หองสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย

(Assay of fibrinolytic enzyme activities in Thai traditional fermented foods)

จัดทำโดย

นางสาวมณีพร อัครพลกุล รหัสนักศึกษา 45040803

นางสาวสุกัญญา สุขสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 45040817

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 23/มี.ค./49 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21096

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย

(Assay of fibrinolytic enzyme activities in Thai traditional fermented foods)

T096607

จัดทำโดย

นางสาวมณีพร อัครพลกุล รหัสนักศึกษา 45040803

นางสาวสุกัญญา สุขสวัสดิ์ รหัสนักศึกษา 45040817

อาจารย์ที่ปรึกษา

ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ปพ.
ป133ก
2548
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน เดือน ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นางสาวมณีพร อัครพลกุล และนางสาวสุกัญญา สุขสวัสดิ์ . 2549 : การตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย (Assay of fibrinolytic enzyme activities in Thai traditional fermented foods) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

จากการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารหมักพื้นบ้านของไทยชนิดต่างๆ ได้แก่ กะปี ปูดอง ปูจืด ปลาร้า แหนมหมู แหนมปลา เต้าเจี้ยวขาว ข้าวหมาก หอยดอง หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง เต้าหู้ยี้ โยเกิร์ต กระเทียมดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาส้ม ขิงดอง และไส้กรอกอีสาน จำนวน 40 ตัวอย่าง โดยวิธีไฟบรินเพลท พบว่าอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินคือ กะปี ปูดอง แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน ซึ่งปูจืดจากตลาดหัวตะเข้มีแอคติวิตีสูงที่สุด คือ 4.56 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง รองลงมาคือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้ 2.26 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และกะปีสมุทรสงคราม มีแอคติวิตี 2.14 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีแอคติวิตีต่ำสุดคือ ไส้กรอกอีสาน 0.03 ยูนิตพลาสมิน/กรัมตัวอย่าง และเมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างกะปีสมุทรสงครามและปูดองจากตลาดหัวตะเข้ที่อุณหภูมิและพีเอชต่างๆ กัน พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวในช่วงอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความคงตัวในช่วงพีเอช 5-10 โดยมีแอคติวิตีลดลงที่พีเอชต่ำกว่า 5

มณีพร อัครพลกุล
สุกัญญา สุขสวัสดิ์
ลายมือนักศึกษา

.....
(ผศ. ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม)
ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

23/มี.ค./49
วัน / เดือน / ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำปัญหาพิเศษฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ทั้งนี้ผู้จัดทำของกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งกรุณาสละเวลาอันมีค่ามาดูแลเอาใจใส่มิได้ขาด รวมทั้งให้กำลังใจและช่วยแก้ปัญหาต่างๆ ที่เกิดขึ้น จนสามารถผ่านอุล่วงไปได้ และขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ จนทำให้การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้

ขอขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัวของคณะผู้จัดทำ ที่คอยเกื้อหนุนกำลังทรัพย์และกำลังใจเสมอมา จนทำให้ผู้จำทำผ่านอุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น ไปได้ ด้วยดี และขอขอบคุณพี่ๆ นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมี จนทำให้การทำปัญหาพิเศษสำเร็จได้ ขอบคุณที่คอยรับฟังปัญหาต่างๆ ทั้งยังช่วยแก้ปัญหาและให้คำแนะนำที่ดี และขอบคุณสำหรับมิตรภาพที่ได้รับตลอดระยะเวลา 4 ปีที่อยู่ด้วยกัน

ขอขอบคุณคุณศศิอาภา บุญคง (มหาวิทยาลัยแม่โจ้) ที่ให้คำปรึกษาตั้งแต่เริ่มต้นทำปัญหาพิเศษ ทั้งยังคอยให้กำลังใจในการต่อสู้ตลอดมา และ Dr.Yoshinori Mine ที่ให้คำแนะนำที่ดีในการทำปัญหาพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอบคุณเราทั้ง 2 คนที่คอยสู้ด้วยกันมาตลอด ขอบคุณอำนาจแห่งความดีในโลกนี้ที่ดลบันดาลให้เราทำในสิ่งที่ดี

นางสาวมณีพร อัครพลกุล
นางสาวสุกัญญา สุขสวัสดิ์
23 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 วารสารปริทรรศน์	
2.1 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน	2
2.2 แหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบริน	3
2.2.1 เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหาร	3
2.2.2 เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งที่ไม่ใช่อาหาร	3
2.3 สมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งต่าง ๆ	4
2.3.1 กะปิของจีน (fermented shrimp paste)	4
2.3.2 ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศเกาหลี (Jeot – Gal)	7
2.3.3 เห็ดที่บริโภคได้ (Edible honey mushroom)	11
2.3.4 ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักพื้นบ้านของจีน (Douchi)	13
2.3.5 ถั่วเน่า ถั่วหมักพื้นบ้านของไทย	14
2.3.6 ปลาหมักของประเทศญี่ปุ่น (Shiokara)	17
2.3.7 สาหร่ายทะเลสีเขียว (Marine green algae)	17
2.4 การศึกษาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน	19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัตถุดิบ	20
3.2 สารเคมี	21
3.3 อุปกรณ์ที่สำคัญ	22
3.4 วิธีการทดลอง	22
3.4.1 การสกัดเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก	22
3.4.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน	22
3.4.2.1 การเตรียมไฟบรินเพลท	22
3.4.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.4.2.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมัก 23
3.4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากตัวอย่าง 23
3.4.4 การศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากตัวอย่าง 24
บทที่ 4 ผลการทดลอง
4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน 25
4.2 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ 27
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก 31
4.4 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก 32
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ
5.1 สรุปผลการทดลอง 33
5.2 ข้อเสนอแนะ 34
เอกสารอ้างอิง 35
ภาคผนวก 37
ประวัติผู้เขียน 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงถึงอาหารที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบรินและชนิดของเอนไซม์	3
2.2	ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้ได้จากกะปิของจีน	6
2.3	ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปิของจีน	6
2.4	ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA 38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot - Gal	8
2.5	ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA 38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot – Gal	9
2.6	ผลของ EDTA และ $ZnCl_2$ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก *Bacillus* sp. KA 38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot – Gal	10
2.7	ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเห็ดที่บริโภคได้	13
2.8	ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเห็ดที่บริโภคได้	13
2.9	ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Douchi	14
2.10	ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากถั่วเน่า	16
2.11	ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากถั่วเน่า	17
2.12	ผลของสารยับยั้งโปรติเอสที่มีต่อแอคติวิตีของ CLP	19
4.1	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสและแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมัก 40 ชนิด	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	การย่อยลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ชื่อว่า พลาสมิน	2
2.2	เปรียบเทียบลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N – terminal ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากกะปีกับอาหารชนิดอื่น	4
2.3	ผลของ pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีน	5
2.4	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีน	5
2.5	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Bacillus sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot – Gal	7
2.6	ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Bacillus sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot – Gal	8
2.7	ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้	11
2.8	ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้	12
2.9	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า	15
2.10	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า	15
2.11	ผลของพีเอชที่มีความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก CLP	18
2.12	การใช้สารสกัดจากนัตโตในการรักษาหนูที่ได้รับบาดเจ็บที่บริเวณต้นขา	19
4.1	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับต่าง ๆ กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น	25
4.2	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 0.1 – 0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น	26
4.3	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 1 – 5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น	27
4.4	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมักชนิดต่าง ๆ	30
4.5	ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม	31
4.6	ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความสนใจปัญหาเกี่ยวกับสุขภาพกันมากขึ้น โดยเฉพาะในเรื่องเกี่ยวกับอาหาร ดังจะเห็นได้ว่าผู้ผลิตหลายรายได้พยายามที่จะเสริมสารที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพลงไปในอาหารเพื่อเป็นจุดขายของผลิตภัณฑ์ เช่น กรดไขมันโอเมก้า-3 จากน้ำมันปลา , ใยอาหาร และพรีไบโอติกต่าง ๆ เป็นต้น แต่โรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นกับประชากรของโลกก็ได้ทำลายชีวิตของผู้คนไปมาก โดยเฉพาะโรคหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตของประชากรโลก นักวิทยาศาสตร์จึงได้ค้นคว้าวิจัยแนวทางในการป้องกันการเกิดโรคหัวใจ และที่น่าสนใจคือ มีการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหาร โดยเฉพาะอาหารหมักของทางเอเชีย เช่น กะปิของจีน นัตโต ปลาหมักของญี่ปุ่นและเกาหลี เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ย่อยไฟบรินดังกล่าวมีคุณสมบัติในการย่อยสลายลิ่มเลือด (fibrin clot) ที่เกิดขึ้นในหลอดเลือด โดยลิ่มเลือดเกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไฟบริโนเจนกับทรอมบิน การสะสมของลิ่มเลือดในหลอดเลือดทำให้เลือดไหลเวียนไม่สะดวก และอาจก่อให้เกิดโรคหัวใจในที่สุด

สำหรับการป้องกันการเกิดโรคหัวใจนั้น นอกจากจะต้องอาศัยการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอแล้ว การใส่ใจกับการเลือกบริโภคอาหารต่าง ๆ ก็เป็นสิ่งสำคัญ โดยเฉพาะอาหารที่มีไขมันอิ่มตัวมาก ต้องพยายามหลีกเลี่ยง และนอกจากนี้ได้มีรายงานว่าการบริโภคอาหารที่มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินอยู่เป็นประจำ จะมีผลทำให้ไม่มีการสะสมลิ่มเลือดซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหัวใจ เนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายลิ่มเลือดได้และจากการทดลองให้เอนไซม์ชนิดนี้กับสุนัขและมนุษย์ พบว่าเอนไซม์สามารถอยู่ในร่างกายได้นานกว่า 6 ชั่วโมง ผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าหากบริโภคเอนไซม์ชนิดนี้เป็นประจำเพื่อเป็นการสะสมไว้ในร่างกาย ก็น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้ ดังที่ได้กล่าวข้างต้น ซึ่งในประเทศไทยได้มีการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักทางภาคเหนือของไทย ได้แก่ ถั่วเน่า (ศศิอาภาและคณะ, 2548) พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวมีความคงตัวที่พีเอช 5-10 และอุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส

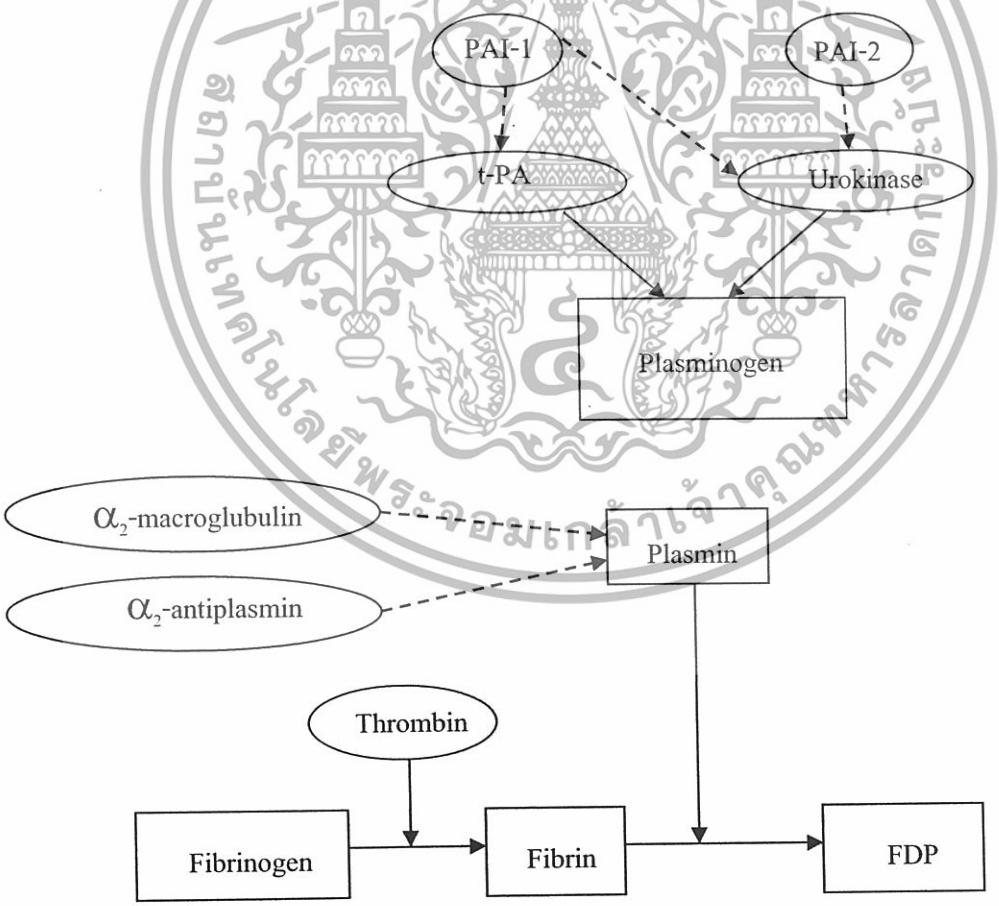
เนื่องจากในประเทศไทยมีอาหารหมักพื้นบ้านอยู่หลากหลายชนิด ปัญหาพิเศษนี้จึงทำการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักพื้นบ้านชนิดต่างๆ พร้อมทั้งศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ที่อุณหภูมิและที่พีเอชต่าง ๆ ซึ่งจากการทดลองที่ได้จะเป็นการเพิ่มทางเลือกในการเลือกบริโภคอาหารที่จะมีผลต่อการป้องกันการเกิดโรคหัวใจได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทรรศน์

2.1 ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน

เมื่อร่างกายเกิดบาดแผลขึ้นจะมีกระบวนการยับยั้งไม่ให้เลือดออกมากเกินไป โดยจะมีการสร้างเกล็ดเลือดและรวมตัวเป็นร่างแห ในขณะเดียวกันนี้ก็จะมีการสลายเกล็ดเลือดที่สร้างขึ้นด้วย หากกระบวนการดังกล่าวไม่มีความสมดุล กล่าวคือการสร้างเกล็ดเลือดมากกว่าการสลายเกล็ดเลือด จะทำให้เกล็ดเลือดจับตัวกันเป็นลิ่มเลือด ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นนี้จะเกาะที่ผนังหลอดเลือด ทำให้การไหลเวียนของเลือดไม่เป็นปกติ แต่ทว่าลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นนั้นก็จะถูกย่อยสลายได้โดยสารที่ชื่อว่าเอนไซม์ย่อยไฟบริน (fibrinolytic enzyme) ซึ่งกระบวนการย่อยสลายลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินแสดงในรูปที่ 2.1 ซึ่งจากรูปจะเห็นว่าลิ่มเลือด (fibrin) เกิดจากการกระตุ้นไฟบริโนเจน (fibrinogen) โดยเอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) ซึ่งลิ่มเลือดนี้สามารถถูกย่อยสลายได้โดยพลาสมินที่เกิดจากการถูกกระตุ้นจากพลาสมิโนเจน



รูปที่ 2.1 การย่อยลิ่มเลือดโดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีชื่อว่าพลาสมิน

ที่มา : Dobrovolsky & 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 ซึ่งชนิดของตัวอย่างอาหารและชนิดของเอนไซม์ย่อยไฟบรินแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 แสดงถึงอาหารที่เป็นแหล่งของเอนไซม์ย่อยไฟบรินและชนิดของเอนไซม์

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 *et al.*, 2005

2.2.2 เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งที่ไม่ใช่อาหาร

เอนไซม์ย่อยไฟบริน โดยทั่วไปจะพบในธรรมชาติอยู่แล้ว 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.*, 2004)

2.3 สมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากแหล่งต่าง ๆ

2.3.1 กะปีของจีน (fermented shrimp paste)

มีรายงานการค้นพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีนจากการศึกษาทดลองของ Wong และ Mine (2004) โดยเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 18 กิโลดาลตันและมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal คือ DPYEEGPGCENLQVA ลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลาย N – terminal บ่งบอกว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปีเป็นเอนไซม์ชนิดใหม่ ที่ไม่เหมือนกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เคยมีรายงานมาแล้ว (รูปที่ 2.2)

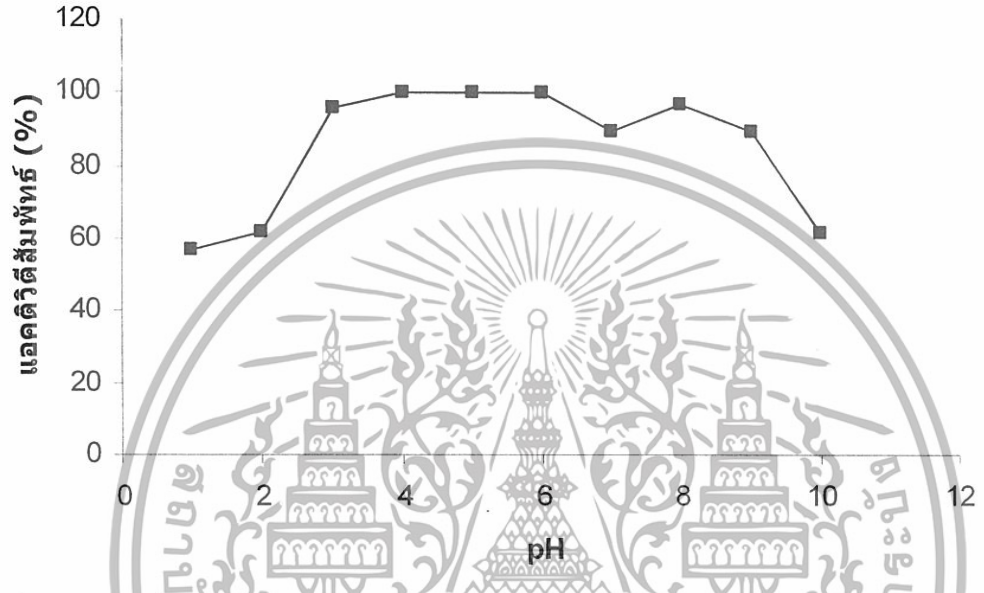
	1				5					10					15
Fermented shrimp paste	D	P	Y	E	E	G	P	G	C	E	N	L	Q	V	A
Natto (nattokinase)	A	Q	S	V	P	Y	G	I	S	Q	I	K	A	P	
Chungkook-Jang (CK)	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P	L	I	K	A	D	
Bacillus subtilis BK-17	A	Q	S	V	P	Y	G	V	S	Q	I	K	A	P	A
Tofuyo (SMCE)	A	Q	T	V	P	Y	G	I	P	Q	I	K	A	D	
Skipjack "Shiokara" (katsuwokinase)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

ที่มา : Mine *et al* ., 2005

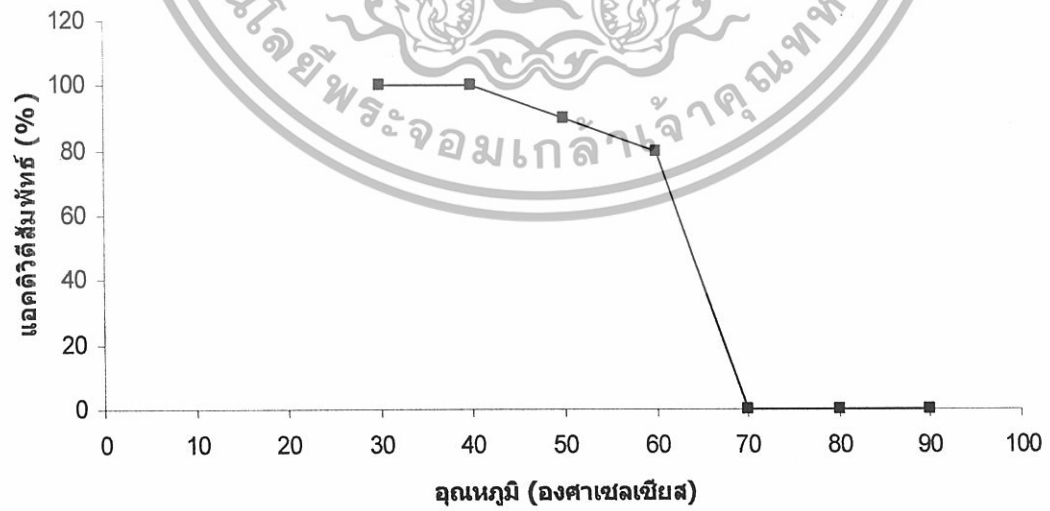
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ชนิดนี้ค่อนข้างมีความจำเพาะต่อไฟบรินหรือไฟบริโนเจนซึ่งเป็นสับสเตรท เอนไซม์จะไม่ไฮโดรไลซ์ พลาสมาโปรตีน รวมถึง BSG , IgG , ทรอมบิน และฮีโมโกลบิน เอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีนเป็นประเภทนิวทรัลโปรติเอส (neutral protease) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มีความเสถียรในช่วงพีเอช 3-6 (รูปที่ 2.3) และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส แต่จะเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ที่สำคัญเอนไซม์ชนิดนี้สามารถทนต่อการย่อยของเอนไซม์เปปซินและเอนไซม์ทริปซินได้



รูปที่ 2.3 ผลของค่า pH ที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีน

ที่มา : Wong และ Mine, 2004



รูปที่ 2.4 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปีของจีน

ที่มา : Wong และ Mine, 2004

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทดสอบความเสถียรต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยไอออนโลหะ 5 ชนิด คือ Fe^{2+}, Mg^{2+}, Zn^{2+}, Hg^{2+} และ Cu^{2+} ที่ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ พบว่าโลหะไอออนทั้งหมดที่ใช้ทดสอบมีผลยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น (ตารางที่ 2.2)

ตารางที่ 2.2 ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปิของจีน

ไอออนโลหะ	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
Fe	96.9
Mg	93.8
Zn	93.8
Hg	93.8
Cu	75.0

ที่มา : Wong และ Mine, 2004

ตารางที่ 2.3 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปิของจีน

สารยับยั้งโปรติเอส	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)	
	1 มิลลิโมลาร์	2 มิลลิโมลาร์
DNP	100	100
E64	100	100
1,10-phenanthroline	100	100
collagenase inhibitor	100	100
TLCK	98.7	100
PMSF	96.7	88.9
Pepstatin A	96.7	88.9
DTT	99.3	77.8
EDTA	94.7	77.8

ที่มา : Wong และ Mine, 2004

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) ,

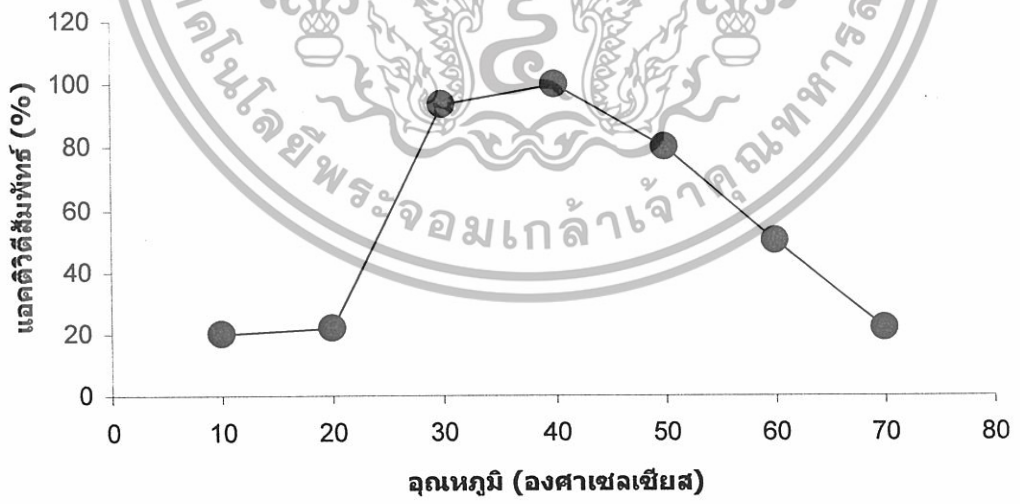
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), Pepstatin A , Dithiothreitol (DTT) , ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) (ตารางที่ 2.3) พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปิของจีนที่เหลือไม่ถูกยับยั้งด้วย 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 ดังนั้นเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากกะปิของจีนนี้เป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิดใหม่

2.3.2 ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของประเทศเกาหลี (Jeot-Gal)

จากรายงานของ Kim *et al.*,1997 ที่ทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Jeot-Gal พบเชื้อ *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งเป็นเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิดใหม่ได้ โดยเอนไซม์ที่แยกได้จะทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโทกราฟีแบบคอลัมน์ ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 41 กิโลดาลตัน และมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้าน N-terminal คือ Val-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn

ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบริน โดยศึกษาในช่วงอุณหภูมิ 10-80 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรมากสุดในช่วงอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และจะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (รูปที่ 2.5)

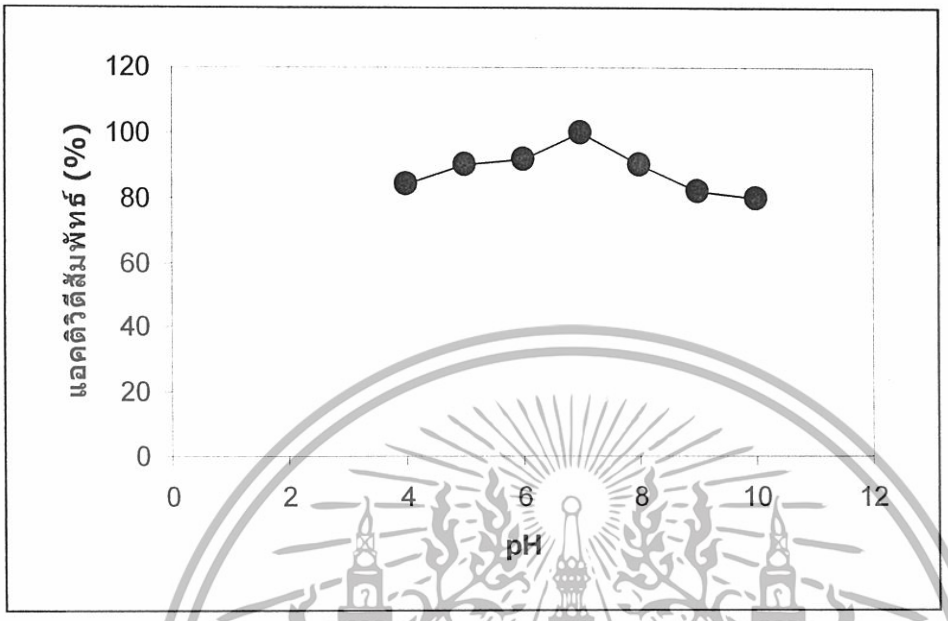


รูปที่ 2.5 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot-Gal

ที่มา : Kim *et al.*, 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และการศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ ซึ่งศึกษาในช่วงพีเอช 4-10 โดยวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือ หลังจากบ่มที่พีเอชต่าง ๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 4-10 โดยที่พีเอช 7 เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด (รูปที่ 2.6)



รูปที่ 2.6 ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Bacillus sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot-Gal

ที่มา : Kim *et al.*, 1997

ผลการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกจาก Jeot-Gal ด้วยไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ทดลองโดยใช้ $ZnCl_2$, NaCl , KCl , $CoCl_2$, $CaCl_2$, $CuSO_4$ และ $FeCl_3$ แสดงดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot-Gal

ไอออนโลหะ	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
$ZnCl_2$	158
NaCl	98
KCl	97
$CoCl_2$	77
$FeCl_3$	76
$CaCl_2$	2
$CuSO_4$	6

ที่มา : Kim *et al.*, 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน 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 แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot-Gal

สารยับยั้งโปรติเอส	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
DFP	0.1	103
SBTI	0.1	100
PMSF	1	99
TLCK	0.1	97
Aprotinin	1	93
TPCK	0.1	88
EDTA	0.1	14
2,2'-bipyridine	0.1	10
o-phenanthroline	0.1	0

ที่มา : Kim *et al.*, 1997

จากตารางที่ 2.5 จะเห็นได้ว่าผลของสารยับยั้งที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในกลุ่ม 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของ EDTA ต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินซึ่งทดลองโดยการแปรค่าความเข้มข้นของ Zn^{2+} ที่แตกต่างกัน 3 ระดับ (ตารางที่ 2.6) โดยแอคติวิตีของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของ EDTA จากตารางหากเพิ่มค่าความเข้มข้นของ 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

ตารางที่ 2.6 ผลของ EDTA และ $ZnCl_2$ ที่มีต่อแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก จาก *Bacillus* sp. KA38 ซึ่งแยกได้จาก Jeot-Gal

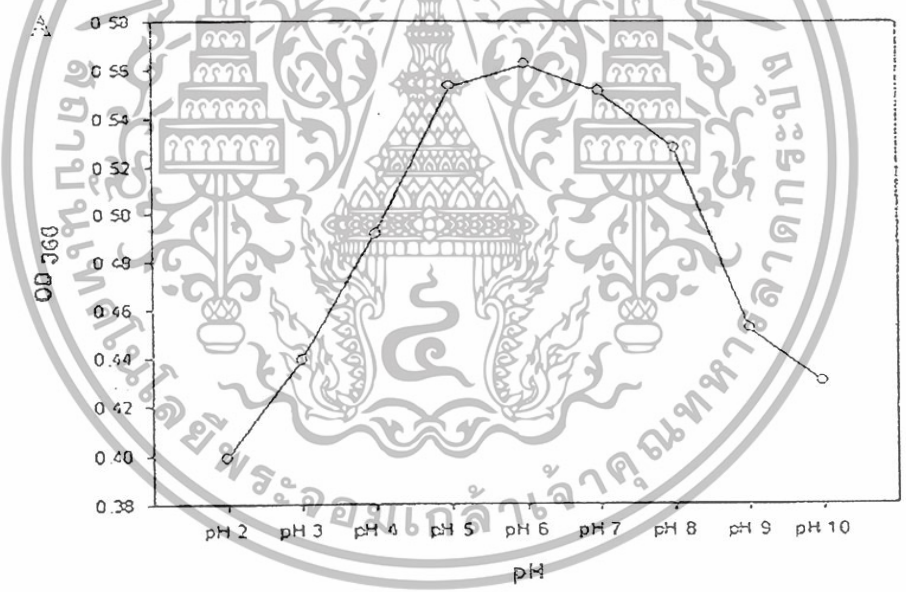
ความเข้มข้นของ EDTA (มิลลิโมลาร์)	ความเข้มข้นของ $ZnCl_2$ (มิลลิโมลาร์)	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
0	0	100
0.01	0	62
0.05	0	36
0.1	0	18
1	0	13
10	0	0
0	1	161
0.01	1	87
0.05	1	66
0.1	1	18
1	1	13
10	1	0
0	2	152
0.01	2	111
0.05	2	103
0.1	2	80
1	2	40
10	2	0

ที่มา : Kim *et al.*, 1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 เห็ดที่บริโภคได้ (Edible mushroom)

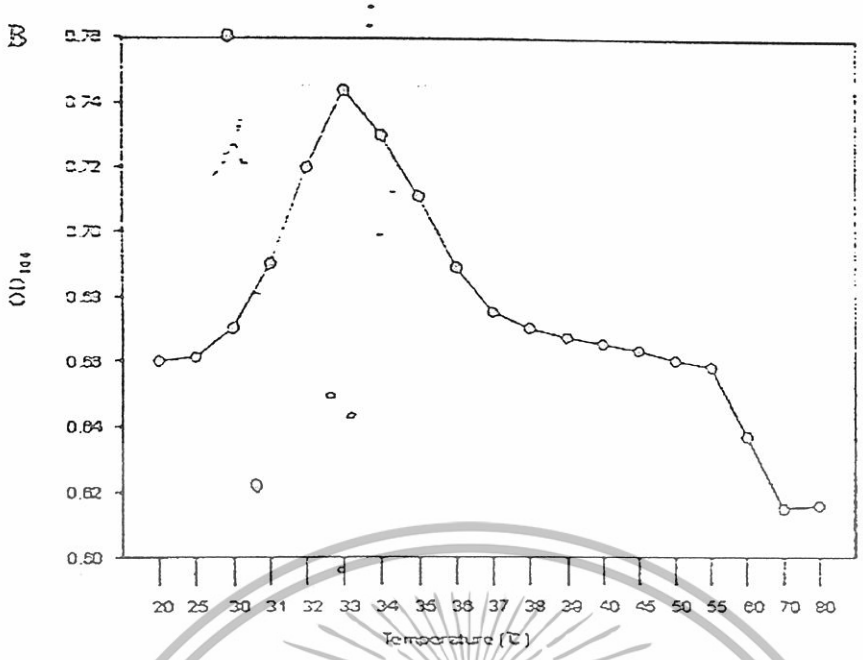
จากการทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ซึ่งเป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้โดย Lee *et al.*, 2005 วิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์จะใช้วิธีโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) ตามด้วยวิธีเจลฟิลเตรชัน (gel filtration) เอนไซม์ที่ได้มีชื่อว่า Armillaria mellea metalloprotease (AMMP) พบว่ามีมวลโมเลกุลเท่ากับ 21 กิโลดาลตัน และมีลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal 24 ตัวแรก คือ MFSLSSRFFLYTLCLSAVAVSAAP เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ AMMP ในช่วงพีเอช 2-8 จะพบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5-8 แต่ถ้าพีเอชสูงเกิน 8 ความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงทันที (รูปที่ 2.7) และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ AMMP ในช่วงอุณหภูมิ 20-80 องศาเซลเซียส จะพบว่าที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด แต่ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 55 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 2.7 ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้

ที่มา : Lee *et al.*, 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.8 ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้

ที่มา : Lee *et al*., 2005

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยการเติมไอออนโลหะชนิด Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+}, Zn^{2+}, Cu^{2+} และ Co^{2+} ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเติม Ca^{2+} และ Mg^{2+} แต่แอคติวิตีของเอนไซม์จะถูกยับยั้งด้วย Co^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+} และ Zn^{2+} (ตารางที่ 2.7) และเมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินด้วยสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสจำนวน 5 ชนิด คือ APMSF , TLCK , PMSF , TPCK และ EDTA ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.8) พบว่า APMSF , TLCK , PMSF และ TPCK มีผลการยับยั้งแอคติวิตีของ AMMP ได้เล็กน้อยเท่านั้น แต่ EDTA มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งแอคติวิตีของ AMMP โดย EDTA นั้นเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่ม metalloprotease ดังนั้นเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้นี้จัดอยู่ในกลุ่ม metalloprotease

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้

ไอออนโลหะ	ค่าของแอคติวิตีที่ยังคงเหลืออยู่ (%)
Ca^{2+}	126.4
Mg^{2+}	121.5
Fe^{2+}	87.6
Zn^{2+}	86.3
Cu^{2+}	81.7
Co^{2+}	78.2

ที่มา : Lee *et al.*, 2005

ตารางที่ 2.8 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Armillaria mellea* ที่ใช้เลี้ยงเชื้อเห็ดที่บริโภคได้

สารยับยั้งโปรติเอส	ค่าของแอคติวิตีที่ยังคงเหลืออยู่ (%)
APMSF	89.2
TLCK	88.9
PMSF	81.5
TPCK	78.7
EDTA	50.6

ที่มา : Lee *et al.*, 2005

2.3.4 ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักพื้นบ้านของจีน (Douchi)

มีรายงานการทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก Douchi โดย Peng *et al.*, 2002 ทดลองแยกเชื้อจาก Douchi พบเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens DC-4* ซึ่งเชื้อชนิดนี้สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไฟบรินได้ เอนไซม์ที่แยกได้มีชื่อว่า Subtilisin DFE มีมวลโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน ลำดับของกรดอะมิโนทางด้านปลาย N-terminal ได้แก่ AQSVPYGVSQIKAPALHSQGFTGS ซึ่งจากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อความเสถียรของ Subtilisin DFE บริสุทธิ์ พบว่าเอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิระหว่าง 28-60 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความเสถียรสูงที่สุด และเมื่อศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ โดยทดสอบด้วยบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่าง ๆ ผลการทดสอบพบว่าแอคติวิตีที่เหลือของ Subtilisin DFE มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเสถียรที่พีเอช 6-11 แต่ที่พีเอช 9 เอนไซม์มีความเสถียรสูงสุด และจากการศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่างๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Douchi สามารถถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วย phenylmethylsulfony fluoride (PMSF) ซึ่ง PMSF นี้เป็นตัวยับยั้ง serine protease และแอคติวิตีของเอนไซม์ที่เหลือบางส่วนจะถูกยับยั้งด้วย Benzamidine hydrochloride , Leupeptin และ Pepstatin A แต่ EDTA , EGTA และ Apoptin ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (ตารางที่ 2.9) ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่า Subtilisin DFE เป็นเอนไซม์ย่อยไฟบรินชนิด serine protease

ตารางที่ 2.9 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จาก Douchi

สารยับยั้งโปรติเอส	ความเข้มข้น	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
Apoptin	1000 ยูนิตสากล/มล.	100
EGTA	10 มิลลิโมลาร์	100
EDTA	10 มิลลิโมลาร์	100
Pepstatin A	0.25 มก./มล.	84.2
Leupeptin	0.25 มก./มล.	76.5
Benzamidine hydrochloride	0.8 มก./มล.	43
PMSF	10 มิลลิโมลาร์	0

<u>หมายเหตุ</u> PMSF ละลายในไอโซโพรพานอล , Pepstatin A ละลายในเมทานอล และตัวยับยั้งอื่นๆ ละลายในน้ำกลั่น หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลืออยู่ จะทำการทดสอบด้วยวิธีไฟบรินเพลท

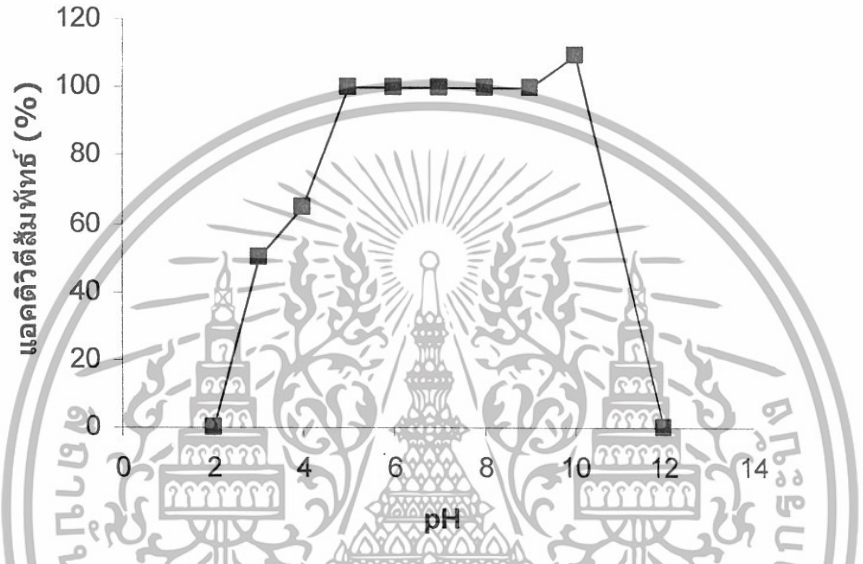
ที่มา : Peng *et al.*, 2002

2.3.5 ถั่วเน่า ถั่วหมักพื้นบ้านของประเทศไทย

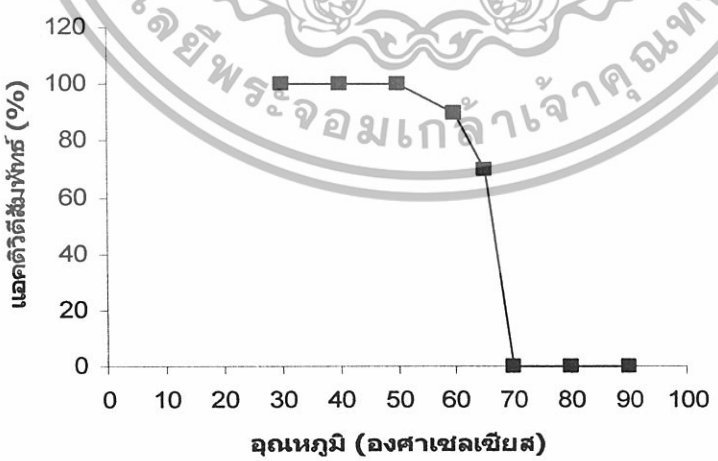
ถั่วเน่าอาศัยการหมักตามธรรมชาติที่มีการผลิตในประเทศไทยเป็นระยะเวลานานกว่า 100 ปี การสกัดเอนไซม์จากถั่วเน่าพบว่าสารสกัดเอนไซม์ที่ยังไม่บริสุทธิ์ (crude extract) ประกอบด้วยเอนไซม์ย่อยไฟบรินหลายชนิดและทำการแยกเอนไซม์จากถั่วเน่าโดยเทคนิคโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (anion exchange chromatography) นำเอนไซม์ที่แยกได้จากคอลัมน์ไปทำการศึกษาด้วยวิธี continuous elution native polyacrylamide gel electrophoresis (CAN-PAGE) เมื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเอนไซม์โดยวิธี SDS-PAGE พบว่าให้แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 14.2 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ใช้วิธีเฉพาะในการตรวจสอบเอนไซม์ย่อยไฟบริน เรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฟบรินไซโมกราฟี (fibrin zymography) พบว่าเอนไซม์ที่แยกได้จากการแยกด้วยโครมาโตกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุลบ มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ 14.2 กิโลดาลตัน และมีเอนไซม์ย่อยไฟบรินอย่างน้อย 4 ชนิด คือ มวลโมเลกุล 14.2, 20, 24 และ 45 กิโลดาลตัน การทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินใน crude extract พบว่ามีความเสถียรที่พีเอช 5-10 (รูปที่ 2.9) และเอนไซม์ย่อยไฟบรินดังกล่าวความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส โดยจะเริ่มลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (ดังรูปที่ 2.10)



รูปที่ 2.9 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า
ที่มา : ศศิอาภา และ คณะ, 2548



รูปที่ 2.10 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่า
ที่มา : ศศิอาภา และ คณะ, 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ด้วยไอออนโลหะ ชนิดของไอออนโลหะที่ใช้ทดสอบมี 6 ชนิด คือ $MgCl_2$, $FeCl_2$, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, $HgCl_2$ และ $CuCl_2$ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ (ตารางที่ 2.10) โดยการผสมเอนไซม์ที่สกัดได้กับสารละลายของไอออนโลหะ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยวิธีไฟบรินเพลท ผลที่ได้พบว่าแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากถั่วเน่าไม่ถูกยับยั้งด้วยไอออนโลหะชนิดต่าง 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 (ตารางที่ 2.11) โดยการผสมกับเอนไซม์ที่สกัดได้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ด้วยไฟบรินเพลท พบว่า crude extract ที่สกัดได้อยู่ในกลุ่มของ serine protease เนื่องจากแอคติวิตีของเอนไซม์ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ด้วยสาร PMSF และ TLCK ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากถั่วเน่าจัดอยู่ในกลุ่ม serine protease (ศศิอาภาและคณะ, 2548)

ตารางที่ 2.10 ผลของไอออนโลหะชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากถั่วเน่า

ไอออนโลหะ	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
$MgCl_2$	100
$FeCl_2$	100
$CaCl_2$	94.44
$ZnCl_2$	86.11
$HgCl_2$	86.11
$CuCl_2$	77.77

ที่มา : ศศิอาภา และ คณะ, 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.11 ผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ ต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่แยกได้จากถั่วเน่า

สารยับยั้งโปรติเอส	แอคติวิตีสัมพัทธ์ (%)
E64	100
DNP	94.44
Pepstatin A	94.44
DTT	91.67
EDTA	88.89
1,10-phenanthroline	88.89
PMSF	0
TLCK	0

ที่มา : ศศิอาภา และ คณะ, 2548

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 Ɛ-amino-n-caproic acid และ t-4-amino-methylcyclohexane carboxylic acid ไม่สามารถยับยั้งแอคติวิตีของเอนไซม์ได้ (Sumi *et al.*, 1995)

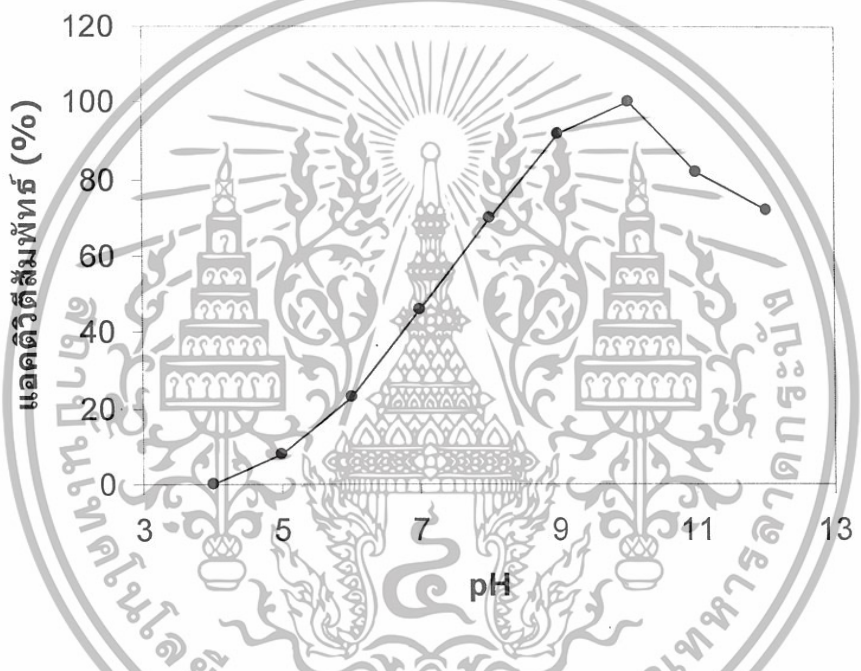
2.3.7 สาหร่ายทะเลสีเขียว (Marine green algae)

สาหร่ายทะเลมีสมบัติเป็นตัวยับยั้งแบคทีเรียและเนื้องอก โพลีแซคคาไรด์ของสาหร่ายบางชนิดเป็นสารยับยั้งการจับตัวกันเป็นก้อนของเลือดและกระบวนการสลายลิ่มเลือด สารหลายชนิดในสาหร่ายทะเล เช่น เลคตินและฟิวโคสเตอรอลในสาหร่ายสีน้ำตาล มีผลต่อการเกิดลิ่มเลือดและการสลายลิ่มเลือด อีกทั้งมีสมบัติในการเหนี่ยวนำการผลิตตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนในเซลล์เยื่อบุผิว อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำเอนไซม์ย่อยไฟบรินในสาหร่ายทะเล โดยพบเอนไซม์ในสาหร่ายทะเลสีเขียวจากหลาย ๆ สปีชี่ส์ ของจีนัส Codium และพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในการสกัดจากสาหร่ายนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96607

Matsubara *et al.*, 1999 ได้ทดลองแยกเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากสาหร่ายทะเลสีเขียว *(Codium latum)* เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้เรียกว่า Codium latum protease (CLP) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 23 กิโลดาลตัน เอนไซม์ดังกล่าวแสดงแอคติวิตีสูงสุดที่พีเอช 10 ดังรูปที่ 2.11 และเมื่อทดสอบของสารยับยั้งโปรติเอส ที่มีต่อแอคติวิตีของ CLP (ตารางที่ 2.12) 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



รูปที่ 2.11 ผลของพีเอชที่มีต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก CLP
ที่มา : Matsubara *et al.*, 1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.12 ผลของสารยับยั้งโปรติเอสที่มีต่อแอคติวิตีของ CLP

สารยับยั้งโปรติเอส	ความเข้มข้น	กิจกรรมที่เหลือ (%)
PCMB	1 มิลลิโมลาร์	109
EDTA	10 มิลลิโมลาร์	106
SBTI	200 ไมโครกรัม/มล.	32
Aprotinin	10 ยูนิตสากล/มล.	20
DFP	1 มิลลิโมลาร์	0
TLCK	1 มิลลิโมลาร์	1

ที่มา : Matsubara *et al*., 1999

2.4 การศึกษาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ย่อยไฟบริน

Sumi *et al.* ได้รายงานว่าเมื่อให้เอนไซม์ยูโรไคเนส ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นพลาสมิโนเจนให้เปลี่ยนไปเป็นพลาสมินที่สามารถย่อยสลายลิ่มเลือดได้ทางปากกับสุนัขและมนุษย์ พบว่าจะยังคงรักษาระดับของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในเลือดได้นานกว่า 6 ชั่วโมง (Kim *et al.*, 1997) นอกจากนี้ Suzuki *et al.*, 2003 รายงานว่าได้ใช้สารสกัดจากนัตโตในการรักษาหนูที่ได้รับบาดเจ็บที่หลอดเลือดเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ผลปรากฏดังรูป 2.12

รูปที่ 2.12 การใช้สารสกัดจากนัตโตในการรักษาหนูที่ได้รับบาดเจ็บที่บริเวณต้นขา

ที่มา : Suzuki *et . al* ., 2003

จากรูปจะเห็นว่ารูป 2.12 (a) หลอดเลือดหนูที่มีการควบคุมไม่ใช้สารสกัดจากนัตโตมีลักษณะผนังด้านในของหลอดเลือดหนา แต่รูป 2.12 (b) ผนังของหลอดเลือดด้านในมีลักษณะบางลง เนื่องจากมีการฉีดสารสกัดจากนัตโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการทดลองซื้อจากตลาดในเขต หัวตะเข้ พระโขนง จังหวัดกรุงเทพมหานคร และเขตบางพลี จังหวัดสมุทรปราการและซื้อจากซุปเปอร์มาร์เก็ต 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

21096

- 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 จากห้าง โลตัส
- ของดอง 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)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคนิคการแพทย์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

3.3 อุปกรณ์ที่สำคัญ

- เครื่องหมุนเหวี่ยง
- Hot plate
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
- เครื่องปั่น
- 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 นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยเครื่องปั่นที่ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 3-5 นาที ขึ้นกับชนิดตัวอย่าง จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสของสารละลายตัวอย่างที่ได้ นำมากรองด้วยกระดาษกรองวอร์ทแมนเบอร์ 1 จะได้สารละลายเอนไซม์ที่ใส วัดปริมาตรที่เหลือสุทธิโดยใช้กระบอกตวง เก็บใส่ขวดสีชาแช่ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

3.4.2 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะใช้วิธีไฟบรินเพลท (fibrin plate method) ซึ่งมีหลักการคือ ลิ่มเลือดที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะขาวขุ่นเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะทำให้เกิดลักษณะของวงใส (clear zone) แล้วจึงวัดขนาดของวงใส ซึ่งวิธีนี้รายงานโดย Wong และ Mine (2004) ซึ่งจะรายงานค่าแอคติวิตีของเอนไซม์เทียบกับพลาสมิน โดยมีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้คือ

3.4.2.1 การเตรียมไฟบรินเพลท

ละลายไฟบริโนเจน 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในโซเดียมบอเรท-บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7.8) ใช้แท่งแก้วคนจนละลายเข้ากัน จะได้สารละลายไฟบริโนเจนแล้วพักไว้ จากนั้นชั่งอะกาโรส 0.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ละลายในโซเดียมบอเรท-บัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7.8) นำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 75 องศาเซลเซียส ใช้แท่งแก้วคนให้ละลาย จากนั้นลดอุณหภูมิของสารละลายลงจนมีอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จึงเท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลาย ไฟบริโนเจนที่เตรียมไว้ข้างต้นลงไปผสม คนให้เข้ากัน เมื่ออุณหภูมิลดถึง 37 องศาเซลเซียส ให้เติมสารละลายทรอมบิน 0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แล้วคนให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว จนสังเกตเห็นสารละลายเริ่มเปลี่ยนเป็นสีขาวขุ่นให้เทลงเพลททันที ตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เจาะรูบนแผ่นวุ้น จำนวน 8-10 รู จะได้ไฟบรินเพลทไว้ใช้ในการทดลองต่อไป โดยสามารถเก็บไฟบรินเพลทไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส ได้ไม่เกิน 1 สัปดาห์

3.4.2.2 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน

พลาสมินเป็นเอนไซม์ที่มีสมบัติในการย่อยสลายไฟบรินได้ และนิยมใช้เป็นเอนไซม์มาตรฐานในการวิเคราะห์เปรียบเทียบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากวัตถุดิบต่าง ๆ ที่นำมาศึกษา สำหรับกราฟมาตรฐานของพลาสมินเตรียมได้โดย หยดสารละลายพลาสมินในบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้นต่าง 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 วัดขนาดของวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นด้วย เวอร์เนียคาลิปเปอร์ นำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของพลาสมิน (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) กับขนาดวงใส (มิลลิเมตร)

3.4.2.3 การวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมัก

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

3.4.3 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากตัวอย่าง

ทดสอบความเสถียรของเอนไซม์จากตัวอย่างอาหารที่สกัดด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 8) ซึ่งตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบคือ สารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากกะปิสมุทรสงครามและปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ โดยปิเปตสารละลายเอนไซม์จากกะปิหรือปูดองเกลือ 1 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองจำนวน 8 หลอด เติมสารละลายทริสบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ (พีเอช 8) 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 การศึกษาผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ได้จากตัวอย่าง

ทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากกะปิสมุทรสงครามและปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ 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

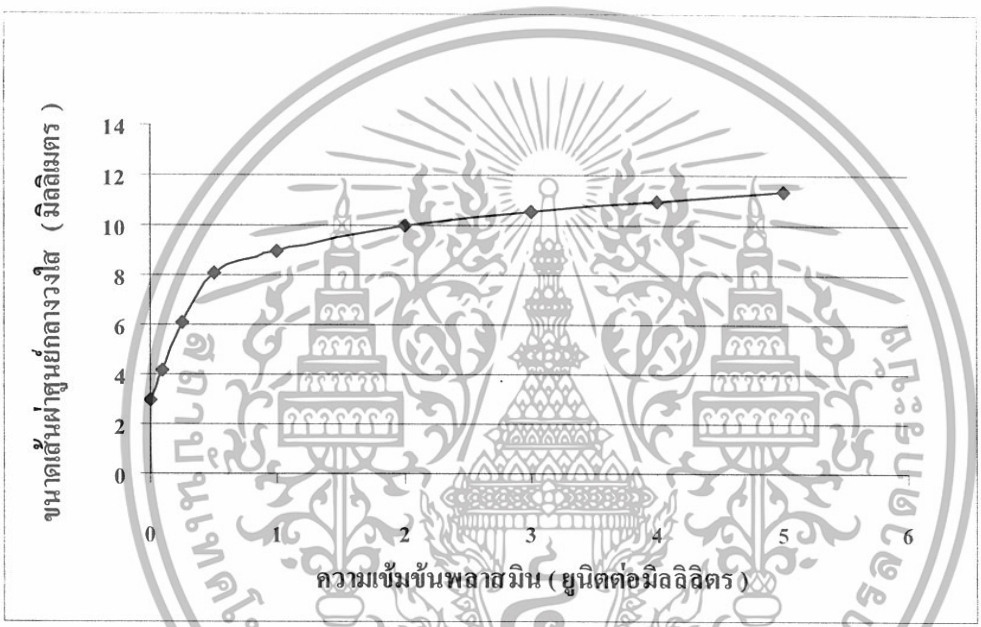
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมกราฟมาตรฐานของพลาสมิน

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



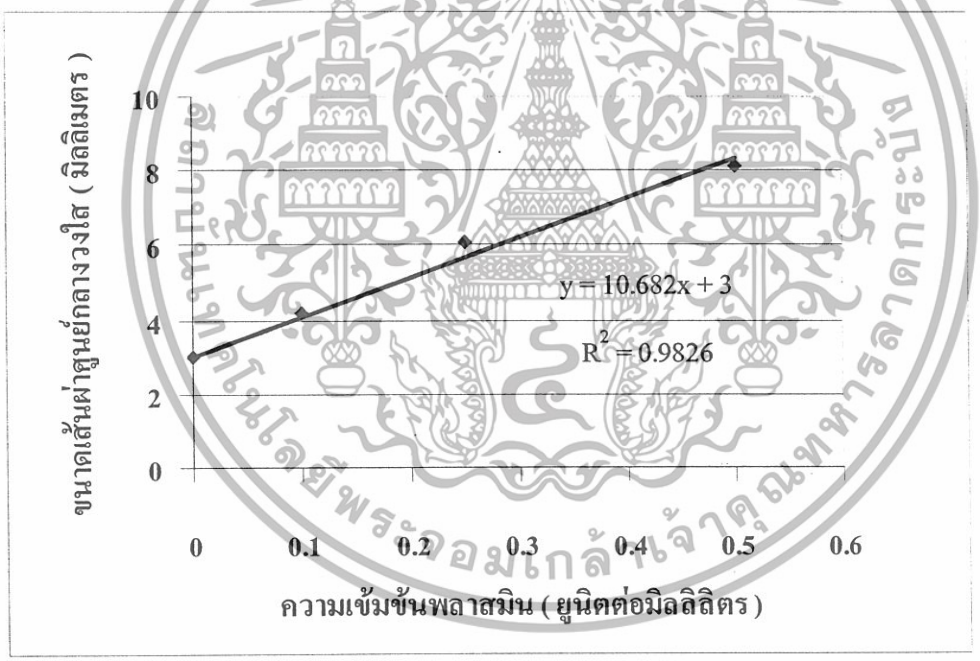
รูปที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับต่าง ๆ กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

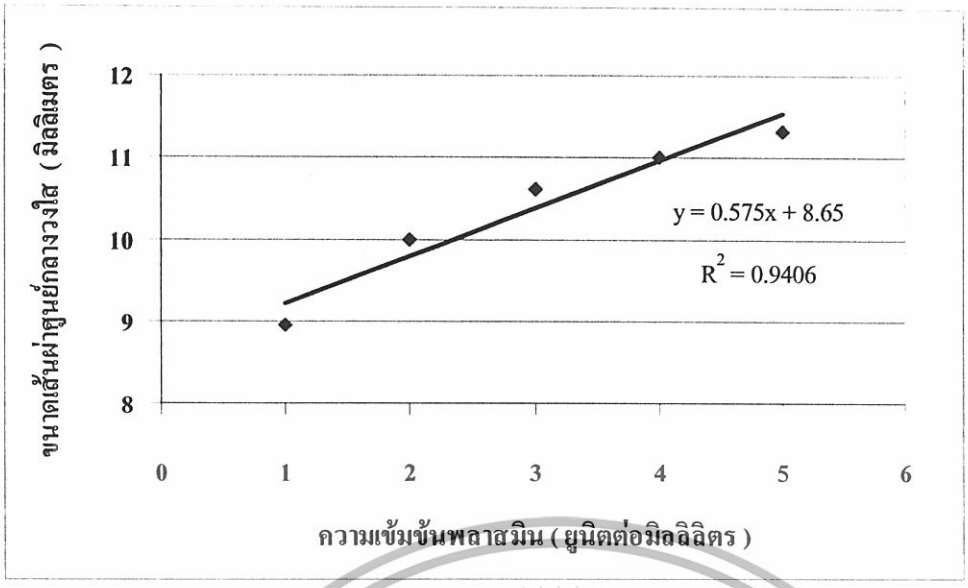
ใช้ในการวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวอย่างอาหารหมัก สำหรับการทดลองนี้จึงควรเป็นช่วงความเข้มข้นที่ให้อัตราเร็วที่แท้จริงของปฏิกิริยา (0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ซึ่งให้ขนาดวงใสที่เกิดขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 8.65 มิลลิเมตร โดยตัวอย่างสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมักจะต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม และให้วงใสมีขนาดไม่เกิน 8.65 มิลลิเมตร ดังกล่าว

อย่างไรก็ตามเนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องเงินทุนและสารเคมีมีราคาแพง จึงไม่ได้ทำการเจือจางตัวอย่างให้ค่าเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นตกอยู่ในช่วงที่เป็นอัตราเร็วที่แท้จริงของปฏิกิริยา จึงแก้ปัญหาโดยแบ่งกราฟมาตรฐานของพลาสมินออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ความเข้มข้นของพลาสมินเท่ากับ 0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 1-5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในรูปที่ 4.2 และ 4.3 และใช้สมการเส้นตรง 2 สมการในการคำนวณ คือ ถ้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.65 มิลลิเมตร ให้ใช้สมการจากรูปที่ 4.2 และถ้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสมากกว่า 8.65 มิลลิเมตร ให้ใช้สมการจากรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 0.1-0.5 ยูนิตต่อมิลลิลิตร กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นพลาสมินที่ระดับ 1-5 ยูนิตต่อมิลลิลิตรกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้น

4.2 การตรวจวิเคราะห์แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสและแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในตัวอย่างอาหารหมัก 40 ชนิด

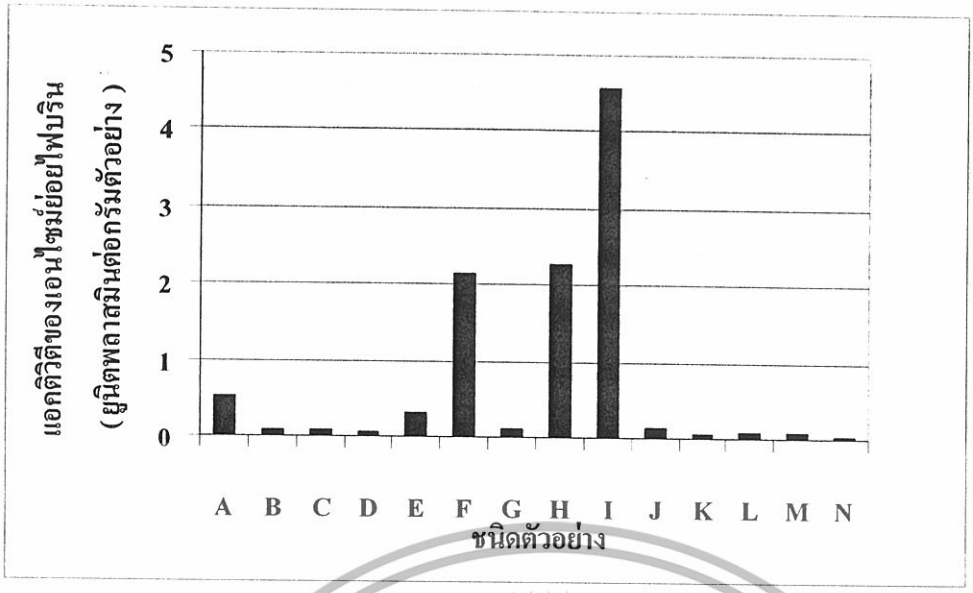
ชนิดตัวอย่าง	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตต่อกรัมตัวอย่าง)
กะปี (หัวตะเข้)	42	9.38	0.53
กะปี(อุดมสุข)	43	8.75	0.08
กะปี ตรากุ้งไทย	42	5.30	0.09
กะปีทั่วไป (บางพลี)	42	ไม่เกิดวงใส	-
กะปีใต้ (บางพลี)	43	4.45	0.06
กะปีเกาะช้าง(บางพลี)	43	9.05	0.30
กะปีสมุทรสงคราม (เคย 100%)	42	11.58	2.14
ปูดองเกลือ (บางพลี)	41	5.85	0.11
ปูดองเกลือ (หัวตะเข้)	42	10.2 (เจือจาง 2 เท่า)	2.26
ปูจืด (หัวตะเข้)	43	11.7 (เจือจาง 2 เท่า)	4.56
ปูดองน้ำปลา (หัวตะเข้)	41	ไม่เกิดวงใส	-
ปูนาดองเกลือ (บางพลี)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ปูนาดองน้ำปลา (หัวตะเข้)	42	6.35	0.13
ปลาร้า (อุดมสุข)	42	ไม่เกิดวงใส	-
ปลาร้า (หัวตะเข้)	43	ไม่เกิดวงใส	-
แหนมหมู (ตราห้วยแก้ว)	42	4.60	0.06
แหนมหมูห่อใบตอง	43	5.10	0.08
แหนมหมู (ตรานิตยา)	42	5.10	0.08
แหนมปลา (บางพลี)	40	ไม่เกิดวงใส	-
แหนมปลากราย	41	ไม่เกิดวงใส	-
เต้าเจี้ยวขาว (หัวตะเข้)	40	ไม่เกิดวงใส	-
เต้าเจี้ยวขาว (อุดมสุข)	43	ไม่เกิดวงใส	-
ข้าวหมาก (ตรารสสุคนธ์)	42	ไม่เกิดวงใส	-
ข้าวหมาก (เพชรบุรี)	44	ไม่เกิดวงใส	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดตัวอย่าง	ปริมาตรของสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ (มิลลิลิตร)	ขนาดวงใส (มิลลิเมตร)	แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง)
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	0.03

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าจากตัวอย่างอาหารหมัก 40 ตัวอย่าง มีเพียง 14 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน ได้แก่ กะปีตลาดหัวตะเข้ กะปีตลาดอุดมสุข กะปีตรากุ้งไทย กะปีใต้ตลาดบางพลี กะปีเกาะช้างตลาดบางพลี กะปีสมุทรสงคราม ปูดองเกลือตลาดบางพลี ปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้ ปูจืดตลาดหัวตะเข้ ปูดองน้ำปลาตลาดหัวตะเข้ แหนมหมูตราห้วยแก้ว แหนมหมูห่อใบตองตลาดหัวตะเข้ แหนมหมูตรานิตยา และไส้กรอกอีสานตลาดบางพลี โดยตัวอย่างดังกล่าวจะมีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินแตกต่างกันไปดังแสดงในกราฟรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 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 ปูดองน้ำปลา จากตลาดหัวตะเข้
K คือ แหนมหมูตรา ห้วยแก้ว L คือ แหนมหมูห่อใบตอง
M คือ แหนมหมู ตรานิตยา N คือ ไส้กรอกอีสาน จากตลาดบางพลี

จากกราฟในรูปที่ 4.4 จะเห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินสูงที่สุดคือ ปูจืดจากตลาดหัวตะเข้ มีแอคติวิตี 4.56 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง รองลงมาคือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้ มีแอคติวิตี 2.26 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง และกะปีสมุทรสงคราม มีแอคติวิตี 2.14 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง และตัวอย่างที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยไฟบรินค่อนข้างน้อยได้แก่ กะปีจากตลาดหัวตะเข้มีแอคติวิตี 0.53 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง กะปีเกาะช้างจากตลาดบางพลีมีแอคติวิตี 0.30 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง ปูนาดองน้ำปลาจากตลาดหัวตะเข้มีแอคติวิตี 0.13 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง ปูนาดองเกลือจากตลาดบางพลี มีแอคติวิตี 0.11 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง กะปีตรากุ้งไทยมีแอคติวิตี 0.09 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง กะปีจากตลาดอุดมสุขมีแอคติวิตี 0.08 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง แหนมหมูห่อใบตองมีแอคติวิตี 0.08 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง แหนมหมูตรานิตยามีแอคติวิตี 0.08 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง กะปีใต้จากตลาดบางพลีมีแอคติวิตี 0.06 ยูนิตต่อกรัมตัวอย่าง แหนมหมูตราห้วยแก้วมี

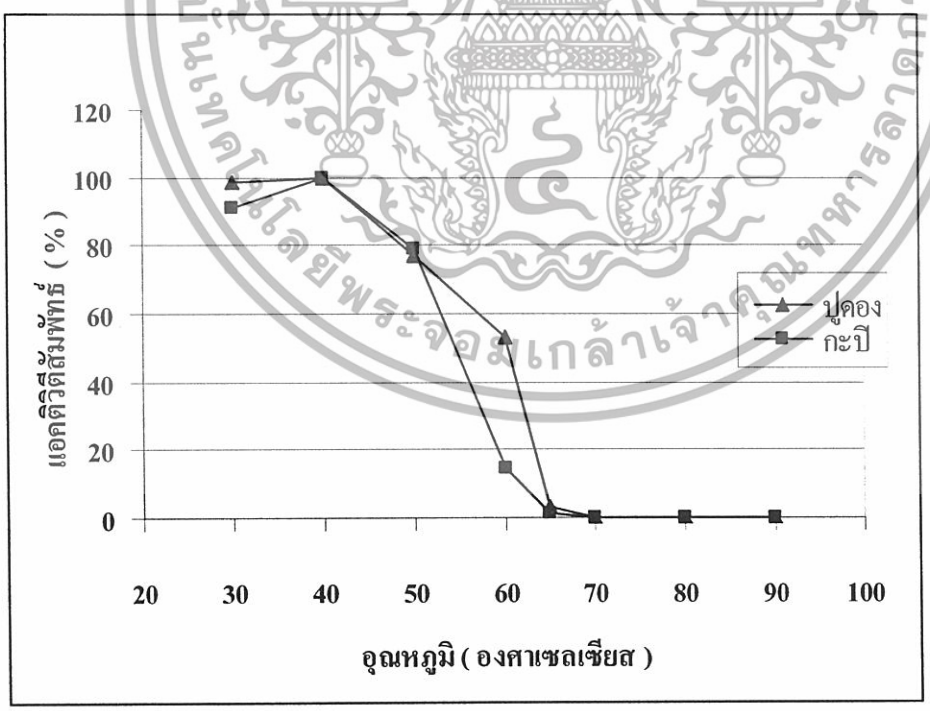
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอคติวิตี 0.06 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง และไส้กรอกอีสานจากตลาดบางพลีมีแอคติวิตี 0.03 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

เป็นที่น่าสังเกตว่า ปูจืด ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมักดอง แต่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินสูงสุด จึงเกิดข้อสันนิษฐานว่าตามธรรมชาติจะพบเอนไซม์ย่อยไฟบรินในตัวปูอยู่แล้ว นอกจากนี้แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่พบในตัวอย่างปูดองเกลือ น่าจะเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในวัตถุดิบเริ่มต้นตามธรรมชาติ ไม่น่าจะเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมัก สำหรับตัวอย่างกะปินั้นมีรายงานเป็นที่แน่ชัดแล้วว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ (Wong & Mine, 2004) สำหรับตัวอย่างแหนมหมูและไส้กรอกอีสาน แอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบน่าจะมีที่มาจากจุลินทรีย์ที่เจริญในระหว่างกระบวนการหมัก

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมัก 2 ชนิด คือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม โดยนำสารละลายเอนไซม์ไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากนั้นตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลือโดยวิธีไฟบรินเพลท ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.5



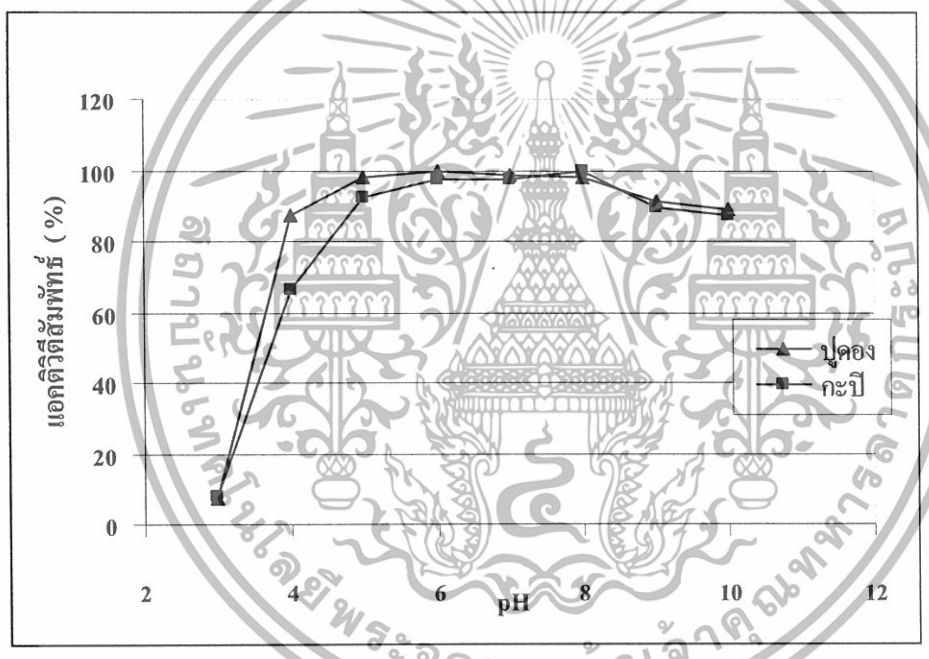
รูปที่ 4.5 ผลของอุณหภูมิต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.5 จะเห็นว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างอาหารหมักทั้ง 2 ชนิดให้ผลที่ใกล้เคียงกันคือ เอนไซม์มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์เริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และจะสูญเสียแอคติวิตีอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

4.4 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างอาหารหมัก

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากตัวอย่างอาหารหมัก 2 ชนิด คือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม โดยทดสอบในบัฟเฟอร์ พีเอช 3-10 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่เหลือ โดยวิธีไฟบรินเพลท ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ผลของพีเอชต่อความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่ตรวจพบในปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้และกะปิสมุทรสงคราม

จากผลการทดลองในรูปที่ 4.6 จะเห็นว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างอาหารหมักทั้ง 2 ชนิด ให้ผลที่ใกล้เคียงกันคือ เอนไซม์มีความเสถียรที่พีเอช 5-10 แต่ที่พีเอชต่ำกว่า 5 เอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้มีความเสถียรลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจหาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ได้แก่ กะปี ปลาร้า แหนมหมู แหนมปลา เต้าเจี้ยวขาว ข้าวหมาก หอยดอง หน่อไม้ดอง ผักกาดดอง เต้าหู้ยี้ห่อใบไผ่ โยเกิร์ต กระเทียมดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาส้ม ขิงดองและไส้กรอกอีสาน โดยวิธีไฟบรินเพลท พบว่าอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน คือ กะปี ปูดอง แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน ซึ่งอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์สูงสุดคือ ปูจืด มีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 4.56 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง รองลงมาคือ ปูดองเกลือจากตลาดหัวตะเข้มีแอคติวิตีเท่ากับ 2.26 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง และกะปีสมุทรสงครามมีแอคติวิตีของเอนไซม์เท่ากับ 2.14 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง และตัวอย่างอาหารที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์น้อยสุดคือ ไส้กรอกอีสานจากตลาดบางพลีมีแอคติวิตีเท่ากับ 0.03 ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

จากการทดสอบความเสถียรของเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดจากตัวอย่างปูดองเกลือตลาดหัวตะเข้และกะปีสมุทรสงคราม ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในช่วง 30-90 องศาเซลเซียส พบว่าเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากตัวอย่างทั้งสองให้ผลเหมือนกันคือ มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส และเริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเสียสภาพอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทำกราฟมาตรฐานของพลาสมินควรจะให้ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่เป็นอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่แท้จริง เพราะจะทำให้การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์มีความถูกต้องแม่นยำและตรงตามความเป็นจริง แต่เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของเงินทุนและสารเคมี ในการทดลองนี้จึงไม่ได้ทำการทดลองใหม่ โดยเจือจางสารละลายเอนไซม์ที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม จึงได้แบ่งกราฟออกเป็น 2 ช่วง และใช้ 2 สมการในการคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์

5.2.2 การเตรียมไฟบรินเพลท สิ่งที่ต้องระวังคือ การควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสม เพราะสารที่ใช้ในการเตรียมเพลทเป็นโปรตีน หากอุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้โปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ และในช่วงของการเทเพลท ควรเทสารละลายให้เต็ม โดยที่ไม่ต้องหมุนเพลทเพื่อให้สารละลายกระจายทั่วเพลท เพราะจะทำให้คลอตไฟบริน (clot fibrin) ที่เกิดขึ้นมีความไม่สม่ำเสมอ

5.2.3 ผลการทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิและพีเอชต่าง ๆ ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองเกลือและกะปิสมุทรสงครามให้ผลที่คล้ายกันกับเอนไซม์ย่อยไฟบรินที่สกัดได้จากถั่วเน่าซึ่งมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส พีเอช 5-10 และสูญเสียแอคติวิตีตามธรรมชาติอย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์นั้นมีอยู่ในปูจืดที่ไม่ได้ดองด้วยเช่นกัน

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.

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

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 .

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).

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.

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.

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. 134(B) : 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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
การเตรียมสารเคมีต่างๆ 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 แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้ถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน เก็บใส่ขวดสีชาแล้วแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 5-8 องศาเซลเซียส

2. สารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ (Sodium borate buffer) 0.05 โมลาร์

ชั่ง $Na_2B_4O_7 . 10H_2O$ 9.5342 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับเป็น 500 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร ได้สารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ นำไปปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้พีเอชที่ต้องการ คือพีเอช 8-10 โดยเทสารละลายโซเดียมบอเรทบัฟเฟอร์ประมาณ 30 มิลลิลิตร ปรับด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์จนได้พีเอช 8-10 แล้วเทใส่ขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นจนถึงขีด เขย่าให้เข้ากัน

3. สารละลายซิตริกฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Citric phosphate buffer) 0.05 โมลาร์

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

สาร B : ละลาย $Na_2HPO_4 . 7H_2O$ 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

เตรียมพลาสมินจากพลาสมินที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น 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 1 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 2 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อยลิ่มเลือด 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 กับค่าเฉลี่ยของขนาดวงใสที่เกิดขึ้นจากการย่อยลิ่มเลือดมาเขียนกราฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

การคำนวณแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน

การคำนวณแอคติวิตีคำนวณโดยใช้สมการของกราฟมาตรฐาน โดยในที่นี้ใช้ 2 สมการ ในการคำนวณคือ

1. ถ้าขนาดวงใสน้อยกว่าหรือเท่ากับ 8.65 มิลลิเมตร ให้ใช้สมการ $y = 10.682x + 3$
2. ถ้าขนาดวงใสมากกว่า 8.65 มิลลิเมตร ให้ใช้สมการ $y = 0.575x + 8.65$

โดยที่ y เป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส

X เป็นแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน (ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร)

ตัวอย่างการคำนวณ

ตัวอย่างที่ 1 หาแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินในกะปิ (จากหัวตะเข้)

ขนาดวงใส เท่ากับ 9.38 มิลลิเมตร จึงใช้สมการ $y = 0.575x + 8.65$

แทนค่าในสมการได้

$9.38 = 0.575x + 8.65$

$x = 1.27$ ยูนิตพลาสมินต่อมิลลิลิตร

ในสารสกัดเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปิตลาดหัวตะเข้ 1 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ 1.27 ยูนิตพลาสมิน

ดังนั้นสารสกัดของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากกะปิตลาดหัวตะเข้ 42 มิลลิลิตร มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ $1.27 \times 42 = 53.34$ ยูนิตพลาสมิน

แสดงว่าในตัวอย่าง 10 กรัม มีเอนไซม์ย่อยไฟบริน เท่ากับ 53.34 ยูนิตพลาสมิน

ถ้าตัวอย่าง 1 กรัม มีเอนไซม์ย่อยไฟบรินเท่ากับ $\frac{53.34}{10} = 5.33$ ยูนิตพลาสมินต่อกรัมตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง.
การคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ เมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ย่อยไฟบริน ที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 4 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดองตลาดหัวตะเข้ 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 5 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 จากตัวอย่างปูดอง 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 เมื่อทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ย่อยไฟบริน ที่พีเอชต่าง ๆ

ตารางที่ 6 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจากปูดอง 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 7 ค่าเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพันธ์ของเอนไซม์ย่อยไฟบรินจาก กะปิ 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

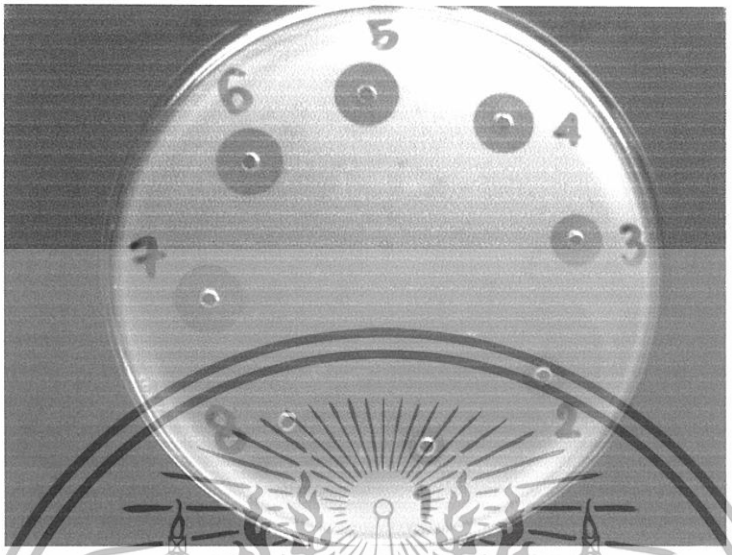
การคำนวณเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพันธ์

กำหนดให้พีเอชที่มีแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบรินมากที่สุดมีเปอร์เซ็นต์แอคติวิตีสัมพัทธ์เท่ากับ 100 เช่นจากตัวอย่างปูดองที่พีเอช 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

ภาคผนวก ฉ.

ภาพผลการทดลองและตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน



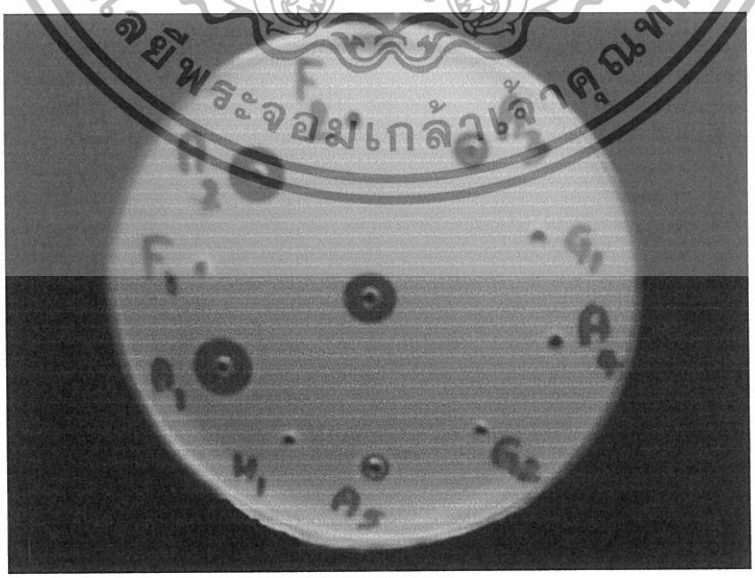
รูปที่ 1 การวัดแอคติวิตีของพลาสมินเพื่อใช้เป็นกราฟมาตรฐาน โดยวิธีไฟบรินเพลท

หมายเหตุ : 1 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 0.25 U/ml 5 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 3.0 U/ml

2 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 0.50 U/ml 6 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 4.0 U/ml

3 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 1.0 U/ml 7 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 5.0 U/ml

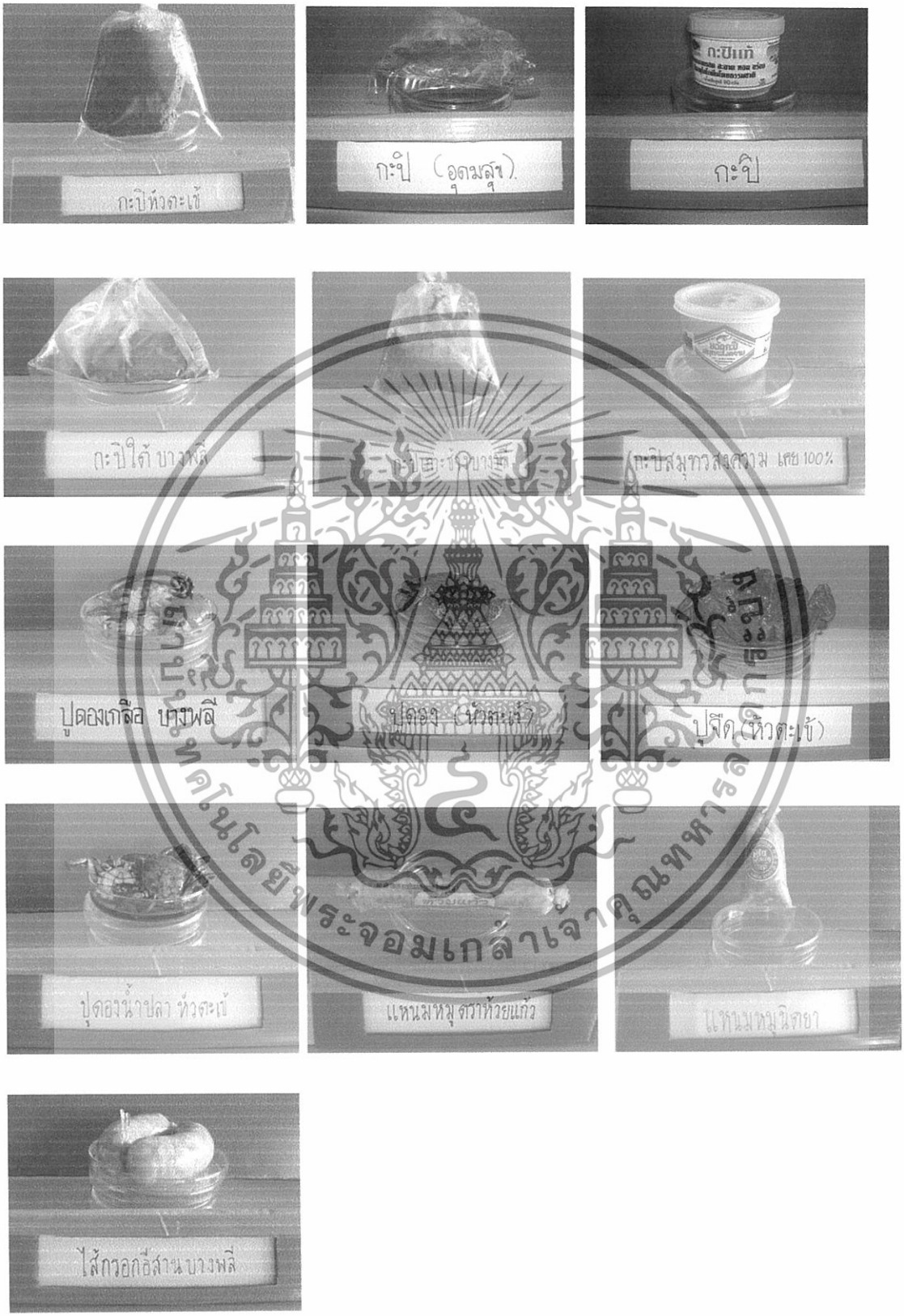
4 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 2.0 U/ml 8 = พลาสมินที่มีความเข้มข้น 0 U/ml



รูปที่ 2 ตัวอย่างผลการทดสอบแอคติวิตีของเอนไซม์ย่อยไฟบริน โดยไฟบรินเพลท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 3 ตัวอย่างอาหารที่ตรวจพบจำนวน 14 ตัวอย่าง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

1. นางสาวมณีพร อัครพลกุล
เกิดเมื่อวันที่ 1 ธันวาคม พ. ศ. 2525
ภูมิลำเนา จังหวัด กรุงเทพมหานคร
การศึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิวิทยาศาสตร์บัณฑิต ปี พ. ศ. 2549
จากโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
05-1407879

2. นางสาวสุกัญญา สุขสวัสดิ์
เกิดเมื่อวันที่ 28 กันยายน พ. ศ. 2526
ภูมิลำเนา จังหวัด บุรีรัมย์
การศึกษา จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วุฒิวิทยาศาสตร์บัณฑิต ปี พ. ศ. 2549
จากโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
04-0124685

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้