอนไซม์ส่วนใหญ่คงตัวสูงที่อุณหภูมิต่ำ สำหรับการเลือกอุณหภูมิในการทำงานของเอนไซม์ควรคำนึงถึงอัตราเร็วในการย่อยและความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ (Whitaker, 1994)

2.4 ค่าพีเอช

พีเอชมีผลต่อการแตกตัวของไอออนของหมู่โพรโทโทรพิก (prototropic group) ของกรดแอมิโนในบริเวณเร่งของเอนไซม์ เอนไซม์จึงมีประจุเปลี่ยนไปเกิดการเบี่ยงเบนในการจับกับสับสเตรท การเร่งปฏิกิริยา และความคงตัวของเอนไซม์ (Dixon and Webb, 1979; Fullbrook, 1996; Whitaker, 1994; ดาวัลย์, 2548) ซึ่งอุณหภูมิ ชนิดของบัฟเฟอร์ ความเข้มข้นของสับสเตรท สารยับยั้งหรือกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ ชนิดของสับสเตรท และค่า ionic strength ล้วนมีผลต่อพีเอชของระบบ (Neilands and Stumpf, 1958) ถ้าพีเอชสูงหรือต่ำมากอาจทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติของโครงสร้างได้ (ดาวัลย์, 2548) โดยทั่วไปเอนไซม์มีกิจกรรมอยู่ในช่วงพีเอชจำกัด เมื่อให้ความเข้มข้นของเอนไซม์และสับสเตรทคงที่ และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆ ส่วนใหญ่จะได้กราฟรูประฆังหรือเรียกว่า pH activity curve ซึ่งกราฟนี้บอกรายละเอียดได้เฉพาะภายใต้สภาวะที่ศึกษาเท่านั้น (Neilands and Stumpf, 1958; Fullbrook, 1996) พีเอชที่ทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาสูงสุดเรียกว่าพีเอชที่เหมาะสม (optimum pH) และอาจมีค่าเปลี่ยนแปลงได้เมื่อเปลี่ยนสับสเตรทที่ทำปฏิกิริยา (Reed, 1966; Dixon and Webb, 1979) ในบางกรณี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์อาจมีพีเอชที่เหมาะสมมากกว่า 1 ค่าเนื่องจากมีเอนไซม์หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ เช่น ในสารสกัดหยาบของเอนไซม์ (crude enzyme) หรือมีสับสเตรทหลายชนิด เป็นต้น โดยทั่วไป เอนไซม์มักเกิดกิจกรรมได้ดีเมื่อปรับสภาวะการทำงานให้มีพีเอชเหมือนกับพีเอชภายในเซลล์หรือในสารคัดหลั่งจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เช่น เอนไซม์เปปซินภายในกระเพาะอาหารทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดแก่ คือช่วงพีเอช 1.5-2.5 หรือเอนไซม์โปรติเอสที่หลั่งจากตับอ่อนมีกิจกรรมการทำงานสูงที่พีเอชในช่วงเบส (Reed, 1966)

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชอาจมีผลต่อความคงตัวของเอนไซม์เนื่องจากการเสียสภาพของโปรตีนแบบย้อนกลับไม่ได้ส่งผลต่อการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เพราะเกิดการเปลี่ยนประจุทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติของเอนไซม์ (Bisswanger, 2002) โดยการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ต่อพีเอชที่เวลาต่างๆ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการเลือกเอนไซม์ไปใช้งาน (Fullbrook, 1996) โดยเริ่มจากการบ่มเอนไซม์ที่พีเอชต่างๆตามระยะเวลาที่กำหนด จากนั้นวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ที่เหลือซึ่งพีเอชที่คงตัวเอนไซม์จะมีกิจกรรมคงที่ และพีเอชที่ไม่คงตัวกิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเนื่องจากเอนไซม์เกิดการยับยั้งอย่างถาวร (Bisswanger, 2002) โดยการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารไม่จำเป็นต้องปรับสภาวะให้มีค่า พีเอชที่เอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดแต่ควรคำนึงถึงพีเอชของอาหารด้วย รวมถึงความคงตัวของเอนไซม์ต่อพีเอชเพื่อปรับพีเอชให้เหมาะสมต่อการใช้งานจริงมากที่สุดโดยที่เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งกิจกรรมการทำงาน (Reed, 1966; Whitaker, 1994; Fullbrook, 1996)

3. **เอนไซม์โปรติเอส** (Protease)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ที่สลายพันธะและเปลี่ยนหมู่-เอซิล (acyl group) โดยอาศัยน้ำในการเกิดปฏิกิริยา (Bugg, 2004) เอนไซม์โปรติเอสมีชื่อสามัญหลายชื่อ ได้แก่ เปปติเดส (peptidase) โปรติเนส (proteinase) เปปไทด์ไฮโดรเลส (peptide hydrolases) และเอนไซม์โปรติโอไลติค (proteolytic enzyme) (ปราณี, 2543) สำหรับการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสคือการสลายพันธะเปปไทด์ (peptide bonds) ของโปรตีน (Whitaker, 1994) โดยเอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งที่เกิดการย่อย คือ เอนโดเปปติเดส (endopeptidase) และเอกโซเปปติเดส (exopeptidase) (ภาพที่ 4) (Howell, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. เอนโดเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากภายในสายโปรตีนที่ตำแหน่งกรดแอมิโนที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ ทำให้เกิดเปปไทด์ขนาดต่างๆ

2. เอกโซเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะเปปไทด์จากปลายสายด้านใดด้านหนึ่งของสายโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์นั้นๆ ทำให้เกิดกรดแอมิโนอิสระขึ้น

ภาพที่ 4 การย่อยพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์โปรติเอสแบบเอนโดเปปติเดส และเอกโซเปปติเดส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bugg (2004)

นอกจากนี้ยังอาจแบ่งชนิดของเอนไซม์โปรติเอสได้เป็น 4 ชนิดตามกลไกการทำงาน (Whitaker, 1994; ปราณี, 2543) ได้แก่

1. ซีรีนโปรติเอส (serine proteases) โปรติเอสชนิดนี้มีหมู่อนุมูลซีริล (seryl residue) หมู่อิมิดาโซล (imidazole group) และแอสพาติลคาร์บอกซิล (aspartyl carboxyl group) ในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ ถูกยับยั้งได้โดย diisopropyl phosphorofluoridate (DFP) โดยการทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลในบริเวณเร่งที่มีอนุมูลซีริล (Whitaker, 1994) และเป็นพวก alkaline proteases ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาในช่วง 7-11 เอนไซม์ทั้งหมดในกลุ่มนี้เป็นพวกเอนโดเปปติเดส (ปราณี, 2543) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน

1.1 ทริปซินหลั่งจากตับอ่อนในรูปของทริปซิโนเจนมีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 ดาลตัน ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดยเอนไซม์จากลำไส้เล็กชื่อเอนเทอโรไคเนสซึ่งย่อยทริปซิโนเจนให้เป็นทริป-ซิน โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดในช่วงพีเอช 7-9 ทริปซินสามารถสลายพันธะเปปไทด์ เอไมด์ เอสเทอร์ ฯลฯ ที่หมู่คาร์บอกซิลของกรดแอมิโนไลซีน และอาร์จินีน ถูกยับยั้งได้ด้วย trypsin inhibitor ที่พบในของเหลวในตับอ่อน ไข่ขาว ข้าวสาลี และถั่วเหลืองดิบ (Yamamoto, 1975; Hamada, 1992; เพทาย, 2538) ทริปซินที่มีความบริสุทธิ์สูงจะนำมาใช้ในทางการแพทย์ ขณะที่สารสกัดเอนไซม์หยาบจากตับอ่อนที่มีกิจกรรมของทริปซินจะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต (Yamamoto, 1975) โดยทริปซินมีความสามารถในการย่อยโปรตีนได้เร็วแต่ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสชาติขม เนื่องจากทริปซินไม่สามารถสลายพันธะของกรดแอมิโนชนิดไฮโดรโฟบิกจึงก่อให้เกิดรสขมขึ้นในผลิตภัณฑ์ ดังนั้นจึงต้องควบคุมระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) ให้สูงมากหรือใช้เอนไซม์ที่สามารถสลายโครงสร้างไฮโดรโฟบิกแล้วจึงใช้ทริปซินย่อยต่อ (Godfrey, 1996)

1.2 ไคโมทริปซินเป็นเอนไซม์ที่หลั่งจากตับอ่อนในรูปของไคโมทริปซิโนเจนซึ่งเร่งปฏิกิริยาไม่ได้สามารถเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ทำงานได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ทำงานในพีเอชช่วงเบส (8-9) ซึ่งเป็นสภาวะภายในลำไส้เล็ก (Hamada, 1992) มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000-40,000 ดาลตัน ไคโมทริปซินจะสลายพันธะเปปไทด์ เอไมด์ และเอสเทอร์ โดยเฉพาะหมู่คาร์บอก-ซิลของกรดแอมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง คือ ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และทริปโตเฟน และย่อยกรดแอมิโนขนาดใหญ่ที่มีสายข้างเป็นไฮโดรโฟบิกได้เล็กน้อยถูกยับยั้งได้ด้วยสาร organic phosphate เช่น isopropyl fluorophosphate (Yamamoto, 1975; Hamada, 1992; เพทาย, 2538) นำมาประยุกต์ใช้สำหรับผลิตโปรตีนนมไฮโดรไลเสตเพื่อกำจัดสารที่ก่อให้เกิดการแพ้ (Godfrey, 1996)

2. ซัลฟไฮดริลโปรติเอส (sulfhydryl proteases) หรือไทออลโปรติเอส (thiol proteases) หรือ ซิสเตอีนโปรติเอส (cysteine proteases) โปรติเอสชนิดนี้มีหมู่อนุมูลซัลฟไฮดริลอยู่ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ ถูกยับยั้งโดยสารจับหมู่ซัลฟไฮดริล (sulfhydryl reagents) สลายพันธะแบบเอนโดเปปติเดสและเป็น neutral proteases ซึ่งมีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเกิดปฏิกิริยาในช่วง 6-7.5 คงตัวต่อความร้อนถึง 60-80°ซ ที่พีเอชเป็นกลาง เอนไซม์ในกลุ่มนี้ค่อนข้างจำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิดจึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมซึ่งตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ปาเปน ฟิซิน และโบรมิเลน ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด (Whitaker, 1994; ปราณี, 2543)

2.1 ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่สกัดจากยางของ *Carica papaya* มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 23,00 ดาลตัน (Reed, 1966; Whitaker, 1994) โดยบริเวณเร่งของปาเปนมีหมู่ซัลฟ-ไฮดริล (SH group) ของซิสเตอีน (cysteine) ซึ่งปาเปนถูกยับยั้งโดยโลหะหนักและสารออกซิไดซ์ (oxidizing agent) เนื่องจากเกิดพันธะไดซัลไฟด์ทำให้การทำงานของเอนไซม์หยุดลงแต่ปาเปนไม่ถูกยับยั้งการทำงานโดยสารคีเลท (chelating agents) เอนไซม์จะมีความคงตัวและทำงานได้ดีเมื่อมีสารรีดิวซ์ (reducing agents) เช่น ซิสเตอีน ซัลไฟด์ ซัลไฟท์ และไซยาไนด์ เพื่อรีดิวซ์พันธะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไดซัลไฟด์ในโมเลกุลของปาเปนให้อยู่ในรูปซัลฟไฮดริลอิสระ นอกจากนี้การเติมสารที่จับโลหะหนัก เช่น ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) จะช่วยให้ปาเปนทำงานได้ดีขึ้น (Arnon, 1970; Yamamoto, 1975)

ปาเปนมีกิจกรรมในช่วงพีเอช 5-9 ขึ้นอยู่กับสับสเตรทที่ใช้ มีความคงตัวลดลงเมื่อพีเอชต่ำกว่า 3 หรือมากกว่า 11 (Yamamoto, 1975; เพทาย, 2538) โดยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60-70°ซ (Godfrey, 1996) เป็นเอนไซม์ที่ค่อนข้างทนต่อความร้อนจึงประยุกต์ใช้งานได้หลากหลาย (Reed, 1966) จำเพาะต่อสับสเตรทหลายชนิดโดยจะย่อยพันธะเปปไทด์ได้ดีสลายพันธะเอไมด์ และเอสเทอร์ได้ดีมาก รวมถึงกรดแอมิโนพื้นฐาน เช่น ลิวซีน อาร์จินีน หรือไกลซีน (Hamada, 1992; Godfrey, 1996; Bugg, 2004) แต่ถูกยับยั้งการทำงานอย่างรวดเร็วด้วยโอลิโกเปปไทด์ที่มีฟีนิลอะลานีนเป็นกรดแอมิโนตัวที่สองจากปลายสายคาร์บอกซิล (Yamamoto, 1975) เมื่อย่อยแล้วให้ไฮโดรไลเสตที่มีค่าการละลายสูงและรสชาติดีโดยไม่ค่อยมีรสขมในผลิต-ภัณฑ์ (Godfrey, 1996) ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการเตรียมโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต เนื่องจากมีประสิทธิภาพการย่อยสูงและได้ไฮโดรไลเสตที่มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดี (Cho *et al*., 2009; Chen and Chi, 2011; Chen *et al*., 2012b) โดย Chen *et al*. (2009) ทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพการย่อยไข่ขาวของไข่เป็ดด้วยเอนไซม์ปาเปน ทริปซิน ไคโมทริปซิน อัลคาเลส และฟลาโวไซม์ พบว่าปาเปนย่อยโปรตีนไข่ขาวได้ดีกว่าเอนไซม์ชนิดอื่น เมื่อเทียบจากปริมาณเปปไทด์ในไฮโดรไลเสต

3. เมทัลโปรติเอส (Metal-containing proteases) โปรติเอสชนิดนี้มีไอออนและโลหะรวมอยู่โมเลกุลของเอนไซม์ ถูกยับยั้งด้วยสารจับไอออนของโลหะ (metal-chelating agents) เช่น EDTA และ 1,10-phenanthroline เป็นต้น ซึ่งทำให้ไอออนของโลหะหลุดออกและสูญเสียกิจกรรมในที่สุด (Bugg, 2004) เอนไซม์กลุ่มนี้เป็นเอกโซเปปติเดสเกือบทั้งหมด ได้แก่ คาร์บอกซีเปปติเดสและแอมิโนเปปติเดส (Whitaker, 1994; ปราณี, 2543)

3.1 คาร์บอกซีเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากตับอ่อนมีสมบัติในการย่อยโปรตีนที่ปลายหมู่คาร์บอกซิล (-COOH-) และถูกยับยั้งการทำงานด้วยกรดแอมิโน (เพทาย, 2538) ตัวอย่างเช่น คาร์บอกซีเปปติเดส เอ ซึ่งผลิตจากตับอ่อนในรูปของโพรคาร์บอกซีเปปติเดส เอ (procarboxypeptidase A) ที่มีมวลโมเลกุล 80,000 ดาลตัน จากนั้นจะถูกกระตุ้นด้วยทริปซินเป็นคาร์บอกซีเปปติเดส เอ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 34,500 ดาลตัน (Whitaker, 1994) โดยเกิดกิจกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ได้ดีที่พีเอช 7-8 เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยกรดแอมิโนได้หลายชนิดและจะหยุดย่อยเมื่อมีกรดแอมิโนอาร์จินีน ไลซีน โพรลีน หรือไฮดรอกซีโพรลีนอยู่ที่ปลายหมู่คาร์บอกซิลโดยเอนไซม์สามารถย่อยโพลีเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ได้เร็วกว่าไดเปปไทด์ (Yamamoto, 1975) โดยทั่วไปการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดรสขมในผลิตภัณฑ์เนื่องจากเกิดเปปไทด์ไฮโดรโฟบิกในสายโพลีเปปไทด์ที่ปลายหมู่คาร์บอกซิล คาร์บอกซีเปปติเดส เอ มีสมบัติในการกำจัดรสขม และเอนไซม์ที่อยู่ในรูปสารสกัดหยาบสามารถย่อยกรดแอมิโนไฮโดรโฟบิกได้ดีกว่าเอนไซม์ที่บริสุทธิ์ (Yamamoto, 1975)

3.2 แอมิโนเปปติเดสเป็นเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์หรือเยื่อบุเมือกของลำไส้สัตว์ต่างๆ (Yamamoto, 1975) มีสมบัติในการย่อยพันธะเปปไทด์ที่ปลายเป็นชนิดหมู่แอมิโน (-NH-) ถูกยับยั้งด้วยปลายหมู่คาร์บอกซิลที่อยู่ใกล้เคียง (เพทาย, 2538) ทำงานได้ดีที่พีเอช 8 (Yamamoto, 1975) ค่อนข้างจำเพาะต่อกรดแอมิโนหลายชนิดทั้งเอไมด์ เอสเทอร์ และ เปปไทด์ โดยเฉพาะลิวซีน และอะลานีน (Yamamoto, 1975; Mane *et al*., 2010) แอมิโนเปปติเดส สามารถลดรสขมในไฮโดรไลเสตได้ดีกว่าคาร์บอกซีเปปติเดส นอกจากนี้ยังย่อยไดเปปติเดสได้เร็วกว่าคาร์บอกซี-เปปติเดส (Yamamoto, 1975)

4. แอซิดโปรติเอส (acidic proteases) หรือคาร์บอกซิลโปรติเอส (carboxyl proteases) หรือแอสพาร์ติกโปรติเอส (aspartic proteases) เป็นโปรติเอสที่ทำงานในช่วงพีเอชกรดมีพีเอชที่เหมาะสำหรับเกิดปฏิกิริยาช่วง 2-4 (ปราณี, 2543) ตัวอย่างเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ เปปซิน

4.1 เปปซินเป็นเอนไซม์ที่ได้จากกระเพาะอาหาร ตัดพันธะแบบเอนโดเปปติเดส ทำงานได้ดีในช่วงพีเอชเป็นกรดระหว่าง 1.0-5.0 มีน้ำหนักโมเลกุล 34,000 – 38,000 ดาลตัน (เพทาย, 2538) คงตัวที่พีเอช 2 ถึงประมาณ 5 ถ้าพีเอชมากกว่า 5 จะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็ว โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 2 (Whitaker, 1994) ย่อยพันธะเปปไทด์ที่อยู่ติดกับกรดแอมิโนที่มีโครงสร้างเป็นวง เช่น ไทโรซีน และฟีนิลอะลานีน เป็นต้น (เพทาย, 2538) เป็นเอนไซม์ที่ทนอุณหภูมิได้สูง เมื่อย่อยจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติขมมาก จึงใช้สำหรับผลิตอาหารสัตว์ อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Godfrey, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์โปรติเอสมีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ซึ่งเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตมีอยู่หลายชนิด เช่น อัลคาเลส ปาเปน ทริปซิน และไคโมทริปซิน เป็นต้น ซึ่งผลิตได้จากแหล่งของพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ในตารางที่ 7 จึงได้สรุปสมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิดที่พบในพืช และสัตว์

ตารางที่ 7 สมบัติทั่วไปของเอนไซม์โปรติเอสบางชนิด

แหล่งของเอนไซม์	เอนไซม์	ประเภท[1,4]	ตำแหน่งการทำงาน	พีเอชที่เหมาะสม	ความจำเพาะ
สัตว์					
ตับอ่อน	ทริปซิน	ซีรีนโปรติเอส	เอนโดเปปติเดส	7	ไลซีน อาร์จินีน อะลานีน ไกลซีน[4]
	ไคโมทริปซิน	ซีรีนโปรติเอส	เอนโดเปปติเดส	8	ไทโรซีน ฟีนิลอะลานีน และทริปโตเฟน[1]
	คาร์บอกซี-เปปติเดส เอ	เมทาโลโปร-ติเอส	เอกโซเปปติเดส	7-8[1]	กรดแอมิโนอะโรมาติกหรืออะลิฟาติกยกเว้นอาร์จินีน ไลซีน โพรลีน ไฮดรอกซีโพรลีน[1,3]
	คาร์บอกซี-เปปติเดส บี	เมทาโลโปร-ติเอส	เอกโซเปปติเดส	7-9[1]	อาร์จินีน ไลซีน[1]
ลำไส้	แอมิโน-เปปติเดส	เมทาโลโปร-ติเอส	เอกโซเปปติเดส	8-9	ลิวซีน อะลานีน[2]
พืช					
ยางจาก *Carica papaya*	ปาเปน	ซิสเตอีน-โปรติเอส	เอนโดเปปติเดส	6-7[1]	ช่วงกว้าง เช่นอาร์จินีนไลซีน ลิวซีน อะลานีน ฟีนิลอะลานีน[1,4]

ที่มา: ดัดแปลงจาก Neilands and Stumpf (1958)

[1] Bugg (2004)

[2] Mane *et al*. (2010)

[3] Reed (1966)

[4] Godfrey (1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไข่ขาว

สาเหตุที่เรียกว่าไข่ขาวเนื่องจากเวลาตกลิ่ม (coagulation) จะเป็นสีขาว ไข่ขาวมีประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของไข่ทั้งฟอง มีสีเหลืองอ่อนเนื่องจากสีของโอโวเฟลวิน (ovoflavin) และบางครั้งพบว่ามีสีชมพูหรือสีเขียวอ่อนเนื่องจากอาหารบางชนิดที่ใช้เลี้ยงไก่ องค์ประกอบหลักทางเคมีของไข่ขาว คือ น้ำ และโปรตีน ประมาณ 88เปอร์เซ็นต์ และ 10.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีคาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ และไขมันอีกเล็กน้อย (Sugino *et al*., 1997) สำหรับโครงสร้างของไข่ขาวประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้ (สุวรรณ, 2529)

1. เยื่อขั้วไข่แดง (chalaziferous) เป็นส่วนของไข่ขาวข้นที่มาห่อหุ้มไข่แดงอยู่ชิดกับเยื่อหุ้มไข่แดง (vitelline membrane) และขมวดเป็นเกลียวอยู่ที่หัวท้ายตามแกนยาวของไข่แดง โดยขั้วยึดไข่แดงจะเป็นสายของไข่ขาวข้นที่ยื่นออกมาจากส่วนไข่ขาวข้น มีลักษณะบิดเป็นเกลียวยื่นไปทางด้านป้านและด้านแหลมของไข่ ขั้วที่อยู่ทางด้านแหลมเรียกว่า choacal chalaza ซึ่งจะมีลักษณะเป็นเส้นใยยาวและใหญ่กว่าของด้านป้าน ที่เรียกว่า infundibular chalaza ทำหน้าที่ช่วยยึดไม่ให้ไข่แดงเคลื่อนที่ไปมาจากตำแหน่งเดิม เมื่อเก็บไข่ไว้นานขึ้นส่วนนี้จะเกิดการอ่อนตัวลงทำให้ไข่แดงเคลื่อนที่ได้มากขึ้น

2. ไข่ขาวเหลวชั้นใน (inner liquid layer) เป็นส่วนของไข่ขาวที่ค่อนข้างเหลวใสอยู่ชั้นรอบนอกมีประมาณ 16.8 เปอร์เซ็นต์ของไข่ขาวทั้งหมด เป็นชั้นที่เยื่อขั้วไข่แดงโยงดึงไข่แดงให้ลอยอยู่ตรงกลางฟองไข่

3. ไข่ขาวข้น (dense albumen) อยู่ถัดไข่ขาวเหลวชั้นนอกออกมาเป็นชั้นหรือถุงไข่ขาวข้นที่ห่อหุ้มไข่แดงกับไข่ขาวใสตอนใน ความข้นของตัวมันจะช่วยประคองไข่แดงและน้ำไข่ขาวใสตอนในให้แขวนลอยอยู่และพ้นอันตรายจากการกระทบกระทั่ง ไข่ขาวส่วนนี้มีปริมาณ 57.3 เปอร์เซ็นต์ของไข่ขาวทั้งหมด เส้นใยมิวซินของชั้นนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญของไข่ขาวข้นและไปเชื่อมยึดกับเยื่อหุ้มไข่ชั้นในที่ด้านป้านกับด้านแหลมของฟองไข่ ไข่ขาวข้นจะมีลักษณะเป็นเส้นใยข้นๆ (semisolid fiber) ที่รวมกับส่วนที่เป็นของเหลวทำให้ดูข้นขึ้น เส้นใยเหล่านี้ด้านนอกที่ติดกับไข่ขาวเหลวชั้นนอกเป็นเส้นใยยาวอยู่กันอย่างหนาแน่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ไข่ขาวเหลวชั้นนอก (outer liquid layer) หรือน้ำค้างไข่ จะอยู่รอบๆ ด้านข้างของไข่ขาวข้น เว้นแต่ที่ตรงหัวและท้ายของไข่ มีลักษณะเหลวใส อยู่เป็นชั้นบางๆ ติดเยื่อเปลือกไข่ มีปริมาณ 23.2 เปอร์เซ็นต์ของไข่ขาวทั้งหมด โดยส่วนประกอบของไข่ขาวเหลวชั้นนอกนี้จะเหมือนกับไข่ขาวเหลวชั้นในแต่มีเส้นใยมิวซินบ้างเล็กน้อย

1. โปรตีนของไข่ขาว

ไข่ขาวเป็นระบบโปรตีนที่ประกอบด้วยเส้นใยโอโวมิวซินอยู่ในสารละลายของโปรตีนหลายชนิด ส่วนประกอบของโปรตีนในชั้นไข่ขาวใสและไข่ขาวข้นต่างกันเฉพาะที่ปริมาณของโอโวมิวซิน ไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดสามารถแยกได้โดยการแยกลำดับส่วนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์โดยใช้เทคนิค ion exchange โดยโปรตีนที่สำคัญของไข่ขาว (ตารางที่ 8) ได้แก่

ตารางที่ 8 องค์ประกอบ สมบัติทางเคมี และกายภาพของโปรตีนไข่ขาว

โปรตีน	ปริมาณ (เปอร์-เซ็นต์)	Isoelectric point	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	อุณหภูมิการเสียสภาพ (°ซ)	สมบัติ
Ovalbumin	54	4.5	45,000	71.5[1]-84	ฟอสโฟไกลโคโปรตีน
Ovotransferrin	12	6.1	76,000-80,000	57.3[1]-61	ทำปฏิกิริยากับอนุมูลโลหะ เช่นเหล็ก
Ovomucoid	11	4.1	28,000	77[2]-79	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน
Ovomucin	3.5	4.5-5.0	5.5-8.3×10[6]	-	ไกลโคโปรตีน, ให้ความหนืด
Lysozyme	3.4	10.7	14,300	70-75	ทำลายแบคทีเรียบางชนิด
Ovoglobulin G2	4	5.5	30,000-45,000	92.5	-
Ovoglobulin G3	4	4.8	-	-	-
Ovoinhibitor	1.5	5.1	49,000	69-72[1]	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซีรีนโปรติเอส
Ovoglycoprotein	1	3.9	24,000-24,400	69-72[1]	ไกลโคโปรตีน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 **(ต่อ)**

โปรตีน	ปริมาณ (เปอร์-เซ็นต์)	Isoelectric point	น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	อุณหภูมิการเสียสภาพ (°ซ)	สมบัติ
Ovoflavoprotein	0.8	4	32,000-35,000	69-72[1]	ทำปฏิกิริยากับไรโบฟลาวิน
Ovomacro-globulin	0.5	4.5	760,000-900,000	69-72[1]	ไกลโคโปรตีน
Cystatin	0.05	5.1	12,700	-	ยับยั้งการทำงานของไทออลโปรติเอส
Avidin	0.05	10	68,300	85	ทำปฏิกิริยากับไบโอติน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Li-Chan *et al*. (1995)

[1] Campbell *et al*. (2003)

[2] Alleoni (2006)

1. โอวัลบูมิน (Ovalbumin)

โอวัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีมากที่สุดในไข่ขาวเป็นสารพวกฟอสโฟไกลโคโปรตีน (phosphoglycoprotein) เพราะมีคาร์โบไฮเดรตและหมู่ฟอสเฟตเกาะอยู่กับสายพอลิเปปไทด์ โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ A_1, A_2 และ A_3 หมายถึง การมีหมู่ฟอสเฟต 2 หมู่ 1 หมู่ และไม่มีเลย ต่อโมเลกุลตามลำดับ มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 45 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยหมู่ซัลฟไฮดริล (sulfhydryl group) ทั้งหมด 4 หมู่ โดยมีหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ 1 หมู่ จัดเป็นโปรตีนไข่ขาวเพียงชนิดเดียวที่มีหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ และมีพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะ มีค่า pI (Isoelectric point) เท่ากับ 4.5 โปรตีนชนิดนี้ทนความร้อนได้ดีโดยมีอุณหภูมิการเสียสภาพเท่ากับ 71.5-84.0°ซ เมื่อไข่มีอายุการเก็บรักษานานขึ้นโอวัลบูมินจะเปลี่ยนไปเป็นเอส-โอวัลบูมิน (S-ovalbumin) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทนความร้อนได้มากกว่าอุณหภูมิในการเสียสภาพเท่ากับ 92.5°ซ โดยที่องค์ประกอบของกรดแอ-มิโนในโมเลกุลของโอวัลบูมินและเอส-โอวัลบูมินนั้นไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้โอวัลบูมินยังสามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่ายเมื่อทำการเขย่า (shaking) โอวัลบูมินเป็นโปรตีนสำคัญที่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ก่อให้เกิดการแพ้โปรตีนไข่ขาวในผู้บริโภคบางกลุ่ม (López-Expósito *et al*., 2008) โดยการแพ้ผู้ป่วยจะแสดงอาการทางระบบหายใจ ทางผิวหนัง และ/หรือระบบทางเดินอาหาร (Mine and Yang, 2008) ซึ่งการย่อยโอวัลบูมินด้วยเอนไซม์เปปซินร่วมกับการใช้ความดันสูงจะได้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ก่อให้เกิดการแพ้น้อยลง (López-Expósito *et al*., 2008)

2. โอโวทรานส์เฟอร์ริน (Ovotransferrin)

โอโวทรานส์เฟอร์ริน หรือคอนอัลบูมิน (conalbumin) คิดเป็นปริมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไข่ขาวทั้งหมดมีขนาดโมเลกุล 76-80 กิโลดาลตัน มีค่า pI ประมาณ 6.1 ประกอบด้วยกรดแอมิโน 686 ตัว และมีพันธะไดซัลไฟด์ 15 พันธะ ไม่มีหมู่ฟอสเฟตหรือหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ จัดเป็นพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวที่เรียกว่าไกลโคโปรตีน ประกอบด้วยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตโดยมีน้ำตาลเฮกโซส (hexose) 0.8 เปอร์เซ็นต์ และเฮกโซซามีน (hexosamine) 1.4 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนที่แยกได้ง่ายโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ทนความร้อนได้น้อยกว่าโอวัลบูมิน อุณหภูมิที่ทำให้เสียสภาพประมาณ 61°ซ สามารถจับกับอนุมูลโลหะ เช่น Fe^{3+}, Al^{3+}, Cu^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ทนต่อความร้อน และการย่อยของโปรตีน โดยโอโว-ทรานส์เฟอร์รินเป็นสารแอนติเจนซึ่งจะมีผลกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายของผู้บริโภคที่แพ้โปรตีนไข่ให้สร้างแอนติบอดี้ (Mine and Yang, 2008)

3. โอโวมิวคอยด์ (Ovomucoid)

โอโวมิวคอยด์เป็นโปรตีนที่มีอยู่ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไข่ขาว เป็นสารพวกไกลโคโปรตีน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 25 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สามารถทนต่อความร้อนได้ดี โอโว-มิวคอยด์มีขนาดโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 4.1 และมีพันธะไดซัลไฟด์ 9 พันธะ แต่ไม่มีหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน (trypsin inhinitor) โดย 1 โมเลกุลของโอโวมิวคอยด์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ 1 โมเลกุล ในช่วงความเป็นกรดโอโวมิวคอยด์จะสามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงความร้อนได้ดีโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางกายภาพ และทางเคมี แต่ในสภาวะที่เป็นด่างโอโวมิวคอยด์จะเปลี่ยน แปลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งโอโวมิวคอยด์ที่เปลี่ยนแปลงด้วยความร้อนจะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และจะถูกย่อยได้ดีขึ้นโดยเอนไซม์ไคโมทริปซิน ทั้งนี้โอโวมิวคอยด์เป็นโปรตีนสำคัญที่ก่อให้เกิดการแพ้โปรตีนไข่ขาว (Kovacs-Nolan *et al*., 2000)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. โอโวมิวซิน (Ovomucin)

โอโวมิวซินเป็นไกลโคโปรตีนที่มีหมู่ซัลเฟตทำให้ไข่ขาวข้นมีลักษณะเป็นวุ้น โดยพบโอโวมิวซินในไข่ขาวข้นมากกว่าไข่ขาวใสถึง 4 เท่า มีขนาดโมเลกุล 5,500-8,300 กิโลดาลตัน โครงสร้างของโอโวมิวซินนั้นมีส่วนสำคัญมากในการทดสอบสมบัติเชิงเคมี และกายภาพของโปรตีนไข่ขาว โอโวมิวซินแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ชนิดที่มีคาร์โบไฮเดรตมากเรียก β-ovomucin และชนิดที่มีคาร์โบไฮเดรตน้อยเรียก α-ovomucin โดย β-ovomucin มีปริมาณของคาร์โบไฮ-เดรตอยู่ถึง 30 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากมีปริมาณของคาร์โบไฮเดรตสูงจึงทำให้ทนต่อความร้อนได้ดี โดยสารละลายโอโวมิวซินที่พีเอช 7.1-9.4 จะไม่เปลี่ยนแปลงความหนืด หรือความทึบแสง ระหว่างที่ให้ความร้อน 90°ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สมบัติที่สำคัญของโปรตีนชนิดนี้คือเป็นสารช่วยให้เกิดฟองที่คงทน และสามารถยับยั้งการทำงานของไวรัส (viral hemagglutination) ได้

5. ไลโซไซม์ (Lysozyme)

ไลโซไซม์ หรือที่รู้จักกันในชื่อ mucopeptide *N*-acetylmuramoylhydrolase (EC3.2.1.17) เป็นเอนไซม์ในไข่ขาวที่สามารถทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ไลโซไซม์มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 14.3 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 10.7 ประกอบด้วยกรดแอมิโน 129 ตัว มีพันธะไดซัลไฟด์ 4 หมู่ แต่ไม่มีหมู่ซัลฟไฮดริลอิสระ การใช้ความร้อนในการยับยั้งเอนไซม์นี้ขึ้นอยู่กับพีเอชและอุณหภูมิ โดยไลโซไซม์จะถูกทำลายมากขึ้นถ้าพีเอชมากกว่า 7 ขึ้นไป และเสียสภาพที่อุณหภูมิประมาณ 70-75°ซ ทั้งนี้ไลโซไซมเป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ได้เล็กน้อย (Mine and Zhang, 2002)

6. โอโวโกลบูลิน (Ovoglobulin)

โอโวโกลบูลิน มีอยู่ประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไข่ขาว พบว่าประกอบด้วยโปรตีน 3 ส่วน คือ G_1, G_2 และ G_3 โดยที่ G_1 นั้นต่อมาได้ระบุว่าเป็นไลโซไซม์ ส่วน G_2 และ G_3 นั้นมีการศึกษาค่อนข้างน้อย เมื่อวิเคราะห์ด้วย Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่า G_2 และ G_3 เป็นสารไกลโคโปรตีนมีค่า pI เท่ากับ 5.5 และ 4.8 ตามลำดับ และพบว่าเป็นสารที่ช่วยในการเกิดฟองได้ดี ช่วยในการขึ้นฟูในผลิตภัณฑ์ขนมอบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. โอโวอินฮิบิเตอร์ (Ovoinhibitor)

โอโวอินฮิบิเตอร์เป็นสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน มีอยู่ 1.5 เปอร์เซ็นต์ในโปรตีนไข่ขาวทั้งหมด ประกอบด้วยเฮกโซส 3.5 เปอร์เซ็นต์ และเฮกโซซามีน 2.7 เปอร์เซ็นต์สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน และไคโมทริปซินรวมทั้งโปรติเอสของราและแบคทีเรีย

8. โอโวไกลโคโปรตีน (Ovoglycoprotein)

โอโวไกลโคโปรตีน พบประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ในโปรตีนไข่ขาว มีขนาดโมเลกุล 24 กิโลดาลตัน เป็นไกลโคโปรตีนประเภทกรดประกอบด้วยน้ำตาลเฮกโซส 13.6 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซา-มีน 13.8 เปอร์เซ็นต์ และ *N*-acetylneuraminic acid 3 เปอร์เซ็นต์ เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนโดยยังคงอยู่ในรูปที่ละลายได้แม้ให้ความร้อนที่ 100°ซ หรือจากการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอ-โรอะซิติก (TCA)

9. โอโวฟลาโวโปรตีน (Ovoflavoprotein)

โอโวฟลาโวโปรตีนมีอยู่ 0.8 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนไข่ขาว จัดเป็นสารประกอบประเภทฟอสโฟไกลโคโปรตีน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 32 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 4.0 ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีน้ำตาลแมนโนส 6 เปอร์เซ็นต์ กาแลคโตส 1.3 เปอร์เซ็นต์ กลูโคซามีน 11.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถจับกับไรโบฟลาวิน (riboflavin) ที่พบในไข่ขาวในอัตราส่วน 1:1 และทำหน้าที่ในการขนถ่าย ไรโบฟลาวินจากน้ำเลือดไปยังไข่ขาว

10. โอโวมาโครโกลบูลิน (Ovomacroglobulin)

โอโวมาโครโกลบูลินหรือโอโวสเตติน (Ovostatin) เป็นโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เป็นอันดับสองรองจากโอโวมิวซิน โดยมีขนาดโมเลกุล 769 กิโลดาลตัน และมีค่า pI เท่ากับ 4.5 โอโวมาโครโกลบูลินมีกรดแอมิโนที่เป็นองค์ประกอบคล้ายกับที่พบใน α_2-macroglobulin จากพลาสมา โดยมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ 0.28 เปอร์เซ็นต์ (Saxena and Tayyab, 1997) ทั้งนี้โอโวมาโครโกลบูลินเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสประเภทซีรีน ซัลฟไฮ-ดริล และเมทัลโปรติเอส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. ซิสเตติน (Cystatin)

ซิสเตตินเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซัลฟไฮดริลโปรติเอส เช่น ปาเปน ฟิซิน คาเทปซิน บี ซี เอช และ แอล ฯลฯ เป็นโปรตีนทนต่อความร้อนสูงได้ดีแต่จะสูญเสียความคงตัวเมื่อนำไปแช่แข็งหรือทำแห้งแบบระเหิด และคงตัวสูงที่พีเอชเป็นเบส (Saxena and Tayyab, 1997) ทั้งนี้ซิสเตตินมีผลในการต่อต้านจุลินทรีย์ ป้องกันการเกิดเนื้องอก และชะลอการเสื่อมของกระดูก (Kovacs-Nolan *et al*., 2005)

12. อะวิดิน (Avidin)

อะวิดินเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดแอมิโน 128 ตัว มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 68.3 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 10.0 และมีพันธะไดซัลไฟด์ 1 พันธะ สามารถทนความร้อนได้ดี โดยมีอุณหภูมิเสียสภาพเท่ากับ 85°ซ สามารถจับกับไบโอติน (biotin) ซึ่งเป็นวิตามินที่มนุษย์ต้องการ โดยพบว่าอะวิดิน 1 โมเลกุลสามารถจับกับไบโอตินได้ 4 โมเลกุล สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างอะวิดินและไบโอตินนั้นสามารถทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 100°ซ ดังนั้นการที่จะนำไบโอตินมาใช้จะต้องให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงเกินกว่า 100°ซ จึงจะเกิดการสลายพันธะระหว่างอะวิดินและไบโอติน นอกจากนี้อะวิดินยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

2. **การย่อยโปรตีน** (Protein hydrolysis)

การย่อยเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการดัดแปรโครงสร้างของโปรตีนเพื่อให้โปรตีนเกิดสมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพดีขึ้น ในการย่อยนั้นจะทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลงด้วยการสลายพันธะเปปไทด์ได้เป็นกรดแอมิโนและเปปไทด์ โปรตีนที่ผ่านการย่อยเรียกว่าโปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate) (Howell, 1996) วิธีการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตโดยทั่วไปมี 2 วิธี คือ การย่อยโปรตีนด้วยสารเคมี และเอนไซม์

1. การย่อยด้วยสารเคมี

การย่อยด้วยสารเคมีเป็นวิธีการที่มีต้นทุนต่ำ แบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ การย่อยด้วยสารละลายกรด และสารละลายเบส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

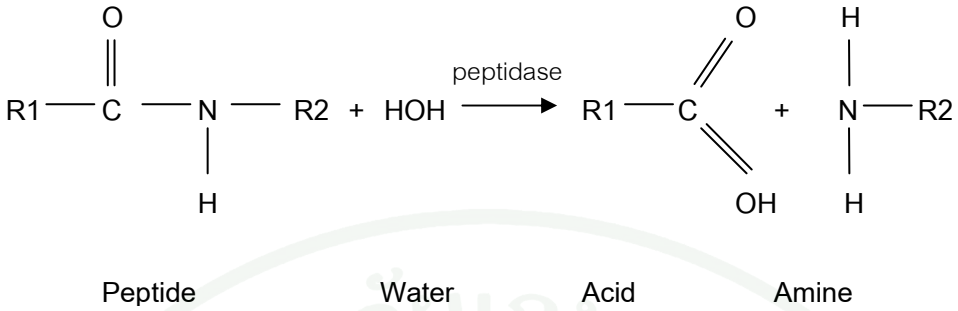
1.1 การย่อยด้วยสารละลายกรดเป็นการย่อยโปรตีนเพียงบางส่วนเท่านั้น วิธีนี้นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพราะมีต้นทุนต่ำและรวดเร็ว (Gao *et al*., 2006) ซึ่งการย่อยด้วยสารละลายกรดพันธะเปปไทด์ที่มีกรดแอมิโนแอสพาร์ติกอยู่ทางด้านปลายสายจะถูกย่อยได้เร็วกว่าพันธะเปปไทด์อื่นๆ (Shih, 1992) นอกจากนี้การย่อยด้วยกรดจะทำให้กรดแอมิโนทริปโตเฟน ซีรีน ทรีโอนีน กรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบ และกรดแอมิโนที่มีหมู่ไฮดรอกซิลถูกทำลาย (รุ่งอรุณ, 2545) รวมถึงกรดแอมิโนบางชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทำให้คุณภาพทางเคมีและสมบัติทางชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตเปลี่ยนแปลงไป (Nair *et al*., 1976) นอกจากนี้การใช้กรดยังควบคุมยากทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ไม่คงที่

1.2 การย่อยด้วยสารละลายเบส เช่น สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เป็นต้น ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดจากการย่อยด้วยสารละลายเบสจะเร็วกว่าการย่อยด้วยสารละลายกรด (Shih, 1992) หากทำการย่อยด้วยสารละลายเบสที่สภาวะรุนแรงจะทำให้เกิดปฏิกิริยาเรซิไมเซชัน (racemization) ของกรดแอมิโน ทำให้กรดแอมิโนเปลี่ยนรูปจากแบบแอล (L-form) เป็นแบบดี (D-form) ซึ่งร่างกายของมนุษย์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการสูญเสียกรดแอมิโนจำเป็นและเกิดสารพิษขึ้น (Howell, 1996)

2. การย่อยด้วยเอนไซม์

ปัจจุบันการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตนิยมใช้เอนไซม์โปรติเอสในการย่อยโปรตีนโดยเอนไซม์จะย่อยพันธะเปปไทด์ของโปรตีนได้เป็นเปปไทด์สายสั้นและกรดแอมิโน (ภาพที่ 5) วิธีการนี้เป็นที่นิยมมากเนื่องจากเอนไซม์มีความจำเพาะต่อสับสเตรท ใช้สภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่ทำลายกรดแอมิโนและสามารถควบคุมขอบเขตของการย่อยรวมทั้งขนาดของเปปไทด์ที่เกิดขึ้นได้ (Adler-Nissen,1986) ซึ่งการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทำให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างส่วนใหญ่หรือทั้งหมดของโครงสร้างตติยภูมิ (tertiary structure) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะอยู่ในรูปโครงสร้างปฐมภูมิ (primary structure) หรือทุติยภูมิ (secondary structure) ส่วนใหญ่ไฮโดรไลเสตที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์จะมีคุณสมบัติในการเกิดเจล การเกิดโฟม มีค่าการละลายที่ดีขึ้น มีความคงตัว อีกทั้งยังให้กลิ่นและรสที่เกิดจากกรดแอมิโนอิสระหรือเปปไทด์ได้ดีกว่าการใช้สารเคมี โดยสมบัติดังกล่าวสัมพันธ์กับโครงสร้างของโปรตีนที่ใช้เป็นวัตถุดิบ ไฮโดรไลเสตนิยมใช้เป็นส่วนประกอบในอาหาร (food ingredient) เพื่อเพิ่มกลิ่นรส เป็นอาหารเด็ก อาหารสัตว์ หรือใช้ในทางการแพทย์ (Godfrey, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 กระบวนการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์

ที่มา: Randall *et al*. (1997)

3. การผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

ไข่ขาวเป็นวัตถุดิบที่มีโปรตีนสูง มีกรดแอมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย และมีราคาถูก ส่วนใหญ่ไข่ขาวถูกนำไปใช้เป็นองค์ประกอบในอาหารเนื่องจากให้สมบัติเชิงหน้าที่ที่ดี เช่น การเกิดโฟม และเจล เป็นต้น แต่การนำไข่ขาวไปใช้ประโยชน์ก็ยังมีข้อจำกัดเนื่องจากไข่ขาวมีความหนืดสูง ไม่ทนต่อความร้อนนอกจากนี้ยังมีผู้บริโภคที่แพ้ไข่ขาว โดยการนำไข่ขาวมาผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวได้ และยังเป็นการปรับปรุงสมบัติของไข่ขาวให้ดีขึ้น (Cigic and Zelenik-Blatnik, 2004; Yujie *et al*., 2006) ซึ่งตารางที่ 9 ได้สรุปสมบัติเชิงหน้าที่ และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของไข่ขาวไฮโดรไลเสต มีรายงานว่าไข่ขาวไฮโดรไลเสตมีสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ลดการหืนของไขมัน ยับยั้งแองจิโอเทนซิน I คอนเวิร์ตติงเอนไซม์ (angiotensin I converting enzyme, ACE I) ลดความดันโลหิตสูง ลดการแพ้โปรตีนในไข่ขาว (Xu *et al*., 2007; López-Expósito *et al*., 2008; Cho *et al*., 2009; Liu *et al*., 2010; Chen and Chi 2011; Chen *et al*., 2012b) โดยไข่ขาวที่ผ่านการย่อยส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของไดเปปไทด์ และไตรเปปไทด์ซึ่งสามารถดูดซึมได้โดยตรงผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท (brush border membrane) (Cigic and Zelenik-Blatnik, 2004) จากสมบัติดังกล่าวไข่ขาวจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสำหรับผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตเพื่อใช้เป็นอาหารที่มีสมบัติเชิงหน้าที่ (functional food) ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร หรือพัฒนาเป็นเครื่องดื่มเพื่อเสริมโปรตีนที่มีคุณภาพให้แก่ผู้บริโภค (Yu, 2004; Liu *et al*., 2010)

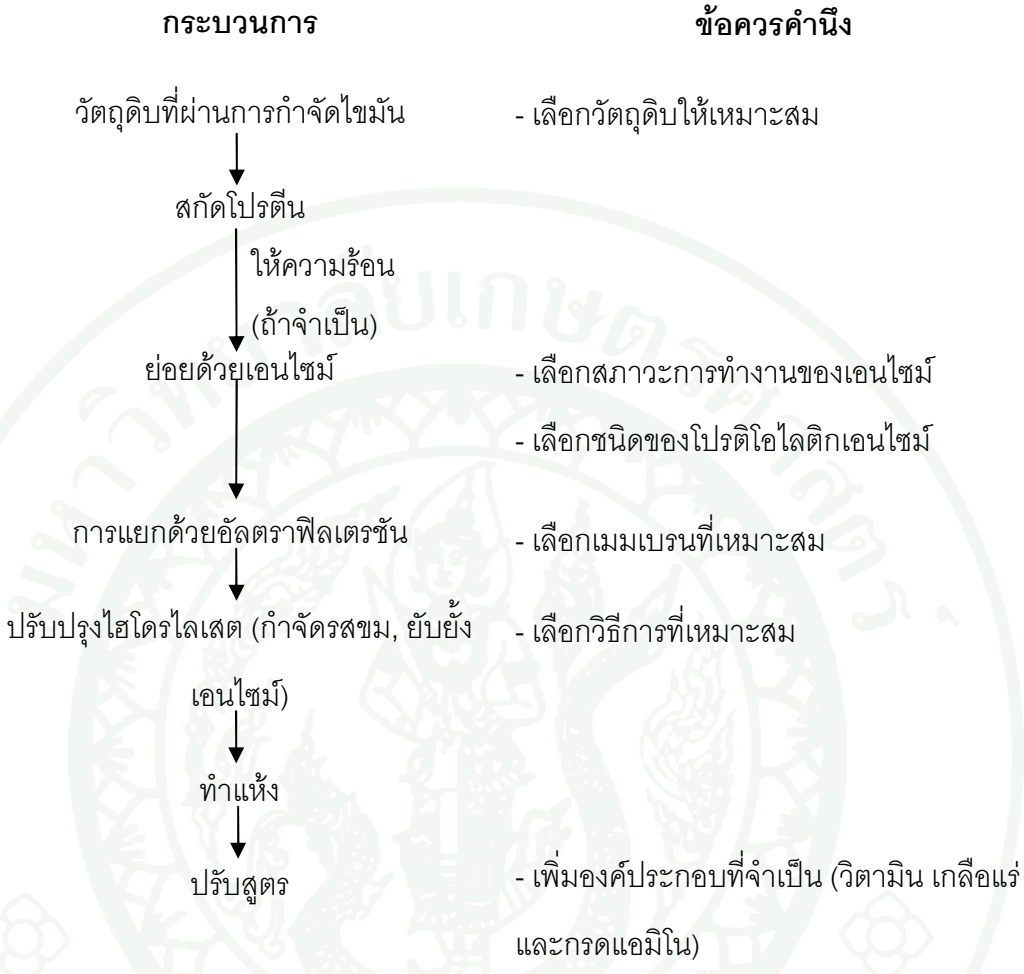
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 สมบัติเชิงหน้าที่และสมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

สับสเตรท	**เอนไซม์**	**สมบัติเชิงหน้าที่/สมบัติการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ**	**เอกสารอ้างอิง**
ไลโซไซมของไข่ขาว	เปปซิน, ทริปซิน	ยับยั้งจุลินทรีย์	Mine *et al*. (2004)
ไข่ขาว	เปปซิน	ลดความดันโลหิตสูงในหนู	Manso *et al*. (2008)
ไข่ขาว	ปาเปน, ทริปซิน และเปปติเดส	ลดโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ไข่ขาว, ยับยั้งการจับตัวของเกล็ดเลือดและการเกิดลิ่มเลือด	Cho *et al*. (2009)
ไข่ขาวของไข่เค็ม	เปปซิน	ทดแทนฟอสเฟตในกุ้ง	Kaewmanee *et al*. (2009)
ไข่ขาว	อัลคาเลส	ยับยั้ง ACE I	Liu *et al*. (2010)
โอโวทรานส์เฟอรริน	เปปซิน, เทอร์โมไลซิน	ยับยั้ง ACE I	Majumder and Wu (2010)
ไข่ขาว	ปาเปน	ต้านอนุมูลอิสระ การเกิดโฟมและอิมัลชัน	Chen *et al*. (2012b)
ไข่ขาวผง	ปาเปน	ต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้ง ACE I การละลาย การเกิดโฟมและอิมัลชัน	Chen and Chi (2011)

ในภาพที่ 6 แสดงกระบวนการทั่วไปสำหรับการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ ซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 6 กระบวนการทั่วไปในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

ที่มา: ดัดแปลงจาก Clemente (2000)

1. วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตไฮโดรไลเสตควรมีปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมและมีไขมันต่ำ Šlizyte *et al*. (2005ab) กล่าวว่าปริมาณไขมันในวัตถุดิบสัมพันธ์กับปริมาณผลได้ของโปรตีนในไฮโดร-ไลเสตผง ถ้าวัตถุดิบมีไขมันสูงปริมาณโปรตีนในไฮโดรไลเสตผงที่ผลิตได้จะน้อยกว่าวัตถุดิบที่มีไขมันต่ำเนื่องจากไขมันในวัตถุดิบมีผลต่อการละลายของโปรตีน นอกจากนี้ถ้าไฮโดรไลเสตมีปริมาณไขมันสูงจะนำไปประยุกต์ใช้ในอาหารได้จำกัด ซึ่งไข่ขาวมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูงและมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

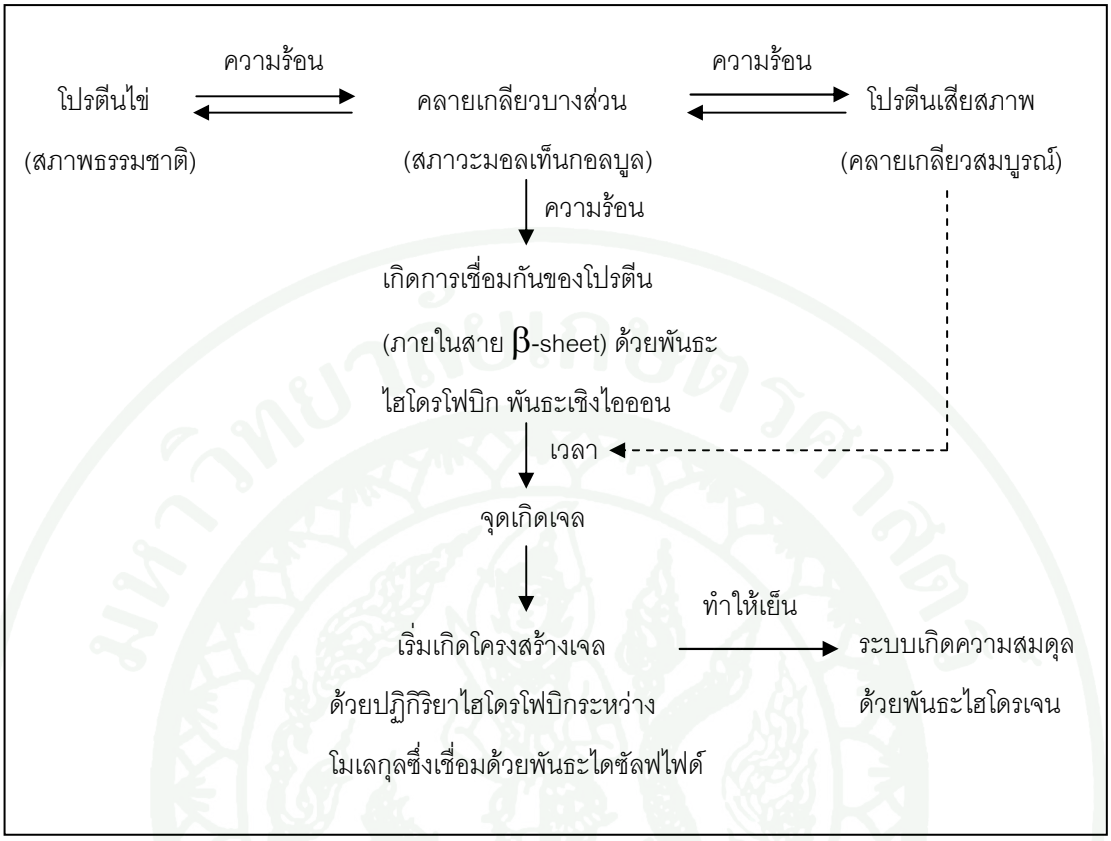
ไขมันน้อยมาก (0.03 เปอร์เซ็นต์) (Li-Chan *et al*., 1995) สำหรับการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตต้องมีการเตรียมวัตถุดิบโดยเริ่มจากการทำให้ไข่ขาวมีความเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการกวนผสมเบาๆ หรือโฮโมจิไนซ์ (Cigic and Zelenik-Blatnik, 2004; Yu, 2004; Chen *et al*., 2009) อาจมีการเติมน้ำเพื่อปรับปริมาณโปรตีนให้เหมาะสมป้องกันการจับตัวกันเป็นก้อนของไข่ขาวเมื่อนำไปให้ความร้อน (Yu, 2004) โดยปกติการย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์จำเป็นต้องมีน้ำเข้าร่วมปฏิกิริยา ซึ่งน้ำมีผลต่อการกระจายตัวของเอนไซม์ (Imm and Lee, 1999) นอกจากนี้ยังมีผลต่อปริมาณโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ผลิตได้ (Šlizyte *et al*., 2005a) Imm and Lee, 1999 พบว่าเมื่อมีปริมาณน้ำในการทำปฏิกิริยาน้อย ไฮโดรไลเสตที่เป็นของเหลวจะมีความหนืดสูงทำให้กรองได้ยากทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง ขณะที่เพิ่มปริมาณน้ำจะได้ผลผลิตเพิ่มขึ้นโดยที่ระดับการย่อยสลายไม่เปลี่ยนแปลง

ในบางกรณีการเตรียมไข่ขาวสำหรับผลิตไฮโดรไลเสตอาจต้องมีการให้ความร้อนแก่โปรตีนก่อน Yujie *et al*. (2006) กล่าวว่าการให้ความร้อนแก่สารละลายไข่ขาวก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์มีวัตถุประสงค์เพื่อให้โปรตีนคลายโครงสร้างเพื่อให้พันธะเปปไทด์คลายออกและทำให้โปรตีนโอโวมิวคอยด์ โอโวอินฮิบิเตอร์ โอโวมาโครโกลบูลิน ฯลฯ (Mine, 1995) ในไข่ขาวที่ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสเกิดการเสียสภาพ แต่การให้ความร้อนไม่ควรใช้เวลานานและใช้อุณหภูมิสูงจนทำให้เกิดเจล หรือไข่ขาวตกตะกอนจับตัวเป็นก้อนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งจะทำให้เอนไซม์เข้าทำปฏิกิริยาได้ยาก (Cigic and Zelenik-Blatnik, 2004; Yujie *et al*., 2006)

1.1 ผลของความร้อนต่อโปรตีน

จากภาพที่ 7 เมื่อโปรตีนไข่ขาวได้รับความร้อนจะทำให้เกิดการสลายพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ โมเลกุลของโปรตีนจึงคลายเกลียวมีโครงสร้างที่ต่างไปจากสภาพธรรมชาติ (Mine, 1995; Campbell *et al*., 2003) อยู่ในสถานะคลายเกลียวบางส่วน (partially unfolded state) หรือมอลเท็นกอลบูล โดยที่สถานะนี้โอวัลบูมิน โอโวทรานสเฟอรร์ริน และไลโซมเกิดการขดตัวแบบบีตาชีท (β-sheet) ทำให้ไวต่อปฏิกิริยามากขึ้น สารละลายมีลักษณะขุ่นเนื่องจากเกิดการรวมตัวกันของโปรตีนด้วยปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิก เมื่อให้ความร้อนมากขึ้นโปรตีนไข่ขาวจะเริ่มเกิดเจล (Van der Plancken *et al*., 2005) จากการเชื่อมระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พันธะไฮโดรเจน พันธะเชิงไอออน ปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิกภายใต้สภาวะที่เหมาะสม หรือจากการออกซิเดชันของซัลฟไฮดริลเป็นพันธะไดซัลฟไฟด์ (Mine, 1995; Sun and Hayakawa, 2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 ขั้นตอนการเกิดเจลของโปรตีนไข่ขาวด้วยความร้อน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mine (1995)

การให้ความร้อนแก่โปรตีนมีผลต่อการทำปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และสับสเตรทในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต Stanciuc *et al*. (2010) ทดลองให้ความร้อนแก่โปรตีนเวย์เข้มข้นที่อุณหภูมิ 60-85°ซ แล้วนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ Proteinase K พบว่าการให้ความร้อนแก่วัตถุดิบก่อนการย่อยทำให้โปรตีนเกิดการคลายเกลียวบางส่วน และเอนไซม์เข้าทำงานได้ดีกว่าวัตถุดิบที่ไม่ให้ความร้อน โดยการให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 30 นาทีเป็นสภาวะที่ไฮโดรไลเสตมีระดับการย่อยสลายสูงสุด ขณะที่ Van der Plancken *et al*. (2004) รายงานว่าการให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาว 10 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 67.5-77°ซ แล้วจึงนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินร่วมกับแอลฟาไคโมทริปซิน พบว่าเอนไซม์สามารถย่อยไข่ขาวได้ดีขึ้นทำให้มีระดับการย่อยที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เนื่องจากโปรตีนมีการละลายอยู่ในสารละลายได้มากกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. เอนไซม์

การเลือกเอนไซม์ในการผลิตไฮโดรไลเสตควรเลือกเอนไซม์ที่มีราคาต่ำเมื่อเทียบกับประสิทธิภาพในการทำงาน หาได้ง่าย อยู่ในรูปที่ใช้งานได้สะดวก โดยเอนไซม์ควรมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานใกล้เคียงพีเอชตามธรรมชาติของสับสเตรท หลังจากการย่อยโปรตีนต้องยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพื่อไม่ให้เกิดการย่อยโปรตีนอีกด้วยการควบคุมพีเอชหรือการให้ความร้อนหรือใช้ทั้งสองวิธีร่วมกัน ซึ่งการเลือกวิธีต้องคำนึงถึงชนิดของเอนไซม์และลักษณะของผลิตภัณฑ์ เช่น การใช้ความร้อนควรขึ้นอยู่กับความสามารถในการต้านทานความร้อนของเอนไซม์รวมถึงความร้อนที่จะมีผลต่อการตกตะกอนของโปรตีนซึ่งทำให้สมบัติของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนแปลงไป (รุ่งอรุณ, 2545)

3. การแยกและการปรับปรุงคุณสมบัติของไฮโดรไลเสต

เมื่อโมเลกุลโปรตีนถูกย่อยจะทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้นๆ และกรดแอมิโนอิสระที่ละลายอยู่ในส่วนของเหลว ดังนั้นจึงต้องแยกส่วนของเหลวออกจากของแข็งโดยการแยกผ่านตระแกรงร่อน การกรอง หรือการเหวี่ยงแยก นอกจากนี้อาจมีการเพิ่มขั้นตอนการกำจัดสี กลิ่น รสขม (Clemente, 2000) หรือนำของเหลวที่แยกได้มาผ่านกระบวนการอัลตราฟิวเตรชัน (รุ่งอรุณ, 2545) ซึ่งเป็นกระบวนการที่นิยมใช้เพื่อกำจัดเปปไทด์โมเลกุลใหญ่ และโปรตีน รวมถึงโปรติโอไลติกเอนไซม์ที่ถูกยับยั้งด้วยความร้อนภายหลังการย่อย (Clemente, 2000) โดยโมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสตสัมพันธ์กับสมบัติเชิงหน้าที่ของไฮโดรไลเสต มีรายงานว่าโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กจะมีสมบัติการต้านออกซิเดชันและยับยั้ง ACE I สูง (Chen and Chi, 2011) โดยขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสตสามารถใช้ขนาดของเมมเบรนเป็นตัวกำหนด Chiang *et al*. (2008) นำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่เตรียมโดยใช้โปรตีนไข่ขาว 1 เปอร์เซ็นต์ย่อยด้วยเอนไซม์เทอร์โมไลซิน 1 เปอร์เซ็นต์นาน 2 ชั่วโมงมากรองผ่านเยื่อเมมเบรน ขนาด 10, 3 และ 1 กิโลดาลตัน พบว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านเยื่อเมมเบรน ขนาด 1 กิโลดาลตัน จะมีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 0.4 กิโลดาลตัน ซึ่งไฮโดรไลเสตที่เตรียมได้มีคุณสมบัติในการยับยั้ง ACE I สูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. การทำแห้ง

เพื่อความสะดวกในการเก็บรักษาและการนำไปใช้ประโยชน์จึงนิยมนำโปรตีนไฮโดร-ไลเสตที่เป็นของเหลวมาผ่านกระบวนการทำแห้งด้วยวิธีต่างๆ เช่น การทำแห้งแบบพ่นฝอย แบบสุญญากาศ และแบบแช่เยือกแข็ง เป็นต้น (รุ่งอรุณ, 2545) โดย Chen *et al*. (2012b) ทดลองนำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่เตรียมโดยใช้เอนไซม์ปาเปนไปทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือก-แข็ง พบว่าไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองแบบมีองค์ประกอบและการกระจายตัวของโมเลกุลที่คล้ายกัน แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไฮโดรไลเสตจะมีสมบัติการเกิดโฟมที่ดีขึ้น ตรงข้ามกับเมื่อนำไปทำแห้งแบบพ่นฝอย สำหรับสมบัติการต้านออกซิเดชันของไฮโดรไลเสตที่ผ่านการทำแห้งทั้งสองแบบและไฮโดรไลเสตที่ไม่ผ่านการทำแห้งพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ดังนั้นการทำแห้งแบบพ่นฝอยจึงเป็นวิธีที่ดีในการเตรียมไฮโดรไลเสตผงจากไข่ขาวที่มีคุณสมบัติต้านออกซิเดชัน เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่าย ต้นทุนต่ำ และประหยัดเวลา

5. การปรับสูตร

ขั้นตอนนี้เป็นการประยุกต์ใช้ไฮโดรไลเสตเพื่อบริโภคหรือเติมในผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร โดย Amerongen *et al*. (2009) แนะนำว่าไฮโดรไลเสตของโอโวทรานสเฟอร์ริน โอโวมิวซิน หรือไลโซไซมสามารถนำมาเติมในอาหาร หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เนื่องจากมีสมบัติในการลดเบาหวานชนิดที่ 2 ลดไขมันในเส้นเลือด โดยอาจเติมในเครื่องดื่ม พุดดิ้ง ซอส และผลิตภัณฑ์จากนม โดยสามารถเติมไฮโดรไลเสตได้ในระหว่างกระบวนการผลิต หรือในผลิตภัณฑ์สุดท้าย ขณะที่ Yu (2004) ได้พัฒนากระบวนการเตรียมไฮโดรไลเสตจากไข่ขาวเพื่อลดการตกตะกอนของไข่ขาวเนื่องจากความร้อน และลดรสขม โดยที่ยังคงรักษารสชาติและคุณค่าของโปรตีนไข่ขาว ซึ่งไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่เตรียมขึ้นจะนำมาเติมโอลิโกแซคคาไรด์ และโพลีเดกซ์โตรส จากนั้นนำมาสเทอริไลซ์ 10 นาทีและทำให้เย็นจะได้เครื่องดื่มเสริมร่างกายจากไข่ขาว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. วัตถุดิบ (Materials)

1.1 ไส้และตับอ่อนของเป็ดพันธุ์เชอร์รี่วัลเลย์อายุ 42-43 วัน จากบริษัท ซีพีเอฟ ผลิตภัณฑ์ อาหาร จำกัด

1.2 ไข่ไก่ของแม่ไก่พันธุ์ H&N Browning จากฟาร์มไก่หลวงสุวรรณวาจกสิกิจ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยใช้ไข่เบอร์ 1 ที่มีอายุการเก็บรักษา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30°ซ

2. อุปกรณ์ (Equipments)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการเตรียมเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด

2.1.1 เครื่องปั่นผสม (Blender ยี่ห้อ Philips รุ่นHR2011/70)

2.1.2 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ OHAUS รุ่น ARC 120, USA)

2.1.3 เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Thermo Fisher รุ่น Sorval RC 6-Plus)

2.1.4 เครื่องทำแห้งแบบระเหิด (Lyophilizer ยี่ห้อ Heto รุ่น FD 2.5)

2.1.5 ตระแกรงร่อนขนาด 40 ไมครอน (Test sieve ยี่ห้อ Retsch, Germany)

2.1.6 ชุดกรวยแยกแบบสุญญากาศ (Buchner funnel)

2.1.7 อุปกรณ์เครื่องครัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด

2.2.1 เครื่องชั่งวิเคราะห์ 4 ตำแหน่ง (Analytical balance ยี่ห้อ OHAUS รุ่น Analytical Plus)

2.2.2 เครื่องกวนแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic stirrer รุ่น Multistirrer 6, Velp scientific, Italy)

2.2.3 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath ยี่ห้อ Lab. Companion รุ่น BS-11, OSKON, Thailand)

2.2.4 เครื่องปั่นผสมของเหลว (Vortex mixerm รุ่น VX 100 จากบริษัท Labnet International, Inc, USA)

2.2.5 ไมโครปิเปต (ยี่ห้อ Pipette Man, Gilson S.A.S.)

2.2.5 ชุดอุปกรณ์เครื่องแก้ว

2.2.6 สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo รุ่น Genesis 10-s, TherMo Electron Corparation., Madison, USA)

2.3 เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางกายภาพ และเคมีของไข่ขาวสด ไข่ขาวที่ผ่านการให้ความร้อน และโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

2.3.1 เครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer รุ่น RVDV III^{+} และหัววัด UL adaptor)

2.3.2 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter รุ่น Microcomputer pH-vision 6071, Jenco Electronics Limited)

2.3.3 เครื่องกวนผสม (Stirrer ยี่ห้อ Cole Parmar รุ่น 51450-series)

2.3.4 อ่างควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Shaking water bath รุ่น BS-11, Jeio Tech Limited)

2.3.5 เครื่องไล่อากาศโดยระบบอัลตราโซนิกส์ (Ultrasonicator ยี่ห้อ Sanyo Gallenkamp PLC, รุ่น Soniprep 150, Leicester, UK)

2.3.6 ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ (digital thermometer) และสายเทอร์โมคัปเปิล (thermocouple)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.3.7 เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Thermo Fisher รุ่น Sorval RC 6-Plus)

2.3.8 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven ยี่ห้อ Memmert, Schwach, Germany)

2.3.9 เตาเผาอุณหภูมิสูง (Muffle furnace ยี่ห้อ Gallenkamp รุ่น FSE 621, UK)

2.3.10 เครื่องวิเคราะห์โปรตีนแบบ Kjeldahl (ยี่ห้อ BÜCHI รุ่น 435: digestion, BÜCHI รุ่น B-316: distillation unit, Labortechnik AG, Switzerland)

2.3.11 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน (ยี่ห้อ Tecator รุ่น Soxtec System HT 1043: Extraction Unit, UK)

2.3.12 เครื่องวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน (SDS-PAGE รุ่น Mini-protein II Electrophoresis Cell และ Power supply, Bio-Rad Laboratory)

2.3.13 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-visible spectrophotometer ยี่ห้อ Thermo รุ่น Genesis 10-s, TherMo Electron Corparation., Madison, USA)

2.3.14 โถดูดความชื้น (Desiccator)

2.3.15 อุปกรณ์เครื่องแก้วงานวิทยาศาสตร์

3. สารเคมี

3.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์กิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ปาเปน และโปรตีน (Lowry's method)

3.1.1 เคซีน (Casein: Analytical grade: Fluka, Switzerland)

3.1.2 ไทโรซีน (Tyrosine: Analytical grade: Fluka, Switzerland)

3.1.3 โฟลิน-ซีโอเคาทูล (Folin & Ciocalteu's Phenol Reagent: Analytical grade: Sigma-Aldrich, USA)

3.1.4 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate anhydrous, Na_2CO_3: Analytical grade: Rankem, India)

3.1.5 ไตรคลอโรอะซีติกแอซิด (Trichloroacetic acid (TCA): Analytical grade: Fisher Chemical, UK)

3.1.6 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (di-Sodium hydrogen orthophosphate dehydrate, $Na_2HPO_4.2H_2O$: Analytical grade: Ajax Finechem Pty Ltd.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.7 โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต (Sodium dihydrogen orthophosphate, $NaH_2PO_4.2H_2O$: Analytical grade: Ajax Finechem Pty Ltd.)

3.1.8 ไกลซีน (Glycine, $H_2NCH_2CO_2H$: MB grade: USB Corporation, USA)

3.1.9 โบวายเซรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin: Fluka, Switzerland)

3.1.10 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate, $CuSO_4.5H_2O$: Analytical grade Fisher Chemical, UK)

3.1.11 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: Analytical grade: Merck, Germany)

3.1.12 โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต (Potassium sodium – Tartrate, $KNaC_4H_4O_6.4H_2O$: Analytical grade: UNIVAR, APS Ajax Finechem, Australia)

3.1.13 ซิสเทอีน (L-Cysteine hydrochloride Monohydrate, $C_3H_7NO_2S.HCl.H_2O$: Analytical grade: Fluka, Switzerland)

3.1.14 เอทธิลีนไดเอมีนเททระอะซีติกแอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), $C_{10}H_{16}N_2O_8$: Analytical grade: Ajax Finechem Pty Ltd.)

3.2 สารเคมีสำหรับการเตรียมไข่ขาวไฮโดรไลเสต

3.2.1 เอนไซม์ปาเปน (2×crystallized, EC 3.4.22.2, Sigma-Aldrich, มีกิจกรรม 4.20 หน่วย/มก.โปรตีน (วิเคราะห์กิจกรรมตามวิธีของ Cupp-Enyard (2008) ที่อุณหภูมิ 40°ซ พีเอช 7)

3.2.2 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid, HCl: Analytical grade: Merck, Germany)

3.2.3 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: Analytical grade: Merck, Germany)

3.3.4 สารป้องกันการเกิดโฟม (Silicone antifoaming agent: General purpose grade: Fisher Scientific, UK)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์โปรตีน

3.3.1 กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid, H_2SO_4: Analytical grade: Merck, Germany)

3.3.2 โพแทสเซียมซัลเฟต (Potassium sulphate, K_2SO_4: Analytical grade: Ajax Finechem)

3.3.3 คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper (II) sulfate, $CuSO_4.5H_2O$: Analytical grade: Fisher Chemical, UK)

3.3.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide, NaOH: Commercial grade)

3.3.5 โซเดียมคาร์บอเนต (Sodium carbonate, Na_2CO_3: Commercial grade)

3.3.6 กรดบอริก (Boric acid, H_3BO_3: Analytical grade: Ajax Finechem)

3.3.7 เมทิลเรด (Methyl Red, $C_{15}H_{15}N_3O_2$: Analytical grade: Panreac, Panreac Quimica Sa, Spain)

3.3.8 โบรโมครีซอลกรีน (Bromocresol Green, $C_{21}H_{14}Br_4O_5S$: Analytical grade : LABCHEM, Ajax Finechem)

3.3.9 เอทานอล (Ethanol, C_2H_5OH: Analytical grade: Merck, Germany)

3.4 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ไขมัน

3.4.1 ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether: Analytical grade: Fisher Chemical, UK)

3.5 สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์มวลโมเลกุลของโปรตีน

3.5.1 โปรตีนมาตรฐาน (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range: Bio-Rad Laboratories)

3.5.2 เมทานอล (Methanol, CH_3OH: Analytical grad: Merck, Germany)

3.5.3 แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium Persulfate: $(NH_4)_2S_2O_8$: ACS Reagent grade: USB Corporation, Japan)

3.5.4 กรดอะซิติก (Acetic acid: CH_3COOH: Analytical grade: Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.5.5 Acrylamide PAGE ($CH_2CHCONH_2$: Amersham Biosciences, Sweden)

3.5.6 Methylenebisacrylamide ($(CH_2CHCONH)_2CH_2$: Amersham Biosciences, Sweden)

3.5.7 ไกลซีน (Glycine, $H_2NCH_2CO_2H$: MB grad: Plus One USB Corporation, USA)

3.5.8 Mercaptoethanol ($HSCH_2CH_2OH$: Amersham Biosciences, Sweden)

3.5.9 Sodium Dodecyl Sulfate (SDS, $CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$: USB Corporation, USA)

3.5.10 Coomassie brilliant blue R-250 ($C_{45}H_{44}N_3O_7S_2Na$: USB Corporation, USA)

3.5.11 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED, $(CH_3)_2NCH_2CH_2N(CH_3)_2$: MB grade: USB Corporation, USA)

3.5.12 โบรโมฟีนอลบลู (Bromophenol blue, $C_{19}H_{10}Br_4O_5S$: Ajax Finechem)

3.5.13 Tris (hydroxymethyl aminomethane) ($NH_2C(CH_2OH)_3$: MB grade: USB Corporation, USA)

3.5.14 กลีเซอรอล (Glycerol, $CH_2OHCHOHCH_2OH$: Analytical grade: Asia Pacific Specialty Chemicals Limited)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. การเตรียม และการศึกษาคุณภาพสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

1.1 การเตรียมวัตถุดิบไส้และตับอ่อนของเป็ด

นำไส้เป็ดทั้งพวงที่ตัดแยกกระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี กึ๋น และตับ และผ่านการชำแหละไม่เกิน 12 ชั่วโมงแช่ในน้ำแข็งขณะขนส่งจากโรงงานนำมาทำความสะอาด ใช้มือรูดเอาเศษอาหารด้านในออก ผ่าตามยาว ขูดไขมันบริเวณผิวด้านนอกของลำไส้และล้างด้วยน้ำเย็น 5 รอบ พักให้สะเด็ดน้ำในกระชอนจากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติกโดยแยกแต่ละพวงเก็บในถุงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°ซ เพื่อใช้สำหรับการสกัดเอนไซม์โปรติเอสโดยเก็บไม่เกิน 2 สัปดาห์

1.2 การเตรียมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของสารละลาย และผงแห้งโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rathinaraj *et al*. (2010)

ในการสกัดเอนไซม์แต่ละครั้งใช้ไส้และตับอ่อนของเป็ดจำนวน 5 พวง โดยนำไส้และตับอ่อนของเป็ดมาหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1.5×1.5×1.5 เซนติเมตร และปั่นผสมกับน้ำกลั่นเย็นอุณหภูมิ 4°ซ โดยใช้อัตราส่วนไส้และตับอ่อนของเป็ดต่อน้ำกลั่นเย็น (พีเอช 6.12) เท่ากับ 1ต่อ 2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปั่นให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมอาหารนาน 5 นาทีที่ความเร็วรอบสูงสุด จากนั้นนำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิด้วยอัตราเร็ว 12,000×g ที่ 4°ซ นาน 20 นาที โดยนำสารละลายที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 จะได้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปสารละลาย จากนั้นจึงนำไปทำแห้งแบบระเหิด นำมาผ่านตระแกรงร่อนขนาด 40 เมช และบรรจุสารสกัดหยาบของเอนไซม์ผงที่ได้ในถุงพลาสติก และหุ้มด้วยถุงฟอยล์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -18°ซ เพื่อศึกษาปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์และใช้ในการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.3 คุณภาพสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของสารละลาย และผงแห้ง

นำสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปของสารละลาย และผงแห้งมาศึกษาปริมาณโปรตีน และค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพของเอนไซม์ในรูปของสารละลาย และผงแห้ง

1.3.1 ศึกษาปริมาณโปรตีนในสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

เจือจางสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปของสารละลาย 1 มล. ด้วยน้ำกลั่น 19 มล. คนให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็ก ในกรณีของเอนไซม์ผงแห้งจะใช้เอนไซม์ 10 มก. เจือจางด้วยน้ำกลั่น 10 มล. ผสมให้เข้ากันด้วยแท่งแม่เหล็กจนเอนไซม์ละลาย จากนั้นนำสารละลายของเอนไซม์ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry method (Lowry *et al*., 1951) ตามวิธีในภาคผนวก โดยปริมาณโปรตีนคิดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน

1.3.2 การศึกษาค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

เจือจางสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปสารละลาย และผงแห้งให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.5 จากนั้นนำไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีของ Cupp-Enyard (2008) แสดงวิธีในภาคผนวก หัวข้อที่ 1 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสารละลายเคซีน (สับสเตรท) เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ โดยค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสคิดเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน สำหรับค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสแสดงเป็น หน่วย/มก.เอนไซม์ ทั้งนี้เอนไซม์ 1 หน่วยหมายถึงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล (181.19 ไมโครกรัม) ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

2.1 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ในการศึกษาผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์ ศึกษาที่พีเอช 6 ระดับ คือ 6, 7, 7.5, 8, 9 และ 10 โดยใช้โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ในช่วงพีเอช 6-8 และไกลซีน-โซเดียมไฮดรอกไซด์บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ในช่วงพีเอช 9-10 โดยละลายสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และเตรียมสารละลายเคซีนที่ช่วงพีเอช 6-10 ตามระบบบัฟเฟอร์ข้างต้น จากนั้นวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Cupp-Enyard (2008) ซึ่งแสดงวิธีในภาคผนวกหัวข้อที่ 1 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 37°ซ จากนั้นเลือกพีเอชที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ละลายสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่พีเอชซึ่งเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุด (จากข้อ 2.1) จากนั้นวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีในภาคผนวกหัวข้อที่ 1 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°ซ จากนั้นเลือกอุณหภูมิที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุด

2.3 ผลของพีเอชที่อุณหภูมิ 60°ซ ต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ในการศึกษาผลของพีเอชที่อุณหภูมิ 60°ซ ต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ศึกษาที่พีเอช 6 ระดับ คือ 6, 7, 7.5, 8, 9 และ 10 ซึ่งใช้ระบบบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 โดยละลายสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และเตรียมสารละลายเคซีนที่ช่วงพีเอช 6-10 ตามระบบบัฟเฟอร์ที่ระบุในข้อ 2.1 จากนั้นวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Cupp-Enyard (2008) ซึ่งแสดงในภาคผนวกหัวข้อที่ 1 โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ร่วมกับสับสเตรทเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60°ซ และเลือกพีเอชที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากผลการศึกษาค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส ทำการเลือกพีเอชและอุณหภูมิที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดสำหรับวัดค่ากิจกรรมเอนไซม์ในการศึกษาเรื่องความคงตัวของเอนไซม์

3. การศึกษาความคงตัวสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด (ดัดแปลงจาก Jamadar *et al*., 2003)

3.1 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอช 6, 7, 7.5, 8, 9 และ 10 โดยนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์มาละลายในบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งใช้ระบบบัฟเฟอร์เช่นเดียวกับที่ระบุไว้ในข้อ 2.1 จากนั้นบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ตามวิธีการในภาคผนวก โดยใช้สภาวะ (พีเอช และอุณหภูมิ) ที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุด (จากข้อ 2) เพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์โปรติเอส (%Residual activity)

$$\text{กิจกรรมคงเหลือ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่ผ่านการบ่มตามช่วงเวลาที่กำหนด}}{\text{ค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ 0 ชั่วโมง}} \times 100$$

จากนั้นเลือกพีเอชที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูง และมีความคงตัวดี เพื่อใช้เป็นสภาวะในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

3.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°ซ โดยนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์มาละลายในบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (จากข้อ 2 และ 3.1) บ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ ต่างๆ นาน 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 และ 12 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลานำไปลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วด้วยการแช่ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสตามวิธีการในภาคผนวกหัวข้อที่ 1 โดยใช้สภาวะ (พีเอช และอุณหภูมิ) ที่เอนไซม์มีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมสูงสุด (จากข้อ 2) เพื่อคำนวณหาค่ากิจกรรมคงเหลือของเอนไซม์โปรติเอส (%Residual activity) โดยวิธีการคำนวณเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 3.1

จากผลการศึกษาค่ากิจกรรม (ข้อ 2) และความคงตัวของเอนไซม์ (ข้อ 3.1 และ 3.2) จึงเลือกพีเอชและอุณหภูมิที่เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูง และมีความคงตัวดี เพื่อใช้เป็นสภาวะสำหรับการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จากไส้และตับอ่อนของเป็ด

4. ผลของการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไข่ขาว

4.1 คุณภาพทางเคมี และกายภาพของไข่ขาวสด

นำไข่ไก่ที่ใช้สำหรับการทดลองมาแยกไข่ขาวออกจากไข่แดง นำไข่ขาวไปกรองด้วยผ้าขาวบาง 2 รอบ เพื่อนำไปศึกษาผลของระยะเวลาการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของโปรตีนไข่ขาว และสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี และกายภาพดังนี้

4.1.1 องค์ประกอบทางเคมีของไข่ขาวสด ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน เถ้า ตามวิธี AOAC (2000) และคาร์โบไฮเดรตโดยการคำนวณ

4.1.2 ค่าความหนืดด้วยเครื่องวัดความหนืด (Brookfield viscometer RVDV III^{+}) พร้อมอุปกรณ์เสริม คือ UL Adapter ทำการวัดโดยใช้ตัวอย่างครั้งละ 16 มล. หัววัดเบอร์ 00 หมุนที่ความเร็วรอบ 0.8 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที

4.1.3 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำไข่ขาวสดมาเจือจางด้วยสารละลายตัวอย่างให้มีปริมาณโปรตีน 15 และ 3 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟรริซิสใน 4.5เปอร์เซ็นต์ stacking gel และ 12.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ separating gel ย้อมด้วยสี 0.1เปอร์เซ็นต์ Coomassie brilliant blue R-250 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับ Broad range marker (Bio-Rad No.161-0363, USA)

4.2 ผลของระยะเวลาการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไข่ขาว

4.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำไข่ขาวสดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (โดยน้ำหนัก/ปริมาตร) เพื่อให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 5.5 เปอร์เซ็นต์ เติมสารป้องกันการเกิดโฟม (silicone oil) 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของโปรตีน กรองด้วยผ้าขาวบาง 2 รอบ และคนผสมเบาๆ ด้วยแท่งแม่เหล็กนาน 5 นาที นำไปไล่ฟองอากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิกส์นาน 20 นาที (ดัดแปลงจากวิธีของอัจนา, 2549) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จะได้สารละลายโปรตีนไข่ขาวที่มีความเข้มข้นของโปรตีนประมาณ 5.5 เปอร์เซ็นต์ นำไปวัดค่าความหนืดตามวิธีในข้อ 4.1.2 และศึกษาการให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาว

4.2.2 ศึกษาระยะเวลาการให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาว

นำสารละลายโปรตีนไข่ขาวปริมาตร 150 มล. ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. ปิดบีกเกอร์ด้วยอลูมินัมฟอยล์ จากนั้นนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 75°ซ ติดตามและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในสารละลายตลอดช่วงเวลาการให้ความร้อนโดยใช้ดิจิตอลเทอร์โมมิเตอร์ และสายเทอร์โมคัปเปิล โดยทำการสุ่มตัวอย่างทุก 5, 10, 15, 20, 30 และ 40 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง สังเกตและบันทึกลักษณะปรากฏของสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ผ่านการให้ความร้อนที่ระยะเวลาต่างๆ และนำไปวัดค่าความหนืดตามวิธีในข้อ 4.1.2

จากผลการทดลองให้ความร้อนสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่อุณหภูมิ 75°ซ ต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และค่าความหนืด ทำการเลือกระยะเวลาการให้ความร้อนที่โปรตีนไข่ขาวยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่าความหนืด และสารละลายที่ได้ยังไม่เกิดการจับตัวกันเป็นก้อนตกตะกอนเพื่อนำไปศึกษาการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. เปรียบเทียบการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

5.1 การผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส และปาเปน

5.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

เตรียมสารละลายโปรตีนไข่ขาวความเข้มข้นของโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ โดยนำสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านความร้อนในระยะเวลาที่เหมาะสม มาเจือจางด้วยน้ำให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการศึกษาผลของระยะเวลาการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน

5.1.2 ศึกษาระยะเวลาการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปร-ติเอส

ศึกษาผลของระยะเวลาการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง โดยนำสารละลายโปรตีนไข่ขาวความเข้มข้นโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ มาปรับพีเอชเป็น 8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 25 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารสกัดหยาบของเอนไซม์ปริมาณ 1 หน่วยต่อโปรตีนไข่ขาว 50 มก. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50°ซ สุ่มตัวอย่างทุก 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง นำสารละลายมาให้ความร้อนที่ 90°ซ นาน 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราเร็ว 10,000xg ที่ 25°ซ นาน 20 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ซึ่งสารละลายที่ได้คือโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ โดยบรรจุโปรตีนไข่ขาวไฮโดร-ไลเสตในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.3 ศึกษาระยะเวลาการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยปาเปน

ศึกษาผลของระยะเวลาการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยปาเปนที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง โดยนำสารละลายโปรตีนไข่ขาวความเข้มข้นโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ มาปรับพีเอชเป็น 7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอก-ไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 25 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 40°ซ นาน 10 นาที จากนั้นจึงเติมปาเปนปริมาณ 1 หน่วยต่อโปรตีนไข่ขาว 50 มก. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 40°ซ สุ่มตัวอย่างทุก 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง นำสารละลายมาให้ความร้อนที่ 90°ซ นาน 10 นาที เพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราเร็ว 10,000xg ที่ 25°ซ นาน 20 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ซึ่งสารละลายที่ได้คือโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปน โดยบรรจุโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อรอการวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

ทั้งนี้ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนตามวิธีของ Cupp-Enyard (2008) โดยกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปน 1 หน่วยหมายถึงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล (181.19 ไมโครกรัม) ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

5.1.4 การวิเคราะห์คุณภาพของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

นำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตจากข้อ 5.1.2 และ 5.1.3 มาวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

5.1.4.1 ผลได้ของของแข็ง (เปอร์เซ็นต์) นำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตมาวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ AOAC (2000) ในภาคผนวกหัวข้อที่ 3 จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ผลได้ของของแข็ง (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณของแข็งในโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต (กรัม)}}{\text{ปริมาณของแข็งในสารละลายโปรตีนไข่ขาว (กรัม)}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.4.2 ปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์) นำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตมาวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน ด้วยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) ตามภาคผนวกหัวข้อที่ 5 จากนั้นนำมาคำนวณตามสูตรต่อไปนี้

$$\text{ไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)ในโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต}}{\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)ในสารละลายโปรตีนไข่ขาว}} \times 100$$

5.1.4.3 การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970) โดยนำโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตมาเจือจางด้วยสารละลายตัวอย่าง (sample buffer) ให้มีปริมาณโปรตีน 4 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ทำอิเล็กโทรโฟริซิสใน 4.5 เปอร์เซ็นต์ stacking gel และ 16.5เปอร์เซ็นต์ separating gel ย้อมด้วยสี 0.1เปอร์เซ็นต์ coomassie blue R250 น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนเปรียบเทียบกับ Broad range marker (Bio-Rad No.161-0363, USA)

เลือกระยะเวลาการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ให้ผลได้ของของแข็งสูง ปริมาณไนโตรเจนคืนกลับสูง และได้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กเมื่อย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส และปาเปน

5.2 เปรียบเทียบการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส ปาเปน และการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับปาเปน

5.2.1 การย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์

เตรียมโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ ตามวิธีการในข้อ 5.1.2 ทั้งนี้ใช้ระยะเวลาการย่อยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5 โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ได้จะนำไปวิเคราะห์คุณภาพตามข้อ 5.1.4 และระดับการย่อยสลายตามวิธีการของ Qi *et al*. (1997) ซึ่งแสดงในภาคผนวกหัวข้อที่ 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2.2 การย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยปาเปน

เตรียมโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยปาเปน ตามวิธีการในข้อ 5.1.3 ทั้งนี้ใช้ระยะเวลาการย่อยที่ได้จากการศึกษาในข้อ 5 โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ได้จะนำไปวิเคราะห์คุณภาพตามข้อ 5.1.4 และระดับการย่อยสลายตามวิธีการของ Qi *et al*. (1997) ซึ่งแสดงในภาคผนวกหัวข้อที่ 7

5.2.3 การย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปน

นำสารละลายโปรตีนไข่ขาวความเข้มข้นโปรตีน 2 เปอร์เซ็นต์ มาปรับพีเอชเป็น 8 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำสารละลายที่ได้ปริมาตร 25 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 10 นาที แล้วเติมสารสกัดหยาบของเอนไซม์ปริมาณ 1 หน่วยต่อโปรตีนไข่ขาว 50 มก. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 50°ซ นาน 6 ชั่วโมง นำสารละลายมาให้ความร้อนที่ 90°ซ นาน 10 นาที เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราเร็ว 10,000xg ที่ 25°ซ นาน 20 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 จากนั้นนำสารละลายที่ได้มาปรับพีเอชเป็น 7 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ตวงสารละลายปริมาตร 25 มล. ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 50 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 40°ซ นาน 10 นาที แล้วเติมปาเปนปริมาณ 1 หน่วยต่อโปรตีนไข่ขาว 50 มก. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 40°ซ นาน 2 ชั่วโมง นำสารละลายมาให้ความร้อนที่ 90°ซ นาน 10 นาที เหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่อัตราเร็ว 10,000xg ที่ 25°ซ นาน 20 นาที กรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ซึ่งโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ได้จะถูกบรรจุในขวดสีชา เก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อนำไปวิเคราะห์คุณภาพตามข้อ 5.1.4 และระดับการย่อยสลายตามวิธีการของ Qi *et al*. (1997) ซึ่งแสดงในภาคผนวกหัวข้อที่ 7

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองทั้งหมดทำการทดลอง 2 ซ้ำ สำหรับการเปรียบเทียบคุณภาพสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปของสารละลาย และผงแห้งจะเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของข้อมูลโดยใช้ T-test ส่วนการทดลองที่เหลือวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(CRD) วิเคราะห์ข้อมูลโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Statistical Package for the Social Science, version 12.0)

7. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการเคมี ห้องปฏิบัติการแปรรูป และห้องวิจัยปริญญาโทของภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพฯ

8. ระยะเวลาการทำการทดลอง

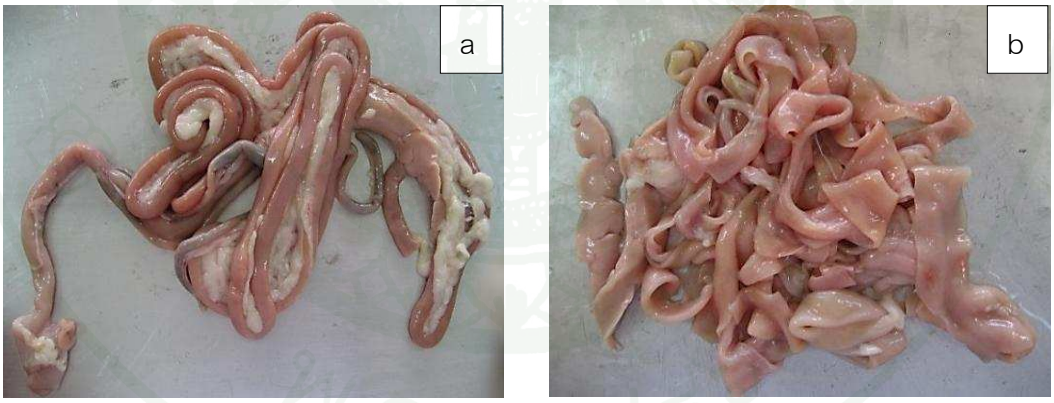
เดือนตุลาคม 2553 - เมษายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

1. การเตรียม และการศึกษาคุณภาพสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

การเตรียมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ใช้วัตถุดิบจากเป็ดพันธุ์เชอร์รี่วัลเล่ย์อายุ 42-43 วัน ซึ่งมีน้ำหนักของไส้และตับอ่อน (ไส้เป็ดทั้งพวงไม่รวมกระเพาะอาหาร ถุงน้ำดี กึ๋น และตับ) เท่ากับ 123.96±13.56 กรัมต่อตัว ซึ่ง Jamroz *et al*. (2001) รายงานว่าสัดส่วนของไส้และตับอ่อนของเป็ดป่าคิดเป็น 2.64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบจากน้ำหนักของเป็ดมีชีวิต (เป็ดป่าอายุ 42 วัน น้ำหนัก 2.56 กิโลกรัม) และไส้เป็ด 100 กรัม จะมีตับอ่อน 14.58 กรัม ในการทดลองนี้พบว่าไส้และตับอ่อนของเป็ด 1 ตัว (ภาพที่ 8a) ภายหลังการทำความสะอาด (ภาพที่ 8b) จะได้ไส้และตับอ่อนของเป็ด 73.13±6.56 กรัม หรือคิดเป็นผลได้ 59.12±1.79 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบจากน้ำหนักไส้ก่อนทำความสะอาด ไส้และตับอ่อนที่สะอาดแล้วจะนำไปใช้สำหรับสกัดเอนไซม์ โดยการสกัดแต่ละครั้งจะใช้ไส้และตับอ่อนจากเป็ดจำนวน 5 ตัว

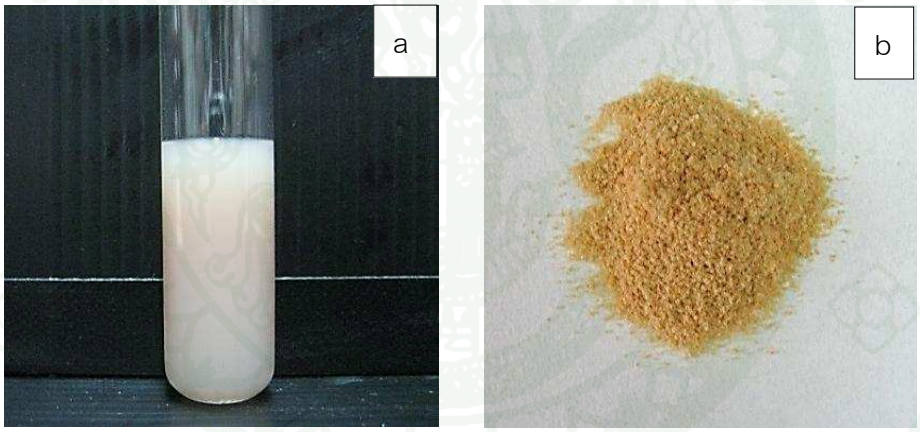


ภาพที่ 8 ไส้และตับอ่อนของเป็ดพันธุ์เชอร์รี่วัลเล่ย์อายุ 42-43 วัน ก่อน (a) และหลังทำความสะอาด (b)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.1 คุณภาพสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลาย และผงแห้ง

การสกัดเอนไซม์ได้ดัดแปลงจากวิธีของ Rathinaraj *et al*. (2010) ซึ่งรายงานว่าเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากไส้ไก่มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อสกัดด้วยน้ำกลั่นพีเอช 6.8 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงใช้น้ำกลั่นเป็นตัวสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ซึ่งได้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลายที่มีพีเอช 5.87±0.09 (ภาพที่ 9a) โดยไส้และตับอ่อนของเป็ดที่ทำความสะอาดแล้วจำนวน 100 กรัม นำมาปั่นผสมกับน้ำกลั่น 200 มล. เตรียมสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปสารละลายได้ 156.83±13.36 กรัม เมื่อนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37°ซ พบว่าสารละลายมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ 2.46±0.61หน่วย/มล.เอนไซม์ ปริมาณโปรตีน 24.63±1.88 มก./มล.เอนไซม์ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.100±0.025 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 10)



ภาพที่ 9 สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสในรูปสารละลาย (a) และผงแห้ง (b) ที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

อย่างไรก็ตามสารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปสารละลายเสื่อมเสียกิจกรรมได้ง่าย ทำให้ไม่สะดวกในการศึกษากิจกรรม และใช้งาน จึงนำเอนไซม์ในรูปสารละลายมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดเพื่อความสะดวกในการศึกษาวิจัย อีกทั้งยังเป็นการรักษาความคงตัวของเอนไซม์ โดยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบระเหิดมีลักษณะเป็นผงละเอียดสีน้ำตาลอ่อน (ภาพที่ 9b) โดยไส้และตับอ่อนของเป็ดที่ทำความสะอาดแล้วจำนวน 100 กรัม จะได้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปสารละลาย 163.60±9.06 กรัม และเมื่อทำแห้งจะได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอนไซม์ในรูปผงแห้ง 6.51±0.38 กรัม ทั้งนี้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ในรูปผงแห้งมีปริมาณโปรตีน 0.60±0.03 มก./มก.เอนไซม์ ขณะเดียวกันก็มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 10.23±0.63 หน่วย/มก.เอนไซม์ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะ 17.05±1.06 หน่วย/มก.โปรตีน (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ปริมาณโปรตีนและค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดในรูปของสารละลาย และผงแห้ง

ค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส[1]	**สารละลาย**	**ผงแห้ง**
โปรตีน (มก./มล.เอนไซม์)	24.63±1.88	-
กิจกรรม (หน่วย/มล.เอนไซม์)	2.46±0.61	-
โปรตีน (มก./มก.เอนไซม์)	-	0.60±0.03
กิจกรรม (หน่วย/มก.เอนไซม์)	-	0.056±0.003
กิจกรรมจำเพาะ (หน่วย/มก.โปรตีน)[ns]	0.100±0.025	0.094±0.006

[1] ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่พีเอช 7.5 อุณหภูมิ 37°ซ

[ns] หมายถึงค่าเฉลี่ยในแนวนอนไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

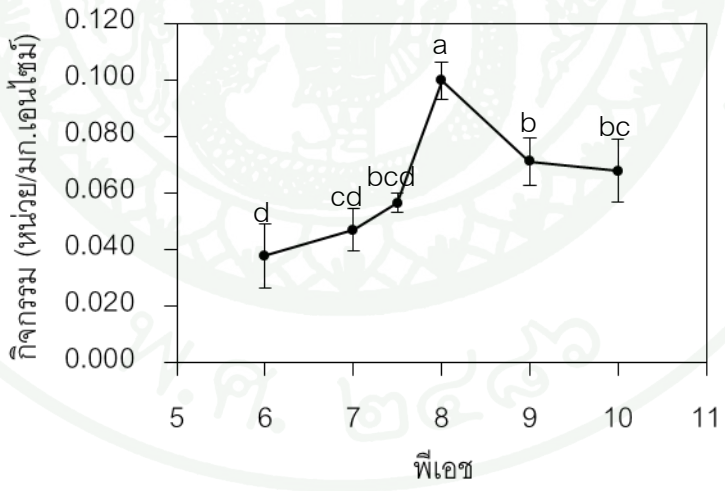
เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมจำเพาะในสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดในรูปของสารละลายและผงแห้ง พบว่าสารละลายเอนไซม์มีค่ากิจกรรมจำเพาะไม่แตกต่างจากเอนไซม์ผงแห้ง ($p>0.05$) ทั้งนี้ Dixon and Webb (1979) กล่าวว่าการนำเอนไซม์ไปผ่านการทำแห้งแบบระเหิดน้ำแข็งโดยการกำจัดของเหลวเป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มความเข้มข้นแต่จะไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ อย่างไรก็ตามเอนไซม์ส่วนใหญ่ที่อยู่ในรูปผลึกหรือผงแห้งจะคงตัวดี (Fullbrook, 1996) และเก็บรักษาได้นานกว่าในรูปของเหลว (นิธิยา, 2553) ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือกเตรียมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเสในรูปผงแห้ง เพื่อรักษาความคงตัวของเอนไซม์ รวมทั้งยืดอายุการเก็บรักษา ทำให้สะดวกในการศึกษาค่ากิจกรรม และการนำไปใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การศึกษาค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

2.1 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

Guyonnet *et al*. (1999), Jamadar *et al*. (2003) และ Mane *et al*. (2010) รายงานว่าเอนไซม์ที่พบในไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีก มีพีเอชที่เหมาะสมในการเกิดปฏิกิริยาในช่วงพีเอชเป็นกลางถึงเบส ดังนั้นในการทดลองนี้จึงเลือกพีเอช 6, 7, 7.5, 8, 9 และ 10 สำหรับศึกษากิจกรรมในสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด โดยวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37°ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใกล้เคียงกับอุณหภูมิในร่างกายของสัตว์ และใช้เคซีนเป็นสับสเตรท ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10 พบว่าที่พีเอช 6-10 สารสกัดหยาบมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส 0.038-0.100 หน่วย/มก.เอนไซม์ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าที่พีเอช 8 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุด ($p \leq 0.05$) โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.100±0.007 หน่วย/มก.เอนไซม์ ขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 7.5, 9 และ 10 มีค่าใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และเอนไซม์มีค่ากิจกรรมต่ำที่พีเอช 6



ภาพที่ 10 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิ 37°ซ

หมายเหตุ - ตัวอักษร a, b, c,... ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

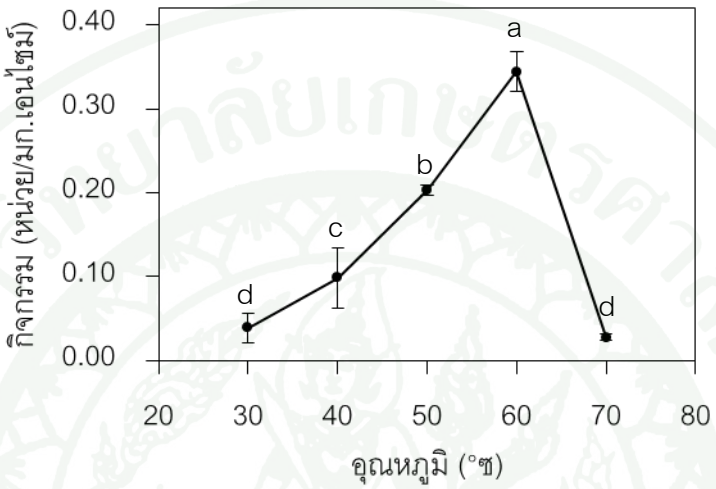
จากผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดมีกิจกรรมสูงที่พีเอชค่อนข้างเป็นเบสอ่อน ขณะที่ Mane *et al*. (2010) รายงานว่าเอนไซม์แอมิโนเปปติเดส เอ็นจากไส้ไก่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 6.0 Guyonnet *et al*. (1999) กล่าวว่าเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของไก่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8-8.2 ส่วนไคโมทริปซินมีกิจกรรมสูงที่ช่วงพีเอช 8.6 ถึง 10 และ Rathinaraj *et al*. (2010) พบว่าเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่มีกิจกรรมสูงในช่วงพีเอช 7-11 เอนไซม์ส่วนใหญ่ที่พบในไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีก คือ ทริปซิน และไคโมทริปซิน (Guyonnet *et al*., 1999; Zhao *et al*., 2007) ซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภทซีรีนโปรติเอส โดยช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของทริปซินคือ 7-9 และไคโมทริปซินคือ 8-9 (Hamada, 1992) นอกจากนี้ในไส้ของสัตว์ปีกยังมีรายงานการพบกิจกรรมของแอมิโนเปปติเดส (Jamadar *et al*., 2003; Mane *et al*., 2010) ซึ่งเป็นโปรติเอสประเภทเมทัลโปรติเอส มีพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานประมาณ 8 (Yamamoto, 1975) เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดในการทดลองนี้เป็นสารสกัดหยาบของเอนไซม์ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดดังกล่าวข้างต้นจึงแสดงค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 จึงเลือกพีเอชนี้สำหรับศึกษาค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่อุณหภูมิต่างๆ ต่อไป

2.2 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์ทำการทดลองในช่วงอุณหภูมิ 30-70°ซ ที่พีเอช 8 ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 11 พบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30-60°ซ เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยที่อุณหภูมิ 60°ซ เอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 0.34±0.02 หน่วย/มก.เอนไซม์ ทั้งนี้ค่ากิจกรรมที่ได้แตกต่างจากค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 70°ซ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่า 60°ซ กลับพบว่าเอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลงอย่างรวดเร็วซึ่ง Dixon and Webb (1979) กล่าวว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเอนไซม์จะมีกิจกรรมเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิสูงถึงระดับหนึ่งจะเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงโมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายเกลียวและเสียสภาพธรรมชาติ (Whitaker, 1994) ดังนั้นเอนไซม์ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งจึงเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ โดย Neilands and Stumpf (1958) กล่าวว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°ซ จากการศึกษาเอนไซม์ในไส้ไก่พบว่าเอนไซม์แอมิโนเปปติเดสที่แยกได้จากไส้ไก่มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 40-50°ซ (Jamadar *et al*., 2003) และ 50°ซ (Damle *et al*., 2010b) และแอมิโนเปปติเดส เอ็น จากไส้ไก่มีกิจกรรมสูงที่อุณหภูมิ 60°ซ (Mane

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

et al., 2010) จากการที่ไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกประกอบด้วยเอนไซม์โปรติเอสมากกว่า 1 ชนิด (Guyonnet et al., 1999; Zhao et al., 2007; Han et al., 2008) ดังนั้นกิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจึงเป็นผลร่วมของเอนไซม์หลายชนิด



ภาพที่ 11 ผลของอุณหภูมิต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่พีเอช 8

หมายเหตุ - ตัวอักษร a, b, c,… ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

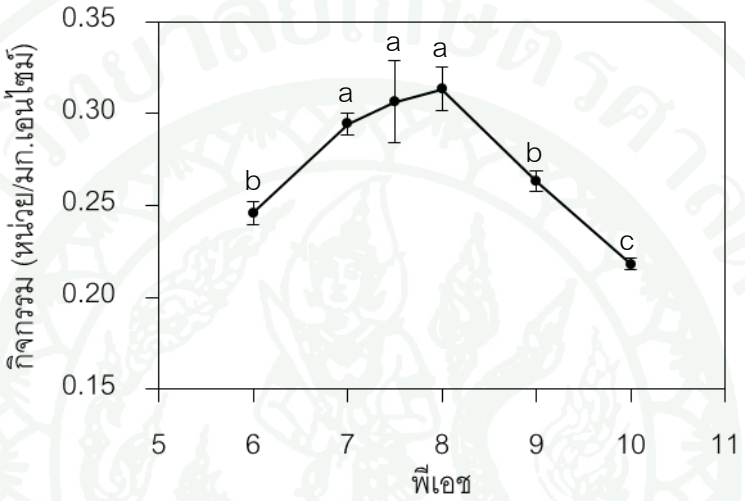
จากผลการทดลองนี้พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60°ซ เมื่อศึกษาที่พีเอช 8 อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมอาจเปลี่ยนไป จึงศึกษาผลของพีเอชต่อการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60°ซ

2.3 ผลของพีเอชที่อุณหภูมิ 60°ซ ต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ในการศึกษาพีเอช 6, 7, 7.5, 8, 9 และ 10 ต่อค่ากิจกรรมสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิ 60°ซ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 12 โดยสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 เท่ากับ 0.31±0.01 หน่วย/มก.เอนไซม์ อย่างไรก็ตามค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิจกรรมที่ได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) กับค่ากิจกรรมที่พีเอช 7 และ 7.5 ขณะที่พีเอช 6, 9 และ 10 เอนไซม์มีค่ากิจกรรมลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 37 และ 60°ซ ที่พีเอชต่างๆ พบว่าเอนไซม์จะมีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิสูงมีผลให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น เอนไซม์จึงมีอัตราเร็วเริ่มต้นเพิ่มขึ้น (Fullbrook, 1996)



ภาพที่ 12 ผลของพีเอชต่อค่ากิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่อุณหภูมิ 60°ซ

หมายเหตุ - ตัวอักษร a, b, c,... ที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากการศึกษาค่ากิจกรรม พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ คือพีเอช 8 อุณหภูมิ 60°ซ อย่างไรก็ตามผลที่ได้ยังไม่เพียงพอต่อการนำเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดไปประยุกต์ใช้ ซึ่งควรมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ เพิ่มเติม โดย Fullbrook (1996) ได้กล่าวว่าการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ และพีเอชสำคัญต่อการควบคุมการทำงานของเอนไซม์และการนำเอนไซม์ไปใช้งาน ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

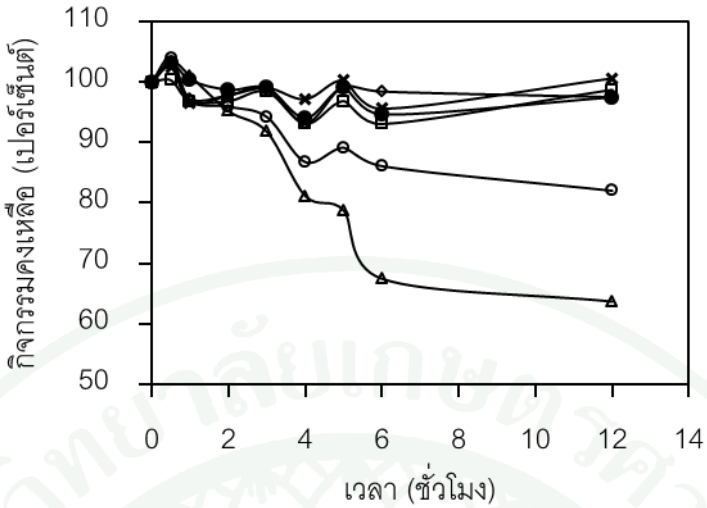
3. การศึกษาความคงตัวสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด

3.1 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด ทำการศึกษาในช่วงพีเอช 6-10 ที่เวลา 0-12 ชั่วโมง โดยบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 25°ซ และทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 60°ซ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 13 พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีความคงตัวสูงในช่วงพีเอช 6-8 โดยยังคงรักษากิจกรรมได้มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ตลอด 12 ชั่วโมงของการศึกษา ส่วนที่พีเอช 9 และ 10 เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงเหลือประมาณ 63 และ 82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับที่ 12 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ มีความคงตัวดีที่พีเอชเป็นกลางถึงเบสอ่อน ผลการทดลองที่ได้ใกล้เคียงกับที่ Jamadar *et al*. (2003) รายงานว่าเอนไซม์แอมิโนเปปติเดสจากไส้ไก่ที่ผ่านการเพิ่มความบริสุทธิ์แล้วคงตัวดีที่พีเอช 7-10 Mane *et al*. (2010) พบว่าเอนไซม์แอมิโนเปปติเดส เอ็น จากไส้ไก่ที่ผ่านกระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์มีความคงตัวสูงที่พีเอช 5-7 นอกจากนี้เอนไซม์ทริปซิน และไคโม-ทริปซินจากเครื่องในปลานิลคงตัวดีที่พีเอชเป็นเบสโดยคงตัวดีมากที่พีเอช 8-10 (Hinsui *et al*., 2006) ขณะที่เอนไซม์ทริปซินจากไพโลริกซีกา (pyloric caeca) ของปลากะพงแดงคงตัวดีที่พีเอชเป็นกลางถึงเบส (พีเอช 7-10) (Khantaphant and Benjakul, 2010)

Battestin and Macedo (2007) กล่าวว่าเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีกรดแอมิโนเป็นองค์ประกอบ โดยค่าพีเอชทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงประจุของกรดแอมิโนที่อยู่ในบริเวณแร่งของเอนไซม์ ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน (Bisswanger, 2002) เมื่อพีเอชของระบบแตกต่างจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์มาก กรดแอมิโนจะมีประจุสูงขึ้นทำให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมหรือไม่คงตัว เนื่องจากโมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายเกลียว เอนไซม์จึงสูญเสียโครงสร้างตามธรรมชาติ ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ (Whitaker, 1994; Klomklao *et al*., 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

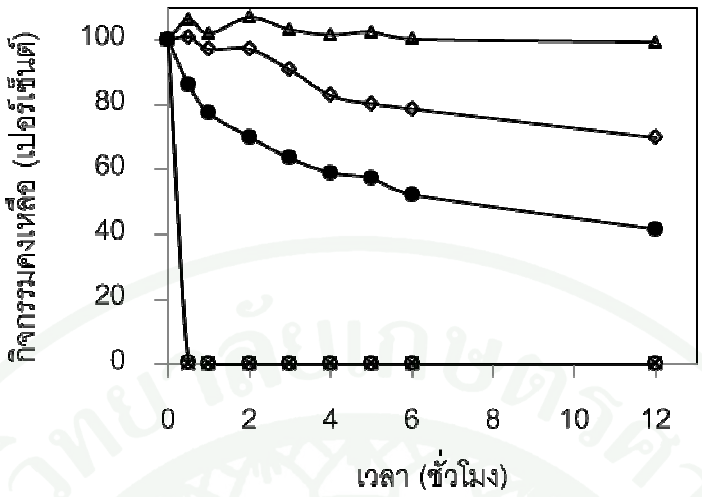


ภาพที่ 13 ความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่พีเอช 6 (□), 7 (×), 7.5 (◇), 8 (●), 9 (△) และ 10 (○) ที่อุณหภูมิ 25°ซ

3.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด โดยบ่มเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 30-70°ซ นาน 0-12 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 60°ซ ผลการทดลองปรากฏดังภาพที่ 14 พบว่าที่อุณหภูมิ 30°ซ เอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดโดยยังคงรักษากิจกรรมได้เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ ตลอด 12 ชั่วโมง ทั้งนี้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงภายหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 50°ซ นาน 12 ชั่วโมง โดยยังคงเหลือค่ากิจกรรมประมาณ 69 และ 41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 60 และ 70°ซ เอนไซม์กลับสูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อบ่มเพียง 30 นาที ผลการทดลองดังกล่าวใกล้เคียงกับ Bezerra *et al*. (2005), Khantaphant and Benjakul (2010) และ Mane *et al*. (2010) ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 60°ซ เอนไซม์สูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็ว ขณะที่ Neilands and Stumpf (1958) กล่าวว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°ซ เนื่องจากความร้อนทำให้โปรตีนในเอนไซม์สูญเสียสภาพธรรมชาติ กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลง (Dixon and Webb, 1979; Fullbrook, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 ความคงตัวของสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ที่อุณหภูมิ 30 (△), 40 (◇), 50 (●), 60 (○) และ 70°ซ (×) ที่พีเอช 8

จากการศึกษาสภาวะการทำงานต่อค่ากิจกรรม (ข้อ 2) และความคงตัว (ข้อ 3.1 และ 3.2) ของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ พบว่าที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 40°ซ หรือพีเอช 8 อุณหภูมิ 50°ซ เอนไซม์มีค่ากิจกรรมใกล้เคียงกันเมื่อใช้เวลาในการทำปฏิกิริยานาน จึงสามารถใช้ศึกษาต่อไปได้ทั้ง 2 สภาวะ แต่ในการทดลองนี้เลือกใช้สภาวะการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50°ซ โดยที่สภาวะนี้สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีค่ากิจกรรมประมาณ 0.20±0.01 หน่วย/มก.เอนไซม์ และค่ากิจกรรมจำเพาะ 0.34±0.01 หน่วย/มก.โปรตีน (ไมโครโมลไทโรซีน/นาที/มก.โปรตีน) หรือ 61.32±1.98 หน่วย/มก.โปรตีน (ไมโครกรัมไทโรซีน/นาที/มก.โปรตีน)

โดย Jamdar and Harikumar (2005) รายงานว่าในไส้ไก่พบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส 21.14 ไมโครกรัมไทโรซีน/นาที/มก.โปรตีน และ Rathina Raj and Mahendrakar (2010) พบว่าไส้ไก่มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส 26.3 ไมโครกรัมไทโรซีน/นาที/มก.โปรตีน จึงกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดมีกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสค่อนข้างสูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่นเดียวกับที่นักวิจัยได้นำเอนไซม์จากไส้ไก่ไปใช้ประโยชน์ เช่น Raju *et al*. (1997) ใช้เอนไซม์ในไส้ไก่ย่อยวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมฟอกหนัง เพื่อนำผลผลิตที่ได้เติมในสูตรอาหารสัตว์ Jamdar and Harikumar (2005) นำสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่ไปทดลองย่อยโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลท

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

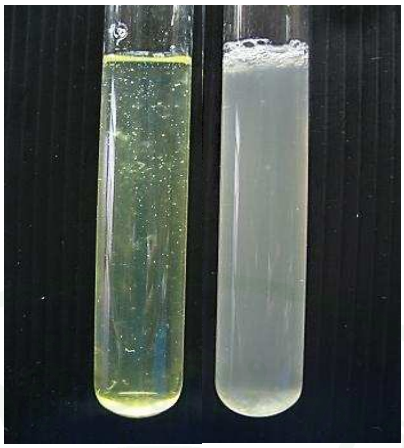
(soybean protein isolate) ซึ่งทำให้ขนาดโมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลทลดลง และ Damle *et al*. (2010a) ใช้เอนไซม์แอมิโนเปปติเดส จากไส้ไก่เพื่อลดรสขมในโปรตีนถั่วเหลือง และเคซีนไฮโดรไลเสต เป็นต้น สำหรับในงานวิจัยนี้จะนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดไปใช้ประโยชน์ในการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต

4. ผลของการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไข่ขาว

4.1 คุณภาพทางเคมี และกายภาพของไข่ขาวสด

ไข่ขาวสดที่ใช้ในการทดลองมีอายุการเก็บรักษา 1 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30°ซ เมื่อนำไข่ขาวสดมากรองแล้ววัดความหนืด พบว่ามีค่าเฉลี่ย 67±9.90 เซนติพัวส์ (centipoise) ตัวอย่างไข่ขาวมีลักษณะข้นหนืด สีเหลืองใส มีฟองอากาศกระจายอยู่ในตัวอย่าง (ภาพที่ 15a) โดยมีองค์ประกอบทางเคมีดังแสดงในตารางที่ 11 ซึ่งไข่ขาวมีน้ำเป็นองค์ประกอบหลักคิดเป็น 87 เปอร์เซ็นต์ขององค์ประกอบทั้งหมดในไข่ขาวสด ของแข็งในไข่ขาวสดโดยส่วนใหญ่ประกอบ ด้วยโปรตีน 11 เปอร์เซ็นต์ ขณะเดียวกันก็พบคาร์โบไฮเดรตซึ่งอยู่ในรูปอิสระและจับอยู่กับโปรตีน (Li-Chan *et al*., 1995) และมีเถ้าซึ่งแสดงถึงแร่ธาตุอีกเล็กน้อย ทั้งนี้ในไข่ขาวสดมีไขมันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไข่ขาวสดที่ได้สอดคล้องกับ Li-Chan *et al*. (1995) ที่รายงานว่าไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีน 9.7-10.6 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 0.03 เปอร์เซ็นต์ คาร์โบไฮเดรต 0.4-0.9 เปอร์เซ็นต์ และเถ้า 0.5-0.6 เปอร์เซ็นต์ โดยไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนมากกว่า 40 ชนิด (Sugino *et al*., 1997) ซึ่งภาพที่ 16 แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในไข่ขาวสดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



a b

ภาพที่ 15 ไข่ขาวสด (a) และสารละลายไข่ขาวความเข้มข้นโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างโดยนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง เติมสารป้องกันการเกิดโฟม คนผสม และไล่ฟองอากาศด้วยเครื่องอัลตราโซนิกส์ (b)

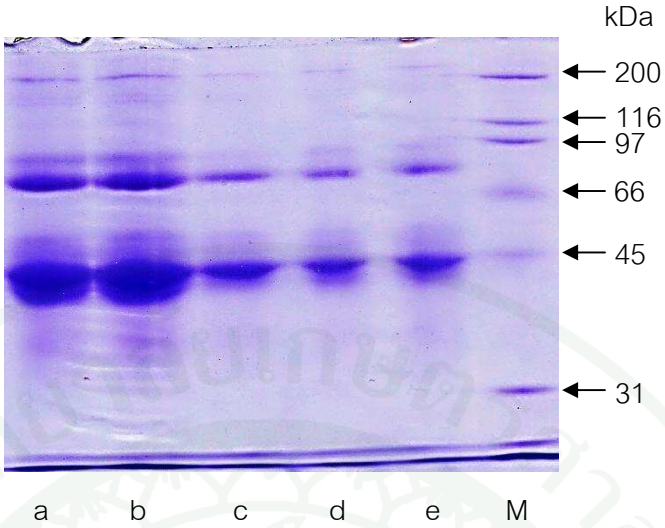
ตารางที่ 11 องค์ประกอบทางเคมีของไข่ขาวสด

องค์ประกอบทางเคมี	**น้ำหนักเปียก[1] (เปอร์เซ็นต์)**
ความชื้น	87.11±0.19
โปรตีน (เปอร์เซ็นต์Total Nitrogen×6.25)	11.48±0.16
ไขมัน	0.02±0.004
เถ้า	0.65±0.01
คาร์โบไฮเดรต[2]	0.78±0.01

[1] หมายถึง ค่าเฉลี่ย±SD

[2] (เปอร์เซ็นต์) คาร์โบไฮเดรต = 100- (เปอร์เซ็นต์ความชื้น+เปอร์เซ็นต์โปรตีน+เปอร์เซ็นต์ไขมัน+เปอร์เซ็นต์เถ้า)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 16 แผ่นเจล SDS-PAGE (12 เปอร์เซ็นต์เจล) แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนในไข่ขาวสด lane a, b ใช้โปรตีนไข่ขาว 15 ไมโครกรัม lane c, d, e ใช้โปรตีนไข่ขาว 3 ไมโครกรัม และ lane M โปรตีนมาตรฐาน

จากภาพที่ 16 SDS-PAGE แสดงหน่วยย่อยของโปรตีนในไข่ขาวสด พบว่าไข่ขาวสดประกอบด้วยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 31-200 กิโลดาลตัน โดยพบแถบโปรตีนหนาแน่นมากที่ 45 กิโลดาลตัน แสดงถึงโปรตีนโอวัลบูมินซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มี 54 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนในไข่ขาว นอกนั้นเป็นแถบโปรตีนในช่วง 66-90 กิโลดาลตัน 45-60 กิโลดาลตัน และ 30-40 กิโลดาลตัน ซึ่งโปรตีนต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบในไข่ขาวและมีการรายงานขนาดโมเลกุล ได้แก่ โอโวทรานส์เฟอร์ริน (76-80 กิโลดาลตัน) อะวิดิน (68.30 กิโลดาลตัน) โอโวโกลบูลิน จี2 (30-45 กิโลดาลตัน) โอโวอินฮิบิเตอร์ (49 กิโลดาลตัน) เป็นต้น (Li-Chan *et al*., 1995) นอกจากนี้ไข่ขาวยังประกอบด้วยโปรตีนโอโวมิวซินที่มีขนาดโมเลกุล 5,500-8,300 กิโลดาลตัน และโอโวมาโครโกลบูลินขนาดโมเลกุล 760-900 กิโลดาลตันโดยโปรตีนทั้ง 2 ชนิดเป็นไกลโคโปรตีน แต่การทำ SDS-PAGE จะนำไข่ขาวสดมาผ่านขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างโดยเจือจางในสารละลายตัวอย่าง (sample buffer) ที่มีส่วนประกอบของ mercaptoethanol และ sodium dodecyl sulfate (SDS) จากนั้นนำไปให้ความร้อนที่ 100°ซ นาน 5 นาที จึงทำให้โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (โอโวมิวซินและโอโวมาโครโกลบูลิน) แยกเป็นหน่วยย่อยเช่นเดียวกับ Desert *et al*. (2001) ที่รายงานว่าโอโวมิวซินถูกแยกเป็นหน่วยย่อยที่มีขนาดโมเลกุล 170-290 กิโลดาลตันภายหลังการเติมสารรีดิวซ์ เช่น mercaptoethanol เป็นต้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Mine and Yang (2008) กล่าวว่าไข่ขาวประกอบด้วยโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ ได้แก่ โอวัลบูมิน (45 กิโลดาลตัน) โอโวมิวคอยด์ (28 กิโลดาลตัน) โอโวทรานส์เฟอร์ริน (78 กิโลดาลตัน) และไลโซไซม (14.3 กิโลดาลตัน) ซึ่งโอโวมิวคอยด์จัดเป็นโปรตีนหลักที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาว (Urisu *et al*., 1997) ปกติอาการแพ้ไข่ขาวพบในเด็กเล็ก ซึ่งอาการแพ้พบในลักษณะที่แสดงออกทางผิวหนัง (ผื่น บวม คัน ลมพิษ ผิวหนังอักเสบ) ระบบหายใจ (หืด เยื่อจมูกอักเสบ) หรือระบบย่อยอาหาร (อาเจียน ท้องร่วง ปวดท้อง) โดยโปรตีนจะไปกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี้ของร่างกาย ซึ่งการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์โปรติเอสจะทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพช่วยลดอาการแพ้ไข่ขาวได้ (López-Expósito *et al*., 2008; Cho *et al*., 2009)

อย่างไรก็ตามการย่อยไข่ขาวด้วยเอนไซม์โปรติเอสต้องมีการทำให้โปรตีนในไข่ขาวที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ โอโวมิวคอยด์ โอโวอินฮิบิเตอร์ และโอโวมาโครโกลบูลิน (Saxena and Tayyab, 1997) เสียสภาพด้วยความร้อนก่อน โดยโอโวมิวคอยด์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน โปรตีนนี้เสียสภาพด้วยความร้อนที่ 77-79°ซ (Li-Chan *et al*., 1995; Alleoni, 2006) โอโวอินฮิบิเตอร์ยับยั้งการทำงานของซีรีนโปรติเอส เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน (Saxena and Tayyab, 1997) และเสียสภาพที่อุณหภูมิ 69-72°ซ (Campbell, 2003) โอโวมาโครโกลบูลินยับยั้งการย่อยของซีรีน ไทออล และเมทัลโปรติเอส (Li-Chan *et al*., 1995; Saxena and Tayyab, 1997) และเสียสภาพที่อุณหภูมิ 69-72°ซ (Campbell, 2003) จากรายงานดังกล่าวพบว่าโปรตีนไข่ขาวที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ส่วนใหญ่มีอุณหภูมิการเสียสภาพที่ 69-79°ซ ดังนั้นในการเตรียมตัวอย่างจึงนำสารละลายไข่ขาวมาให้ความร้อนที่ 65-85°ซ

4.2 ผลของระยะเวลาการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของสารละลายโปรตีนไข่ขาว

Cigic and Zelenik-Blatnik (2004) และ Yujie *et al*. (2006) กล่าวว่าการให้ความร้อนแก่โปรตีนไข่ขาวเพื่อนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ไม่ควรทำให้เกิดการรวมกลุ่ม/รวมตัว (aggregation/coagulation) ของโปรตีน หรือเกิดเจลด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ซึ่งทำให้เอนไซม์เข้าย่อยได้ยากยิ่งขึ้น จากการทดลองเบื้องต้นโดยให้ความร้อนแก่สารละลายไข่ขาวที่อุณหภูมิ 65, 75 และ85°ซ พบว่าที่อุณหภูมิ 85°ซ สารละลายไข่ขาวเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อนอย่างรวดเร็ว โดยมีลักษณะข้นหนืดมาก ขณะที่การให้ความร้อนที่ 65°ซ สารละลายไข่ขาวมีลักษณะเหลวสีขาวออกเหลือง มีความหนืดไม่เปลี่ยนแปลงมากนักเมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานถึง 40 นาที (ข้อมูลไม่ได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แสดง) แสดงว่าที่อุณหภูมินี้โปรตีนส่วนใหญ่ในสารละลายไข่ขาวยังไม่เกิดการเสียสภาพ แต่ที่ 75°ซ สารละลายไข่ขาวมีความหนืดเพิ่มขึ้นไม่มาก ขณะเดียวกันที่อุณหภูมินี้ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในไข่ขาวที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรติเอส (Campbell, 2003) จึงนำมาใช้ในการให้ความร้อนสารละลายไข่ขาวก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ โดยจะศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการให้ความร้อน โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของสารละลายไข่ขาว

4.2.1 ผลของระยะเวลาการให้ความร้อนต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏ และความหนืดของสารละลายโปรตีนไข่ขาว

การให้ความร้อนจะทำให้ไข่ขาวสดเกิดการแข็งเป็นเจล ดังนั้นจึงนำไข่ขาวสดมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้น 5.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 15b) ก่อนนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°ซ นาน 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาที พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะปรากฏดังภาพที่ 17 และสารละลายโปรตีนไข่ขาว 5.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าความหนืดเปลี่ยนแปลงดังตารางที่ 12 โดยเมื่อให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 5 นาที สารละลายมีลักษณะขุ่น สีขาวออกเหลืองเล็กน้อย ทึบแสง มีแผ่นเล็กๆสีขาวขุ่นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลาย โดยสารละลายจะมีอุณหภูมิ 60.85°ซ โดยโอโวทรานส์เฟอร์รินซึ่งมีประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ในไข่ขาวเป็นโปรตีนที่ไวต่อความร้อน เสียสภาพที่อุณหภูมิ 57.3-61°ซ (Campbell *et al*., 2003; Alleoni, 2006) ดังนั้นที่เวลา 5 นาทีจึงเกิดการเสียสภาพธรรมชาติของโอโวทรานส์เฟอร์ริน โปรตีนสูญเสียความสามารถในการละลายเกิดการรวมกลุ่มของโปรตีน จึงสังเกตเห็นสารละลายมีลักษณะที่ขาวขุ่นขึ้น (Mine, 1995; Sun and Hayakawa, 2002)

เมื่อให้ความร้อนนาน 10-15 นาที สารละลายจะมีลักษณะคล้ายน้ำนม สีขาวขุ่น ทึบแสง เป็นเนื้อเดียวกัน และมีแผ่นเล็กๆสีขาวแขวนลอยอยู่บริเวณผิวหน้าของสารละลาย และที่ 20 นาทีสารละลายมีลักษณะคล้ายน้ำนม สีขาวขุ่น ทึบแสง ยังคงเป็นเนื้อเดียวกัน และไม่พบแผ่นเล็กๆสีขาวแขวนลอยบริเวณผิวหน้าของสารละลาย ซึ่งอุณหภูมิช่วงนี้ (70-73.35 °ซ) ทำให้โปรตีนโอวัลบูมิน โอโวฟลาโวโปรตีน โอโวมาโครโกลบูลิน โอโวอินฮิบิเตอร์ และโอโวไกลโคโปรตีนเกิดการเสียสภาพบางส่วน (อุณหภูมิการเสียสภาพของโปรตีนจากการรายงานของ Li-Chan *et al*. (1995) และ Campbell *et al*. (2003)) จากนั้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนเป็น 25 นาที สารละลายจะมีลักษณะข้นและเริ่มสังเกตเห็นการจับตัวกันเป็นก้อน ขณะที่สารละลายที่ให้ความร้อนนาน 30 นาทีสังเกตได้ว่ามีลักษณะที่ข้นมาก เริ่มจับตัวกันเป็นก้อนนิ่มๆ และไหลได้ยาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สำหรับการให้ความร้อนนาน 35 และ 40 นาที พบว่าสารละลายมีลักษณะที่ข้นมาก จับตัวกันเป็นก้อนชัดเจน เนื่องจากเกิดการเสียสภาพของโปรตีน และเกิดเจลในสารละลาย ดังนั้นการให้ความร้อนที่ 20 นาทีจึงน่าจะเหมาะสมในการให้ความร้อนสารละลายโปรตีนไข่ขาว เพื่อให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนบางส่วนที่ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ ขณะเดียวกันทำให้โปรตีนไข่ขาวเกิดการคลายตัวแต่ยังไม่รวมตัวกันหรือเกิดเป็นเจล

5 10 15 20 25 30 35 40 นาที

ภาพที่ 17 สารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 และ 40 นาที

การเปลี่ยนแปลงค่าความหนืดของสารละลายไข่ขาวเมื่อให้ความร้อน 75°ซ ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที สารละลายไข่ขาวมีค่าความหนืดไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่าความหนืดประมาณ 33-74 เซนติพัวส์ จากนั้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาการให้ความร้อนเป็น 25 นาที สารละลายไข่ขาวมีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 1411 เซนติพัวส์ จากนั้นสารละลายโปรตีนไข่ขาวมีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อให้ความร้อนนาน 30-40 นาที และที่ 40 นาทีสารละลายมีค่าความหนืดสูงสุดที่ 7346 เซนติพัวส์ ทั้งนี้ค่าความหนืดสัมพันธ์กับการรวมตัวกัน และการเกิดเจลของโปรตีน เมื่อโมเลกุลของโปรตีนเกิดการรวมตัวกันเนื่องจากความร้อนมีผลให้ค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และทำให้เกิดการฟอร์มโครงสร้างร่างแหของโปรตีนซึ่งจะนำไปสู่การเกิดเจลต่อไป (Alleoni, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 ลักษณะปรากฏ อุณหภูมิ และค่าความหนืด ของสารละลายไข่ขาว 5.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อให้ความร้อนอุณหภูมิ 75°ซ ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ผลของการให้ความร้อนที่ 75°ซ			
	เวลา (นาที)	อุณหภูมิ (°ซ)	ความหนืด (เซนติพัวส์)[1]	ลักษณะปรากฏ
ไข่ขาวโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์	-	25-27	33.33e	มีสีขาวขุ่นออกเหลืองแสงผ่านลอดได้ และมีตะกอนขนาดเล็กสีขาวอยู่ก้นภาชนะ
ไข่ขาวโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ และให้ความร้อนที่ 75°ซ	5	60.85	20.67e	มีสีขาวขุ่น ทึบแสง มีแผ่นเล็กๆสีขาวลอยบริเวณผิวหน้าสารละลาย
	10	70.00	32.00e	มีสีขาวขุ่น ทึบแสง โดยมีแผ่นเล็กๆสีขาวขุ่นลอยอยู่บริเวณผิวหน้าเล็กน้อย
	15	72.35	42.00e	มีสีขาวขุ่น ทึบแสง ลักษณะคล้ายน้ำนม พบแผ่นเล็กๆสีขาวกระจายบริเวณผิวหน้าของสารละลาย
	20	73.35	74.67e	มีสีขาวขุ่น ทึบแสง เป็นเนื้อเดียวกัน ลักษณะคล้ายน้ำนม ไม่พบแผ่นเล็กๆที่ผิวหน้า หนืดขึ้นเล็กน้อย
	25	74.60	1411.00d	สารละลายมีสีขาวขุ่น ทึบแสง เป็นเนื้อเดียวกัน หนืดขึ้น และเริ่มจับตัวกันเป็นก้อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 (ต่อ)

ตัวอย่าง	เวลา (นาที)	ผลของการให้ความร้อนที่ 75°ซ อุณหภูมิ (°ซ)	ความหนืด (เซนติพัวส์)[1]	ลักษณะปรากฏ
ไข่ขาวโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ และให้ความร้อนที่ 75°ซ	30	75.05	2902.00c	มีสีขาวขุ่น ทึบแสง และข้นมาก สารละลายเริ่มจับตัวกันเป็นก้อนที่มีลักษณะนิ่มแต่ค่อนข้างเป็นเนื้อเดียวกัน หนืดขึ้นและไหลได้ยาก
	35	75.35	4402.67b	มีสีขาวขุ่น จับตัวกันเป็นก้อนนิ่ม ข้นมากไหลได้ค่อนข้างยาก
	40	75.60	7346.67a	สีขาวขุ่น จับตัวกันเป็นก้อนค่อนข้างคงตัวและไหลได้ยาก

[1] ตัวอักษร a, b, c,… ในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ทั้งนี้ไข่ขาวที่มีการให้ความร้อนที่เหมาะสมจะทำให้โปรตีนอยู่ในสภาพที่ละลายได้ซึ่งจะช่วยเพิ่มระดับการย่อยสลายของโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์ (Van der Plancken *et al*., 2004) ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากลักษณะปรากฏของสารละลายโปรตีนไข่ขาวที่ให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 30, 35 และ40 นาที จึงไม่เหมาะเนื่องจาก ปรากฏชัดเจนว่าสารละลายมีลักษณะจับตัวกันเป็นก้อน หนืดไหลได้ยากเนื่องจากเกิดโครงสร้างเป็นเจล และเมื่อพิจารณาค่าความหนืดของสารละลายไข่ขาว พบว่าสารละลายไข่ขาวมีค่าความหนืดเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ($p \leq 0.05$) เมื่อให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 25 นาที โดยค่าความหนืดบอกได้ว่าโปรตีนเกิดการจับตัวเป็นโครงสร้างร่างแหให้ลักษณะเป็นเจลโปรตีน จึงไม่เหมาะที่จะนำไปย่อยด้วยเอนไซม์ จึงเลือกการให้ความร้อนที่ 75°ซ นาน 20 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. เปรียบเทียบการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติ-เอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

จากการทดลองผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยเอนไซม์ โดยใช้สารละลายโปรตีนไข่ขาวที่มีความเข้มข้นของโปรตีน 5.5 เปอร์เซ็นต์ และนำไปย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โดยเติมเอนไซม์ 1 หน่วย ต่อโปรตีนไข่ขาว 50 มก. ย่อยนาน 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นให้ความร้อนเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 90°ซ 10 นาที นำสารละลายมาเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนออกจากส่วนใสของไฮโดรไลเสต พบว่าแยกไฮโดรไลเสตออกมาได้น้อยมาก (ผลไม่ได้แสดง) เนื่องจากสารละลายเกิดเป็นเจล จึงต้องลดความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนเริ่มต้น ดังนั้นในการทดลองจึงเจือจางไข่ขาวด้วยน้ำให้มีปริมาณโปรตีนประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ก่อนนำไปย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปนต่อไป

5.1 ผลของระยะเวลาการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์และปาเปน

การย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด จะใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ (ข้อ 2 และ 3) คือ พีเอช 8 อุณหภูมิ 50°ซ ส่วนปาเปนจะใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่รายงานโดย Chen *et al*. (2009) คือ พีเอช 7 อุณหภูมิ 40°ซ ซึ่งในการย่อยจะเติมเอนไซม์ในอัตราส่วนเอนไซม์ 1 หน่วยต่อโปรตีนไข่ขาว (สับสเตรท) 50 มก. โดยทำการศึกษาผลของระยะเวลาในการย่อยที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง จากนั้นยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°ซ เป็นเวลา 10 นาที และนำไปเหวี่ยงแยกที่ 10,000 g นาน 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปศึกษาคุณภาพ โดยวิเคราะห์ปริมาณของแข็งด้วยวิธี AOAC (2000) เพื่อหาผลได้ของของแข็ง (เปอร์เซ็นต์) วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 2000) เพื่อหาปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์) และวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ SDS-PAGE

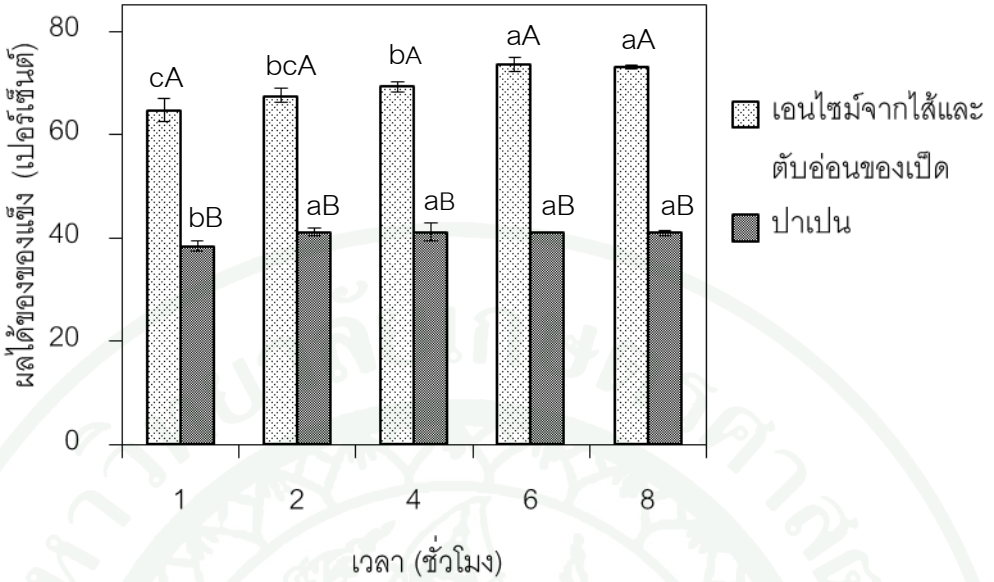
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.1.1 ผลได้ของของแข็งในโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน

จากภาพที่ 18 แสดงผลของระยะเวลาการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์และปาเปน ต่อผลได้ของของแข็ง พบว่าชนิดของเอนไซม์มีผลต่อผลได้ของของแข็ง โดยการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ในการย่อยทำให้ได้โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่มีผลได้ของของแข็ง 64-73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ใช้เอนไซม์ปาเปน ซึ่งมีผลได้ของของแข็ง 38-41 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาการย่อย พบว่าโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตมีปริมาณผลได้ของของแข็งเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อระยะเวลาการย่อยเพิ่มขึ้น โดยโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีปริมาณผลได้ของของแข็งสูงสุดที่ 6 ชั่วโมง และคงที่จนถึง 8 ชั่วโมง ($p>0.05$) สำหรับปาเปนให้ไฮโดรไลเสตของไข่ขาวที่มีผลได้ของของแข็งสูงสุดเมื่อย่อยที่ 2 ชั่วโมง และคงที่ตลอดระยะเวลา 8 ชั่วโมง สังเกตได้ว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นปริมาณของแข็งในไฮโดรไลเสตเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เช่นเดียวกับผลการทดลองของ Graszkiewicz *et al*. (2010) ที่นำโปรตีนไข่ขาวที่ตกตะกอนมาผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเตส พบว่าพันธะเปปไทด์จะถูกย่อยอย่างรวดเร็วใน 1 ชั่วโมง จากนั้นการย่อยพันธะเปปไทด์จะเกิดขึ้นได้ช้าลงเมื่อผ่าน 1 ชั่วโมงไปแล้ว

ขณะที่ Chen *et al*. (2009) ทดลองย่อยโปรตีนไข่ขาวของไข่เป็ดด้วยเอนไซม์ปาเปน ทริปซิน ไคโมทริปซิน อัลคาเลส และ ฟลาโวไซม์ พบว่าปริมาณเปปไทด์เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วที่ระยะเวลาการย่อย 0-1 ชั่วโมง และเริ่มคงที่ภายหลังการย่อย 1 ชั่วโมงเช่นกัน อธิบายได้ว่าเมื่อเริ่มเกิดการย่อยเอนไซม์จะแข่งขันกันจับสับสเตรทเพื่อเข้าไปสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนให้แตกตัวอยู่ในรูปของเปปไทด์ หรือกรดแอมิโน โดยพันธะเปปไทด์จะถูกสลายได้มากในช่วงต้นของการย่อย ทำให้มีปริมาณเปปไทด์ หรือกรดแอมิโนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นอัตราเร็วของการย่อยจะลดลงและเข้าสู่สมดุล เนื่องจากพันธะเปปไทด์ซึ่งเป็นสับสเตรทของเอนไซม์มีจำนวนลดลง ไฮโดรไลเสตที่ได้จึงมีค่าคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อย (Adler-Nissen, 1986; Šlizyte *et al*., 2005b; Kaewmanee *et al*., 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 18 ผลของระยะเวลาต่อผลได้ของของแข็ง (เปอร์เซ็นต์) ในโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

หมายเหตุ - ตัวอักษร A, B ที่แตกต่างกันของเอนไซม์แต่ละชนิดที่ระยะเวลาการย่อยเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันของระยะเวลาการย่อยในเอนไซม์แต่ละชนิดแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

5.1.2 ปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ (Nitrogen recovery) ของโปรตีนไข่ขาวไฮโดร-ไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน

จากตารางที่ 13 พบว่าโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีปริมาณไนโตรเจนคืนกลับสูงกว่าการใช้เอนไซม์ปาเปนในการย่อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาการย่อย พบว่าเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นค่าไนโตรเจนคืนกลับของไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย และมีปริมาณสูงสุดเมื่อย่อยที่ 6 และ 8 ชั่วโมง โดยมีค่าไนโตรเจนคืนกลับประมาณ 69 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าไนโตร-เจนของสับสเตรทเริ่มต้น สำหรับปาเปนพบว่าระยะเวลาการย่อยไม่มีผลต่อปริมาณไนโตรเจนคืน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กลับของไฮโดรไลเสต ($p>0.05$) โดยไฮโดรไลเสตมีค่าไนโตรเจนคืนกลับประมาณ 34-37 เปอร์เซ็นต์ เมื่อย่อย 1-8 ชั่วโมง Cigic and Zelenik-Blatnik (2004) ได้ทดลองย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์อัลคาเลส และเอนไซม์อัลคาเลสร่วมกับฟลาโวไซม์ พบว่าได้ค่าไนโตรเจนที่ละลายได้มากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์จากปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้น ทั้งนี้ค่าที่แตกต่างกันในการทดลองอาจเป็นผลเนื่องมาจากสภาวะที่แตกต่างกันในการทดลอง เช่น ลักษณะของสับสเตรท อุณหภูมิ ระยะเวลา ชนิดและปริมาณของเอนไซม์ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลต่อประสิทธิภาพในการย่อยของเอนไซม์ (Adler-Nissen, 1986; Benjakul and Morrissey, 1997; Nilsang *et al*., 2005; Chen *et al*., 2009)

ตารางที่ 13 ผลของระยะเวลาต่อปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์) ของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์)	
	เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด	ปาเปน
1	61.06±3.89 bA	34.98±1.15 aB
2	63.47±4.04 abA	37.06±1.56 aB
4	64.72±1.39 abA	37.20±2.09 aB
6	69.18±1.56 aA	36.97±1.08 aB
8	69.12±2.72 aA	37.53±1.09 aB

หมายเหตุ - ตัวอักษร A,B ที่แตกต่างกันในแนวนอน แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

- ตัวอักษร a, b ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\leq0.05$)

จากข้อมูลผลได้ของของแข็งและปริมาณไนโตรเจนคืนกลับของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต สังเกตว่าผลได้ของของแข็ง และค่าไนโตรเจนคืนกลับมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากของแข็งในไข่ขาวส่วนใหญ่คือโปรตีนซึ่งโปรตีนคือสารประกอบไนโตรเจน ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ค่าไนโตรเจนในไฮโดรไลเสต ค่าที่ได้จึงสอดคล้องกับปริมาณของแข็งที่วิเคราะห์ได้ ทั้งนี้ค่าไนโตรเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คืนกลับในไฮโดรไลเสตแสดงถึงปริมาณเปปไทด์สายสั้น และกรดแอมิโนที่ละลายในไฮโดรไลเสต (ตารางที่ 13)

จากการทดลองหาค่าผลได้ของของแข็งและปริมาณไนโตรเจนคืนกลับของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต พบว่าไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดมีปริมาณผลได้ของของแข็งและปริมาณไนโตรเจนคืนกลับมากกว่าการย่อยด้วยปาเปน ซึ่งในการทดลองสังเกตว่าภายหลังให้ความร้อนที่ 90°ซ 10 นาทีเพื่อยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และทำให้โปรตีนโมเลกุลใหญ่เกิดการเสียสภาพ พบว่าไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปนมีลักษณะข้นหนืดกว่าการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และเมื่อนำไปเหวี่ยงแยกที่ 10,000×g ไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปนจะมีการตกตะกอนของแข็งออกมามากจึงได้ไฮโดรไลเสตที่มีโปรตีนละลายอยู่น้อยกว่าตัวอย่างที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ สันนิษฐานว่าอาจเป็นผลเนื่องมาจากค่าพีเอชที่แตกต่างกันของสภาวะในการย่อย โดยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ใช้สภาวะย่อยที่พีเอช 8 และปาเปนใช้ที่พีเอช 7

ผลกระทบจากการที่ไฮโดรไลเสตมีพีเอชต่างกันอาจอธิบายได้ดังนี้ เมื่อโปรตีนไข่ขาวได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูง (90°ซ 10 นาที) จะเกิดการเสียสภาพธรรมชาติ โดยความร้อนจะทำให้เกิดพลังงานที่ไปทำลายพันธะในโมเลกุลของโปรตีน โครงสร้างของโปรตีนเกิดการคลายตัวเป็นสายยาว เผยหมู่ไฮโดรโฟบิกออกมาที่ผิวโมเลกุล และมีหมู่ซัลฟไฮดริลเพิ่มขึ้น ซึ่งที่พีเอช 8 มีการปลดปล่อยหมู่ไฮโดรโฟบิกน้อยกว่าที่พีเอช 7 จากนั้นหมู่ไฮโดรโฟบิกจะเกิดปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุลทำให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีน (Sun and Hayakawa, 2002) นอกจากนี้ค่าพีเอชมีผลต่อแรงผลักระหว่างโมเลกุล เมื่อพีเอชเข้าใกล้ Isoelectric point (pI) (ส่วนใหญ่ pI ของโปรตีนไข่ขาวอยู่ที่ 4.5-5) (Van der Plancken *et al*., 2005) ประจุรวมของโมเลกุลเป็น 0 จะไม่มีแรงผลักระหว่างโมเลกุล ดังนั้นที่พีเอช 8 ประจุรวมของโมเลกุลโปรตีนจะเป็นบวกมากกว่าที่พีเอช 7 จึงเกิดการรวมกลุ่มของโปรตีนน้อยกว่าที่พีเอช 7 เมื่อให้ความร้อนแก่โปรตีนไข่ขาวต่อไปเรื่อยๆ จะเกิดปฏิกิริยาระหว่างสายโพลีเปปไทด์ทำให้โปรตีนรวมตัวกัน โมเลกุลของโปรตีนมีขนาดใหญ่ขึ้น (Mine, 1995; Yang and Baldwin, 1995; Sun and Hayakawa, 2002; Van der Plancken *et al*., 2005) จึงตกตะกอนหลังการหมุนเหวี่ยง และถูกกรองแยกจากไฮโดรไลเสต ดังนั้นไฮโดรไลเสตที่มีพีเอช 8 จึงมีตะกอนโปรตีนแยกออกไปน้อยกว่าที่พีเอช 7

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้พบว่าการให้ความร้อนสารละลายโปรตีนที่มีหมู่ซัลฟไฮดริลและได-ซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบ พีเอชของสารละลายจะมีผลต่อการละลายของโปรตีนดังกล่าว Van der Plancken *et al*. (2005) ทดลองนำโปรตีนไข่ขาวไปให้ความร้อนและเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะส่วนใส ไปวิเคราะห์ปริมาณซัลฟไฮดริลพบว่าที่พีเอช 7.6 แทบไม่พบหมู่ซัลฟไฮดริลในส่วนของสารละลายใส (supernatant) ซึ่งนักวิจัยอธิบายว่าโอวัลบูมินที่มีหมู่ซัลฟไฮดริลเมื่อมีการให้ความร้อนทำให้เกิดการสลายพันธะไดซัลไฟด์จึงเกิดหมู่ซัลฟไฮดริลดังนั้นการไม่พบหมู่ซัลฟไฮดริลในส่วนสารละลายใส แสดงว่าที่พีเอช 7.6 โอวัลบูมินยังคงเชื่อมด้วยพันธะไดซัลไฟด์และแยกอยู่ในส่วนตะกอน ขณะที่พีเอช 8.8 กลับพบหมู่ซัลฟไฮดริลจำนวนมากอยู่ในส่วนของสารละลายใส แสดงว่าการให้ความร้อนที่พีเอช 8.8 ทำให้โอวัลบูมินละลายได้ดีกว่าที่พีเอช 7.6 จากการอธิบายข้างต้นจึงสนับสนุนเหตุผลที่ว่าพีเอช 7 (สภาวะการย่อยด้วยปาเปน) ซึ่งเป็นพีเอชที่เข้าใกล้ pI ของโปรตีนไข่ขาวเมื่อนำไฮโดรไลเสตไปให้ความร้อนจึงมีโปรตีนที่ตกตะกอนออกมามากกว่าที่พีเอช 8 (สภาวะการย่อยด้วยเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด)

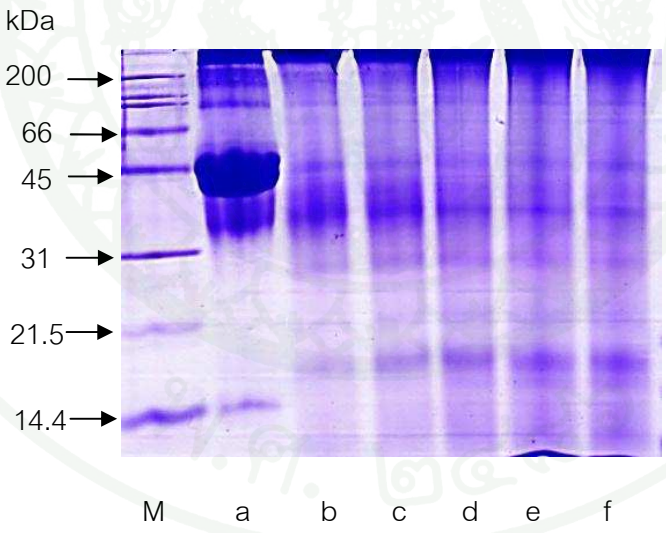
5.1.3 ขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน

จากการศึกษาขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวที่ผ่านการเตรียมตัวอย่างก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ และโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ได้จากการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์และปาเปนที่ระยะเวลาต่างๆ ด้วย SDS-PAGE โดยเตรียมแผ่นเจลความเข้มข้น 16.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าโปรตีนไข่ขาวก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอยู่ในช่วง 14.4 ถึงมากกว่า 200 กิโลดาลตัน (lane a ของภาพที่ 19 และ 20) แถบโปรตีนดังกล่าวแสดงถึงโปรตีนในไข่ขาว ได้แก่ โอโวทรานสเฟอร์ริน (78กิโลดาลตัน) โอวัลบูมิน (45 กิโลดาลตัน) โอโวอิน-ฮิบิเตอร์ โอโวโกลบูลิน จี2 โอโวโกลบูลิน จี3 (49 กิโลดาลตัน) และไลโซไซม์ (14.4 กิโลดาลตัน) โดยพบแถบโปรตีนหนาแน่นมากอยู่ในช่วง 45 กิโลดาลตัน รองลงมาคือ 30-40 กิโลดาลตันและมากกว่า 200 กิโลดาลตัน และโปรตีนหลักที่พบในสารละลายโปรตีนไข่ขาวก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ คือ โอวัลบูมินซึ่งเป็นโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุดในไข่ขาว ในกรณีของแถบโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน ที่ปรากฏเข้มทั้งที่มีโปรตีนในไข่ขาวปริมาณไม่มากที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 200 กิโลดาลตัน คาดว่าน่าจะเป็นโปรตีนของไข่ขาวที่เกิดการรวมกลุ่มภายหลังการให้ความร้อนที่ 75°ซ 20 นาที ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้ Van der Plancken *et al*. (2006) รายงานว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นโปรตีนไข่ขาวจะละลายได้น้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

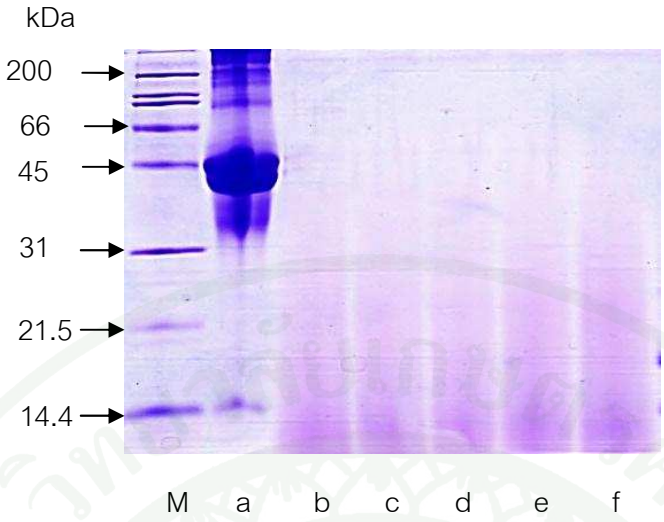
เนื่องจากเกิดการทำลายสภาพธรรมชาติของโปรตีนทำให้โปรตีนจับตัวหรือรวมกลุ่มกันเป็นขนาดโมเลกุลใหญ่

เมื่อนำสารละลายโปรตีนไข่ขาวไปย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปนที่เวลา 1-8 ชั่วโมง พบว่าหลังการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวที่ 45-200 กิโลดาลตัน มีความเข้มแถบลดลง และที่มวลโมเลกุลขนาดเล็ก (14-21 กิโลดาลตัน) (ภาพที่ 19 lane b, c, d, e และ f) มีความเข้มแถบเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อย ขณะที่การย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยปาเปน มวลโมเลกุลขนาดมากกว่า 45 กิโลดาลตันจางลง โดยปรากฏแถบของโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 35 กิโลดาลตัน และปรากฏแถบมากขึ้นที่ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 14.4 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 20 lane b, c, d, e และ f) โดยระยะเวลาการย่อยไม่มีผลต่อขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปน โดยขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปน ไม่ปรากฏแถบของโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลมากกว่า 35 กิโลดาลตัน คาดว่าพีเอช 7 ซึ่งเป็นสภาวะของการย่อยน่าจะมีผลต่อการละลายของโปรตีน



ภาพที่ 19 แผ่นเจล SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 16.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต เมื่อผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่ระยะเวลา 1 (lane b), 2 (lane c), 4 (lane d), 6 (lane e) และ 8 (lane f) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ (lane a) และโปรตีนมาตรฐาน (lane M)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 แผ่นเจล SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 16.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต เมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่ระยะเวลา 1 (lane b), 2 (lane c), 4 (lane d), 6 (lane e) และ 8 (lane f) ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโปรตีนไข่ขาวก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ (lane a) และโปรตีนมาตรฐาน (lane M)

Van der Plancken *et al*. (2005) ได้ทดลองให้ความร้อนแก่โปรตีนไข่ขาวที่ 85°ซ และนำสารละลายมาเหวี่ยงแยกโปรตีนที่ละลายได้ จากการวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE พบว่าโปรตีนไข่ขาวที่พีเอช 7.6 ไม่ปรากฏแถบของโอวัลบูมิน โดยโอวัลบูมินอยู่ในส่วนของโปรตีนที่ไม่ละลาย แต่ที่พีเอช 8.8 พบแถบของโอวัลบูมินในส่วนของสารละลายโปรตีน ดังนั้นการให้ความร้อนแก่โปรตีนไข่ขาวทำให้เกิดการรวมกลุ่มของโปรตีน ซึ่งค่าพีเอชมีผลต่อการละลายของโปรตีนที่รวมกลุ่ม โดยโปรตีนที่รวมกลุ่มจะละลายได้มากขึ้นเมื่อพีเอชสูงขึ้น

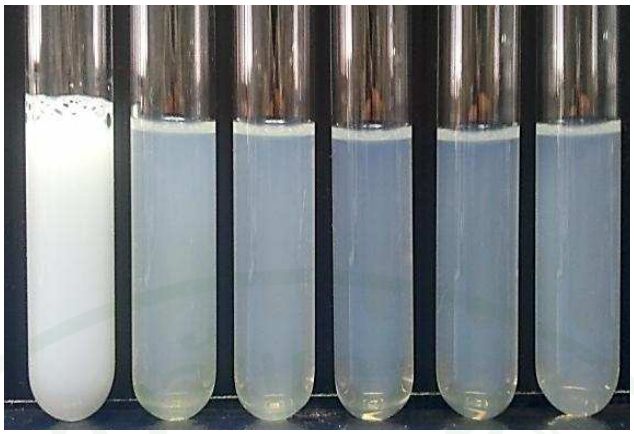
จากการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน สังเกตว่าโปรตีนที่ขนาดโมเลกุล 14.3, 28, 45 และ 78 กิโลดาลตันมีความเข้มแถบลดลงเมื่อเทียบกับโปรตีนไข่ขาวที่ไม่ผ่านการย่อย (ภาพที่ 19 และ 20) โดยขนาดโมเลกุลเหล่านี้แสดงถึงโปรตีนไลโซไซม์ โอโวมิวคอยด์ โอวัลบูมิน และโอโวทรานส์เฟอร์รินซึ่งเป็นโปรตีนในไข่ขาวที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาวในผู้บริโภคบางกลุ่ม (Mine and Yang, 2008) แสดงว่าการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน สามารถลดโปรตีนที่ทำให้เกิดการแพ้ไข่ขาวได้ และเมื่อพิจารณาขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสต พบว่าเอนไซม์ปาเปนมีผลในการลดขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวได้ดีกว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ สังเกตจากขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสตที่เล็ก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กว่า สอดคล้องกับผลการทดลองของ Chen *et al*. (2009) ที่รายงานว่าปาเปนซึ่งเป็นซิสเตอีนโปรติเอสมีประสิทธิภาพในการย่อยไข่ขาวของเป็ดได้ดีกว่าซีรีนโปรติเอสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในตับอ่อนของสัตว์ปีกเมื่อเทียบจากระดับการย่อยสลาย (degree of hydrolysis) โดยขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสตสัมพันธ์กับสมบัติทางหน้าที่ของไฮโดรไลเสต Miguel *et al*. (2007) รายงานว่าโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 3000 ดาลตัน มีสมบัติยับยั้งเอนไซม์ ACE-I ซึ่งมีผลลดความดันโลหิตสูงในหนูทดลอง

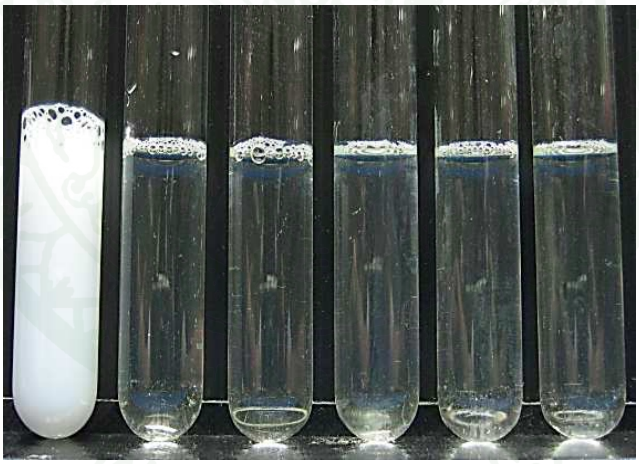
การเตรียมโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต จะนำสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน มาย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาว และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90°ซ นาน 10 นาที จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกที่ 10,000×g และกำจัดตะกอน จะได้สารละลายโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต โดยไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จะมีสีขาวค่อนข้างขุ่น (ภาพที่ 21) เพราะยังคงมีโปรตีนที่ไม่ตกตะกอนหลังการหมุนเหวี่ยงแขวนลอยอยู่ในสารละลาย โดยค่าพีเอชมีผลต่อการรวมตัวกันของโปรตีนไข่ขาวที่ได้รับความร้อน กล่าวคือที่พีเอช 8 (สภาวะในการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์) โปรตีนไข่ขาวที่ได้รับความร้อนจะเกิดการรวมกลุ่มของโปรตีนน้อย (Van der Plancken *et al*., 2005) ทำให้โปรตีนตกตะกอนหลังการเหวี่ยงแยกน้อย แต่ไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปนจะมีลักษณะใส (ภาพที่ 22) เพราะที่พีเอช 7 (สภาวะการทำงานของปาเปน) โปรตีนไข่ขาวที่ได้รับความร้อนจะเกิดการรวมกลุ่มมากกว่า (Van der Plancken *et al*., 2005) ซึ่งอนุภาคขนาดใหญ่ตกตะกอนเมื่อนำไปหมุนเหวี่ยง สารละลายที่เหลือหลังการแยกตะกอนจึงใส โดยขนาดโมเลกุลที่แสดงด้วย SDS-PAGE ในภาพที่ 19 และ 20 สนับสนุนคำอธิบายข้างต้น เมื่อพิจารณาจากระยะเวลาการย่อย พบว่า ไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์มีลักษณะใสขึ้นเล็กน้อยเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อย ทั้งนี้เพราะเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้เพิ่มขึ้นโปรตีนจึงมีการละลายดีขึ้น สารละลายจึงใสขึ้น แต่ไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยปาเปนเป็นเวลา 1-8 ชั่วโมง มีลักษณะใส ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะปรากฏของไฮโดรไลเสตเมื่อเพิ่มระยะเวลาการย่อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



0 1 2 4 6 8 ชั่วโมง

ภาพที่ 21 โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเมื่อผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง โดย 1-8 ชั่วโมง เป็นสารละลายส่วนที่แยกตะกอนออก หลังการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000×g



0 1 2 4 6 8 ชั่วโมง

ภาพที่ 22 โปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเมื่อผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนที่เวลา 0, 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง โดย 1-8 ชั่วโมง เป็นสารละลายส่วนที่แยกตะกอนออก หลังการหมุนเหวี่ยงที่ 10,000×g

จากการทดลองย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปน พบว่าไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ปริมาณของแข็งและไนโตรเจนคืนกลับสูงกว่าการย่อยด้วยปาเปน โดยมีปริมาณสูงสุดเมื่อย่อยที่ 6 และ 8 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามไฮโดรไลเสต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ได้ยังมีขนาดโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ ซึ่งการย่อยด้วยปาเปนจะให้ไฮโดรไลเสตที่มีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า แต่ก็ให้ค่าผลได้ของของแข็ง และปริมาณไนโตรเจนคืนกลับน้อยกว่าด้วย โดยเวลาการย่อยที่ 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง ไฮโดรไลเสตของปาเปนมีปริมาณผลได้ของของแข็งคงที่ ขณะที่ค่าไนโตรเจนคืนกลับและขนาดโมเลกุลไม่แตกต่างกันเมื่อย่อยที่ 1, 2, 4, 6 และ 8 ชั่วโมง

จากค่าผลได้ของของแข็ง ปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ และขนาดโมเลกุลของโปรตีน จึงสรุปว่าการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดควรย่อยที่ 6 ชั่วโมง และปาเปนใช้เวลา 2 ชั่วโมงก็เพียงพอสำหรับการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากผลการทดลองจึงมีแนวคิดการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ และปาเปนในการย่อยโปรตีนไข่ขาวร่วมกันโดยใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ 6 ชั่วโมงเพื่อให้ได้ไฮโดรไลเสตที่มีผลได้ของของแข็งปริมาณมากจากนั้นจึงใช้ปาเปนย่อยต่ออีก 2 ชั่วโมง เพื่อย่อยไฮโดรไลเสตให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง

5.2 เปรียบเทียบการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอส ปาเปน และการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสร่วมกับปาเปน

ในการทดลองใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปนเพื่อผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต โดยการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ 6 ชั่วโมง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วยความร้อนแล้วเหวี่ยงแยกนำเฉพาะส่วนใสมาย่อยต่อด้วยปาเปนอีก 2 ชั่วโมง โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงผลได้ของของแข็ง ค่าไนโตรเจนคืนกลับ ระดับการย่อยสลาย และขนาดโมเลกุลของไฮโดรไลเสต เปรียบเทียบกับไฮโดรไลเสตที่ผ่านการย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ 6 ชั่วโมง และ ปาเปน 2 ชั่วโมง

จากตารางที่ 14 พบว่าการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์และปาเปนร่วมกันได้ไฮโดรไลเสตที่มีผลได้ของของแข็งและปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ ไม่แตกต่างจากการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ย่อยที่ 6 ชั่วโมง ($p>0.05$) โดยมีผลได้ของของแข็ง 74-76 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณไนโตรเจนคืนกลับ 71-73 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่ามากกว่าการใช้ปาเปนเพียงอย่างเดียว เมื่อนำไฮโดรไลเสตไปวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย พบว่าไฮโดรไลเสตที่ใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์มีระดับการย่อยสลายต่ำสุด คือ 3 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปนจะมีระดับการย่อยสลายมากกว่า คือ 9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการใช้ปาเปนได้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การย่อยสลายสูงสุดคือ 18 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้ระดับการย่อยสลายหมายถึง จำนวนพันธะเปปไทด์ที่ถูกย่อยเทียบกับพันธะเปปไทด์เริ่มต้นในวัตถุดิบ ดังนั้นเมื่อระดับการย่อยสลายสูงขึ้นความยาวของสายเปปไทด์จะสั้นลง (Adler-Nissen, 1986) เมื่อพิจารณาจากระดับการย่อยสลาย พบว่าการย่อยสารละลายโปรตีนไข่ขาวด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ ปาเปน และการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปนจะได้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายแตกต่างกัน โดยระดับการย่อยสลายจะสัมพันธ์กับสมบัติทางกายภาพ และสมบัติทางหน้าที่ของไฮโดรไลเสต โดย Godfrey (1996) กล่าวว่าที่ระดับการย่อยสลายต่ำคือ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรไลเสตจะมีสมบัติการเกิดโฟม การเกิดอิมัลชันดี ส่วนระดับการย่อยสลายสูงเช่น 9 หรือ 18 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรไลเสตจะมีการละลายที่ดีขึ้น คงตัวต่อความร้อน และสามารถดูดซึมภายในร่างกายได้ง่าย อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ยังไม่ได้ศึกษาสมบัติของโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้

ตารางที่ 14 ผลได้ของของแข็ง ไนโตรเจนคืนกลับ และระดับการย่อยสลายของไฮโดรไลสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ปาเปน และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปน

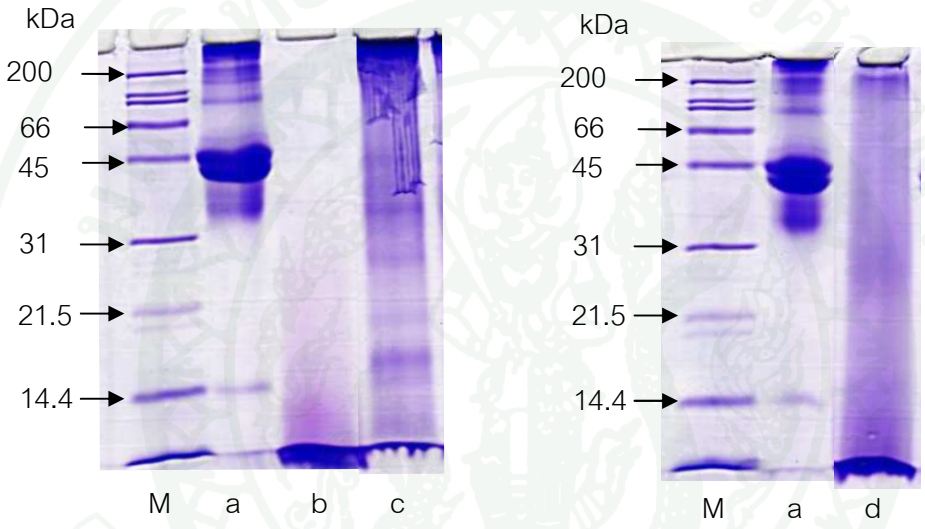
เอนไซม์	ผลได้ของของแข็ง (เปอร์เซ็นต์)[1]	ไนโตรเจนคืนกลับ (เปอร์เซ็นต์)[1]	ระดับการย่อยสลาย (เปอร์เซ็นต์)[1]
เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด	76.24±1.21a	73.20±1.10a	3.06±0.17c
ปาเปน	40.38±0.69b	37.41±0.02b	18.77±0.44a
เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปน	74.95±2.17a	71.49±0.57a	9.52±1.06b

[1] ตัวอักษร a, b, c ในคอลัมน์เดียวกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

เมื่อพิจารณาแถบโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วย SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 16.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 23) พบว่าโปรตีนไข่ขาวก่อนย่อยด้วยเอนไซม์ประกอบด้วยแถบโปรตีนอยู่ในช่วง 14.4-200 กิโลดาลตัน จากนั้นเมื่อนำมาย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นาน 6 ชั่วโมง พบว่าแถบโปรตีนที่ 45 กิโลดาลตัน ซึ่งพบมากในโปรตีนไข่ก่อนย่อยด้วยเอนไซม์มีแถบโมเลกุลจางลง ขณะที่แถบโมเลกุลน้อยกว่า 31 กิโลดาลตันเข้มขึ้น ส่วนการย่อยด้วยปาเปนนาน 2 ชั่วโมง พบว่าแถบโมเลกุลของโปรตีนที่มากกว่า 25 กิโลดาลตันหายไป ส่วนการใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปนจะให้ไฮโดรไลเสตที่มีขนาดโมเลกุลเล็กลงแต่ก็ยังปรากฏแถบของโปรตีนขนาดใหญ่ด้วย ซึ่งในการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์ทั้ง 3 แบบมีผลช่วยลดโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาวได้แก่ ไลโซไซม โอโวมิวคอยด์ โอวัลบูมิน และโอโวทรานส์เฟอร์รินโดยสังเกตจากที่ 14.3, 28, 45 และ 78 กิโลดาลตันมีความเข้มแถบลดลง (ภาพที่ 23)



ภาพที่ 23 แผ่นเจล SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นเจล 16.5 เปอร์เซ็นต์ แสดงขนาดโมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดนาน 6 ชั่วโมง (lane c) ปาเปน 2 ชั่วโมง (lane b) และสารสกัดหยาบของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ด 6 ชั่วโมงร่วมกับปาเปน 2 ชั่วโมง (lane d) เปรียบเทียบโปรตีนไข่ขาวก่อนการย่อยด้วยเอนไซม์ (lane a) และโปรตีนมาตรฐาน (lane M)

ทั้งนี้ลักษณะของแถบโปรตีนสอดคล้องกับระดับการย่อยสลายของโปรตีนไฮโดร-ไลเสตที่พบว่าการย่อยด้วยปาเปนให้ระดับการย่อยสลายสูงสุด ได้เปปไทด์สายสั้นขนาดโมเลกุลของโปรตีนจึงลดลง ขณะที่การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์เพียงอย่างเดียวให้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายต่ำ โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนไข่ขาวได้เพียงเล็กน้อยจึงได้เปปไทด์ที่มีสายยาว ขณะที่การใช้สารสกัดหยาบของเอนไซม์ร่วมกับปาเปนให้ระดับการย่อยสลายเพิ่มขึ้น แต่ระดับการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ย่อยสลายก็ไม่สูงมาก เพราะว่าหลังจากย่อยด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์ได้นำสารละลายไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ด้วยความร้อน 90°ซ นาน 10 นาที ก่อนย่อยต่อด้วยปาเปน จึงเป็นไปได้ว่าโปรตีนเสียสภาพจากความร้อนทำให้ปาเปนย่อยได้ยากขึ้น ระดับการย่อยสลายจึงเพิ่มขึ้นไม่มาก

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตด้วยสารสกัดหยาบของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน เนื่องจากเหตุผลหลายประการ เช่น ชนิดของเอนไซม์ ความบริสุทธิ์ ความคงตัวของเอนไซม์ และสภาวะในการทดลอง เป็นต้น มีรายงานว่าไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกจะพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสประเภทซีรีน และเมทัลโลโปรติเอส ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน และแอมิโนเปปติเดส (Guyonnet *et al*., 1999; Jamdar and Harikumar, 2005; Zhao *et al*., 2007; Han *et al*., 2008) ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวจะมีความจำเพาะต่อกรดแอมิโนแตกต่าง จากปาเปนซึ่งเป็นเอนไซม์ประเภทซิสเตอีนโปรติเอสที่มีความจำเพาะต่อกรดแอมิโนหลายชนิด (Hamada, 1992; Godfrey, 1996; Bugg, 2004) โดย Chen *et al*. (2009) พบว่าปาเปนมีประสิทธิภาพในการย่อยโปรตีนไข่ขาวของไข่เป็ดได้ดีกว่าเอนไซม์ประเภทซีรีนโปรติเอสโดยได้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายสูงกว่า

นอกจากนี้เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดที่ใช้ในการทดลองยังเป็นสารสกัดหยาบของเอนไซม์ (crude enzyme) มีสิ่งเจือปนอยู่มากซึ่งอาจมีองค์ประกอบที่รบกวนการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ และเมื่อศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ พบว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์จะมีกิจกรรมลดลงเมื่อระยะเวลานานขึ้น ขณะที่ปาเปนเป็นเอนไซม์ที่บริสุทธิ์มีความคงตัวสูง เป็นผลให้เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีกิจกรรมแตกต่างกันในระหว่างการทดลอง ขณะที่สภาวะการทดลองอาจมีผลรบกวนการเกิดกิจกรรมของสารสกัดหยาบของเอนไซม์ เช่น สารอินทรีย์ที่ใช้ในการปรับพีเอชของสารละลายไข่ขาว เป็นต้น อย่างไรก็ตามผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบของเอนไซม์ที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดสามารถย่อยโปรตีนไข่ขาวได้ถึงแม้ระดับการย่อยสลายจะไม่ดีเท่าปาเปน แต่สารสกัดหยาบของเอนไซม์ก็เป็นเอนไซม์ที่มาจากวัตถุดิบมูลค่าต่ำ และมีวิธีการเตรียมที่ไม่ยุ่งยาก ต่างจากปาเปนที่มีราคาค่อนข้างสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. เอนไซม์ที่เตรียมโดยการสกัดไส้และตับอ่อนของเป็ดด้วยน้ำกลั่นเย็น และนำไปทำแห้งแบบระเหิด แสดงค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสสูง และคงตัวดีที่พีเอช 8 อุณหภูมิ 50°ซ

2. จากการทดลองให้ความร้อนแก่สารละลายโปรตีนไข่ขาวแล้วพิจารณาลักษณะปรากฏและค่าความหนืด พบว่าระยะเวลาให้ความร้อนนาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 75°ซ เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมไข่ขาวเพื่อนำไปผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต โดยสารละลายโปรตีนไข่ขาวมีลักษณะสีขาว เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่จับตัวกันเป็นก้อน ค่าความหนืดยังคงไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก

3. ในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด และปาเปน คือ 6 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดได้ผลได้ของของแข็ง และปริมาณไนโตรเจนคืนกลับสูงกว่าการย่อยด้วยปาเปน แต่การย่อยด้วยเอนไซม์ปาเปนได้ไฮโดรไลเสตที่ประกอบด้วยเปปไทด์ขนาดโมเลกุลเล็กกว่า

4. เมื่อพิจารณาระดับการย่อยสลายของไฮโดรไลเสต พบว่าการใช้เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดได้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายต่ำกว่า การใช้ปาเปน สำหรับการใช้เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปนโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตที่ได้มีผลได้ของของแข็ง และปริมาณไนโตรเจนคืนกลับใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดเพียงอย่างเดียว แต่การใช้เอนไซม์สองชนิดร่วมกันได้ไฮโดรไลเสตที่มีระดับการย่อยสลายสูงกว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด แต่ต่ำกว่าปาเปน ทั้งนี้ระดับการย่อยสลายส่งผลต่อสมบัติทางกายภาพ และชีวภาพของไฮโดรไลเสต

5. การย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด ปาเปน และเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดร่วมกับปาเปนช่วยลดโปรตีนไลโซไซม โอโวมิวคอยด์ โอวัลบูมิน และโอโวทรานส์เฟอร์รินซึ่งเป็นโปรตีนที่ก่อให้เกิดการแพ้ไข่ขาวได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อเสนอแนะ

1. อาจนำเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดไปผ่านกระบวนการเพิ่มความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ เช่น ทำให้สารสกัดเอนไซม์เข้มข้นขึ้นด้วยวิธีอัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) ก่อนนำไปทำแห้ง หรือการใช้โครมาโทกราฟีแบบกรองด้วยเจล (Gel filtration chromatography) เป็นต้น

2. ควรทดลองนำเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดไปใช้ย่อยโปรตีนจากวัตถุดิบอื่นเพื่อผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต

3. ในการย่อยโปรตีนไข่ขาวด้วยเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดพบว่าไฮโดรไลเสตที่ได้ยังมีขนาดโมเลกุลสูง จึงควรหาสภาวะในการย่อยที่เหมาะสม เช่น สัดส่วนของเอนไซม์ต่อสับสเตรท ระยะเวลาของการย่อย เป็นต้น เพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยของเอนไซม์

4. โปรตีนไฮโดรไลเสตมีคุณสมบัติกายภาพ และหน้าที่หลายประการ ดังนั้นควรมีการศึกษาสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสต เช่น การต้านออกซิเดชัน การยับยั้งเอนไซม์ ACE-I การเกิดโฟม และการละลาย เป็นต้น เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพัฒนาผลิตภัณฑ์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กลุ่มสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2551. สถิติการนำเข้า-ส่งออก สินค้าปศุสัตว์. **วารสารเพื่อการเผยแพร่สถิติการนำเข้า-ส่งออก สินค้าปศุสัตว์รายเดือน**. 10(1): 11-12.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2546. **การผลิต การตลาดเป็ดเนื้อพันธุ์เชอรี่วัลเลย์**. สำนักวิจัยเศรษฐกิจการเกษตร. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กรุงเทพฯ.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. 2548. **ชีวเคมี**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2553. **เคมีอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 4. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

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

ปาริฉัตร หงสประภาส. 2548. **เอกสารคำสอน: โปรตีนในอาหาร**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พินิจ ลำดวนหอม. 2530. **การเลี้ยงเป็ด**. อักษรบัณฑิต, กรุงเทพฯ.

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

ไพโรจน์ ชัยสมตระกูล. 2531. **การเลี้ยงเป็ดในภาคเหนือตอนบน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รุ่งอรุณ ตระการชัยวงศ์. 2545. **การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตไขมันต่ำจากของเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตซูริมิ**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุวรรณ เกษตรสุวรรณ. 2529. **ไข่และเนื้อไก่**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัจนา ยิ้มเจริญพรสกุล. 2549. **การประยุกต์ไข่ขาวจากไข่เป็ด: กรณีศึกษาการพัฒนาฟิล์มบริโภคได้และผลิตภัณฑ์อาหาร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adeola, O. 2006. Review of research in duck nutrient utilization. **Int. J. Poultry Sci**. 5(3): 201-218.

Adler-Nissen, J. 1986. **Enzymic Hydrolysis of Food Proteins**. Elsevier Applied Science Publishers, Barking, England.

Alleoni, A.C.C. 2006. Review albumen protein and functional properties of gelation and foaming. **Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.)**. 63: 291-298.

Amerongen, V., B. Thomissen, M. J. Catharina, V. Zeeland-Wolbers, L. A. Maria, V. Gilst, W. Hendrikus, J. Hendrik and J. W. Petrus Maria. 2009. **Egg protein hydrolysates**. PCT WO 2009/128713 A1

AOAC. 2000. **Official Method of Analysis**. AOAC International, Maryland.

Arnon, R. 1970. Papain, pp. 226-243. *In* G.E. Perlmann and L. Lorand, eds. **Methods in Enzymology volumn XIX Proteolytic Enzymes**. Academic Press, Inc.,USA.

Barbut, S. 2002. **Poultry Products Processing**. CRC Press LLC, USA.

Battestin, V. and G.A. Macedo. 2007. Effects of temperature, pH and additives on the activity of tannase produced by *Paecilomyces variotii*. **Electron. J. Biotechn**. 10(2): 191-199.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Benjakul, S. and M.T. Morrissey. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. **J. Agric. Food Chem**. 45: 3423-3430.

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. 2005. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochem**. 40: 1829-1834.

Bisswanger, H. 2002. **Enzyme Kinetics: Principles and Methods**. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Germany.

Bugg, T. 2004. **Introduction to Enzyme and Coenzyme Chemistry**. 2nd ed. Blackwell Publishing Ltd., UK.

Campbell, L., V. Raikos and S.R. Euston. 2003. Modification of functional properties of egg-white proteins. **Nahrung**. 47(6): 369-376.

Cigic, B. and M. Zelenik-Blatnik. 2004. Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. **Acta Chim. Slov**. 51: 177-188.

Chen, C. and Y.J. Chi. 2011. Antioxidant, ACE inhibitory activities and functional properties of egg white protein hydrolysate. **J. Food Biochem**. 1-12.

_____, _____, M.Y. Zhao and W. Xu. 2012a. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolasate. **Food Sci. Biotechnol**. 21: 27-34.

_____, _____ and W. Xu. 2012b. Comparisons on the functional properties and antioxidant activity of spray-dried and freeze-dried egg white protein hydrolysate. **Food Bioprocess Tech**. 5: 2342-2352.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Chen, Y.C., H.S. Chang, C.T. Wang and F.Y. Cheng. 2009. Antioxidative activities of hydrolysates from duck egg white using enzymatic hydrolysis. **Asian-Aust. J. Anim. Sci**. 22(11): 1587-1593.

Chiang, W.D., M.J. Tsou, C.H. Weng and T.C. Trai. 2008. Production of angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from egg white protein hydrolysates using a membrane reactor. **J. Food Drug Anal**. 16(2): 54-60.

Cho, H.J., R. Kittaka, A.M. Abdou, M. Kim, H.S. Kim, D.H. Lee and H.J. Park. 2009. Inhibitory effects of oligopeptides from hen egg white on both human platelet aggregation and blood coagulation. **Arch. Pharm. Res**. 6: 945-953.

Clemente, A. 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends Food Sci. Tech**. 11: 254-262.

Cupp-Enyard. 2008. Sigma's non-specific protease activity assay – casein as a substrate. **J. Vis. Exp**. 19: 1-3.

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

_____, _____ and _____. 2010b. Chicken intestine: A source of aminopeptidases. **Scie. Asia**. 36: 137-141.

Denbow, D.M. 2000. Gastrointenstinal anatomy and physiology, pp. 299-325. *In* G.C. Whittow, ed. **Sturkie's Avian Physiology**. Academic Press, UK.

Desert, C., C. Guérin-Dubiard, F. Nau, G. Jan, F. Val and J. Mallard. 2001. Comparison of different electrophoretic separations of hen egg white proteins. **J. Agric. Food Chem**. 49: 4553-4561.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

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

Gao, M.T., M. Hirata, E. Toorisaka and T. Hano. 2006. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation. **Bioresource Technol**. 97: 2414-2420.

Godfrey, T. 1996. Protein modification, pp. 302-479. *In* T. Godfrey and S. West, eds. **Industrial Enzymology**. 2nd ed. Macmillan Publishers Ltd., London.

Graszkiewicz, A., M. Zelazko and T. Trziszka. 2010. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg white proteins. **Pol. J. Food Nutr. Sci**. 60: 57-61

_____, _____, _____ and A. Polanowski. 2007. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. **Pol. J. Food Nutr. Sci**. 57: 195-199.

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

Hamada, J.S. 1992. Modification of food proteins by enzymatic methods, pp. 249-267. *In* B.J.F. Hudson, ed. **Biochemistry of Food Proteins**. Elsevier Science Publishers Ltd., England.

Han, X.Y., Q.C. Huang, W.F. Li, J.F. Jiang and Z.R. Xu. 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B_1 levels. **Livestock Sci**. 119: 216-220.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hatta, H., T. Hagi and K. Hirano. 1997. Chemical and physicochemical properties of hen eggs and their application in foods, pp. 117-133. *In* T. Yamamoto, L.R. Juneja, H. Hatta and M. Kim, eds. **Hen Egg Their Basic and Applied Science**. CRC Press, United States of America.

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: 242-248.

Howell, N.K. 1996. Chemical and enzymatic modifications, pp. 235-280. *In* S. Nakai and H.W. Modler, eds. **Food Proteins: Properties and Characterization**. VCH Publishers, New York.

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

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

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

Jayathilakan, K., K. Sultana, K. Radhakrishna and A.S. Bawa. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. **J. Food Sci. Technol**. 49 (3): 278-293.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kaewmanee, T., S. Benjakul and W. Visessanguan. 2009. Protein hydrolysate of salted duck egg white as a substitute of phosphate and its effect on quality of pacific white shrimp (*Litopenaeus Vannamei*). **J. Food Sci**. 74(8): 351-361.

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

Khantaphant, S. and S. Benjakul. 2010. Purification and characterization of trypsin from the pyloric caeca of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). **Food Chem**. 120: 658-664.

Klomklao, S., S. Benjakul, W. Visessanguan, H. Kishimura, B. K. Simpson and H. Saeki. 2006. Trypsins from yellowfin tuna (*Thunnus albacores*) spleen: purification and characterization. **Comp. Biochem. Phys. B**. 144: 47-56.

Kovacs-Nolan, J., M. Phillips and Y. Mine. 2005. Advances in the value of eggs and egg components for human health. **J.Agric Food Chem**. 53: 8421-8431.

_____, J.W. Zhang, S. Hayakawa and Y. Mine. 2000. Immunochemical and structural analysis of pepsin-digested egg white ovomucoid. **J. Agric. Food Chem**. 48: 6261-6266.

Imm, J.Y. and C.M. Lee. 1999. Production of seafood flavor from red hake (*Urophycis chuss*) by enzymatic hydrolysis. **J. Agric. Food Chem**. 47: 2360-2366.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. 277: 680-685.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lee, W.C. and T.C. Chen. 2002. Functional characteristics of egg white solids obtained from papain treated albumen. **J. Food Eng**. 51: 263-266.

Li-Chan, E.C.Y., W.D. Powrie and S. Nakai. 1995. The chemistry of eggs and egg products, pp. 105-176. *In* W.J. Stadelman and O.J. Cotterill, eds. **Egg Science and Technology**. 4th ed. Food Produce Press, New York.

Liu, J., Z.P. Yu, W.Z. Zhao, S.Y. Lin, E.L. Wang, Y. Zhang, H. Hao, Z.Z. Wang and F. Chen. 2010. Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. **Food Chem**. 122: 1159-1163.

López-Expósito, I., R. Chicón, J. Belloque, I. Recio, E. Alonso and R. López-Fandiño. 2008. Changes in the ovalbumin proteolysis profile by high pressure and its effect on IgG and IgE binding. **J. Agric. Food Chem**. 56: 11809-11816.

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.

Lüüs, H. 2009. **Effect of feeding an essential oil blend on chicken pancreatic enzyme activities**. M.Sc. Thesis, University of Helsinki.

Mahagna, M., I. Nir, M. Larbier, Z. Nitsan. 1995. Effect of age and exogenous amylase and protease on development of the digestive tract, pancreatic enzyme activities and digestibility of nutrients in young meat-type chicks. **Reprod. Nutr. Dev**. 35: 201-212.

Majumder, K. and J. Wu. 2010. A new approach for identification of novel antihypertensive peptides from egg proteins by QSAR and bioinformatics. **Food Res. Int**. 43: 1371-1378.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Manso, M.A., M. Miguel, J. Even, R. Hernández, A. Aleixandre and R. López-Fandiño. 2008. Effect of the long-term intake of an egg white hydrolysate on the oxidative status and blood lipid profile of spontaneously hypertensive rats. **Food Chem**. 109: 361-367.

Miguel, M., M.J. Alonso, M. Salaices, A. Aleixandre, R. Lõpez-Fandiño. 2007. Antihypertensive, ACE-inhibitory and vasodilator properties of an egg white hydrolysate: Effect of a simulated intestinal digestion. **Food Chem**. 104: 163-168.

Mine, Y. 1995. Recent advances in the understanding of egg white protein functionality. **Trends Food Sci. Tech**. 6: 225-232.

_____, F. Ma and S. Lauriau. 2004. Antimicrobial peptides released by enzymatic hydrolysis of hen egg white lysozyme. **J. Agric. Food Chem**. 52: 1088-1094.

_____ and J.W. Zhang. 2002. Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denatured egg white proteins. **J. Agric. Food Chem**. 50: 2679-2683.

_____ and M. Yang. 2008. Recent advances in the understanding of egg allergens: basic, industrial, and clinical perspectives. **J. Agric. Food Chem**. 56: 4874-4900.

Nair, B.M., R. Oste, N.G. Asp and A. Dahlqvist. 1976. Enzyme hydrolysis of food protein for amino acid analysis. I. solubilization of the protein. **J. Agric. Food Chem**. 24: 386-389.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Neilands, J.B. and P.K. Stumpf. 1958. **Outlines of Enzyme Chemistry**. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.

Nilsang, S., S. Lertsiri, M. Suphantharika and A. Assavanig. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. **J. Food Eng**. 70: 571-578.

Ockerman, H.W. and C.L. Hansen. 2000. **Animal By-Product Processing and Utilization**. Technomic Publishing Company, Inc., USA.

Osman, A.M. 1982. Amylase in chicken intestine and pancreas. **Comp. Biochem. Physiol**. 73(3): 571-574.

Qi, M., N.S. Hettiarachchy and U. Kalapathy. 1997. Solubility and emulsifying properties of soy protein isolates modified by pancreatin. **J. Food Sci**. 62: 1110-1115.

Raju, A.A., C. Rose, N. Muralidhara Rao. 1997. Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. **Anim. Feed Sci. Tech**. 66: 139-147.

Randall, D., W. Burggren and K. French. 1997. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 4th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

_____, _____ and _____. 2001. **Eckert Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations**. 5th ed. W.H. Freeman and Company, New York.

Rathina Raj, K. and N.S. Mahendrakar. 2010. Effect of ensiling and organic solvents treatment on proteolytic enzymes of layer chicken intestine. **J. Food Sci. Technol**. 47(3): 320-324.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

Reed, G. 1966. **Enzymes in Food Processing**. Academic Press, Inc., New York.

Santos Jounior, A.A. 2005. **Poultry Intestinal Health through Diet Formulation and Exogenous Enzyme Supplementation**. Ph.D. Thesis, North Carolina State University.

Saxena, I. and S. Tayyab. 1997. Protein proteinase inhibitors from avian egg whites. **Cell. Mol. Life Sci**. 53: 13-23.

Sklan, D. and Y. Noy. 2000. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. **Poultry Sci**. 79: 1306-1310.

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

Shih, F.F. 1992. Modification of food proteins by non-enzymatic methods, pp. 235-248. *In* B.J.F. Hudson, eds. **Biochemistry Food Proteins**. Elsevier Applied Science, London.

Sklan, D. and Y. Noy. 2000. Hydrolysis and absorption in the small intestines of posthatch chicks. **Poultry Sci**. 79: 1306-1310.

Šlizyte, R., E. Daukšas, E. Falch, I. Storrø and T. Rustad. 2005a. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. **Process Biochem**. 40: 1415-1424.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Šlizyte, R., T. Rustad and I. Storrø. 2005b. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. **Process Biochem**. 40: 3680-3692.

Stanciuc, N., A. Hintoiu, S. Stanciu and G. Rapeanu. 2010. Thermal treatment can modify the susceptibility of whey protein concentrate to enzymatic hydrolysis. **Innovative Romanian Food Biotechnology**. 7: 30-36.

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

Sugino, H., T. Nitoda and L.R. Juneja. 1997. General chemical composition of hen eggs, pp. 13-24. *In* T. Yamamoto, L.R. Juneja, H. Hatta and M. Kim, eds. **Hen Egg Their Basic and Applied Science**. CRC Press, United States of America.

Sun, Y. and S. Hayakawa. 2002. Heat-induced gels of egg white/ovalbumins from five avian species: thermal aggregation, molecular forces involved, and rheological properties. **J. Agric. Food Chem**. 50: 1636-1642.

Urisu, A., H. Ando, Y. Morita, E. Wada, T. Yasaki, K. Yamada and K. Komada, S. Torii, M. Goto and T. Wakamatsu. 1997. Allergenic activity of heated and ovomucoid depleted egg white. **J. Allergy Clin. Immunol**. 100: 171-176.

Van der Plancken, I., M. Delattre, Indrawati, A. Van Loey and M. E.G. Hendrickx. 2004. Kinetic study on the changes in the susceptibility of egg white proteins to enzymatic hydrolysis induced by heat and high hydrostatic pressure pretreatment. **J. Agric. Food Chem**. 52: 5621-5626.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Van der Plancken, I., A. Van Loey and M.E.G. Hendrickx. 2005. Changes in sulfhydryl content of egg white proteins due to heat and pressure treatment. **J. Agric. Food Chem**. 53: 5726-5733.

_____, _____ and _____. 2006. Effect of heat-treatment on the physico-chemical properties of egg white proteins: a kinetic study. **J. Food Eng**. 75: 316-326.

Whitaker, J.R. 1994. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. 2nd ed. Marcel Dekker, New York.

Xu, M., X.Shangguan, W. Wang and J. Chen. 2007. Antioxidative activity of hen egg ovalbumin hydrolysates. **Asia Pac. J. Clin. Nutr**. 16: 178-182.

Yamamoto, A. 1975. Proteolytic enzymes, pp. 123-179. *In* G. Reed, ed. **Enzymes in Food Processing**. 2nd ed. Academic Press, Inc., New York.

Yang, S.C. and R.E. Baldwin. 1995. Functional properties of eggs in foods, pp. 405-463. *In* W.J. Stadelman and O.J. Cotterill, eds. **Egg Science and Technology**. 4th ed. Food Produce Press, New York.

Yujie, C., T. Bo, S. Bo and G. Mingruo. 2006. Enzymatic hydrolysis conditions for egg white proteins. **Bull. Facul. Agric. Niigata Univ**. 58(2): 143-146.

Yu, L.J. 2004. **A Process for Preparing and Egg White Liquid for Prevention of Coagulation due to Heat Treatment**. International Bureau WO 2005/074703 A1

Zhao, F., S.S. Hou, H.F. Zhang and Z.Y. Zhang. 2007. Effects of dietary metabolizable energy and crude protein content on the activities of digestive enzymes in jejunal fluid of Peking ducks. **Poultry Sci**. 86: 1690-1695.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสดัดแปลงจาก Cupp-Enyard (2008)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1.1 อ่างควบคุมอุณหภูมิ
1.1.2 เครื่องปั่นผสมของเหลว
1.1.3 หลอดทดลอง
1.1.4 กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4
1.1.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารละลายเคซีน 0.65 เปอร์เซ็นต์
1.2.2 สารละลายไตรคลอโรอะซิติคแอซิค 10 เปอร์เซ็นต์
1.2.3 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.5 โมลาร์
1.2.4 สารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล 25 เปอร์เซ็นต์
1.2.5 สารละลายไทโรซีนความเข้มข้น 0.0275, 0.055, 0.11, 0.33 และ 0.55 ไมโครโมล

1.3 วิธีการ

นำสารสกัดหยาบเอนไซม์ในรูปของสารละลาย หรือผงมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับการหาค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจะใช้เคซีนเป็นสับสเตรท เริ่มจากการบ่มสับสเตรทปริมาตร 5 มล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 10 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจางแล้ว 1 มล. และบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติคแอซิค 5 มล. สำหรับแบลงค์ (blank) เติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติคแอซิค 5 มล.ก่อนเติมสารละลายเอนไซม์ที่เจือจาง 1 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที กรองแยกเอาเฉพาะส่วนใสของสารละลายด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 ดูดสารละลายที่กรองได้มา 2 มล. เติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 5 มล. และสารละลายโฟลินซีโอเคาทูลฟีนอล 1 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน เพื่อคำนวณเป็นค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เมื่อ 1 หน่วยเอนไซม์ หมายถึงปริมาณไทโรซีนที่เกิดขึ้น 1 ไมโครโมล (181.19 ไมโครกรัม) ต่อนาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

1.4 วิธีคำนวณ

$$\text{หน่วย/มล.เอนไซม์} = \frac{(\text{ไมโครโมลของไทโรซีนที่เกิดขึ้น})\ (11)}{(1)(10)(2)}$$

เมื่อ 11 = ปริมาตรรวมทั้งหมด (มล.) ที่วิเคราะห์
10 = เวลาของการวิเคราะห์ (นาที) ต่อหน่วย
1 = ปริมาตรของเอนไซม์ (มล.) ที่ใช้ศึกษา
2 = ปริมาตร (มล.) ที่ใช้วัดค่าการดูดกลืนแสง

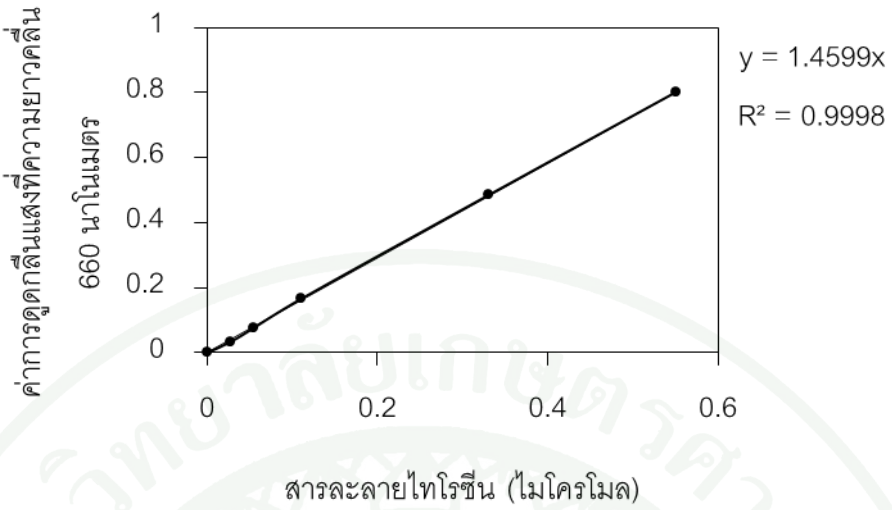
$$\text{หน่วย/มก.เอนไซม์} = \frac{\text{หน่วย/มล.เอนไซม์}}{\text{มก.เอนไซม์/มล.เอนไซม์}}$$

$$\text{หน่วย/มก.โปรตีน (กิจกรรมจำเพาะ)} = \frac{\text{หน่วย/มก.เอนไซม์}}{\text{มก.โปรตีน/มก.เอนไซม์}}$$

1.5 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

นำสารละลายไทโรซีนที่ความเข้มข้นต่างๆ มาผสมกับสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 5 มล. และสารละลาย โฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล 1 มล. บ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีน (ไมโครโมล) ได้กราฟดังภาพผนวกที่ 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al*., 1951)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

2.1.1 หลอดทดลอง

2.1.2 อ่างควบคุมอุณหภูมิ

2.1.3 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.1.4 เครื่องปั่นผสมของเหลว

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารละลายโซเดียมคาร์บอเนท 2 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ก)

2.2.2 สารละลายคอปเปอร์ซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ข)

2.2.3 สารละลายโพแทสเซียมทาร์เทรต 2 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย ค)

2.2.4 สารละลาย ง โดยผสมสารละลาย ก: สารละลาย ข: สารละลาย ค ในอัตราส่วน 100:1:1

2.2.5 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 นอร์มัล

2.2.6 สารละลาย โฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล 50 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.7 สารละลายโบวายเซรัมอัลบูมินความเข้มข้น 50, 100, 250, 500, 1000 และ 1500 มก./ลิตร

2.3 วิธีการ

เจือจางตัวอย่างที่ใช้ทดสอบด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ใส่ตัวอย่างลงในหลอดทดลอง 0.3 มล. เติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 0.3 มล. นำสารละลายไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย ง ปริมาตร 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเติมสารละลายโฟลิน-ซีโอเคา-ทูลฟีนอล 0.3 มล.ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาทีเพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตร-โฟโตมิเตอร์ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ได้นำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวาย-เซรัมอัลบูมินเพื่อคำนวณหาค่าปริมาณโปรตีน

2.4 ตัวอย่างการคำนวณ

ในการทดลองหาปริมาณโปรตีนของสารสกัดหยาบเอนไซม์ในรูปผงจากไส้และตับอ่อนของเป็ด ด้วยวิธี lowry โดยละลายเอนไซม์ผง 20 มก.ด้วยน้ำกลั่น 15 มล. เมื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตรเท่ากับ 0.580 จากค่าการดูดกลืนแสงเมื่อนำไปเทียบกับกราฟมาตรฐานในภาพผนวกที่ 2 จะได้ปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.580/0.0007 = 828.57 มก./ลิตร หรือ 0.828 มก./มล. โดยใน 1 มล.ของสารละลายเอนไซม์มีเอนไซม์ผง 20/15 = 1.33 มก./มล.

ดังนั้นเอนไซม์ 1.33 มก.จึงมีปริมาณโปรตีน 0.828 มก.

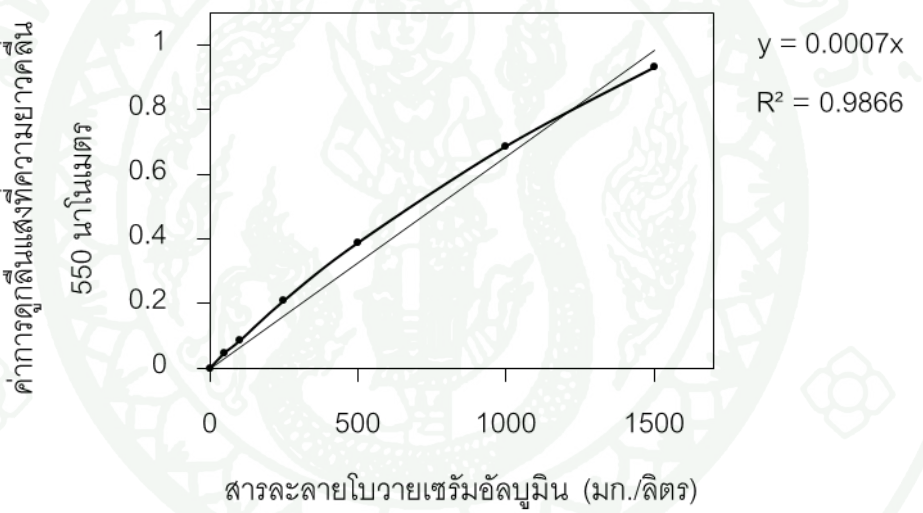
เอนไซม์ผง 1 มก.มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ

0.828 ×1/1.33 = 0.62 มก./มก.เอนไซม์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.5 การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน

นำสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมินที่ความเข้มข้นต่างๆปริมาตร 0.3 มล.ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.3 มล. นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมสารละลาย ง ปริมาตร 3 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วจึงเติมสารละลายโฟลินซีโอเคาทูลฟีนอล 0.3 มล.ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตรด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโต-มิเตอร์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน (มก./ลิตร) ได้กราฟดังภาพผนวกที่ 2



ภาพผนวกที่ 2 กราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน

3. **การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นตามวิธีของ** AOAC (2000)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.1 ถ้วยอลูมิเนียม

3.1.2 ตู้อบลมร้อน

3.1.3 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

3.1.4 เดซิเคเตอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 วิธีการ

อบถ้วยอลูมิเนียมพร้อมฝาในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 3 ชั่วโมงปล่อยให้เย็นในเดซิเคเตอร์แล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอน ใส่ตัวอย่างที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 4-5 กรัม ลงในถ้วยอลูมิเนียม แล้วนำเข้าตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 105 °ซ ประมาณ 3 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์นำตัวอย่างออกมาชั่งหาน้ำหนัก อบซ้ำจนได้น้ำหนักของตัวอย่างคงคือให้น้ำหนักของผลต่างทั้งสองครั้งไม่เกิน 1 มก.

3.3 วิธีคำนวณ

ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ}} \times 100$$

ปริมาณของแข็ง (เปอร์เซ็นต์) = 100 – ปริมาณความชื้น (เปอร์เซ็นต์)

4. การวิเคราะห์ปริมาณไขมันโดยใช้วิธี Soxtec system ดัดแปลงจาก AOAC (2000)

4.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

4.1.1 เครื่องวิเคราะห์ไขมัน Soxtec System HT6
4.1.2 ชุดวิเคราะห์ปริมาณไขมัน
4.1.3 เดซิเคเตอร์
4.1.4 ตู้อบลมร้อน
4.1.5 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

4.2 สารเคมี

4.2.1 ปิโตรเลียมอีเทอร์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 วิธีการ

เปิดเครื่องทำความเย็นให้อุณหภูมิต่ำกว่า 10 °ซ เปิดเครื่องทำความร้อนรอให้เครื่องพร้อมทำงาน ชั่งน้ำหนักตัวอย่างแห้งที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 5 กรัมใส่ใน thimble แล้วนำไปใส่ใน extraction unit นำปีโตรเลียมอีเทอร์ปริมาณ 60 มล.ใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ผ่านการอบชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน จากนั้นนำถ้วยอลูมิเนียมต่อเข้ากับ extraction unit ทำการสกัดนาน 20 นาที จากนั้นทำการล้าง 10 นาที และระเหยตัวทำละลายอีก 20 นาที นำถ้วยอลูมิเนียมไปอบที่อุณหภูมิ 105 °ซ นาน 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ และชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

4.4 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{W3-W2}{W1} \times 100$$

เมื่อ W1 = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)
W2 = น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมที่ผ่านการอบหาน้ำหนักที่แน่นอน (กรัม)
W3 = นำหนักถ้วยอลูมิเนียมและไขมันที่สกัดได้ (กรัม)

5. การวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน และโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl ดัดแปลงจาก AOAC (2000)

5.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

5.1.1 ชุดเครื่องกลั่น Kjeltec 1026 Distilling unit

5.1.2 ชุดเครื่องย่อย Digestion System 1007

5.1.3 หลอดย่อย และ Tube stand

5.2 สารเคมี

5.2.1 กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5.2.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1 นอร์มัล

5.2.3 สารละลายกรดบอริก 2 เปอร์เซ็นต์

5.2.4 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซ็นต์

5.2.5 สารเร่งปฏิกิริยา: คอปเปอร์ซัลเฟต 0.5 กรัม และโพแทสเซียมซัลเฟต 10 กรัม

5.2.6 สารละลายอินดิเคเตอร์ (ละลายเมธิลเรด 0.02 กรัม และ โบรโมครีซอลกรีน 0.1 กรัมใน เอทานอลปริมาตร 100 มล.)

5.2.7 ทริสบัฟเฟอร์

5.3 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.5 กรัมให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ใส่ลงในหลอดย่อย เติมตัวเร่งปฏิกิริยา ใส่เม็ดลูกแก้วกันเดือด (glass bead) 2-3 เม็ด จากนั้นเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 20 มล. นำหลอดต่อเข้ากับชุดย่อย ทำการย่อยจนได้สารละลายใสทิ้งไว้ให้เย็น นำหลอดย่อยต่อเข้ากับชุดเครื่องกลั่นเติมน้ำกลั่น 60 มิลลิตร และเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์จนกว่าสารละลายในหลอดย่อยเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาล โดยใช้เวลากลั่นประมาณ 3 นาที รองรับสารละลายที่กลั่นได้ด้วยขวดรูปชมพู่ซึ่งมีสารละลายกรดบอริกความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 60 มล. และสารละลายอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำสารละลายที่ได้ไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มัล จนได้สารละลายสีเทาซึ่งเป็นจุดยุติทำแบลงค์เปรียบเทียบโดยไม่ใส่ตัวอย่างในหลอดย่อย

สำหรับการหาค่าแฟคเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรท ทำโดยชั่งทริสบัฟเฟอร์ 120 มก. ให้ได้น้ำหนักที่แน่นอน ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 200 มล. หยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด นำไปไตเตรทด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริก 0.1 นอร์มัล จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีเทา

5.4 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{(S-B)\times N\times f\times 1400}{W}$$

ปริมาณโปรตีน (เปอร์เซ็นต์) = ปริมาณไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์) × nitrogen factor

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$\text{แฟคเตอร์กรด (f)} = \frac{E}{121.14 \times N \times V}$$

เมื่อ S = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทตัวอย่าง (มล.)

B = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรทแบลงค์ (มล.)

W = น้ำหนักของตัวอย่าง (มก.)

f = แฟคเตอร์ของกรดที่ใช้ในการไตเตรท

N = ความเข้นข้นของกรดที่ใช้ไตเตรท (นอร์มัล)

V = ปริมาตรของกรดที่ใช้ไตเตรททริสบัฟเฟอร์ (มล.)

E = น้ำหนักของทริสบัฟเฟอร์ (มก.)

6. การวิเคราะห์ปริมาณเถ้าตามวิธีของ AOAC (2000)

6.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

6.1.1 ถ้วยกระเบื้องเคลือบ

6.1.2 เตาเผาไฟฟ้า (electric muffle furnace)

6.1.3 เดซิเคเตอร์

6.1.4 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

6.1.5 ตะเกียงบุนเซ็น

6.2 วิธีการ

ชั่งตัวอย่างแห้งประมาณ 5 กรัม ใส่ในถ้วยกระเบื้องเคลือบที่เผา และทราบน้ำหนักที่แน่นอน นำไปเผาด้วยไฟอ่อนๆ จนหมดควันสีดำ แล้วเผาต่อในเตาเผาไฟฟ้าที่อุณหภูมิ 550 ± 20 °ซ นาน 2-3 ชั่วโมง จนได้เถ้าสีขาวหรือสีเทา ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหาน้ำหนักที่แน่นอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6.3 วิธีคำนวณ

$$\text{ปริมาณเถ้า (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้าที่เหลือ}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนเผา}} \times 100$$

7. **การวิเคราะห์ระดับการย่อยสลาย** (Degree of hydrolysis) (Qi *et al*., 1997)

7.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

7.1.1 หลอดเซนตริฟิว

7.1.2 เครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ

7.1.3 เครื่องปั่นผสมของเหลว

7.2 สารเคมี

7.2.1 สารละลายไตรคลอโรอะซิติคแอซิค 20 เปอร์เซ็นต์

7.3 วิธีการ

นำโปรตีนไฮโดรไลเสตในปริมาตรที่แน่นอนใส่ในหลอดเซนตริฟิวจากนั้นเติมสารละลายไตรคลอโรอะซิติค (TCA) ในปริมาตรเท่ากัน เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมของเหลวนาน 2 นาที จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็ว 10,000×g นาน 15 นาที นำส่วนของเหลวใสด้านบนไปวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจน

7.4 วิธีคำนวณ

ระดับการย่อยสลาย (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{ปริมาณไนโตรเจนที่ละลายใน 10 เปอร์เซ็นต์ TCA}}{\text{ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในวัตถุดิบ}} \times 100$$

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. การวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีนโดยอิเล็กโทรโฟริซิสแบบ sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ดัดแปลงจากวิธีการของ Laemmli (1970)

8.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

8.1.1 เครื่องวิเคราะห์ขนาดโมเลกุลของโปรตีน

8.2 สารเคมี

8.2.1 สารละลาย acrylamide (30เปอร์เซ็นต์)/bis (0.8เปอร์เซ็นต์) (ละลาย acrylamide 30 กรัม และmethylenebisacrylamide 0.8 กรัม ในน้ำปราศจากอิออนและปรับปริมาตรเป็น 100 มล. กรองสารละลายและเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4°ซ โดยเก็บได้ไม่เกิน 30 วัน)

8.2.2 สารละลาย Tris-HCl 1.5 โมลาร์ พีเอช 8.8

8.2.3 สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8

8.2.4 สารละลาย Sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 เปอร์เซ็นต์

8.2.5 สารละลาย running buffer (ผสม Tris base 9 กรัม Glycine 43.2 กรัม และ SDS 3 กรัมละลายให้เข้ากัน และปรับปริมาตรเป็น 600 มล.)

8.2.6 สารละลายสีย้อม (ละลาย Coomassie brilliant blue R-250 1 กรัมในสารละลายที่มีส่วนผสมของเมทานอล 40 เปอร์เซ็นต์ และกรดอะซิติก 10 เปอร์เซ็นต์ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1 ลิตร)

8.2.7 สารละลายล้างสีย้อม (ผสมเมทานอล 200 มล. กับกรดอะซิติก 100 มล.และปรับปริมาตรเป็น 1,000 มล.ด้วยน้ำกลั่น)

8.2.8 สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10 เปอร์เซ็นต์

8.2.9 TEMED (N,N,N',N'-tetra ethylene diamine)

8.2.10 2-mercaptoethanol

8.2.11 กลีเซอรอล

8.2.12 สารละลายโบรโมฟีนอลบลู 1 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.2.13 สารละลายโปรตีนมาตรฐาน broad range ของบริษัท Bio-Rad เลขที่ 161-0363 ประกอบด้วยโปรตีน myosin (200 kDa), β-galactosidase (116.25 kDa), phosphorylase b (97.4 kDa), serum albumin (66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa) และ aprotinin (6.5 kDa)

8.3 วิธีการ

การเตรียมตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลายตัวอย่าง (sample buffer) โดยผสมน้ำปราศจากอิออน 3.8 มล., สารละลาย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.8 ปริมาตร 1 มล., กลีเซอรอล 0.8 มล., สารละลาย SDS 10 เปอร์เซ็นต์ 1.6 มล., 2-mercaptoethanol 0.4 มล. และสารละลายโบรโนฟีนอลบลูความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 0.4 มล.

2. เจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายตัวอย่างโดยในกรณีของไข่ขาวสดเจือจางตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของโปรตีน 30 และ 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 4 ไมโครลิตร และโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตเจือจางตัวอย่าง 30 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 4 ไมโครลิตร

3. นำสารละลายโปรตีนตัวอย่างไปต้มในน้ำเดือดนาน 5 นาที ทิ้งให้เย็นใช้สำหรับหยอดตัวอย่างลงบนแผ่นเจล

การเตรียมเจล

1. ทำความสะอาดแผ่นกระจกสำหรับเตรียมเจล

2. ประกอบแผ่นกระจกเข้ากับอุปกรณ์ชิ้นอื่นๆ ตามวิธีประกอบ โดยควรสวมถุงมือในการประกอบเครื่อง

3. เตรียมสารละลายของ separating gel อัตราส่วนตามตารางผนวกที่ 1 ในกรณีของไข่สดใช้ separating gel ที่ความเข้มข้น 12 เปอร์เซ็นต์และโปรตีนไข่ขาวไฮโดรไลเสตใช้ที่ความเข้มข้น 16.5 เปอร์เซ็นต์ โดยการเตรียมสารละลายจะผสมส่วนประกอบข้อที่ 1-5 ก่อน (ตารางผนวกที่ 1) และนำของผสมที่ได้ไปกำจัดอากาศ (degas) นาน 20 นาที แล้วจึงเติมส่วนประกอบข้อที่ 6 และ 7 ผสมให้เข้ากัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. ใช้ปิเปตดูดสารละลายของเจลลงในช่องว่างระหว่างแผ่นแก้ว โดยระวังอย่าให้มีฟองอากาศให้เหลือระยะห่างจากขอบบนประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร และใช้ปิเปตค่อยๆเติมน้ำกลั่นปิดทับผิวหน้าของเจล

5. ตั้งเจลทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้แข็งตัวซึ่งใช้เวลาประมาณ 45-60 นาที เมื่อเจลแข็งจะเห็นรอยต่อระหว่างเจลกับน้ำค่อยๆดูดน้ำกลั่นทิ้งไป และใช้กระดาษกรองซับผิวหน้าของเจล

6. เตรียมสารละลายของ stacking gel ที่ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยผสมส่วนประกอบในข้อ 1-5 (ตารางผนวกที่ 1) จากนั้นนำของผสมที่ได้ไปกำจัดอากาศ (degas) นาน 20 นาที แล้วจึงเติมส่วนประกอบข้อที่ 6 และ 7 ผสมให้เข้ากัน

7. ใช้ปิเปตดูดสารละลายของเจลลงบน separating gel โดยอย่าให้มีฟองอากาศค่อยๆสอดหวี (Teflon comb) ลงใน stacking gel โดยคอยเติมสารละลายของเจลให้เต็ม ทิ้งให้เจลแข็งตัวที่อุณหภูมิห้องใช้เวลาประมาณ 30-40 นาที เมื่อเจลแข็งตัวแล้วจึงนำหวีออกจะได้ช่องสำหรับใส่ตัวอย่างโปรตีน

การ Loading ตัวอย่าง

1. เตรียมสารละลาย electrode buffer 600 มล. โดยผสมสารละลาย running buffer 120 มล.กับน้ำ 480 มล.

2. ต่อชุดอุปกรณ์อิเล็กโทรโฟรริซิสทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติมสารละลาย electrode buffer ลงในภาชนะทั้งด้านนอกและด้านในแต่อย่าให้ล้น chamber อันบนโดยการเทสารละลายพยายามอย่าให้มีฟองอากาศถ้ามีให้ใช้ปิเปตกวนไล่ฟองอากาศ

3. ใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีนมาตรฐานปริมาตร 4 ไมโครลิตรลงในช่องใส่ตัวอย่าง

4. ปิดฝา chamber จากนั้นต่อขั้วบวกและขั้วลบเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ที่ 100 โวลท์

5. หยุดการจ่ายกระแสไฟเมื่อสีของสารโบรโมฟีนอลบลูเคลื่อนที่เกือบถึงปลายของ separating gel

6. นำแผ่นเจลออกจากอุปกรณ์ แล้วนำไปย้อมด้วยสารละลายสีย้อมนาน 45 นาที ล้างสารละลายสีย้อมด้วยสารล้างสีย้อมจนเห็นแถบโปรตีนชัดเจน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 อัตราส่วนสำหรับการเตรียม SDS-PAGE Separating gel และ Stacking gel

ส่วนประกอบ	Separating gel (0.375M Tris, pH 8.8)		Stacking gel (0.125M Tris, pH 6.8)
	12 เปอร์เซ็นต์ gel	16.5 เปอร์เซ็นต์ gel	4เปอร์เซ็นต์ gel
1. น้ำกลั่น	3.35 ml	1.85 ml	6.1 ml
2. 1.5M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 ml	2.5 ml	-
3. 0.5M Tris-HCl, pH 6.8	-	-	2.5 ml
4. สารละลาย SDS 10เปอร์เซ็นต์	100 µl	100 µl	100 µl
5. สารละลายacrylamide/bis (กำจัดอากาศ 20 นาที)	4 ml	5.5 ml	1.33 ml
6. ละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต 10เปอร์เซ็นต์	100 µl	50 µl	50 µl
7. TEMED	10 µl	5 µl	10 µl

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวโสภิดา ปัญญานวล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	13 ธันวาคม 2528
สถานที่เกิด	จังหวัดลำปาง
ประวัติการศึกษา	วท.บ
	มหาวิทยาลัยราชภัฏลำปาง
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์