สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานวิจัย

การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย

Assay of fibrinolytic enzyme activities in Thai traditional fermented foods

จัดทำโดย

ผศ. ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

RCH
TX
560
.F47
ป3195
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....73022
วัน,เดือน,ปี...27 มิ.ย. 2550

โครงการวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2549

1141911
b.....
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

จากการตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านของไทยชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กะปิ ปูดอง ปูจืด ปลาร้า แหนมหมู แหนมปลา เต้าเจี้ยวขาว ข้าวหมาก หอยดอง หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง เต้าหู้ยี้ โยเกิร์ต กระเทียมดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาส้ม ขิงดอง และไส้กรอกอีสาน จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยวิธีไฟบรินเพลท พบว่าอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน คือ กะปิ ปูดอง แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน ซึ่งกะปิสมุทรสงครามมีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ 8.40 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง รองลงมาคือกะปิเกาะช้าง 7.79 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และปูจืดตลาดหัวตะเข้ มีแอคติวิตี 7.31 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีแอคติวิตีต่ำสุดคือ ไส้กรอกอีสาน 0.34 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และเมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากตัวอย่างกะปิสมุทรสงครามและปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้ที่อุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ กัน พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 5-8 โดยมีแอคติวิตีลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5

Abstract

Fibrinolytic enzyme activities in various Thai traditional fermented foods; including shrimp pastes (Ka-pi), salted or unsalted crabs (Poo-dong), fermented fishes (Pla-raa), fermented ground pork (Nam), fermented ground fish (Nam-pla), white fermented soybean (Tao-geao-khaow), fermented sticky rice (Kao-mark), fermented clams (Hoi-dong), fermented bamboo shoots (Nor-mai-dong), Chinese green pickle (Pak-gard-dong), fermented soybean curd (Tofuyu), yogurts, garlic pickle (Kratium-dong), local vegetable pickle (Pak-sien-dong), sour fishes (Pla-som), ginger pickle (Khing-dong), and fermented sausages (Sai-grog-Isan), total of 40 samples were analyzed by the fibrin plate method. Only 4 groups (14 samples) of fermented products investigated *i.e.* shrimp pastes (Ka-pi), salted or unsalted crabs (Poo-dong), fermented ground pork (Nam), and fermented sausages (Sai-krog-Isan) exhibited fibrinolytic enzyme activities. The shrimp pastes from Samutsongkram showed the highest activity of 8.40 plasmin unit/ g sample, while shrimp pastes from Kao-Chang and unsalted crabs from Hao-ta-kae wet market contained 7.79 and 7.31 plasmin unit/ g sample, respectively. The lowest enzyme activity was found in fermented sausages (Sai-grog-Isan) with 0.34 plasmin unit/ g sample. The crude extracts prepared from shrimp pastes and salted crabs were then investigated for their temperature and pH stability profiles. The fibrinolytic activity was stable in the range of 30-40 $^{\circ}$C and pH 5-8. The activity was completely destroyed at 70 $^{\circ}$C and greatly decreased at pH < 4.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการศึกษาเท่านั้น ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้เป็นส่วนใหญ่ ขอขอบคุณ คุณมณีพร อัครพลกุล คุณสุกัญญา สุขสวัสดิ์ ที่มีส่วนทำให้งานวิจัยนี้เสร็จลุล่วงด้วยดี นอกจากนี้ขอขอบคุณ คุณศศิอาภา บุญคง สำหรับคำแนะนำต่าง ๆ และสุดท้ายขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่เกี่ยวข้อง

ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

14 กันยายน 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
กิตติกรรมประกาศ	ii
สารบัญ	iii
สารบัญตาราง	iv
สารบัญภาพ	v
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	2
2.1 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน	2
2.2 แหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบริน	3
2.3 สมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งต่าง ๆ	4
2.4 แนวทางการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในอาหาร	9
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	10
3.1 วัตถุดิบ	10
3.2 สารเคมี	11
3.3 อุปกรณ์ที่สำคัญ	11
3.4 วิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน	15
4.2 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ	16
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก	20
4.4 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก	21
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	23
5.1 สรุปผลการทดลอง	23
5.2 ข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	อาหารที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบรินและชนิดของเอนไซม์	3
4.1	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมัก 40 ชนิด	
ก1	การเตรียมพลาสมินที่มีความเข้มข้นต่างๆ	28
ข1	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อใช้พลาสมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	29
ง1	ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ เมื่อทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิต่าง ๆ	31
ง2	ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปิสมุทรสงคราม เมื่อทดสอบความเสถียรของอุณหภูมิต่าง ๆ	31
จ1	ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองเกลือ เมื่อทดสอบความเสถียรที่พีเอชต่าง ๆ	33
จ2	ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพันธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก กะปิสมุทรสงคราม เมื่อทดสอบความคงตัวที่พีเอชต่าง ๆ	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การย่อยลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ชื่อว่า พลาสมิน	2
2.2	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N – terminal ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากกะปิกับอาหารชนิดอื่น	4
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับต่าง ๆ กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น	15
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 0.1 – 0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น	16
4.3	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ	19
4.4	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม	20
4.5	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม	22
ฉ1	การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน โดยวิธีไฟบรินเพลท	35
ฉ2	ตัวอย่างผลการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินโดยวิธีไฟบรินเพลท	35
ฉ3	ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจำนวน 14 ตัวอย่าง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพกันมากขึ้น โดยเฉพาะในเรื่องเกี่ยวกับอาหาร ดังจะเห็นได้ว่าผู้ผลิตหลายรายได้พยายามที่จะเสริมสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพลงไปในอาหารเพื่อเป็นจุดขายของผลิตภัณฑ์ เช่น วิตามินต่าง ๆ กรดไขมันโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลา , ใยอาหารและพรีไบโอติกต่าง ๆ เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากโรคภัยไข้เจ็บโดยเฉพาะโรคหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตของประชากรโลกเป็นปัญหาสำคัญ นักวิทยาศาสตร์จึงได้ค้นคว้าวิจัยหาแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจ และที่น่าสนใจคือ มีการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักของทางเอเชีย เช่น กะปิของจีน นัตโต ปลาหมักของญี่ปุ่น และเกาหลี เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ย่อยไฟบรินดังกล่าวมีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิ่มเลือด (fibrin clot) ที่เกิดขึ้นในหลอดเลือด จึงมีสมบัติในการป้องกันการอุดตันของหลอดเลือดได้ โดยลิ่มเลือดซึ่งเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฟบริโนเจนกับทรอมบินนั้น ถ้าเกิดการสะสมของลิ่มเลือดดังกล่าวในหลอดเลือดจะทำให้เลือดไหลเวียนไม่สะดวก และอาจก่อให้เกิดโรคหัวใจในที่สุด

สำหรับการป้องกันการเกิดโรคหัวใจนั้น นอกจากการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอแล้ว การใส่ใจกับการเลือกบริโภคอาหารต่าง ๆ ก็เป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวมากต้องพยายามหลีกเลี่ยง และนอกจากนี้ได้มีรายงานว่าการบริโภคอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินอยู่เป็นประจำ จะมีผลทำให้ไม่มีการสะสมลิ่มเลือดซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายลิ่มเลือดได้ และจากการทดลองให้เอนไซม์ชนิดนี้กับสุนัขและมนุษย์ พบว่าสามารถตรวจพบเอนไซม์ดังกล่าวอยู่ในกระแสเลือดได้นานกว่า 6 ชั่วโมง (Kim *et al.*, 1997) ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการบริโภคอาหารที่มีองค์ประกอบของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นประจำน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ ซึ่งในประเทศไทยได้มีการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักทางภาคเหนือของไทย ได้แก่ ถั่วเน่า (ศศิอาภาและคณะ, 2548)

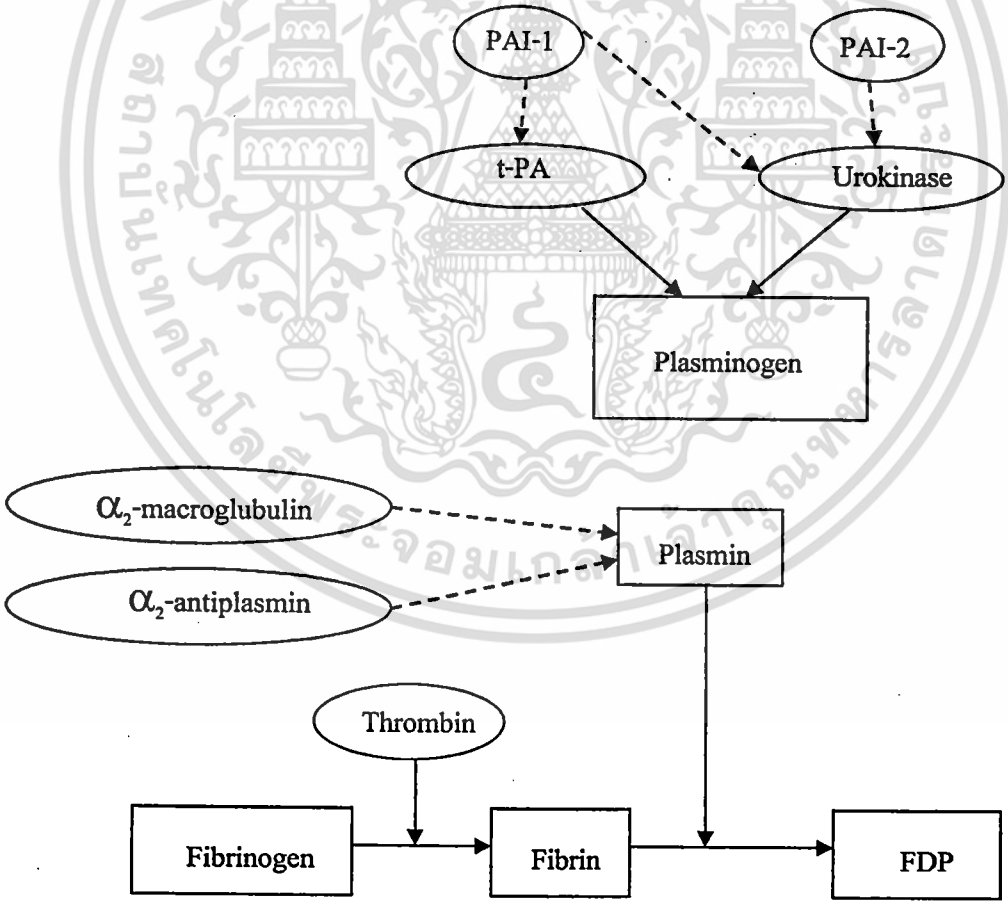
เนื่องจากในประเทศไทยมีอาหารหมักพื้นบ้านอยู่หลากหลายชนิด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านชนิดต่าง ๆ พร้อมทั้งศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและที่พีเอชต่าง ๆ ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะเป็นการเพิ่มแนวทางในการเลือกบริโภคอาหารที่จะมีผลต่อการป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ และสามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาระดับสูงขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน

เมื่อร่างกายเกิดบาดแผลขึ้นจะมีกระบวนการยับยั้งไม่ให้เลือดออกมากเกินไป โดยจะมีการสร้างเกล็ดเลือดและรวมตัวเป็นร่างแห ในขณะเดียวกันนี้ก็จะมีการสลายเกล็ดเลือดที่สร้างขึ้นด้วย หากกระบวนการดังกล่าวไม่มีความสมดุล กล่าวคือการสร้างเกล็ดเลือดมากกว่าการสลายเกล็ดเลือด จะทำให้เกล็ดเลือดจับตัวกันเป็นลิ่มเลือด ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นนี้จะเกาะที่ผนังหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดไม่เป็นปกติ แต่ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นนั้นก็จะถูกย่อยสลายได้โดยสารที่ชื่อว่าเอน-ไซม์ย่อยไฟบริน (fibrinolytic enzyme) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบริน แสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าลิ่มเลือด (fibrin) เกิดจากการกระตุ้นไฟบริโนเจน (fibrinogen) โดยเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) ซึ่งลิ่มเลือดนี้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยพลาสมิน ที่เกิดจากการถูกกระตุ้นจากพลาสมิโนเจน



รูปที่ 2.1 การย่อยลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีชื่อว่าพลาสมิน

ที่มา : Dobrovolsky และ Titaeva (2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 แหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

2.2.1 เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหาร

เอนไซม์ย่อยไฟบรินสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในอาหารหมักของเอเชีย ได้แก่ นัตโต ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่น, เทมเป้ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักของอินโดนีเซีย, เต้าหู้ยี้, กะปิของจีน และกิมจิ เป็นต้น ซึ่งชนิดของตัวอย่างอาหารและชนิดของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อาหารที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบรินและชนิดของเอนไซม์

Food source	origin	Description	Fibrinolytic enzyme
Natto	Japan	Bacillus fermented soy bean	An extracellular serine protease (Nattokinase)
Tofuyo	Japan	Fermented bean curd	A soybean milk coagulating enzyme(SMCE)
Skipjack shiokara	Japan	A salt-fermented fish product	An alkaline trypsine-like serine protease (Katsuwokinase)
Chungkook-Jang	Korea	Fermented soy bean sauce	An alkaline serine protease (CK)
Kimchi	Korea	Fermented vegetables	A Bacillus protease
Armillariella mella	World-wide china	An edible honey mushroom	A neutral metalloprotease
Fermented shrimp paste	china	A salt fermented shrimp paste	Neutral Metallo protease

ที่มา : ดัดแปลงจาก Mine และคณะ (2005)

2.2.2 เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งที่ไม่ใช่อาหาร

เอนไซม์ย่อยไฟบริน จะพบโดยทั่วไปในธรรมชาติอยู่แล้ว เช่น ในพิษงูที่ทำให้เกิดการตกเลือด สารคัดหลั่งของไส้เดือน สารที่จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารสร้างขึ้น โดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยไฟบริจาก *Spirodela polyrhiza* ใช้เป็นส่วนประกอบในยาของชาวตะวันออก ที่ใช้ลดความดันในเลือดและแก้พิษงู เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีศักยภาพสูงจะผลิตจากเชื้อ *Bacillus* sp. ที่พบในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมัก หรือในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง *Stichopous japonicus* และสาหร่ายทะเล *Codiales codium* (Mine *et al.*, 2005)

2.3 สมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งต่าง ๆ

2.3.1 กะปีของจีน (fermented shrimp paste)

มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีนจากการศึกษาทดลองของ Wong และ Mine (2004) โดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 18 กิโลดาลตันและมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal คือ DPYEEGPGCENLQVA ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน (N-terminal) บ่งบอกว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปีเป็นเอนไซม์ชนิดใหม่ที่ไม่เหมือนกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เคยมีรายงานมาแล้ว (รูปที่ 2.2)

	1				5					10					15
Fermented shrimp paste	D	P	Y	E	E	G	P	G	C	E	N	L	Q	V	A
Natto (nattokinase)	A	Q	S	V	P	Y	G	I	S	Q	I	K	A	P	
Chungkook-Jang (CK)	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P	L	I	K	A	D	
Bacillus subtilis BK-17	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S	Q	I	K	A	P	A
Tofuyo (SMCE)	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P	Q	I	K	A	D	
Skipjack "Shiokara" (katsuwokinase)	I	V	G	G	Y	E	Q	Z	A	H	S	Q	P	H	Q
Armillariella mellea	X	X	Y	N	G	X	T	X	S	R	Q	T	T	L	V

รูปที่ 2.2 เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากกะปีกับอาหารชนิดอื่น

ที่มา : Wong และ Mine (2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ชนิดนี้ค่อนข้างมีความจำเพาะต่อไฟบรินหรือไฟบริโนเจนซึ่งเป็นสับสเตรท เอนไซม์ชนิดนี้จะไม่ไฮโดรไลซ์พลาสมาโปรตีน รวมถึง BSG , IgG , ทรอมบิน และฮีโมโกลบิน เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีนเป็นประเภทนิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3-6 และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส แต่จะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่สำคัญเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์เปปซินและเอนไซม์ทริปซินได้

เมื่อทดสอบความเสถียรต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยไอออนโลหะ 5 ชนิด คือ Fe^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Hg^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าโลหะไอออนทั้งหมดที่ใช้ทดสอบมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยสารยับยั้งเอนไซม์โปรติ-เอส 9 ชนิด คือ 2,4-dinitrophenol (DNP), trans-epoxysuccinyl – L - leucylamido (quantidino) butane (E64) , 1,10-phenanthroline, collagenase inhibitor, tosyl-lysyl-chloromethylketose (TLCK), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), pepstatin A , dithiothreitol (DTT) , ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปีของจีนไม่ถูกยับยั้งด้วย PMSF , TLCK และ Pepstatin A ซึ่งชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินดัง กล่าวไม่ใช่ serine protease หรือ aspartic protease และไม่จัดอยู่ในกลุ่ม cystein protease เนื่องจาก E64 และ DNP ไม่มีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ ในทำนองเดียวกันเอนไซม์ที่แยกได้นี้ก็ไม่จัดอยู่ในประเภท metalloprotease เพราะแอคติวิตีของเอนไซม์ไม่ถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้ง metalloprotease เช่น 1,10-phenanthroline และตัวยับยั้ง collagenase อย่างไรก็ตามแอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งเล็กน้อยด้วย EDTA และ DTT ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปีของจีนนี้เป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิดใหม่

2.3.2 ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศเกาหลี (Jeot-Gal)

จากรายงานของ Kim และคณะ (1997) ที่ทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Jeot-Gal พบเชื้อ *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิดใหม่ได้ โดยเอนไซม์ที่แยกได้จะทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 41 กิโลดาลตัน และมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน คือ Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบริน โดยศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรมากสุดในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ ซึ่งศึกษาในช่วงพีเอช 4-10 โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ หลังจากบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4-10 โดยที่พีเอช 7 เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกจาก Jeot-Gal ด้วยไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ทดลองโดยใช้ $ZnCl_2$, NaCl , KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$ และ $FeCl_3$ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน จะถูกกระตุ้นด้วย Zn^{2+} แต่ถูกยับยั้งด้วย Ca^{2+} และ Cu^{2+} สำหรับ Co^{2+} และ Fe^{3+} นั้นสามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้เพียงบางส่วน ในขณะที่ Na^{+} กับ K^{+} นั้นมีผลต่อแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยมาก

ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Jeot-Gal ทดลองโดยใช้ diisopropyl fluorophosphates (DFP) , soybean trypsin inhibitor (SBTI), tosyl-phenylalanyl-chloromethylketose (TPCK), tosyl-lysyl-chloromethylketose (TLCK) , phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) , ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) , 2,2'-bipyridine และ o-phenanthroline พบว่าผลของสารยับยั้งที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม serine protease (DFP , TLCK , TPCK และ PMSF) และสารยับยั้ง trypsin (SBTI และ aprotinin) มีผลเล็กน้อยต่อการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน แต่ EDTA และ สารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม metalloprotease (2,2'-bipyridine , o-phenanthroline) มีผลต่อการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน โดยเฉพาะ o-phenanthroline ที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ นั้น แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์

ผลของ EDTA ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินซึ่งทดลองโดยการแปรค่าความเข้มข้นของ Zn^{2+} ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (0, 1 และ 2 มิลลิโมลาร์) พบว่าการพิ่มค่าความเข้มข้นของ EDTA สูงขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นของ Zn^{2+} เป็นศูนย์ จะพบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์มีค่าลดลง หากเพิ่มระดับความเข้มข้น Zn^{2+} เป็น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ จะช่วยลดการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์โดย EDTA ลงได้ แต่ทั้งนี้แม้ว่าจะเพิ่ม Zn^{2+} เป็น 1 หรือ 2 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าความเข้มข้นของ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ ก็ไม่ช่วยให้แอคติวิตีของเอนไซม์ดำเนินต่อไปได้ แสดงว่าความเข้มข้นของ EDTA 10 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้อย่างสมบูรณ์

2.3.3 เห็ดที่บริโภคได้ (edible mushroom)

จากการทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้โดย Lee และคณะ (2005) วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) ตามด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) เอนไซม์ที่ได้มีชื่อว่า Armillaria mellea metalloprotease (AMMP) พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 21 กิโลดาลตัน และมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโน 24 ตัวแรก คือ MFSLSSRFFLYTLCLSAVAVSAAP เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ AMMP ในช่วงพีเอช 2-8 จะพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5-8 แต่ถ้าพีเอชสูงเกิน 8 ความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงทันที และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ AMMP ในช่วงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะพบว่าที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 55 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้ด้วยการเติมไอออนโลหะต่าง ๆ คือ Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+}และ Co^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อเติม Ca^{2+} และ Mg^{2+} แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} และ Zn^{2+} และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 5 ชนิด คือ APMSF , TLCK , PMSF , TPCK และ EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่า APMSF , TLCK , PMSF และ TPCK มีผลการยับยั้งแอคติวิตีของ AMMP ได้เล็กน้อยเท่านั้น แต่ EDTA มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแอคติวิตีของ AMMP โดย EDTA นั้นเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่ม metalloprotease ดังนั้นเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้นี้จัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease

2.3.4 ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักพื้นบ้านของจีน (Douchi)

มีรายงานการทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Douchi โดย Peng และคณะ (2002) ทดลองแยกเชื้อจาก Douchi พบเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens DC-4* ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้ เอนไซม์ที่แยกได้มีชื่อว่า Subtilisin DFE มีมวลโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน ลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนคือ AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGS ซึ่งจากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ Subtilisin DFE บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 28-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด และเมื่อศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ผลการทดสอบพบว่าแอคติวิตีของ Subtilisin DFE มีความเสถียรที่พีเอช 6-11 แต่ที่พีเอช 9 เอนไซม์มีความเสถียรสูงสุด และจากการศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Douchi สามารถถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย phenylmethylsulfony fluoride (PMSF) ซึ่ง PMSF นี้เป็นตัวยับยั้ง serine protease และแอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย benzamidine hydrochloride , leupeptin และ pepstatin A แต่ EDTA , EGTA และ Apoptin ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า Subtilisin DFE เป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิด serine protease

2.3.5 ถั่วเน่า ถั่วหมักพื้นบ้านของประเทศไทย

ศศิอาภา และ คณะ (2548) ทดลองแยกเอนไซม์จากถั่วเน่าโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) นำเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ไปศึกษาด้วยวิธี continuous elution native polyacrylamide gel electrophoresis (CAN-PAGE) เมื่อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าให้แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.2 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ใช้วิธีเฉพาะในการตรวจสอบเอนไซม์ย่อยไฟบริน เรียกว่า ไฟบรินไซโมกราฟี (fibrin zymography) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากการแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ 14.2 กิโลดาลตันและมีเอนไซม์ย่อยไฟบรินอย่างน้อย 4 ชนิด คือ มวลโมเลกุล 14.2, 20, 24 และ 45 กิโลดาลตัน การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินใน crude extract พบว่ามีความเสถียรที่พีเอช 5-10 และเอนไซม์ย่อยไฟบรินดังกล่าวความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โดยจะเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ด้วยไอออนโลหะ ชนิดของไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ $MgCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$ และ $CuCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่าไม่ถูกยับยั้งด้วยไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ทำให้บ่งชี้ได้ว่าไม่ใช่เอนไซม์ย่อยไฟบรินในกลุ่ม metalloprotease และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ด้วยสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอส 8 ชนิด คือ *trans*-epoxysuccinyl-L-leucyamin (guanidine)-butane (E64), 2,4-dinitrophenol (DNP), pepstatin A , DL-dithiothreitol (DTT) , ethylnediaminetetraacetic acid (EDTA) , 1,10-phenanthroline , phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และ N^{12}-ρ-tosyl-L-lysein chloromethyl ketone (TLCK) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พบว่า crude extract ที่สกัดได้จัดอยู่ในกลุ่มของ serine protease เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยสาร PMSF และ TLCK

2.3.6 ปลาหมักของประเทศญี่ปุ่น (Shiokara)

เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Shiokara มีชื่อว่า Katsuwokinase ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 35 กิโลดาลตัน มีลำดับของกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal 21 ตัว คือ IVGGYEQZAHSQPHQSLNSG เอนไซม์ Katsuwokinase จะไม่มีประสิทธิภาพถ้าอยู่ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10% แต่จะมีความเสถียรในช่วงพีเอช 1-10 แอคติวิตีของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งได้โดย diisopropyl fluorophosphate (DFP) , beef pancreas trypsin inhibitor (BPTI) , soybean trypsin inhibitor (SBTI) , และ aprotinin แต่ Ε-amino-n-caproic acid และ t-4-amino-methylcyclohexane carboxylic acid ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (Sumi *et al.*, 1995)

2.3.7 สาหร่ายทะเลสีเขียว (Marine green algae)

สาหร่ายทะเลมีสมบัติเป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียและเนื้องอก โพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายบางชนิดเป็นสารยับยั้งการจับตัวกันเป็นก้อนของเลือดและกระบวนการสลายลิ่มเลือด สารหลายชนิดในสาหร่ายทะเล เช่น เลคตินและฟิวโคสเตอรอลในสาหร่ายสีน้ำตาล มีผลต่อการเกิดลิ่มเลือดและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสลายลิ่มเลือด อีกทั้งมีสมบัติในการเหนี่ยวนำการผลิตตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนในเซลล์เยื่อบุผิว อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำเอนไซม์ย่อยไฟบรินในสาหร่ายทะเล โดยพบเอนไซม์ในสาหร่ายทะเลสีเขียวจากหลาย ๆ สปีชี่ส์ ของจีนัส Codium และพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในการสกัดจากสาหร่ายนั้น

Matsubara *et al.*, 1999 ได้ทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *(Codium latum)* เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้เรียกว่า Codium latum protease (CLP) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน เอนไซม์ดังกล่าวแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 10 และเมื่อทดสอบของสารยับยั้งโปรติเอส ที่มีต่อแอคติวิตีของ CLP พบว่า แอคติวิตี CLP จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย diisopropyl fluorophosphates (DFP) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง serine protease และแอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งเกือบสมบูรณ์ด้วย TLCK ส่วน SBTI และ aprotinin มีความสามารถในการยับยั้งแอคติวิตีของ CLP บ้าง แต่ EDTA และ PCMB ไม่มีผลในการยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ ซึ่งผลของสารยับยั้งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า CLP นี้จัดอยู่ในกลุ่ม serine protease

2.4 แนวทางการใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในอาหาร

ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า เอนไซม์ย่อยไฟบรินมีสมบัติในการย่อยสลายลิ่มเลือด ซึ่งเป็นสาเหตุของการอุดตันของหลอดเลือดและนำไปสู่ปัญหาของโรคหัวใจ ในทางการแพทย์สามารถใช้เอนไซม์ย่อยไฟบรินบริสุทธิ์ฉีดเข้าไปในตำแหน่งที่มีลิ่มเลือดเกิดขึ้นโดยตรง เพื่อละลายลิ่มเลือดดังกล่าว แต่การใช้ประโยชน์จากเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบอยู่ในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ในเชิงป้องกันโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและโรคหัวใจ โดยการบริโภคอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินในปริมาณสูงเป็นประจำยังไม่มีข้อมูลยืนยันแน่ชัด อย่างไรก็ตามได้มีรายงานวิจัยกล่าวไว้ว่า การให้เอนไซม์ยูโรไคเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิดหนึ่งกับสุนัขหรือคนทางปาก พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินอยู่ในกระแสเลือดนานกว่า 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบผลการทดลองที่คล้ายคลึงกันกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากไส้เดือน (Kim *et al.*, 1997) Suzuki และคณะ (2003) พบว่าการใช้สารสกัดจากนัตโตซึ่งมีเอนไซม์ย่อยไฟบรินในปริมาณสูงในรูปของการเสริมอาหาร (dietary supplememtation) เพื่อการรักษาหนูที่ได้รับบาดเจ็บที่หลอดเลือดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีผลทำให้ผนังด้านในของหลอดเลือดมีลักษณะบางลง ซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

จากรายงานดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การบริโภคอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินเป็นองค์ประกอบเป็นประจำน่าจะมีแนวโน้มในการป้องกันโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดและโรคหัวใจได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการทดลองซื้อจากตลาดสด เขตลาดกระบัง เขตพระโขนง กรุงเทพมหานคร และเขตบางพลี จังหวัดสมุทรปราการ และจากซูเปอร์มาร์เก็ต มีทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ดังนี้

- กะปี ตลาดหัวตะเข้
- กะปี ตลาดอุดมสุข
- กะปีตรากุ้งไทย (เคย 94 %) ผลิตโดยบริษัท พี . เพาเวอร์ โพรดักส์ จำกัด
- กะปี ตลาดบางพลี
- กะปีใต้ ตลาดบางพลี
- กะปีเกาะช้าง ตลาดบางพลี
- กะปีสมุทรสงคราม (เคย 100 %) ผู้แทนจำหน่าย 151 บางนางเกรง สมุทรปราการ
- ปูดองเกลือ ตลาดบางพลี
- ปูดองเกลือ ตลาดหัวตะเข้
- ปูจืด ตลาดหัวตะเข้
- ปูดองน้ำปลา ตลาดหัวตะเข้
- ปูนาดองเกลือ ตลาดบางพลี
- ปูจืดดองน้ำปลา ตลาดหัวตะเข้
- ปลาร้า ตลาดอุดมสุข
- ปลาร้า ตลาดหัวตะเข้
- แหนมหมูตราห้วยแก้ว ผลิตโดย บริษัท อุตสาหกรรมอาหาร ส. ขอนแก่น จำกัด
- แหนมหมูห่อใบตองตลาดหัวตะเข้
- แหนมหมูตรา นิตยา
- แหนมปลา ตลาดบางพลี
- แหนมปลากรายห่อใบตองตราช้อนทอง ผลิตโดย บริษัท ส . กิจวัฒนาฟู้ดส์ จำกัด
- เต้าเจี้ยวขาว ตลาดหัวตะเข้
- เต้าเจี้ยวขาว ตลาดอุดมสุข
- ข้าวหมาก ตรารสสุคนธ์ ผลิตที่ 22 ถ. ลาดพร้าว คลองจั่น บางกะปี กทม . 10240
- ข้าวหมาก ตราเพชรบุรี ผลิตโดย บริษัท เพชรบุรีอินเตอร์ฟู้ดส์ จำกัด
- หอยดอง ตลาดบางพลี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- หน่อไม้ดอง ตลาดหัวตะเข้
- หน่อไม้ดอง ตลาดอุดมสุข
- ผักกาดดอง ตลาดบางพลี
- ผักกาดดอง ตลาดหัวตะเข้
- เต้าหู้ยี้ห่อใบไผ่
- โยเกิร์ตรสธรรมชาติ ตราโฟร์โมสต์ ผลิตโดย บริษัท โฟร์โมสต์ อาหารนม (กรุงเทพ ฯ) จำกัด
- โยเกิร์ตรสธรรมชาติ ตราดัชชี่ ผลิตโดย บริษัท ดัชมิลล์ จำกัด
- กระเทียมดอง ตลาดบางพลี
- กระเทียมดอง ตลาดหัวตะเข้
- ผักเสี้ยนดอง ตลาดหัวตะเข้
- ปลาส้ม ตลาดหัวตะเข้
- ปลาส้ม ตลาดบางพลี
- ขิงดองในเต้าเจี้ยว จากห้างโลตัส
- ขิงดอง ตลาดบางพลี
- ไส้กรอกอีสาน ตลาดบางพลี

3.2 สารเคมี

- ไฟบริโนเจน (fibrinogen) (Sigma , รหัส F – 8630)
- อะกาโรส (agarose) (BDH)
- ทรอมบินความเข้มข้น 1 ยูนิตต่อไมโครลิตร (thrombin) (Sigma , รหัส T – 9000)
- พลาสมิน (plasmin from Human plasma) (Sigma , รหัส P – 1867)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 . H_2O$)
- โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 . 7\ H_2O$)
- ไดโซเดียมบอเรต ($Na_2B_4O_7 . 10\ H_2O$)
- ทริสไฮดรอกซีเมธิลอะมิโนมีเทน (Tris (hydroxy methyl) aminomethane)

3.3 อุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องหมุนเหวี่ยง
- Hot plate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- เครื่องบดผสมอาหาร
- เครื่องชั่ง
- พีเอชมิเตอร์
- เทอร์โมมิเตอร์
- ไมโครปิเปต
- เวอร์เนียคาลิปเปอร์
- เครื่องแก้ว

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การสกัดเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก

ชั่งตัวอย่างอาหาร 10.00 กรัม เติมทริสบัฟเฟอร์ (พีเอช 8) 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องบดผสมอาหารที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 3-5 นาที ขึ้นกับชนิดตัวอย่าง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที รินส่วนใสของสารละลายตัวอย่างที่ได้ นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จะได้สารละลายเอนไซม์ที่ใส วัดปริมาตรที่เหลือสุทธิโดยใช้กระบอกตวง เก็บใส่ขวดสีชาแช่ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.4.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะใช้วิธีไฟบรินเพลท (fibrin plate method) ตามวิธีที่รายงานโดย Wong และ Mine (2004) ซึ่งมีหลักการคือ คลอตไฟบริน (clot fibrin) ซึ่งมีลักษณะขาวขุ่นเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะทำให้เกิดลักษณะของวงใส (clear zone) ขึ้น โดยสามารถวัดขนาดของวงใสและรายงานค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เทียบกับพลาสมินโดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้

3.4.2.1 การเตรียมไฟบรินเพลท

เตรียมละลายไฟบริโนเจน 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7.8) พักไว้ จากนั้นเตรียมสารละลายอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7.8) นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ใช้แท่งแก้วคนให้อะกาโรสละลาย จากนั้นลดอุณหภูมิของสารละลายลงจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงเทสารละลายไฟบริโนเจนที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไปผสม คนให้เข้ากัน เมื่ออุณหภูมิลดถึง 37 องศาเซลเซียส ให้เติมสารละลายทรอมบิน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วคนให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว จนสังเกตเห็นสารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นให้เท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงเพลททันที ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เจาะรูบนแผ่นวุ้น จำนวน 8-10 รู โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร จะได้ไฟบรินเพลทไว้ใช้ในการทดลองต่อไป โดยสามารถเก็บไฟบรินเพลทไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

3.4.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน

พลาสมินเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายไฟบรินได้ และนิยมใช้เป็นเอนไซม์มาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างต่าง ๆ ที่นำมาศึกษา สำหรับกราฟมาตรฐานของพลาสมินเตรียมได้โดยหยดสารละลายพลาสมินในบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0 , 0.1 , 0.25 , 0.50 , 1.0 , 2.0 , 3.0 , 4.0 และ 5.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในรูของไฟบรินเพลทที่เตรียมไว้ นำเพลทไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของพลาสมิน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) กับขนาดวงใส (มิลลิเมตร)

3.4.2.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมัก

เจือจางสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากข้อ 3.4.1 ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้ทริสบัฟเฟอร์ (พีเอช 8) 0.1 โมลาร์ จากนั้นหยดสารละลายเอนไซม์จากตัวอย่างอาหารหมักลงในรูบนไฟบรินเพลท ตัวอย่างละ 2 รู นำเพลทไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 17 ชั่วโมง วัดขนาดของวงใส นำค่าขนาดวงใสที่วัดได้ไปคำนวณหาแอคติวิตีในหน่วยของยูนิตพลาสมินโดยใช้กราฟมาตรฐาน และคำนวณให้อยู่ในหน่วยยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

3.4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

ทดสอบผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างกะปิสมุทรสงครามและปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์จากกะปิหรือปูดองเกลือ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองจำนวน 8 หลอด เติมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 8) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30, 40, 50, 60, 65, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำเย็นทันที จากนั้นนำไปตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลือโดยวิธีไฟบรินเพลท นำค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างอุณหภูมิกับเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

ทดสอบผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากกะปิสมุทรสงคราม และปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ โดยสกัดเอนไซม์จากกะปิและปูดองด้วยน้ำกลั่นแทนทริสบัฟเฟอร์ จากนั้นปิเปตสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ ใส่ในหลอดทดลอง 8 หลอด หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ 1 มิลลิลิตร ดังนี้คือ ที่พีเอช 3-7 ใช้สารละลายซิตริกฟอสเฟสบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ และที่พีเอช 8-10 ใช้สารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วแช่น้ำเย็นทันที จากนั้นนำไปตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินโดยวิธีไฟบรินเพลท นำค่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่วัดได้ไปเขียนกราฟระหว่างพีเอชกับเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์

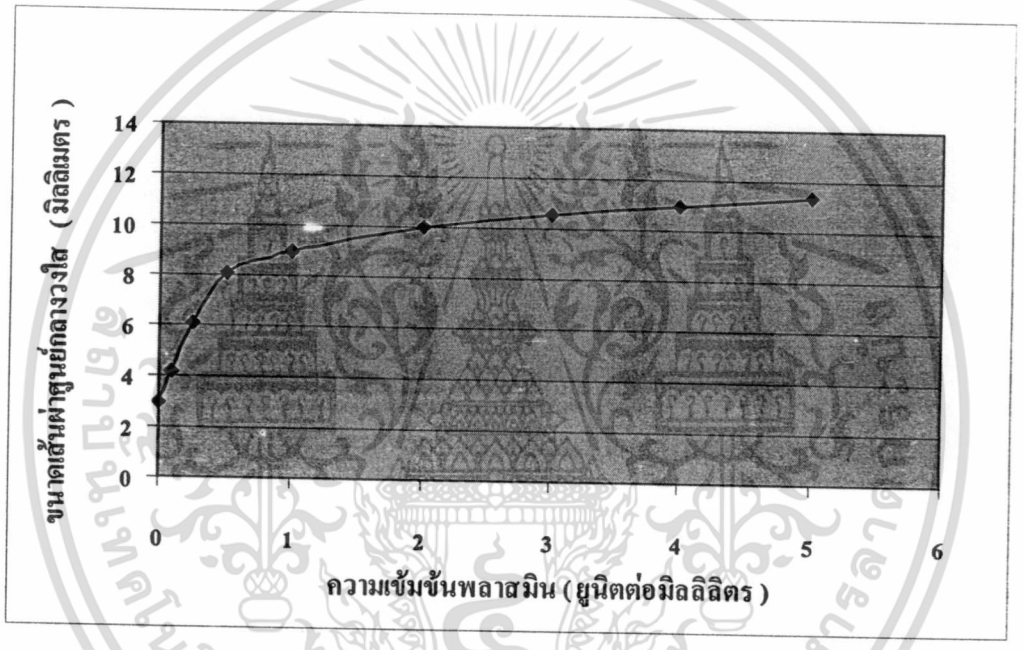
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน

ในการรายงานแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมักจะรายงานในหน่วยของยูนิตพลาสมิน ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีไฟบรินเพลท (fibrin plate method) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมินโดยแปรความเข้มข้นของสารละลายพลาสมินในช่วง 0.1-5.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นบนไฟบรินเพลท ผลการทดลองแสดงดังกราฟรูปที่ 4.1

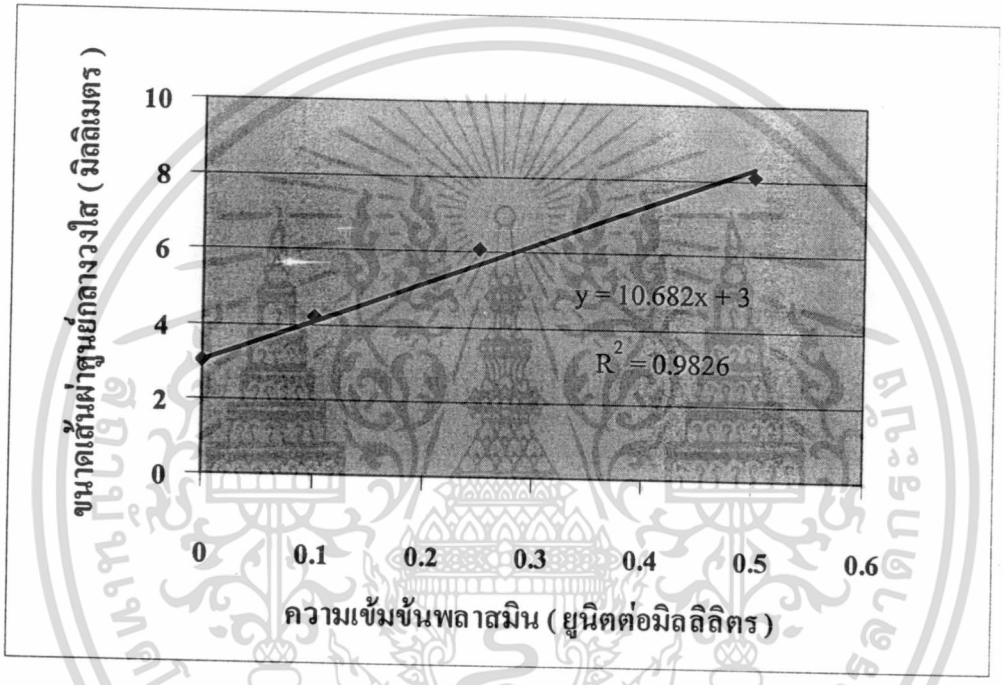


รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับต่าง ๆ กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.1 จะเห็นได้ว่ากราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของพลาสมิน และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นมีลักษณะเหมือนกับกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของเอนไซม์กับอัตราเร็วของปฏิกิริยาโดยทั่วไปที่มีเอนไซม์เป็นตัวเร่ง กล่าวคือ ในช่วงแรกของกราฟที่ความเข้มข้นของพลาสมินน้อย ๆ (0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่เร็ว ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของพลาสมินเพิ่มสูงขึ้น (มากกว่า 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นจะเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่ช้าลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้เนื่องจากสับสเตรท (ไฟบริน) ในระบบมีปริมาณไม่เพียงพอกับความเข้มข้นของพลาสมินที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง ดังนั้นช่วงความเข้มข้นของพลาสมินที่เหมาะสมสำหรับเตรียมกราฟมาตรฐาน เพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมัก สำหรับการทดลองนี้จึงควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่ให้อัตราเร็วที่แท้จริงของปฏิกิริยา (0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งให้ขนาดวงใสที่เกิดขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 8.65 มิลลิเมตร โดยกราฟมาตรฐานที่ได้แสดงดังรูปที่ 4.2 ซึ่งมีสมการเส้นตรงคือ $y = 10.682x + 3$ ตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมักจะต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยให้วงใสที่เกิดขึ้นมีขนาดไม่เกิน 8.65 มิลลิเมตร



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

4.2 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

จากการตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมักต่าง ๆ 40 ตัวอย่าง โดยวิธีไฟบรินเพลทและใช้กราฟมาตรฐานของพลาสมิน (ผลการทดลองข้อ 4.1) ในการคำนวณหาค่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในหน่วยยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง ผลการตรวจวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสและแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมัก 40 ชนิด

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(มิลลิลิตร)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง)
กะปี (หัวตะเข้)	43	7.35	1.75
กะปี(อุดมสุข)	40	6.30	1.24
กะปี ตรากุ้งไทย	42	5.30	0.92
กะปีทั่วไป (บางพลี)	42	ไม่เกิดวงใส	-
กะปีใต้ (บางพลี)	43	4.45	0.60
กะปีเกาะช้าง(บางพลี)	41	7.10 (เจือจาง 5 เท่า)	7.79
กะปีสมุทรสงคราม (เคย 100%)	42	7.50 (เจือจาง 5 เท่า)	8.40
ปูดองเกลือ (บางพลี)	41	5.85	1.11
ปูดองเกลือ (หัวตะเข้)	43	5.10 (เจือจาง 5 เท่า)	4.80
ปูจืด (หัวตะเข้)	43	6.65 (เจือจาง 5 เท่า)	7.31
ปูดองน้ำปลา (หัวตะเข้)	41	ไม่เกิดวงใส	-
ปูนาดองเกลือ (บางพลี)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ปูนาดองน้ำปลา (หัวตะเข้)	42	6.35	1.30
ปลาร้า (อุดมสุข)	42	ไม่เกิดวงใส	-
ปลาร้า (หัวตะเข้)	43	ไม่เกิดวงใส	-
แหนมหมู (ตราห้วยแก้ว)	42	4.60	0.63
แหนมหมูห่อใบตอง	43	5.10	0.82
แหนมหมู (ตรานิตยา)	42	5.10	0.82
แหนมปลา (บางพลี)	40	ไม่เกิดวงใส	-
แหนมปลากราย	41	ไม่เกิดวงใส	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

73022

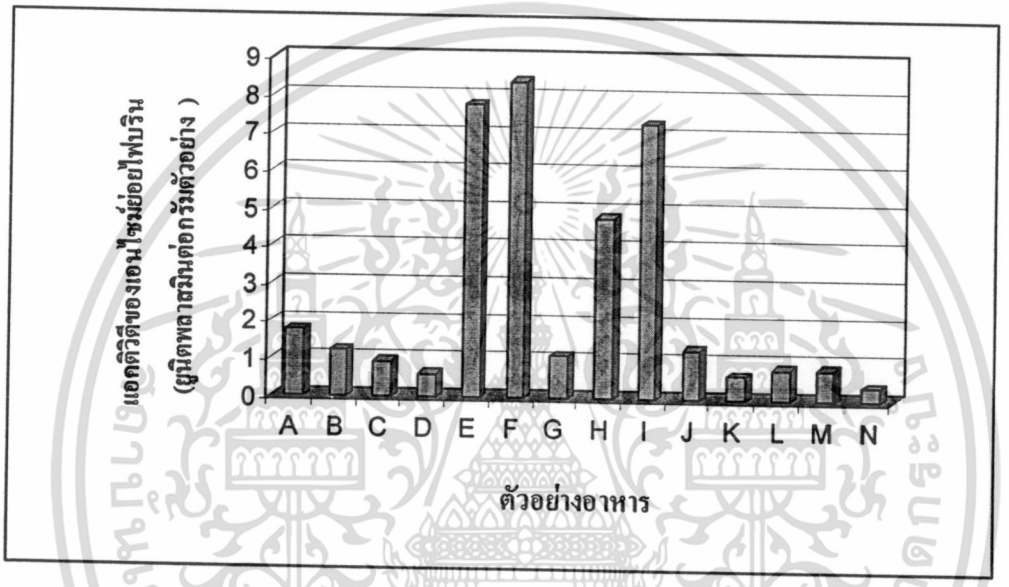
ชนิดตัวอย่าง	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้(มิลลิลิตร)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง)
เต้าเจี้ยวขาว (หัวตะเข้)	40	ไม่เกิดวงใส	-
เต้าเจี้ยวขาว (อุดมสุข)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ข้าวหมาก (ตรารสสุคนธ์)	42	ไม่เกิดวงใส	-
ข้าวหมาก (เพชรบุรี)	44	ไม่เกิดวงใส	-
หอยดอง (บางพลี)	40	ไม่เกิดวงใส	-
หน่อไม้ดอง (อุดมสุข)	42	ไม่เกิดวงใส	-
หน่อไม้ดอง (หัวตะเข้)	42	ไม่เกิดวงใส	-
ผักกาดดอง (บางพลี)	40	ไม่เกิดวงใส	-
ผักกาดดอง (หัวตะเข้)	41	ไม่เกิดวงใส	-
เต้าหู้ยี้ห่อใบไผ่	43	ไม่เกิดวงใส	-
โยเกิร์ต (ตราโฟโมสต์)	40	ไม่เกิดวงใส	-
โยเกิร์ต (ตราดัชมิลล์)	42	ไม่เกิดวงใส	-
กระเทียมดอง (บางพลี)	42	ไม่เกิดวงใส	-
กระเทียมดอง (หัวตะเข้)	44	ไม่เกิดวงใส	-
ผักเสี้ยนดอง (บางพลี)	40	ไม่เกิดวงใส	-
ปลาส้ม (หัวตะเข้)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ปลาส้ม (บางพลี)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ขิงดองเต้าเจี้ยว	40	ไม่เกิดวงใส	-
ขิงดอง (บางพลี)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ไส้กรอกอีสาน (บางพลี)	43	3.90	0.34

หมายเหตุ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสได้จากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารหมัก 40 ตัวอย่าง ที่นำมาวิเคราะห์ มีเพียง 14 ตัวอย่างเท่านั้น ที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน ได้แก่ กะปิตลาดหัวตะเข้ กะปิตลาดอุดมสุข กะปิตรากุ้งไทย กะปิใต้ตลาดบางพลี กะปิเกาะช้างตลาดบางพลี กะปิสมุทรสงคราม ปูดองเกลือตลาดบางพลี ปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ ปูจืดตลาดหัวตะเข้ ปูดองน้ำปลาตลาดหัวตะเข้ แหนมหมูตราห้วยแก้ว แหนมหมูห่อใบตองตลาดหัวตะเข้ แหนมหมูตรานิตยา และไส้กรอก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีสานตลาดบางพลี โดยตัวอย่างดังกล่าวจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินแตกต่างกันไปดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.3 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในปริมาณค่อนข้างสูง คือมากกว่า 4 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง มีอยู่ 4 ตัวอย่างได้แก่ กะปีสมุทรสงคราม รองลงมาคือกะปีเกาะช้างจากตลาดบางพลี ปูจืดจากตลาดหัวตะเข้ และปูดองเกลือจากตลาดหัว-ตะเข้ ซึ่งมีแอคติวิตีเท่ากับ 8.40, 7.79, 7.31 และ 4.80 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างอื่น ๆ นั้นพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเพียงเล็กน้อย คือต่ำกว่า 2 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่างเท่านั้น



รูปที่ 4.3 แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

A คือ กะปี จากตลาดหัวตะเข้ B คือ กะปี จากตลาดอุดมสุข
C คือ กะปี ตรากุ้งไทย D คือ กะปีใต้ จากตลาดบางพลี
E คือ กะปีเกาะช้าง จากตลาดบางพลี F คือ กะปีสมุทรสงคราม (เคย 100 %)
G คือ ปูดองเกลือ จากตลาดบางพลี H คือ ปูดองเกลือ จากตลาดหัวตะเข้
I คือ ปูจืด จากตลาดหัวตะเข้ J คือ ปูนาดองน้ำปลา จากตลาดหัวตะเข้
K คือ แหนมหมูตรา ห้วยแก้ว L คือ แหนมหมูห่อใบตอง
M คือ แหนมหมู ตรานิตยา N คือ ไส้กรอกอีสาน จากตลาดบางพลี

เป็นที่น่าสังเกตว่าตัวอย่างอาหารหมักดองที่ใช้วัตถุดิบประเภทพืช ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง ขิงดอง กระเทียมดอง เต้าเจี้ยวขาว เต้าหู้ยี้ ข้าวหมาก รวมทั้งผลิตภัณฑ์นมหมักได้แก่ โยเกิร์ต ตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเลย อย่างไรก็ตามได้มีรายงานการตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินปริมาณสูงในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากถั่วเหลืองได้แก่ ถั่วเน่าซึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

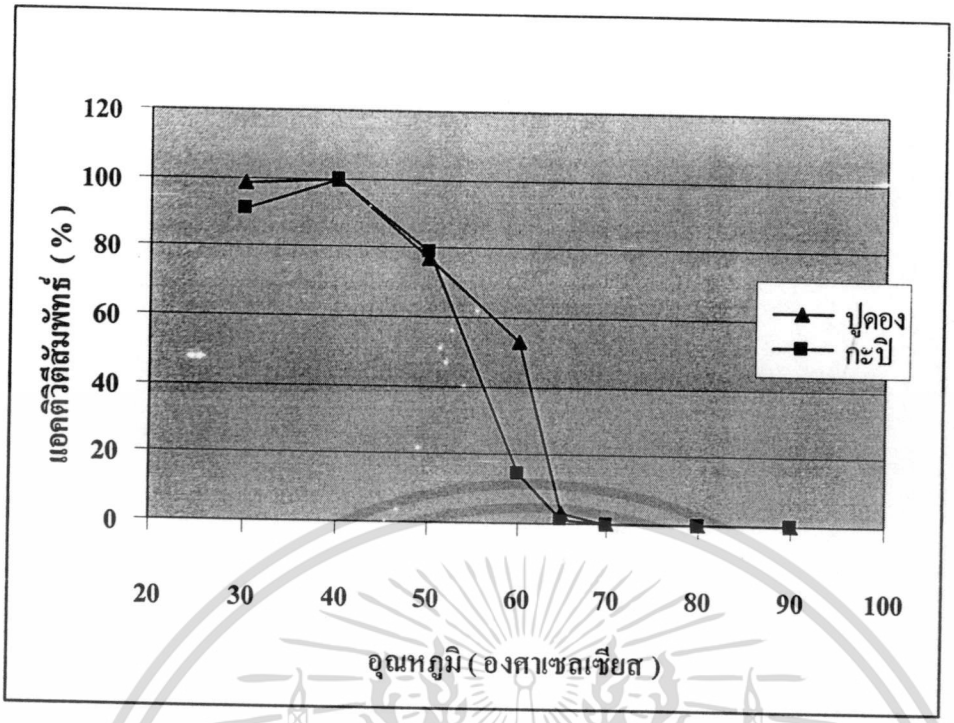
เป็นอาหารหมักพื้นบ้านภาคเหนือของไทย (ศศิอาภา และ คณะ, 2548) และในนัตโตของญี่ปุ่น (Sumi *et al.*, 1987) รวมทั้งกิมจิซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองของเกาหลี (Noh *et al.*, 1999) เป็นต้น ในขณะที่กลุ่มอาหารที่มีแนวโน้มตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในปริมาณสูง จะเป็นกลุ่มของอาหารประเภทกระปิ ซึ่ง Wong และ Mine (2004) ได้รายงานการตรวจพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในกะปิจิงจีนเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามตัวอย่างกะปิทั้งหมด 7 ตัวอย่างซึ่งมาจากแหล่งผลิตต่างกันที่นำมาตรวจวิเคราะห์พบว่ามีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินแตกต่างกัน บางตัวอย่างก็มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูง บางตัวอย่างก็มีแอคติวิตีของเอนไซม์ต่ำ และบางตัวอย่างก็ไม่มีแอคติวิตีของเอนไซม์เลย นอกจากนี้ตัวอย่างปูดองเกลือหรือปูจืดจากบางแหล่งก็มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินสูง ในขณะที่ตัวอย่างจากบางแหล่งตรวจไม่พบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก วัตถุดิบ กระบวนการผลิต รวมทั้งสภาวะและระยะเวลาการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน

สำหรับปูจืด ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมักดอง แต่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินค่อนข้างสูง จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่าตามธรรมชาติจะพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวปูอยู่แล้ว นอกจากนี้แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในตัวอย่างปูดองเกลือ น่าจะเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบเริ่มต้นตามธรรมชาติ ไม่น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก สำหรับตัวอย่างกะปินั้นมีรายงานเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (Wong & Mine, 2004) สำหรับตัวอย่างแหนมหมูและไส้กรอกอีสาน แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบน่าจะมีที่มาจากจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างกระบวนการหมัก

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมัก 2 ชนิด คือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากนั้นตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลือโดยวิธีไฟบรินเพลท ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.4 จากผลการทดลองจะเห็นว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างอาหารหมักทั้ง 2 ชนิดให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันคือ เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-40 องศา-เซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์เริ่มลดลงที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในกะปีของจีน (Wong and Mine, 2004) และเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบใน "Jeot-Gal" ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักของเกาหลี (Kim *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

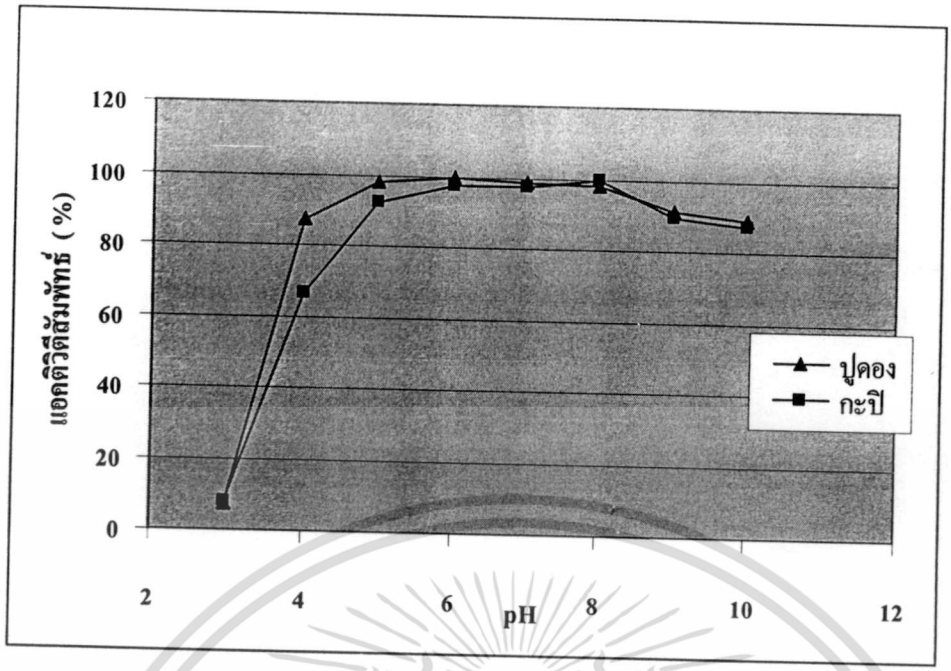


รูปที่ 4.4 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม

4.4 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมัก 2 ชนิด คือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม โดยการบ่มสารละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์พีเอช 3-10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลือ โดยวิธีไฟบรินเพลท ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างอาหารหมักทั้ง 2 ชนิด ให้ผลการทดลองที่ใกล้เคียงกันคือ เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5-8 แต่ที่พีเอชต่ำกว่า 5 เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้มีความเสถียรลดลง ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในกะปีของจีนที่มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3-6 (Wong and Mine, 2004) แต่ให้ผลเหมือนกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบใน "Jeot-Gal"อที่มีความเสถียรในช่วงพีเอช 5-8 (Kim *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กะปี ปลาร้า แหนมหมู แหนมปลา เต้าเจี้ยวขาว ข้าวหมาก หอยดอง หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง เต้าหู้ยี้ ห่อใบไผ่ โยเกิร์ต กระเทียมดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาส้ม ขิงดองและไส้กรอกอีสาน จำนวน 40 ตัวอย่างโดยวิธีไฟบรินเพลท พบว่าอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน คือ กะปี ปูดอง แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน ซึ่งอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือ ซึ่งกะปีสมุทรสงครามมีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ 8.40 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง รองลงมาคือกะปีเกาะช้าง 7.79 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และปูจืดตลาดหัวตะเข้ มีแอคติวิตี 7.31 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยสุดคือ ไส้กรอกอีสานจากตลาดบางพลีมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.34 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างทั้งสองให้ผลเหมือนกันคือ มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และเริ่มลดลงที่อุณหภูมิมากกว่า 40 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม ที่พีเอช 3-10 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์จากตัวอย่างทั้งสองให้ผลเหมือนกันคือ มีความคงตัวในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ ช่วงพีเอช ระหว่าง 5-8 แต่มีความเสถียรลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การเตรียมไฟบรินเพลท สิ่งที่ต้องระวังคือ การควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม เพราะสารที่ใช้ในการเตรียมเพลทเป็นโปรตีน หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ และในช่วงของการเทเพลท ควรเทสารละลายให้เต็ม โดยที่ไม่ต้องหมุนเพลทเพื่อให้สารละลายกระจายทั่วเพลท เนื่องจากจะทำให้คลอตไฟบริน (clot fibrin) ที่เกิดขึ้นมีความไม่สม่ำเสมอ

5.2.2 จากผลการทดลองที่ได้พบว่า กะปีและปูดองบางตัวอย่างมีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินสูง จึงน่ามีการศึกษาต่อไปโดยการทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ที่สกัดได้ นอกจากนี้ยังน่าสนใจที่จะคัดแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ศศิอาภา บุญคง, อุมาภรณ์ ศิลปผดุง, วิจิตรา แดงปรก และ Yoshinori Mine. (2548). การแยกเอนไซม์ให้บริสุทธิ์และการศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า. เอกสารการประชุมสัมมนาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร ครั้งที่ 7, วันที่ 22-24 มิถุนายน 2548 ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติไบเทค บางนา กรุงเทพฯ.

Dobrovolsky, A. B., Titaeva, E.V. 2002. The fibrinolysis system: regulation of activity and physiologic functions of its main components. Biochemtry (Moscow). 67 : 99-108.

Kim, J-H., & Kim, Y-S. (1999). A fibrinolytic metalloprotease from the fruiting bodies of an edible mushroom, *Armillariella mellea*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 63 : 2130-2136.

Kim, H-K., Kim, G-T., Kim, D-K., Choi, W-A., Park, S-H., Jeong, Y-K., & Kong, I-S. (1997). Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. Journal of Fermentation and Bioengineering. 84 : 307-312.

Lee, S-Y., Kim, J-S., Kim, J-E., Sapkota, K., Shen, M-H., Kim, S., Chun, H-S., Yoo, J-C., Choi, H-S., Kim, M-K., & Kim, S-J. (2005). Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. Protein Expression and Purification. (Article in press).

Matsubara, K., Hori, K., Matsuura, Y., Miyazawa, K. (1999). A fibrinolytic enzyme from a marine green alga, *Codium latum*. Phytochemistry. 52 : 993-999.

Mine, Y., Wong, A. H. K., Jiang, Bo. (2004). Fibrinolytic enzymes in Asian traditional fermented foods. Food research International. 38 : 243-250.

Noh, K.A., Kim, D. H., Choi, N.S., Kim, S.H. 1999. Isolation of fibrinolytic enzyme producing strains from kimchi. Korean Journal of Food Science and Technology. 31: 219-223.

Peng, Y., Huang, Q., Zhang, R-H., & Zhang, Y-Z. (2002). Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens DC-4* screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. Comparative Biochemistry and Physiology (B). 134: 45-52.

Wong, A. H. K., Mine, Y. (2004). Novel fibrinolytic enzyme in femented shrimp paste, a traditional asian fermented seasoning. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52 : 980-986.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sumi, H., Hamada, H., Tsushima, H., Mihara, H., Muraki, H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. Experientia. 43: 1110-1111.

Sumi, H., Nakajima, N., Yatagai, C. (1995). A unique strong fibrinolytic enzyme (katsuwokinase) in skipjack "Shiokara", a Japanese traditional fermented food. Comparative Biochemistry and Physiology. 112(B) : 543-547.

Suzuki , Y ., Kondo , K ., Ichise , H ., Tsukamoyo , Y ., Urano , T ., Umemura , K . 2003. Dietary supplementation with fermented soybeans suppress intimal thickening . Nutrition . 19 : 261-264 .

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมีต่าง ๆ ที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลายทริสบัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) 0.1 โมลาร์ (พีเอช 8)

ชั่ง Tris (hydroxy methyl) aminomethane (THAM) 12.12 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นประมาณ 800 มิลลิลิตร นำไปปรับพีเอชให้เป็น 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1 นอร์มอล แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชาแล้วแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส

2. สารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ (Sodium borate buffer) 0.05 โมลาร์

ชั่ง $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 9.5342 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร ได้สารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ นำไปปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอลให้ได้พีเอชที่ต้องการ โดยเทสารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ประมาณ 30 มิลลิลิตร ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้พีเอช 8-10 แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน

3. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citric phosphate buffer) 0.05 โมลาร์

สาร A : ละลาย กรดซิตริก ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 5.25 กรัม ในน้ำกลั่นปรับเป็น 500 มิลลิลิตร ได้สาร A ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

สาร B : ละลาย $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 6.7017 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับเป็น 500 มิลลิลิตร ได้สาร B ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

เตรียมสารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอช 3-4 เตรียมโดยเทสาร A ประมาณ 35 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชด้วยสาร B ให้ได้พีเอช 3 และ 4 จากนั้นเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน

เตรียมสารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ที่มีพีเอช 5-7 เตรียมโดยเทสาร B ประมาณ 35 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ 100 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชด้วยสาร A ให้ได้พีเอช 5 , 6 และ 7 จากนั้นเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดแช่ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สารละลายพลาสมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

เตรียมสารละลายพลาสมินจากพลาสมินที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 0.45 ยูนิตต่อ 150 ไมโครลิตร นำมาละลายด้วยน้ำกลั่น 90 ไมโครลิตร ได้ stock พลาสมินที่มีความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แล้วจึงนำมาเตรียมพลาสมินที่มีความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 0.1, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยปิเปต stock พลาสมินผสมกับสารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช 8) ลงในหลอดแอพเพนดอป ตามตารางที่ 1

ตารางที่ ก1 การเตรียมพลาสมินที่มีความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของพลาสมิน (ยูนิต/มิลลิลิตร)	ปริมาตร stock พลาสมิน 5 ยูนิต/มิลลิลิตร(ไมโครลิตร)	สารละลายโซเดียมบอเรท บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (ไมโครลิตร)
0	0	10
0.1	2	98
0.25	2	38
0.50	2	18
1.0	2	8
2.0	4	6
3.0	6	4
4.0	8	2
5.0	10	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

กราฟมาตรฐานของเอนไซม์ย่อยไฟบริน ซึ่งใช้พลาสมินเป็นสารมาตรฐาน

ตารางที่ ข1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น เมื่อใช้พลาสมินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นพลาสมิน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใส (มิลลิเมตร)		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย
0.10	4.2	4.2	4.2
0.25	6.0	6.2	6.1
0.50	8.2	8.0	8.1
1.0	9.0	8.9	8.95
2.0	9.9	10.1	10.0
3.0	10.5	10.7	10.6
4.0	11.0	11.0	11.0
5.0	11.25	11.40	11.32

จากตารางนำค่าความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับต่าง ๆ กับค่าเฉลี่ยของขนาดวงใสที่เกิดขึ้นมาเขียนกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

การคำนวณแอคติวิตีคำนวณโดยใช้สมการของกราฟมาตรฐาน $y = 10.682x + 3$

โดยที่ y เป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส

x เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างที่ 1 หาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในกะปี (จากหัวตะเข้)

ขนาดวงใส เท่ากับ 7.35 มิลลิเมตร แทนค่าในสมการ $y = 10.682x + 3$ จะได้

$7.35 = 10.682x + 3$

$x = 0.41$ ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร

ในสารสกัดเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีตลาดหัวตะเข้ 1 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ 0.41 ยูนิตพลาสมิน

ดังนั้นสารสกัดของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีตลาดหัวตะเข้ 43 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ $0.4072 \times 43 = 17.51$ ยูนิตพลาสมิน

แสดงว่าในตัวอย่าง 10 กรัม มีเอนไซม์ย่อยไฟบริน เท่ากับ 17.51 ยูนิตพลาสมิน

ถ้าตัวอย่าง 1 กรัม มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ $\frac{17.51}{10} = 1.75$ ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ ง1 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ เมื่อทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)			แอคติวิตีของเอนไซม์ที่สกัดได้ (ยูนิตพลามิน/มิลลิลิตร)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
30	12.20	12.35	12.28	6.31	98.13
40	12.40	12.30	12.35	6.43	100
50	11.80	11.20	11.50	4.96	77.14
60	10.85	10.40	10.62	3.43	53.34
65	5.40	5.10	5.25	0.21	3.26
70	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-

ตารางที่ ง2 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปิสมุทรสงคราม เมื่อทดสอบความเสถียรของอุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (°C)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)			แอคติวิตีของเอนไซม์ที่สกัดได้ (ยูนิตพลามิน/มิลลิลิตร)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
30	10.10	10.65	10.38	3.00	91.21
40	10.30	10.80	11.55	3.30	100
50	10.05	10.25	10.15	2.61	79.09
60	9.10	8.75	8.92	0.47	14.24
65	3.50	3.30	3.40	0.04	1.21
70	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณแอคติวิตีสัมพัทธ์

กำหนดให้อุณหภูมิที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินมากที่สุดมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เช่น จากตัวอย่างปูดองเกลือ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีเท่ากับ 6.43 ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร กำหนดให้มีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % ดังนั้น ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีแอคติวิตีเท่ากับ 6.31 ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร มีแอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ (6.31 ÷ 6.43) × 100 = 98.13 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ.
การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พีเอชต่าง ๆ

ตารางที่ จ1 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองเกลือ เมื่อทดสอบความเสถียรที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)			แอคติวิตีของเอนไซม์ที่สกัดได้ (ยูนิตพลามิน/มิลลิลิตร)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
3	7.25	8.95	8.10	0.48	7.32
4	11.8	12.10	11.95	5.74	87.50
5	12.0	12.70	12.35	6.43	98.02
6	12.05	12.80	12.42	6.56	100
7	12.10	12.65	12.38	6.48	98.78
8	12.10	12.60	12.35	6.43	98.02
9	12.00	12.20	12.10	6.00	91.46
10	12.00	12.00	12.00	5.83	88.87

ตารางที่ จ2 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพันธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก กะปิสมุทรสงคราม เมื่อทดสอบความคงตัวที่พีเอชต่าง ๆ

พีเอช	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)			แอคติวิตีของเอนไซม์ที่สกัดได้ (ยูนิตพลามิน/มิลลิลิตร)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
3	3.20	3.45	3.32	0.03	7.69
4	5.60	5.90	5.75	0.26	66.67
5	6.85	6.90	6.88	0.36	92.31
6	6.95	7.15	7.05	0.38	97.43
7	6.95	7.10	7.02	0.38	97.43
8	6.80	7.50	7.15	0 .39	100
9	6.40	7.05	6.72	0.35	89.74
10	6.40	6.75	6.58	0.34	87.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคำนวณแปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพันธ์

กำหนดให้พีเอชที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินมากที่สุดมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % เช่นจากตัวอย่างปูดองเกลือที่พีเอช 6 มีแอคติวิตีเท่ากับ 6.56 ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตรมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100 % ดังนั้นที่พีเอช 3 มีแอคติวิตีเท่ากับ 0.48 ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร มีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ $(0.48 \div 6.56) \times 100 = 7.32$ %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ฉ3 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจำนวน 14 ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้