ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า

Types and Properties of Enzymes from Tuna Viscera

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์

Thiraratana Prachumratana

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biotechnology

Prince of Songkla University

2541

ก

เลขหมู่ QP609.P76 ฐ64 2541 ก.2

Bib Key 145491

ชื่อวิทยานิพนธ์ ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า

ผู้เขียน นางสาวฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2540

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูนสุข ประเสริฐสรรพ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรรณา ชูฤทธิ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า
ผู้เขียน	นางสาวฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2540

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของพันธุ์ปลาทูน่าและบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (Skipjack tuna : *Katsuwonus pelamis*)พันธุ์ครีบเหลือง (Yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) และพันธุ์โอดำ (Tonggol tuna : *Thunnus tonggol*) ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส พบว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุดเมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอช 10.0 โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสเท่ากับ 72.17 และ 1.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสและไลเปสเท่ากับ 3.089 และ 0.054 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ โดยเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอดำให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเครื่องในแต่ละส่วน (กระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อน) ของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าม้ามเป็นแหล่งที่ดีที่สุดสำหรับเอนไซม์โปรติเอส โดยเอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ (53.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอส (2.56 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) สูงสุด รองลงมาได้แก่ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ แหล่งที่ดีที่สุดของไลเปสได้จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง โดยแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือ ตับ ม้าม และกระเพาะ ตามลำดับ

การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ พันธุ์ครีบเหลือง และพันธุ์โอดำ คือ พีเอช 10.0, 10.0 และ 9.5 ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดมีความคงตัวต่อพีเอชดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (พีเอช 9.5 - 10.0) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปส

จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ คือ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดมีความคงตัวต่ออุณหภูมิในช่วง 37 - 40 องศาเซลเซียส โดยเอนไซม์สกัดจากม้ามของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุด แอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์สกัดจากม้ามลดลงเหลือครึ่งหนึ่งหลังการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 120 และ 90 นาที ตามลำดับ

Thesis Title	Types and Properties of Enzymes from Tuna Viscera
Author	Miss Thiraratana Prachumratana
Major Program	Biotechnology
Academic Year	1997

Abstract

The effects of tuna species : skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*), yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) and tonggol tuna (*Thunnus tonggol*) and pH of the buffer used in the extraction of enzyme from the whole tuna viscera on the activities of protease and lipase were studied. The enzyme extracted from the whole viscera of the yellowfin tuna exhibited their maximum activities at pH 10.0 with the highest values of protease and lipase of 72.17 and 1.26 U/ml, respectively. The enzymes extracted from the tonggol tuna viscera showed the lowest of protease and lipase activities. Comparison on the enzyme activities of the individual viscera organ (stomach, spleen, liver, pancreas) from all three tuna species was carried out. Spleen was found to be the best source for protease with the enzyme extracted from the yellowfin tuna demonstrated the highest protease activity (53.38 U/ml) as well as the specific activity (2.56 U/mg protein) followed by those from liver, pancreas and stomach, respectively. The best source for lipase was the pancreas of the yellowfin tuna, giving the highest lipase activity and specific activity of 0.72 U/ml and 0.03 U/mg protein, respectively. Lower activities were obtained from the liver, spleen and stomach, respectively.

Studies on the properties of the enzymes extracted from viscera of three tuna species revealed that the optimum pH for protease and lipase activities from the whole or individual viscera organ of skipjack tuna, yellowfin tuna and tonggol tuna were at pH 10.0, 10.0 and 9.5, respectively. The enzymes were stable at their optimum pH for enzymes activities (pH 9.5 - 10.0). The optimum temperature for activities of protease and lipase

from the whole or individual viscera organ of all these three tuna species were at 50 °C and 60 °C, respectively but their thermal stability were at 37 - 40 °C. In addition, enzyme extracted from spleen show the best thermal stability. The activity of protease and lipase from enzyme extracted decreased to a half, after they were incubated at 60 °C for more than 120 and 90 min., respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำและคำปรึกษาในการค้นคว้าวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณา ชูฤทธิ์ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำแนะนำต่างๆ และช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อมรรัตน์ พงศ์ดารา กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนการค้นคว้าวิจัยและทุนผู้ช่วยสอน บริษัททรอปิคอลแคนนิ่ง จำกัด และบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด มหาชน ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านวัตถุดิบ

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนด้านการเงินและกำลังใจด้วยดีตลอดมา ขอบคุณนักศึกษา เจ้าหน้าที่ และบุคลากร คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ให้ความช่วยเหลือ และขอบคุณทุกๆท่านที่ไม่ได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ ที่ให้กำลังใจและมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(13)
บทที่	
1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	4
1 ปลาทูน่า	4
1.1 พันธุ์ปลาทูน่า	4
1.2 แหล่งที่อยู่ของปลาทูน่า	6
1.3 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่า	6
1.4 เครื่องในปลาทูน่า	6
2 ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องใน.	8
2.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน	8
2.2 เอนไซม์ย่อยไขมัน	16
2.3 เอนไซม์ย่อยแป้ง	17
3 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติและแอคทิวิตี้ของเอนไซม์	17
3.1 พีเอช	17
3.2 อุณหภูมิ	19
3.3 ปัจจัยอื่นๆ	20

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
วัตถุประสงค์	22
2 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	23
วัสดุ	23
อุปกรณ์	23
วิธีการศึกษา	26
1 ผลของพันธุ์ปลาและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเครื่องในรวม	26
2 ผลของเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์	28
3 คุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่า	28
3.1 พีเอชที่เหมาะสม	28
3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม	30
3.3 ความคงตัวต่อพีเอช	30
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ	30
3 ผลและวิจารณ์	31
1 ผลของพันธุ์ปลาและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเครื่องในรวม	31
1.1 ข้อมูลทั่วไป	31
1.2 ผลของพันธุ์ปลาและพีเอชของบัฟเฟอร์	31
2 ผลของเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์	36

สารบาญ (ต่อ)

	หน้า
3 คุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่า	48
3.1 พีเอชที่เหมาะสม	49
3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม	54
3.3 ความคงตัวต่อพีเอช	60
3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ	81
4 สรุป	105
ข้อเสนอแนะ	106
เอกสารอ้างอิง	107
ภาคผนวก	115
ก วิธีการวิเคราะห์	115
1 การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส	115
2 การคำนวณแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส	116
3 ปริมาณโปรตีน	116
ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์	118
1 สารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์	118
2 สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์	119
3 สารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์	120
4 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของโปรติเอส	121
5 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของอะไมเลส	121
ค ตารางผลการทดลอง	122
ประวัติผู้เขียน	137

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ	10
2	สารละลายสกัดชนิดต่างๆที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อกุ้ง	12
3	น้ำหนักปลาทั้งตัวและน้ำหนักเครื่องในปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์	32
4	เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตตี้จำเพาะสูงสุดของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	39

ตารางภาคผนวกที่

ค1	ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	122
ค2	ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	123
ค3	ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	124
ค4	น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	125
ค5	น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ที่สกัดจากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ	126

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค6 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 127

ค7 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 128

ค8 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 129

ค9 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 130

ค10 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง(*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 131

ค11 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 132

ค12 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 133

ค13 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 134

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

ค14 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 135

ค15 น้ำหนักเครื่องในปลา ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ 136

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	รูปร่างและลักษณะปลาทูน่าชนิดต่างๆ	5
2	ลักษณะเครื่องในปลาทูน่า	7
3	เครื่องในรวมของปลาทูน่า	27
4	เครื่องในของปลาทูน่าแต่ละส่วน	29
5	สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่า	33
6	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	34
7	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	35
8	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	37
9	ผลของพันธุ์ปลาทูน่าต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) ที่สกัดจากเครื่องในรวมปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ	38
10	สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในส่วนต่างๆของปลาทูน่า	41
11	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	42
12	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	43

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
13	ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	45
14	ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	50
15	ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	51
16	ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	53
17	ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	56
18	ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	57
19	ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	59
20	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	62

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
21	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	63
22	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	64
23	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	66
24	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	67
25	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	69
26	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	70
27	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	71
28	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	72
29	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	74
30	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	75
31	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	77
32	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	79

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
33	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	79
34	ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	80
35	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	82
36	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	83
37	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	85
38	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	86
39	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)	87
40	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	89
41	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	91
42	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	92
43	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	94
44	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)	95

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
45	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	97
46	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	98
47	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	100
48	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	101
49	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)	103
รูปภาคผนวกที่ ก1		115
รูปภาคผนวกที่ ก2		117

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋องเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปที่นำรายได้เข้าประเทศได้มากเป็นอันดับหนึ่งของโลกติดต่อกันมาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 โดยในปี พ.ศ. 2536 มีการส่งออกปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋องจำนวน 229,904 ตัน มูลค่า 13,063 ล้านบาท และในครึ่งปีแรกของปี พ.ศ. 2537 มีปริมาณ 137,184 ตัน มูลค่า 7,352 ล้านบาท (กองเศรษฐกิจกรมประมง, 2537) แต่อุตสาหกรรมแปรรูปปลาทูน่าบรรจุกระป๋องของประเทศไทยต้องนำเข้าวัตถุดิบที่ใช้ในการแปรรูปจากต่างประเทศร้อยละ 80 - 90 (กสิกรไทย, 2534) ทั้งนี้เพราะทรัพยากรสัตว์น้ำในอ่าวไทยเสื่อมโทรมและสัตว์น้ำมีขนาดเล็กไม่เหมาะต่อการแปรรูป ปลาทูน่าที่นำเข้าเป็นปลาทูน่าพันธุ์โอแถบร้อยละ 84 พันธุ์ครีบเหลืองร้อยละ 9 พันธุ์ครีบยาวร้อยละ 6 ที่เหลือเป็นพันธุ์อื่นๆ แหล่งนำเข้าที่สำคัญได้แก่ ไต้หวัน สหรัฐอเมริกา ญี่ปุ่น สิงคโปร์ สเปน อินโดนีเซีย และเกาหลีใต้ เป็นต้น โดยนำเข้ามาในรูปปลาสดแช่เย็นและปลาสดแช่แข็ง (กรุงศรีอยุธยาจำกัด มหาชน, 2537) มีรายงานว่า 1 ใน 4 ของวัตถุดิบปลาทูน่าแช่แข็งทั้งหมดมาจากไต้หวัน เกาหลี และญี่ปุ่น ตามลำดับ นอกจากปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบภายในประเทศแล้ว ปัญหาค่าแรงที่เพิ่มขึ้นทำให้ราคาต้นทุนการผลิตของอุตสาหกรรมปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋องของไทยสูงกว่าประเทศคู่แข่ง เช่น มาเลเซีย เวียตนาม อินโดนีเซีย ดังนั้นผู้ผลิตจึงจำเป็นที่จะต้องพัฒนารูปแบบของผลิตภัณฑ์ต่างๆให้สอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภคและพยายามลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้วัตถุดิบให้เกิดประโยชน์มากที่สุด (กองเศรษฐกิจกรมประมง, 2537)

อุตสาหกรรมปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋องจะเกิดวัสดุเศษเหลือแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ วัสดุเศษเหลือส่วนที่เป็นของแข็งมีประมาณร้อยละ 25 - 30 ของวัตถุดิบทั้งหมด ได้แก่ หัวปลา เครื่องในปลา กระดูก หนัง เศษเนื้อดำ เป็นต้น ส่วนวัสดุเศษเหลือที่เป็นของเหลวมีปริมาณร้อยละ 35 ของวัตถุดิบทั้งหมด ได้แก่ น้ำเลือด น้ำนึ่งปลาทูน่า การใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือเหล่านี้ได้แก่ การนำไปผลิตอาหารสัตว์ ปลาป่น อาหารแมวบรรจุกระป๋อง

น้ำสกัดเข้มข้นจากปลา น้ำมันปลา เจลาติน (กองพัฒนาอุตสาหกรรม, 2534) และการนำน้ำนึ่งปลาทูน่าไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (สุวิทย์ สุวรรณโณ, 2535) ตลอดจนการผลิตโปรตีนปลาสกัดจากหัวและเครื่องในปลา (จิตรวดี ไตรเรกพันธุ์, 2540)

Shin และ Zall (1986) เสนอว่า ประโยชน์อย่างหนึ่งของวัสดุเศษเหลือทิ้งจากปลาคือการนำส่วนเครื่องในปลามาสกัดเอนไซม์ย่อยโปรตีน ปัจจุบันมีการศึกษาและนำเอนไซม์มาใช้ประโยชน์มากขึ้น ในปี 2534 การซื้อขายเอนไซม์ในตลาดโลกโดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมมีปริมาณ 2 ใน 3 ของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมทั้งหมด (Fox, *et al.*, 1991) เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมมาจากหลายแหล่ง เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ รวมทั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สกัดได้จากอวัยวะของสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลอื่นๆ ปัจจุบันทั่วโลกสนใจเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สกัดได้จากสัตว์น้ำมากยิ่งขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลมีความหลากหลายของสายพันธุ์ แหล่งที่อยู่ และสภาพแวดล้อม ซึ่งจะก่อให้เกิดชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ที่แตกต่างกันไป สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ (Haard,*et al.*, 1981) อีกทั้งเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากสัตว์น้ำมีคุณสมบัติเด่นจำเพาะหลายประการ เช่น มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์และอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูง ทำงานได้ดีและคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ คงตัวได้ดีที่พีเอชเป็นกลางและด่าง และใช้เวลาในการย่อยสลายสั้น เป็นต้น (Haard and Simpson, 1994)

การนำเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลาค็อด (*Gadus morhua*) ในเขตแอตแลนติก และเอนไซม์เปปซินจากปลาค็อด (*Breogadus saida*) ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนย (Brewer, *et al.*,1984) อีกทั้งมีการผลิตเอนไซม์เปปซินทางการค้าจากปลาค็อด (*Gadus morhua*) (Gildbery and Almas, 1986) และการใช้เอนไซม์ทริปซินจากปลาค็อด (*Gadus ogac*) ในการผลิตกรดอะมิโนชนิดต่างๆ เป็นต้น (Simpson and Haard, 1984) นอกจากนี้อาจจะสามารถสกัดเอนไซม์ชนิดอื่นๆ จากเครื่องในปลา เช่น เอนไซม์ย่อยไขมัน เอนไซม์ย่อยแป้ง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้เช่นกัน

เนื่องจากวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋อง มีส่วนของเครื่องในปลาปริมาณร้อยละ 7 - 8 (Prasertsan, *et al.*, 1988) ดังนั้นการศึกษาการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่าและคุณสมบัติของเอนไซม์ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆได้ จึงเป็นแนวทางการศึกษาที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

ตรวจเอกสาร

1. ปลาทูน่า

1.1 พันธุ์ปลาทูน่า

ตามหลักของ Romer ปลาทูน่าจัดอยู่ในครอบครัว *Scombroidae* วงศ์ *Thunnidae* (วิมล เหมะจันทร์, 2528) รูปร่าง ลักษณะและชนิดของปลาทูน่าพันธุ์ต่างๆที่นิยมนำมาแปรรูปในประเทศไทย (รูปที่ 1) ได้แก่ (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531)

1. ปลาทูน่าครีบยาว (albacore : *Thunnus alaiunga*)

ความยาวของลำตัวปลาที่พบโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 40 - 100 เซนติเมตร ความยาวสูงสุดที่เคยพบ 137 เซนติเมตร ปลายครีบหางสีขาว เนื้อสีขาว เป็นที่ต้องการของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล

2. ปลาทูน่าครีบเหลือง หรือปลาโอกราน (yellowfin tuna : *Thunnus albacares*)

ความยาวเฉลี่ย 50 - 150 เซนติเมตร บริเวณส่วนหัวสีน้ำเงินดำ พื้นท้องสีเหลืองและสีเงิน มีจุดประทั่วไป

3. ปลาโอแถบ (skipjack tuna : *Katsuwonus pelamis*)

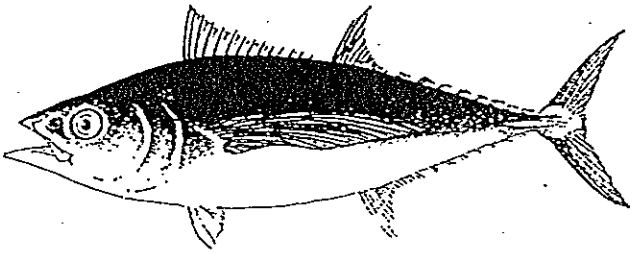
ลำตัวค่อนข้างกลม ลำตัวยาวเฉลี่ย 40 - 80 เซนติเมตร เป็นปลาขนาดกลาง มีแถบยาวสีดำปนน้ำเงินและม่วงบริเวณลำตัวด้านท้อง เริ่มจากครีบใต้ท้องจนถึงบริเวณหาง บริเวณลำตัวด้านบนมีจุดสีดำเล็กๆ กระจายตลอดความยาวของลำตัว ปลาชนิดนี้สั่งเข้าจากต่างประเทศเพื่อการแปรรูปจำนวนมาก

4. ปลาทูน่าหางยาว หรือ ปลาโอดำ (tonggol tuna : *Thunnus tonggol*)

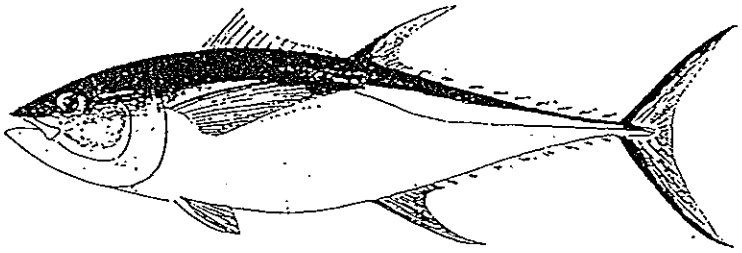
มีขนาดเล็ก ขนาดที่พบโดยทั่วไปอยู่ในช่วง 40 - 70 เซนติเมตร ลำตัวค่อนข้างกลม สีน้ำเงินเข้มเกือบดำ พื้นท้องด้านข้างสีขาวปนสีเงิน มีจุดรูปไข่ด้านล่างลำตัวยาวเกือบจรดหาง อาจมีสีเขียวอมเหลืองที่บริเวณท้องใต้แนวครีบอกลงมา ครีบหางสีดำ ลักษณะสำคัญคือเนื้อปลามีสีค่อนข้างขาว

5. ปลาโอแกลบ หรือ โอขาว (frigate tuna : *Auxis thazard*)

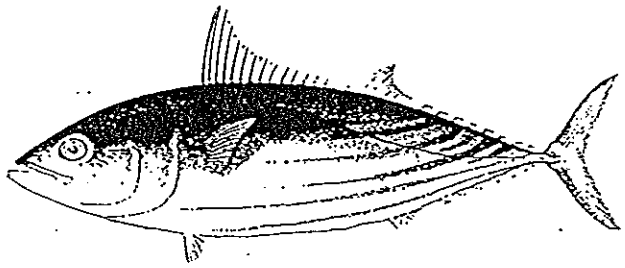
ปลาชนิดนี้มีหัวสีน้ำเงินดำหรือเกือบดำ มีลายดำสั้นๆพาดเฉียงเริ่มตั้งแต่บริเวณครีบหลังอันแรก มีความยาว 25 - 40 เซนติเมตร



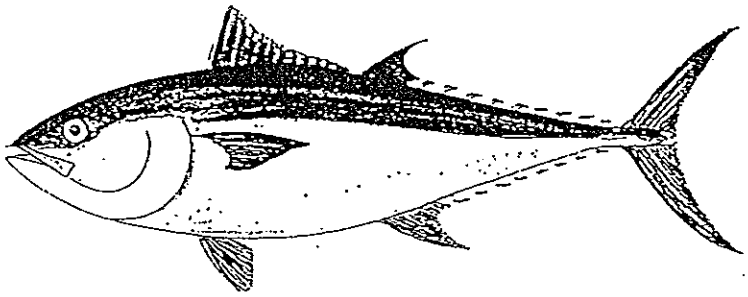
1. ปลาทูน่าครีบยาว (albacore : *Thunnus alaiunga*)



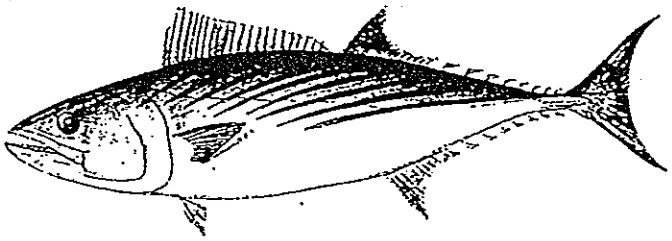
2. ปลาทูน่าครีบเหลือง (yellowfin tuna : *Thunnus albacares*)



3. ปลาโอแถบ (skipjack tuna : *Katsuwonus pelamis*)



4. ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ หรือหางยาว (tonggol tuna : *Thunnus tonggol*)



5. ปลาโอแกลบ หรือโอขาว (frigate tuna : *Auxis thazard*)

รูปที่ 1 รูปร่างและลักษณะปลาทูน่าชนิดต่างๆ

ที่มา : Collete และ Nauen (1983 อ้างโดย วิมล เหมะจันทร์, 2528)

1.2 แหล่งที่อยู่ของปลาทูน่า

ปลาทูน่าจัดเป็นปลาผิวน้ำ (Epipelagic) คือปลาที่หากินเป็นฝูงมีการเคลื่อนที่ว่องไว มีกล้ามเนื้อแข็งแรง อาศัยทั้งบริเวณชายฝั่งและเขตน้ำลึก กินอาหารประเภทแพลงค์ตอน (plankton) ปลาทูน่าบางพันธุ์กินปลาขนาดเล็ก ปลาหมึก และกุ้งเป็นอาหาร (วิมล เหมะจันทร์, 2528)

Chullasorn และ Martosubroto (1986) รายงานว่า ปลาทูน่าอาศัยอยู่ในน่านน้ำรอบๆ อ่าวมะนิลา ทะเลชวา อ่าวไทย ชายฝั่งทะเลอันดามัน โดยพบว่าชายฝั่งอันดามันเป็นแหล่งที่สำคัญของปลาทูน่า

1.3 องค์ประกอบทางเคมีของปลาทูน่า

องค์ประกอบทางเคมีของปลาแตกต่างกันในแต่ละสกุลและชนิดของปลา ปลาทั้งตัวประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน เกลือแร่ (เถ้า) และน้ำ (ความชื้น) มีค่าเฉลี่ยร้อยละ 19.0 5.0 1.2 และ 74.8 ตามลำดับ (Heen and Kreuzer, 1962) และในปลาชนิดเดียวกันพบว่ามีหลายปัจจัยที่ทำให้องค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน เช่น อายุ เพศ ฤดูกาลที่จับ ความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว ความแตกต่างตามตำแหน่งทางสรีรวิทยาหรือตำแหน่งของกล้ามเนื้อในตัวปลา

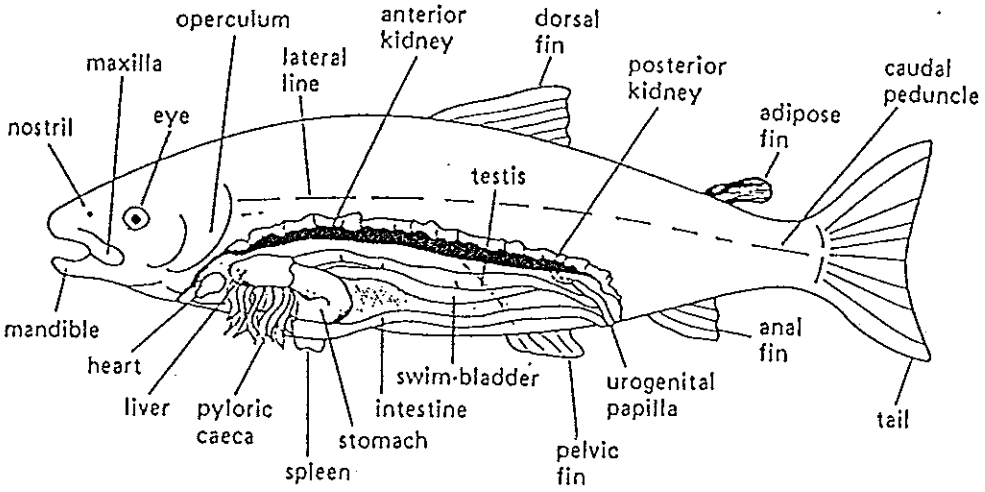
ปลาทูน่าจัดเป็นปลาที่มีไขมันต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 5) แต่มีปริมาณโปรตีนสูง (มากกว่าร้อยละ 20) (Heen and Kreuzer, 1962) Nettleton (1985) รายงานว่า องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลาทูน่าพันธุ์โอแถบประกอบด้วย โปรตีนร้อยละ 25.6 ความชื้นร้อยละ 64.7 เถ้าร้อยละ 1.5 และไขมันร้อยละ 0.6 - 18.7

1.4 เครื่องในปลาทูน่า

เครื่องในปลาทูน่า (รูปที่ 2) ประกอบด้วย (วิมล เหมะจันทร์, 2528)

ก. กระเพาะอาหาร อยู่ในตำแหน่งต่อจากหลอดคอ ปลามีกระเพาะอาหารเป็นรูปถุงยาวก้นแคบ ส่วนมากกระเพาะอาหารมีสีน้ำตาลอ่อน โดยกระเพาะอาหารจะทอดยาวไปตามความยาวของลำตัวปลา ผิวภายในเป็นรอยย่นถี่และมีต่อมเล็กทำหน้าที่ขับน้ำย่อยอยู่เป็นจำนวนมาก

ข. ลำไส้เล็ก จะเป็นอวัยวะในระบบย่อยที่ยาวกว่าอวัยวะอื่นๆ ลักษณะโดยทั่วไปอาจจะเป็นท่อเหยียดตรงหรือม้วนซ้อนทับกันเป็นก้อนใหญ่ ภายในลำไส้เล็กมีเยื่อผิวที่ยกขึ้นเป็นสันแนวตามความยาว ทำให้เกิดช่องเล็กๆจำนวนมาก



รูปที่ 2 ลักษณะเครื่องในปลาทูน่า

ที่มา : ธำรงค์ อมรสกุล (2531)

ค. ลำไส้ใหญ่ อยู่ต่อจากลำไส้เล็กตอนปลายซึ่งจะมีรอยกิ่วคอดเล็กลงอีก ผิวภายในย่นถี่กว่าลำไส้เล็ก ปลากินพืชเป็นอาหารจะมีท่อทางเดินอาหารยาวกว่าปลากินเนื้อ

ง. ตับ เป็นต่อมขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของช่องท้อง มีสีน้ำตาลเหลืองหรือดำปนแดง มีลักษณะเป็นพู (loop) แต่ละพูมีความยาวไม่เท่ากัน

จ. ถุงน้ำดี มีลักษณะเป็นถุงกลมหรือยาว สีเขียวเข้มและมีผนังบางใส ถุงนี้ฝังอยู่ในตับติดต่อกับตับทางท่อซิสดิก (cystic duct) ไปสู่ลำไส้เล็ก โดยส่วนมากปลาทะเลมักมีถุงน้ำดีขนาดเล็ก

ฉ. ไส้ติ่ง เป็นต่อมมีลักษณะคล้ายนิ้วมือเป็นถุงตันมีจำนวนมาก พบอยู่ส่วนท้ายของกระเพาะอาหารหรือบริเวณที่ติดกับลำไส้เล็กตอนบน

ช. ตับอ่อน เป็นอวัยวะสร้างน้ำย่อยมีสีครีม ตั้งอยู่ส่วนท้ายของกระเพาะอาหารหรือใกล้ไส้ติ่ง และมีท่อขนาดเล็กติดต่อกับลำไส้เล็กบริเวณท่อนำดี ตับอ่อนทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยต่างๆ

โดยทั่วไปเครื่องในปลามีน้ำหนักตับร้อยละ 4 - 9 ของน้ำหนักตัว ส่วนเครื่องในปลาทูน่ามีน้ำหนักตับร้อยละ 1 ของน้ำหนักตัว (Stansby, 1967)

2. ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องใน

2.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzyme)

เอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่สุดในกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท ได้แก่ อุตสาหกรรมเนยแข็ง เบียร์ ไวน์ เนื้อสัตว์ ธัญญพืช การฟอกหนัง อุตสาหกรรมผงซักฟอก ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ไข่และผลิตภัณฑ์จากไข่ และอาหารสัตว์ เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

<u>คุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีน</u>

Loffler (1986) กล่าวว่า เอนไซม์ย่อยโปรตีนทำการย่อยสลายสารตั้งต้นที่ประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ต่อเป็นโมเลกุลยาวให้เป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลงหรือกรดอะมิโนซึ่งเซลล์สามารถดูดซับได้ เอนไซม์มีคุณสมบัติเป็นสารประกอบโปรตีน ดังนั้นในการสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยโปรตีนจึงจำเป็นที่จะต้องสังเคราะห์ในรูปที่ไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้ และจะสามารถดำเนินกิจกรรมได้ก็ต่อเมื่อถูกเร่งปฏิกิริยาด้วยโลหะหรือกระบวนการย่อย

ตัวเอง (autocatalytic process) ตัวอย่างเช่น เปปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่เกิดขึ้นในกระเพาะลูกวัวอยู่ในรูปเปปซิโนเจนแล้วเป็นเปปซินโดยขบวนการย่อยตัวเอง

การแบ่งชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลอาจจะแบ่งตามหลักเกณฑ์ดังนี้ เอนไซม์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับเอนไซม์โปรติเอสเรียกว่า trypsin-like, chymotrypsin-like แบ่งตามพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ แบ่งตามความจำเพาะต่อสับสเตรต และแบ่งตามกลไกการเร่งปฏิกริยา (Haard and Simpson,1994)

ตามหลักของ Enzyme Commission of the International Union of Applied Biochemists แบ่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนออกเป็น ซีรีนโปรติเอส (serine protease) แอซิด-โปรติเอส (acid or aspartate protease) ไธออลหรือซีสทีนโปรติเอส (thiol or cystein protease) และเมทาลโลโปรติเอส (metallo protease) (Haard and Simpson, 1994) ตัวอย่างของเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำได้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม ดังตารางที่ 1

Meinke และคณะ (1972) แบ่งเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากปลาตามแหล่งที่มีของเอนไซม์โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

1. เอนไซม์จากเครื่องในปลาและทางเดินอาหาร (gut enzyme หรือ autolytic enzyme) เช่น ทริปซิน, ไคโมทริปซิน, เปปซิน คุณสมบัติของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เป็นเอนไซม์เอนโดเปปติเดส ถูกยับยั้งด้วย DFP (diisopropyl-phosphorofluoridate) สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชมากกว่า 7 (พีเอช 7 - 11) ดังนั้นการสกัดโปรตีนในสภาวะที่เป็นด่างโดยเฉพาะที่พีเอช 10.0 จะเสริมแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ในเครื่องในปลาและทางเดินอาหาร

2. เอนไซม์จากเนื้อเยื่อ (tissue enzyme) ได้แก่ คาเทปซิน มีคุณสมบัติคือ มีช่วงพีเอชของการทำปฏิกริยาการย่อยสลายในช่วงพีเอชน้อยกว่า 7 โดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมระหว่าง 2 - 4 ดังนั้นการสกัดโปรตีนในสภาวะที่เป็นกรดโดยเฉพาะที่พีเอช 3.0 จะเสริมแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเนื้อเยื่อ

Doke และ Ninjoor (1987) ศึกษาการสกัดเอนไซม์จากกล้ามเนื้อกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้สารละลายในการสกัด 10 ชนิด (ตารางที่ 2) พบว่าการใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด (642 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 8.0 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และพบว่า

ตารางที่ 1 การจำแนกเอนไซม์โปรติเอสจากสัตว์น้ำ

Group	Examples	Sources	Reference(s)
Serine	trypsin	capelin	Hjelmeland and Raa (1982)
		catfish	Yoshinaka et al.,(1984)
		cod	Simpson,Simpson and Haard(1989);
			Simpson and Haard (1984a,b);
			Overnell (1973)
		cunner	Simpson and Haard (1985a);
		goldfish	Jany (1975)
		sardine	Murakami and Noda (1981)
		starfish	Chen, Yan and Chen (1978)
	chromotrypsin	capelin	Kalac (1978)
		herring	Kalac (1978)
		dogfish	Ramakrishna,Heltin and Atallah (1987)
Aspartyl /	pepsin	cod	Squires, Haard and Feltham (1986a,b);
acid			Arunchalam and Haard (1985)
		dogfish	Merrett,Bar-Eli and Van Vunakis (1969)
		hake	Sanchez-Chiang and Ponce (1981)
		Salmon	Fruton and Bergmann (1940)
		trout	Owen and Wiggs (1971);
			Twinning et al.,(1983)
		tuna	Tanji, Kageyama and Takahasi (1988)
	gastricin	hake	Sanchez-Chiang and Ponce (1981)
		seal	Shamsuzzaman and Haard (1984,1983)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Group	Examples	Sources	Reference(s)
Cysteine/	cathepsin	carp	Hara, Suzamatsu and Ishihara (1988)
thiol		cod	Schmitt and Siebert (1967)
		herring	Schmitt and Siebert (1967)
		sole	Schmitt and Siebert (1967)
		flounder	Schmitt and Siebert (1967)
		salmon	Ting,Mongmery and Anglemier (1968)
		squid	Hameed and Harrd (1985)
		tilapia	Sherekar, Gore and Hinjor (1988)
		mussel	Zeef and Dennison (1988)
Metallo	collagenase	crab	Grant, Sacchettini and Welgus (1987); Eisen and Jeffrey (1969)
		rockfish	Bracho and Haard (1991)
		lobster	Chen (1992)
	calpains	cod	Gill (1992)
		herring	Gill (1992)
		hake	Gill (1992)
		salmon	Gill (1992)

ที่มา : Haard และ Simpson (1994)

เคซีนเป็นสับสเตรตที่เหมาะสมที่สุดสำหรับอัลคาไลน์โปรติเอสเมื่อเทียบกับฮีโมโกลบิน, azocasein, azocoll และ bovine serum albumin

ตารางที่ 2 สารละลายสกัดชนิดต่างๆที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากกล้ามเนื้อกุ้ง (*Penaeus indicus*)

ชนิดของสารละลาย	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)
0.5% KCl	642
0.2 M KCl (pH 7.2)	366
0.25 Sucrose + 1 mM EDTA	348
0.6 M KCl + 10 mM EDTA (pH 7.2)	240
0.05 M Tris-HCl (pH 8.0)	210
0.05 M Tris-HCl (pH 9.0)	234
0.05 M Tris-HCl + 0.2 M KCl (pH 9.0)	108
0.05 M Tris-HCl + 0.2 M KCl (pH 7.2)	204
0.05 M Phosphate buffer + 0.2 M KCl (pH 7.2)	138
0.05 M Borate buffer + 0.2 M KCl (pH 8.0)	198

ที่มา : Doke และ Ninjoor (1987)

Shin และ Zall (1986) ศึกษาประเภทของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากส่วนของไส้ติ่ง (pyloric caeca) ของเครื่องในปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (*Gadus morhua*) ตามพีเอชที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ โดยการใช้บัฟเฟอร์ 3 ชนิด คือ ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 2.0 - 7.0, ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 - 9.0 และคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนต บัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 - 11.0 ตามลำดับ พบว่าเอนไซม์ที่ได้จัดเป็นซีรีน โปรติเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง หลังจากผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการผ่าน Biogel P-100 gel chromatography พบว่าเอนไซม์ที่ได้เป็นชนิด trypsin-like enzyme มีน้ำหนักโมเลกุล 24,000 ดาลตัน อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 48 ^{0}ช

และพีเอช 9.6 ตามลำดับ เอนไซม์มีแอคทิวิตี้สูงสุดเท่ากับ 1,800 $Cu.ml^{-1}$ และ 670 $HU.ml^{-1}$ เมื่อใช้เคซีนและฮีโมโกลบินเป็นสับสเตรต ตามลำดับ

Benediktsson (1987 อ้างโดย Stefansson and Steingrimsdottir, 1989) รายงานว่า สามารถสกัดและแยก trypsin like enzyme ในสภาพที่เป็นกลางและด่างจากส่วนของเครื่องในปลาค็อดซึ่งประกอบด้วยตับ ไข่ปลา และไข่อ่อน แล้วนำเอนไซม์มาทำให้เข้มข้นโดยการกรองแบบอัลตราและทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็งหรือฉีดพ่นฝอย

Asgeirsson และ Bjarnason (1991) ศึกษาเอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (Atlantic cod : *Gadus morhua*) โดยเอนไซม์สกัดมีแอคทิวิตี้ทั้งหมดเท่ากับ 4,945 ยูนิต แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 10.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน

Arunchalam และ Haard (1984) สกัดเอนไซม์เปปซินจากปลาค็อดขั้วโลก (Polar cod : *Boreogadus saida*) โดยใช้โซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.3 (2 มิลลิลิตรต่อกรัมวัตถุดิบ) ในการสกัดเอนไซม์จากส่วนของ gastric mucosa พบว่าประกอบด้วยเปปซิน 2 ชนิดคือ เปปซิน A และ B มีแอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 1260 และ 2798 ยูนิตต่อมิลลิกรัม น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 42 และ 40 กิโลดาลตัน ตามลำดับ พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองคือ พีเอช 2.0 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมเท่ากับ 37 ^{0}ซ

Gildberg และ Xian-Quan (1994) รายงานว่า น้ำปลาที่ได้จากการหมักเครื่องในปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (Atlantic cod : *Gadus morhua*) ที่มีความเข้มข้นของเกลือแกงสูงร้อยละ 20 - 25 เมื่อผ่านการกรองแบบอัลตราสามารถแยกโปรติเอสทั่วไป (general protease) และซีรินโปรติเอสซึ่งประกอบด้วย ทริปซิน ไคโมทริปซินและอีลาสเทส โดยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ในช่วงเริ่มต้นของการหมัก (2 วัน) มีแอคทิวิตี้ของโปรติเอสทั่วไปเท่ากับ 40 μmol TYR eq./g.hr (TRY = tyrosine) ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเทส เท่ากับ 5, 2.5, 0.1 μmol *p*NA eq./g.mim (*p*NA = *p*-nitroanilide) ตามลำดับ แต่หลังจากการหมัก 5 วันมีแอคทิวิตี้ของโปรติเอสทั่วไปเท่ากับ 2.2 μmol TYR eq./g.hr (TRY = tyrosine) ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเทส เท่ากับ 3.9, 2.2, 0 μmol *p*NA eq./g.mim (*p*NA = *p*-nitroanilide) ตามลำดับ เมื่อศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์จากน้ำปลาหลังจากการหมัก 5 วันที่สภาวะต่างๆได้แก่ เก็บรักษาโดยวิธีทำแห้งฉีดพ่นฝอย เก็บที่อุณหภูมิ 20 ^{0}ซ และการทำให้เอนไซม์เข้มข้นที่

อุณหภูมิ 20 และ 3 ^{0}ซ โดยเก็บรักษาเป็นเวลา 8 เดือน พบว่าการทำแห้งโดยวิธีฉีดพ่นฝอยเก็บที่อุณหภูมิ 20 ^{0}ซ และการทำให้เอนไซม์เข้มข้นเก็บที่ 3 ^{0}ซ แอคทิวิตี้สูญเสียน้อยกว่าการทำให้เอนไซม์เข้มข้นที่อุณหภูมิ 20 ^{0}ซ

Kim และคณะ (1992) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากตับอ่อน (hepatopancreas) ของกุ้ง (crayfish : *Procambarus clarkii*) พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีแอคทิวิตี้ทั้งหมดเท่ากับ 32,000 ยูนิต แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 5.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม หลังจากนั้นทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephacryl S-200 gel fitration พบว่าเอนไซม์สกัดประกอบด้วยทริปซิน 4 ชนิด ได้แก่ ทริปซิน A B C และ D มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 23.8, 27.9, 24.8 และ 31.4 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ซึ่งน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ที่สกัดได้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับน้ำหนักโมเลกุลที่สกัดได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลาชนิดอื่นๆ เอนไซม์ทริปซินทั้ง 4 ชนิดคงตัวต่อพีเอช 6.8 และพีเอช 8.1 โดยที่พีเอช 5.0 ทริปซิน A และ D ไม่สูญเสียแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เลย แต่ทริปซิน B และ C มีแอคทิวิตี้สัมพัทธ์เท่ากับ 45 และ 55 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ที่พีเอช 10.0 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของ A B C และ D เท่ากับ 50, 30, 40 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มเอนไซม์ที่พีเอช 2.0 และ 4.0 เป็นเวลา 8 ชั่วโมง พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งหมดเหลืออยู่เลย โดยเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิด มีความคงตัวต่ออุณหภูมิใกล้เคียงกัน และสามารถถูกยับยั้งปฏิกริยาด้วย TLCK (tosyl-L-lysinechloromethyl ketone, DFP (diisopropyl-phosphorofluoridate) และ PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride) เป็นต้น

Martinez และคณะ (1988) ศึกษาการทำบริสุทธิ์และคุณสมบัติของเอนไซม์จากไส้ติ่งและลำไส้ของปลาไส้ตัน (*Engraulis encrasicholus*) ที่จับได้ใน Bay of Biscay พบว่าเอนไซม์สกัดมีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทริปซินทั้งหมดเท่ากับ 202 ยูนิต แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วย DEAE-Sepharose พบว่ามีทริปซิน 2 ชนิด คือ ทริปซิน A และ B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 27 และ 28 กิโลดาลตัน ตามลำดับ แอคทิวิตี้ทั้งหมดของทริปซิน A และ B เท่ากับ 25 และ 14.1 ยูนิต และแอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 2.5 และ 4.7 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของสารยับยั้งที่ความเข้มข้นต่างๆต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์พบว่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดถูกยับยั้งด้วย benzamidine (1.3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) TLCK (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) PMSF (1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) และ SBTI (soybean trypsin inhibitor) (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ส่วน mercaptoethanol

(2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มีความสามารถในการยับยั้งแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้น้อยมาก และเอนไซม์จะคงตัวได้ดีเมื่อมีอิออนของแคลเซียม (Ca^{2+})

โดยทั่วไปน้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ทริปซินจะมีค่าระหว่าง 20 - 25 กิโลดาลตัน (Keil, 1971) แต่เอนไซม์ทริปซินที่สกัดได้จากอวัยวะของสัตว์น้ำหรือสัตว์ทะเลทั้งที่เป็นสัตว์มีหรือไม่มีกระดูกสันหลังจะมีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 24 - 30 กิโลดาลตัน เช่น ทริปซินจากกุ้ง (white shrimp : *Penaeus setiferus*) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน (Gate and Trauis, 1969) เป็นต้น

Kristjansson และ Nielson (1991) รายงานว่า ไคโมทริปซิน 2 ชนิดที่ได้จากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) โดยวิธีการสกัดเอนไซม์ใช้ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 8.1 ที่มีการเติม 0.3 โมลาร์ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ พบว่าเอนไซม์สกัดมีแอคทิวิตี้ทั้งหมดเท่ากับ 2792 ยูนิตและแอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 0.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์โดยผ่าน ion-exchange chromatography (DEAE-Separose) พบว่า ไคโมทริปซินชนิดที่ I และ II มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 28.2 และ 28.8 กิโลดาลตัน ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากปลาเทรากับไคโมทริปซินที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยใช้ Suc-AAPF-NA (Succinyl - L - Ala - L - Pro - L - Phe -*p*- nitroanilide) เป็นสับสเตรต ที่ 25 ^{0}ซ และเคซีนที่ 10 - 20 ^{0}ซ พบว่าเอนไซม์จากปลาเทรามีแอคทิวิตี้ดีกว่าเอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากปลาเทราจะมีค่าสูงตามอุณหภูมิที่ปลาเทราอาศัยอยู่

Eisen และคณะ (1973) สกัดเอนไซม์คอลลาเจนเนสจากตับอ่อนของปู (Fiddler carb : *Uca pugilator*) เอนไซม์สกัดที่ได้มีแอคทิวิตี้ทั้งหมดเท่ากับ 281 x 10^{3} ยูนิต แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 125 ยูนิตต่อมิลลิกรัม เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์พบว่าประกอบด้วยเอนไซม์คอลลาเจนเนส A และ B มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 25 และ 25.7 กิโลดาลตัน โดยที่พีเอช 8.0 จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองสูงสุด

Chen และ Zall (1985) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการทำบริสุทธิ์เอนไซม์อะซิดิกโปรติเอสชนิด D-like และ B-like จากเครื่องในหอย โดยการกรองแบบอัลตราพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ได้แก่ ชนิดของแผ่นเมมเบรน (membrane) เมื่อศึกษาการใช้เมมเบรน 3 ชนิด พบว่า PM30 มีความสามารถในการกรองแบบอัลตราได้ดีกว่าการใช้ XM50 และ

PM10, พีเอชที่เหมาะสมคือ 2.5 มีประสิทธิภาพในการกรองได้ดีกว่าที่พีเอช 3.2, 4.0 และ 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 20 ^{0}ซ มีประสิทธิภาพในการกรองดีกว่าที่อุณหภูมิ 2 ^{0}ซ ความดัน 2.46 kgf.cm^{-1} มีประสิทธิภาพการกรองดีกว่า 1.05, 1.76, 3.16 kgf.cm^{-1} และอัตราการไหลเวียนที่ 360 มิลลิลิตรต่อนาที มีประสิทธิภาพการกรองดีกว่าอัตราการไหลเวียนที่ 100, 162, 200 มิลลิลิตรต่อนาที ตามลำดับ

2.2 เอนไซม์ย่อยไขมัน (Lipolytic enzyme)

แหล่งของเอนไซม์ย่อยไขมันจะพบทั้งในพืช เช่น เอนไซม์จากเม็ดละหุ่ง ในสัตว์ เช่น เอนไซม์จากตับอ่อน และจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยไขมันได้ปริมาณสูงและมีความคงตัวดี เช่น *Aspergillus niger* (Sugihara, *et al.*, 1988) เป็นต้น

เอนไซม์ย่อยไขมันจากสัตว์มีทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน ไต หัวใจ สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม เอนไซม์ย่อยไขมันจากตับอ่อนได้รับการศึกษาอย่างกว้างขว้าง โดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยไขมันจากตับสุกร เนื่องจากมีความเข้มข้นและสามารถใช้ได้หลายครั้ง นอกจากนี้ยังมีการแยกเอนไซม์ย่อยไขมันจากตับอ่อนหนู และเอนไซม์ย่อยไขมันจากตับอ่อนของโค กระบือ (Shahani, 1975)

เอนไซม์ย่อยไขมันทำหน้าที่ในการย่อยไขมันได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันและกลีเซลรอล เอนไซม์ชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกริยาได้หลายชนิดเช่น ไฮโดรไลซีส (hydrolysis) ทรานเอสเทอร์ริฟิเคชั่น (tranesterification) (ซึ่งประกอบด้วย acidolysis, alcoholysis, ester exchange และ aminolysis) และการสังเคราะห์เอสเทอร์ เป็นต้น

การนำเอนไซม์ไลเปสมาใช้ประโยชน์ เช่น ในอุตสาหกรรมเนยแข็ง เครื่องสำอาง เภสัชกรรม อุตสาหกรรมผงซักฟอกและน้ำยาทำความสะอาด

Asgeirsson และ Bjarnason (1988 อ้างโดย Stefansson and Steingrimsdottir,1989) ศึกษาชนิดของเอนไซม์ที่สกัดได้จากเครื่องในปลาค็อด พบว่าสามารถสกัด crude enzyme mixture ประกอบด้วยทริปซิน ไคโมทริปซิน และอีลาสเทส โดยมีส่วนประกอบของเอนไซม์ย่อยไขมันและเอนไซม์ย่อยแป้งในปริมาณต่ำ

2.3 เอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic enzymes)

เอนไซม์ย่อยแป้งสามารถพบในน้ำลาย ตับอ่อน ข้าวมอลต์ ข้าวบาเลย์และจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ โดยทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของไกลโคซิดิกบอนด์ (glycosidic bond) ชนิด α -(1,4) ของโพลีแซกคาไรด์ เช่น แป้ง ไกลโคเจนหรือเกิดจากการไฮโดรไลซีสของแป้งและไกลโคเจน (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

เอนไซม์อะไมเลสแบ่งออกเป็น 5 ชนิด คือ อัลฟาอะไมเลส (α - amylase หรือ alpha - -1,4 - D - glucan - glucanohydrolase), เบต้าอะไมเลส (β - amylase หรือ alpha - -1,4 - D - glucan - maltohydrolase) โดยสองชนิดแรกนี้จะสามารถย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ α -(1,4), กลูโคอะไมเลส (γ - amylase หรือ alpha - -1,4 - D - glucan - glucohydrolase), จะย่อยพันธะ α -(1,4) ได้ดีกว่าการย่อยพันธะ α -(1,6) และ α -(1,3) ส่วนพูรูลาเนส (pullulanase) และไอโซอะไมเลส (isoamylase) จะย่อยสลายพันธะ α -(1,6) เท่านั้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

อัลฟาอะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่จำเพาะกับอวัยวะเท่านั้นโดยแหล่งของอัลฟาอะไมเลสจะพบในตับอ่อนและน้ำลายเท่านั้น ส่วนกลูโคอะไมเลสจะพบทั่วไปในจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย ในจุลินทรีย์กลูโคอะไมเลสจะมีพีเอชที่เหมาะสมที่ 4.0 - 4.4 (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

การใช้ประโยชน์เอนไซม์อะไมเลสในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ ซอคโกเลต โกโก้ ขนมหวาน น้ำเชื่อม ผลิตภัณฑ์ธัญญพืช เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ผลิตภัณฑ์ขนมอบ และอุตสาหกรรมทอผ้า เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ, 2530)

3. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติและแอคทิวิตี้ของเอนไซม์

3.1. พีเอช

โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ พีเอชจะมีผลต่อการเกิดเอนไซม์-สับสเตรตคอมเพลกซ์ การแตกตัวของสับสเตรต โคแฟคเตอร์ และผลิตภัณฑ์ พีเอชจะมีผลต่อความคงตัวและแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ด้วย (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

Reece (1988) สามารถแยกอะซิดิกและอัลคาไลน์โปรติเอสจากเครื่องในปลาแซมมอน (*Salmon sarda*) และอะซิดิกโปรติเอสจากเครื่องในปลาค็อดและปลาแมคเคเรล

(*Scomber scombrus*) โดยพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของอะซิดิกโปรติเอส เท่ากับ 2.6 และ 37 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แอคทิวิตี้ของอะซิดิกโปรติเอสจากเครื่องใน ปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากับ 13.1, 3.3 และ 26 $Hb.Umg^{-1}$ protein (Hb = Haemoglobin) ตามลำดับ ส่วนอัลคาไลน์โปรติเอสจากเครื่องในปลาแซมมอนมีพีเอชและอุณหภูมิที่ เหมาะสมเท่ากับ 8.5 และ 45 ^{0}ซ ตามลำดับ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เท่ากับ 45.8 $Cas.Umg^{-1}$ protein (Cas = casein)

Doke และ Ninjsoor (1987) สกัดเอนไซม์จากกล้ามเนื้อกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้ โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วงพีเอช 4.0 - 12.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้คือ พีเอช 8.0 ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ

Shin และ Zall (1986) ศึกษาพีเอชต่อความคงตัวของแอคทิวิตี้ซีรินโปรติเอสชนิด trysin-like enzyme ที่สกัดจากส่วนไส้ติ่งของปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (*Gadus morhua*) เอนไซม์มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 24,000 ดาลตัน พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอช 9.0 - 9.6 และอุณหภูมิช่วง 46 - 48 ^{0}ซ เมื่อศึกษาความ คงตัวของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 5 - 10 เวลา 60 นาที พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์คงตัวได้ดีใน ช่วงพีเอช 8.8 - 9.6 โดยที่พีเอช 7.5 และพีเอช 10.0 เอนไซม์มีแอคทิวิตี้สัมพัทธ์มากกว่า 70 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Asgerisson และ Bjarnason (1991) สกัดไคโมทริปซิน A และ B จากปลาค็อดในเขต แอตแลนติก (Atlantic cod : *Gadus morhua*) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมในการย่อยสลาย BzTyrOEt (*N*-benzoyl-L-tyrosine ethyl ester) คือ พีเอช 7.8 แต่จากการศึกษาของ Kristjansson และ Nielson (1991) พบว่า ไคโมทริปซิน I และ II ที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 9.0 เมื่อพีเอชสูงกว่า 9.0 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ Martinez และคณะ (1988) รายงานว่า เอนไซม์สกัดจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลาไส้ตัน (*Engraulis encrasicholus*) มีพีเอชที่เหมาะสม ต่อการทำงานของเอนไซม์ทริปซินคือ พีเอช 9.0 โดยที่พีเอช 4 - 6 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลือ น้อยกว่า 15 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อใช้ BAPNA เป็นสับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 25 ^{0}ซ เวลา 30 นาที และเมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรต พบว่าแอคทิวิตี้ของทริปซินสูงสุดที่พีเอช 9.5

3.2 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกริยาเคมีโดยทั่วไป กล่าวคือมีผลต่อการละลายของสับสเตรต การแตกตัวของบัฟเฟอร์ นอกจากนี้ยังมีผลต่อการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต เอนไซม์กับโคแฟคเตอร์ และเอนไซม์กับตัวยับยั้ง อุณหภูมิยังมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (ionization of active site) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

การสกัดเอนไซม์ควรทำการสกัดที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 0 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการสกัด เช่น การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (Atlantic cod : *Gadus morhua*) โดยการใช้น้ำเย็นในอัตราส่วน 1:2 ของน้ำหนักเครื่องในต่อปริมาณน้ำ ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูงเป็นเวลา 2 นาที นำส่วนที่ปั่นได้มาเหวี่ยงด้วยเครื่องเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000xg เป็นเวลา 30 นาที (Shin and Zall, 1986)

สุนันทา ภิญญาวัธน์ (2535) รายงานว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายสภาพธรรมชาติเมื่ออุณหภูมิ 50 - 60 องศาเซลเซียส ยกเว้นจากแบคทิเรียประเภทเทอร์โมฟิลิกที่สามารถทนร้อนได้ถึง 85 องศาเซลเซียส ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ (2528) กล่าวว่า เอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเร่งปฏิกิริยา ตามปกติการเร่งปฏิกิริยาในระบบทางเดินอาหารจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40 องศาเซลเซียส

Kristjansson และ Nielson (1991) พบว่า ไคโมทริปซิน I และ II ที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) ที่พีเอช 7.5 เมื่ออุณหภูมิมากกว่า 55 องศาเซลเซียส จะมีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไคโมทริปซินทั้ง 2 ชนิดเพิ่มสูงขึ้น (มี Suc-AAPF-NA = Succinyl - L - Ala - L - Pro -L - Phe -*p*- nitroanilide เป็นสับสเตรต)

Shin และ Zall (1986) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของซีรินโปรติเอสจากส่วนไส้ติ่งของปลาค็อดในเขตแอตแลนติก (Atlantic cod : *Gadus morhua*) ที่อุณหภูมิ 37 และ 57 ^{0}ซ พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์คงตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 57 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้เหลืออยู่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ ที่ระยะเวลาการบ่มเดียวกัน และทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติของซีรินโปรติเอสจากส่วนไส้ติ่งของปลาค็อดกับเอนไซม์จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่ามีคุณสมบัติที่เหมือนกัน เช่น น้ำหนักโมเลกุล ปฏิกิริยาต่อสารยับยั้ง

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

การทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ เช่น pepstatin A, TPCK (tosylamide-pheneyl chloromethyl ketone) เป็นต้น ส่วนอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์จากเครื่องในปลาค็อดจะมีค่าสูงกว่าเอนไซม์ทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

มีรายงานว่าร้อยละ 95 ของน้ำในมหาสมุทรมีอุณหภูมิต่ำกว่า 5 ^{0}ซ โดยเอนไซม์ที่สกัดจากสัตว์น้ำในเขตหนาว จะมีอัตราการเร่งปฏิกริยาสูงที่อุณหภูมิต่ำมากกว่าสัตว์เลือดอุ่น (Hultin,1980; Hochachka and Semero, 1984 ; Simpson and Haard, 1987) จากการศึกษาของ Raae (1990) เกี่ยวกับความคงตัวของเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากปลาค็อดและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในสภาวะอุณหภูมิต่างๆกัน พบว่าในสภาวะอุณหภูมิต่ำ (3 - 20 ^{0}ซ) ที่อุณหภูมิ 2.8 - 8.0 ^{0}ซ เอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลาค็อดมีแอคทิวิตี้มากกว่าไคโมทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความแตกต่างของเอนไซม์ลดลง จนมีค่าเดียวกันที่อุณหภูมิห้อง (20 - 25 ^{0}ซ) โดยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 15 ^{0}ซ และเมื่อศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในสภาวะอุณหภูมิสูง (25 - 99 ^{0}ซ) ผลปรากฏว่าที่อุณหภูมิน้อยกว่า 50 ^{0}ซ บ่มเป็นเวลา 50 นาที ไม่มีการสูญเสียแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด แต่ที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ ไคโมทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีแอคทิวิตี้สัมพัทธ์เท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ส่วนไคโมทริปซินจากปลาค็อดไม่มีการสูญเสียแอคทิวิตี้ที่เวลาการบ่มเดียวกัน และที่อุณหภูมิ 68 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองลดลงอย่างรวดเร็ว โดยเมื่อบ่มเอนไซม์เป็นเวลา 0.5 นาที แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของไคโมทริปซินจากปลาค็อดและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีค่าเท่ากับ 65 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

การเก็บรักษาเอนไซม์กับสับสเตรตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าคุณสมบัติการละลายของเอนไซม์จะลดลงก็ตาม (Palmer, 1985) การเก็บรักษาเอนไซม์ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานๆ จะทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนไม่สามารถทำงานได้ นอกจากนี้ในช่วงการทำเอนไซม์บริสุทธิ์จะทำให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ลดลงได้ (Scopes, 1978)

3.3 ปัจจัยอื่นๆ

3.3.1 ความดัน เนื่องจากการสกัดเอนไซม์บางวิธีจำเป็นที่จะต้องใช้ความดันสูงอาจมากกว่า 50,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ผลของความดันอาจทำให้เอนไซม์สูญเสียความ คงตัวและแอคทิวิตี้ (Laidler and Bunting, 1973)

3.3.2 **สารเคมีต่างๆ** ได้แก่ ตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น แอลกอฮอล์ ดีเทอร์เจน (detergent) การเติมแอลกอฮอล์หรือดีเทอร์เจนช่วยปลดปล่อยเอนไซม์ออกมาในสารละลาย แต่บางครั้งอาจจะทำให้แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ลดลงได้ (Dixon and Webb, 1979) เอนไซม์บางชนิดสามารถเก็บที่อุณหภูมิต่ำในสภาพที่มีสารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต แต่การแช่เยือกแข็งจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งสามารถแก้ปัญหาโดยการเติมซูโครสลงไป (Nord, 1960)

3.3.3 **เกลือ** เกลืออาจจะทำให้การละลายของเอนไซม์เพิ่มหรือลดลง ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นที่ใช้ การเติมเกลือแกงลงไปจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Frazier, 1958)

3.3.4 **สารจับโลหะและสารให้ความคงตัว** การปนเปื้อนของโลหะหนัก เช่น เหล็ก สังกะสี ตะกั่ว ทองแดง และปรอท จะสามารถยับยั้งเอนไซม์ต่างๆ สามารถป้องกันได้โดยการเติมสารจับโลหะ เช่น EDTA [ethanedioxy bis (ethylamine) tetraacetic acid] ที่มีความเข้มข้น 1 - 2 มิลลิโมลาร์ ส่วนสารให้ความคงตัวได้แก่ dithiothreitol หรือ mercaptethanol ซึ่งอาจเติมลงไปในสับสเตรต

3.3.5 **สับสเตรต** ความสามารถในการละลายของเอนไซม์เพิ่มขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรตแต่จะมีข้อจำกัดอยู่เพียงแค่ความเข้มข้นระดับหนึ่งเท่านั้น

วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เครื่องในปลาทูน่าเป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอนไซม์และศึกษาคุณสมบัติต่างๆของเอนไซม์ที่ได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. เครื่องในปลาทูน่า

เครื่องในปลาทูน่า 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โอแถบ (Skipjack tuna : *Katsuwonus pelamis*) พันธุ์ครีบเหลือง (Yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) และ พันธุ์โอดำ (Tonggol tuna : *Thunnus tonggol*) จาก บริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต จำกัด มหาชน และ บริษัท ทรอปิคคอลแคนนิ่ง จำกัด อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา

2. สารเคมี

สารเคมีเกรดวิเคราะห์ (analytical grade) ใช้ในการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลาทูน่า และใช้ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส แอคทิวิตี้เอนไซม์ไลเปส แอคทิวิตี้เอนไซม์อะไมเลส และปริมาณโปรตีน

อุปกรณ์

1. เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ Model U - 2000 พร้อมด้วยเครื่องพิมพ์ ของบริษัท Hitachi จำกัด
2. เครื่องเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ Type SCR 20 B ของบริษัท Hitachi Koki จำกัด
3. เครื่องวัดพีเอช Model HM - 7E ของบริษัท Tokyo TOA Electronic จำกัด
4. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) Model W350 ของบริษัท Memmert จำกัด

การวิเคราะห์

1. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส

วิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส โดยดัดแปลงจากวิธีการ ของ Hagihara และคณะ (1958) ดังนี้

นำเอนไซม์ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ที่เจือจางอย่างเหมาะสมใน 50 มิลลิโมลาร์ ของสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) ผสมกับสารละลายสับสเตรต 1 มิลลิลิตร [ในกรณีที่บัฟเฟอร์ที่ใช้ในวิเคราะห์เอนไซม์มีพีเอชน้อยกว่า 6.0 ใช้ฮีโมโกลบิน (Hemoglobin from bovine blood ผลิตโดย Fluka) ร้อยละ 2 หรือ เคซีน (casein ผลิตโดย Sigma) ในกรณีที่บัฟเฟอร์ที่ใช้ในวิเคราะห์เอนไซม์มีพีเอชมากกว่าหรือเท่ากับ 6.0] นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 15 นาที เติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (ภาคผนวก ข) 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของไทโรซีน (รูปภาคผนวกที่ ก1)

หลอดควบคุม เตรียมโดยเติมบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา 2 มิลลิลิตร ลงในสับสเตรต 1 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ 1 มิลลิลิตร

ค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอส 1 ยูนิต หมายถึงความสามารถของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารละลายฮีโมโกลบิน หรือเคซีน ที่เป็นสับสเตรตได้กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครโมล (μmol) ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะ (specific activity) ของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ ยูนิตของเอนไซม์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน

การคำนวณ

$$\text{แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{มิลลิกรัมของไทโรซีน} \times 1000 \times \text{จำนวนเท่าการเจือจางสารละลายเอนไซม์}}{\text{น้ำหนักโมเลกุลของไทโรซีน (กรัมต่อโมล)} \times \text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที)} \times \text{ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

$$\text{แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)} = \frac{\text{ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

$$\text{ค่าแอคทิวิตี้สัมพัทธ์ (relative activity) (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{แอคทิวิตี้ X 100}}{\text{แอคทิวิตี้สูงสุด}}$$

2. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส

วิเคราะห์แอคทิวิตี้เอนไซม์ไลเปส โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Winkler และ Stuckmann (1979)

นำเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมกับสับสเตรตปริมาตร 2 มิลลิลิตร [โดยการผสม *p*-nitrophenol palmitate (ผลิตโดย Sigma) 30 มิลลิกรัม ที่ละลายใน 2-propanol 10 มิลลิลิตร กับ sodium deoxycholate (Na-DOC ผลิตโดย Fluka) 207 มิลลิกรัม และ arabic gum 100 มิลลิกรัม ใน 90 มิลลิลิตรของสารละลายบัฟเฟอร์] บ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ นาน 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมกรดไฮโดรคลอริก 3 โมลาร์ ปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ เวลา 10 นาที นำส่วนใสเติมในโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ค่าแอคทิวิตี้ของไลเปส 1 ยูนิต หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรต ได้ *p*-nitrophenol 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาทีภายใต้สภาวะที่กำหนด

การคำนวณ

$$\text{แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของ } p\text{-nitrophenol x ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มล)}}{\text{ระยะเวลาที่บ่ม (นาที) x ปริมาตรสารละลายเอนไซม์ (มิลลิลิตร)}}$$

$$= 0.222 \times A_{410}$$

3. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลส

วิเคราะห์แอคทิวิตี้ของอะไมเลสโดยวิธีของ Pongsawasdi และ Yagisawa (1988)

นำเอนไซม์ที่เจือจางอย่างเหมาะสมใน 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมรวมกับสารละลายแป้งร้อยละ 1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร และ 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลายบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (หรือพีเอชที่ต้องการศึกษา) นำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายไอโอดีน 5 มิลลิลิตร (ภาคผนวก ข) ทิ้งไว้ 2 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายแป้ง

4. ปริมาณโปรตีน

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry และคณะ (1951) โดยใช้ bovine serum albumin เป็นโปรตีนมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

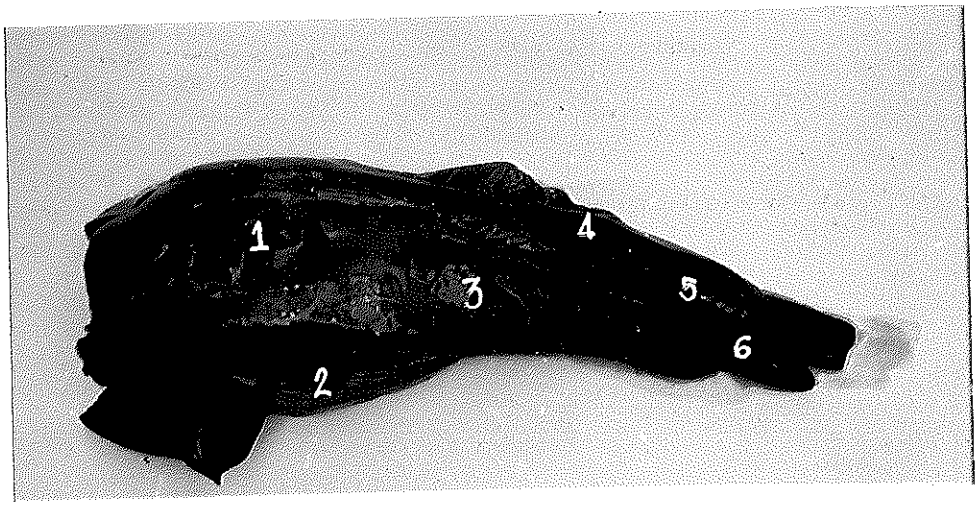
วิธีการ

1. ผลของพันธุ์ปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเครื่องในรวม

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเครื่องในรวม (ประกอบด้วย กระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน ลำไส้ และถุงน้ำดี) ของปลาทูน่า 3 พันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โอแถบ พันธุ์ครีบเหลือง พันธุ์โอดำ โดยเก็บตัวอย่างเครื่องในปลาทูน่าแต่ละพันธุ์จำนวน 10 ตัว เก็บ 3 ครั้ง ชั่งน้ำหนักปลาทั้งตัวก่อนที่จะผ่าท้องควักเครื่องในปลา ชั่งน้ำหนักเครื่องใน เพื่อหาสัดส่วนเครื่องในปลาต่อปลาทั้งตัว รวมทั้งบันทึกแหล่งจับปลา ระยะเวลาการเก็บรักษา อุณหภูมิในการเก็บรักษาตัวอย่าง

นำเครื่องในปลาทั้งหมด (เครื่องในรวมที่ยังไม่ได้แยกส่วน, รูปที่ 3) ของปลาทูน่าแต่ละพันธุ์ ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนักเครื่องในปลา หลังจากนั้นสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมปลาทูน่าด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอชต่างๆ คือ พีเอช 2.0 - 6.0 (ซิเตรท-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์) พีเอช 7.0 - 9.0



รูปที่ 3 เครื่องในรวมของปลาทูน่า, (1) ตับ, (2) ม้าม, (3) กระเพาะ, (4) ตับอ่อน, (5) ลำไส้, (6) ถุงน้ำดี

(ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) และพีเอช 10.0 - 11.0 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) สารละลายบัฟเฟอร์ทุกชนิดที่ใช้ในการสกัดมีการเติม Tween 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ใช้อัตราส่วนเครื่องในปลาต่อบัฟเฟอร์ เท่ากับ 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็วสูงประมาณ 1 - 2 นาที กรองด้วยผ้าขาวบาง นำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 ^{0}ซ ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที สารละลายส่วนใสที่ได้คือ สารละลายเอนไซม์สกัด วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส คัดเลือกสารละลายบัฟเฟอร์และพันธุ์ปลาทูน่าที่ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุด

2. ผลของเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์

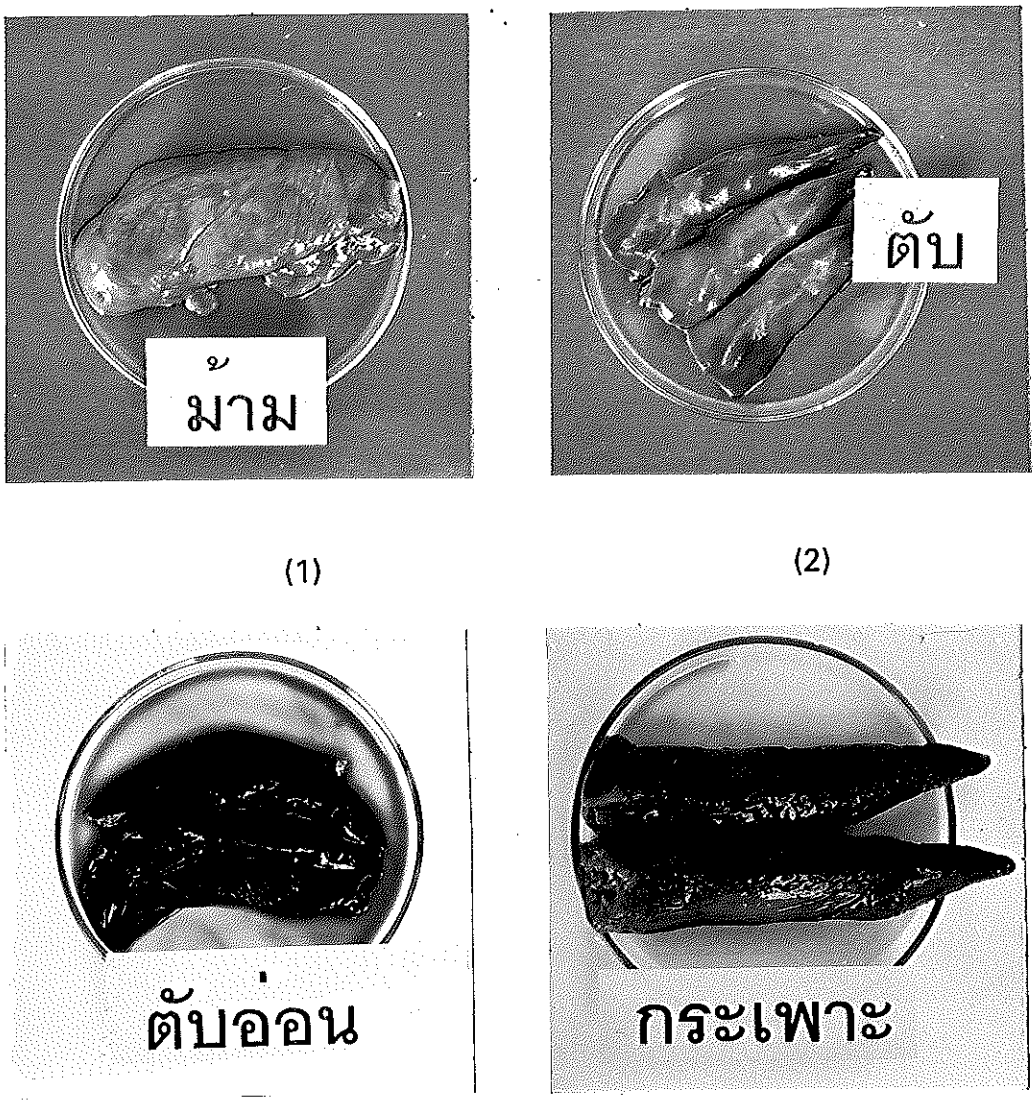
แยกเครื่องในของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ออกเป็นส่วน กระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อน (รูปที่ 4) ล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว บันทึกน้ำหนักแต่ละส่วน เตรียมเอนไซม์สกัดจากแต่ละส่วนของเครื่องใน โดยการสกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ตามพีเอชที่ต้องการศึกษา (เช่นเดียวกับที่เตรียมในข้อ 1) นำสารละลายเอนไซม์สกัดวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน แอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปส คัดเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ที่ให้ค่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด และคัดเลือกชิ้นส่วนของเครื่องในปลาทูน่า (กระเพาะ ม้าม ตับ และ ตับอ่อน) ของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ที่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุด

3. คุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่า

สกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลารวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ ด้วยบัฟเฟอร์ชนิดที่ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด (จากข้อ 1และ ข้อ 2) นำเอนไซม์สกัดที่ได้มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

3.1 พีเอชที่เหมาะสม

ศึกษาผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส นำสารละลายเอนไซม์สกัด (จากข้อ 1 และ 2) ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 (ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์), พีเอช 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 (ทริส-ไฮโดร คลอไรด์บัฟเฟอร์) และพีเอช 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์)



รูปที่ 4 เครื่องในของปลาทูน่าแต่ละส่วน (1) ม้ามปลาทูน่า, (2) ตับปลาทูน่า, (3) ตับอ่อนปลาทูน่า และ (4) กระเพาะปลาทูน่า

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยนำสารละลายเอนไซม์สกัดใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสม (ผลจากข้อ 3.1) วิเคราะห์หาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 10, 20, 30, 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส

3.3 ความคงตัวต่อพีเอช

ศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยนำสารละลายเอนไซม์สกัด (จากข้อ 1 และ 2) เก็บในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 (ซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์), พีเอช 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 และ 9.0 (ทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์) และพีเอช 9.0, 9.5, 10.0, 10.5 และ 11.0 (คาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30, 60, 90,120 นาที หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ที่เหลือ

3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ

ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส โดยบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดที่อุณหภูมิ 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 15, 30, 45, 60, 90 และ 120 นาที วิเคราะห์หาแอคทิวิตี้ที่เหลือ

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. ผลของพันธุ์ปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากเครื่องในรวม

1.1 ข้อมูลทั่วไป

ตัวอย่างปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ และปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง จากบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิตจำกัด มหาชน มีแหล่งจับอยู่ที่ฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิกและมหาสมุทรอินเดีย ตามลำดับ ช่วงเวลาในการจับ (trip period) อยู่ในเดือนมีนาคม พ.ศ. 2540 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 2.47 ± 0.44 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.142 ± 0.024 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 5.75 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว ส่วนปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 2.30 ± 0.25 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.16 ± 0.20 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 6.96 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว สำหรับตัวอย่างปลาทูน่าพันธุ์โอดำ จากบริษัททรอปิคคอลแคนนิ่ง จำกัด มีแหล่งจับอยู่ที่อ่าวไทย ช่วงเวลาในการจับอยู่ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2540 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 1.27 ± 0.15 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.066 ± 0.007 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 5.20 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว (ตารางที่ 3)

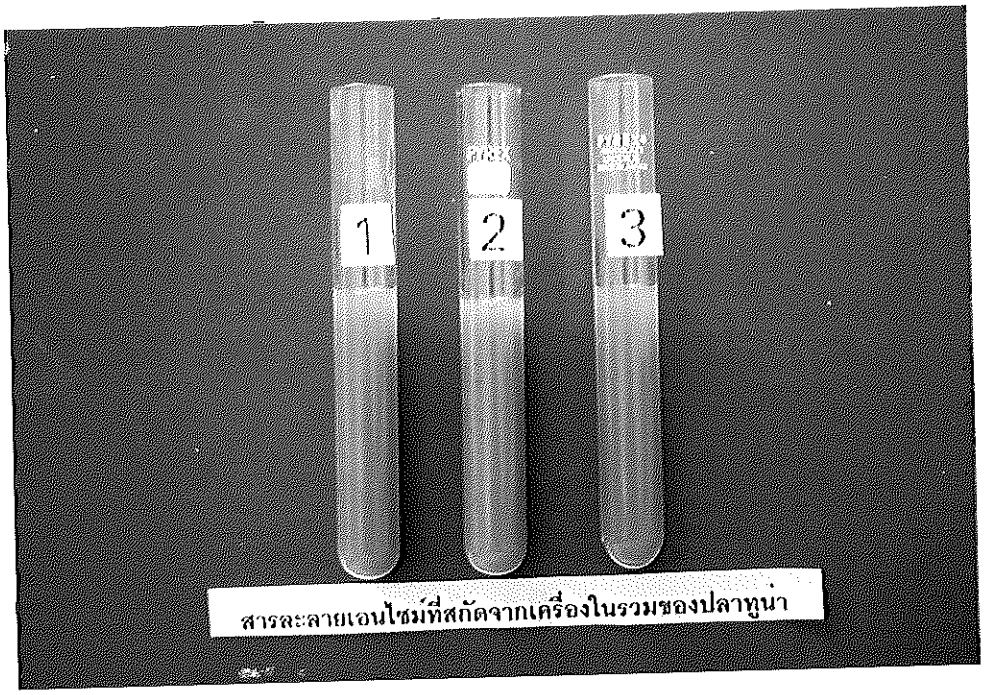
1.2 ผลของพันธุ์ปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์

เมื่อสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าแต่ละพันธุ์ (ประกอบด้วย กระเพาะม้าม ตับ ตับอ่อน ลำไส้ และถุงน้ำดี) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2.0 - 11.0 สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ แสดงดังรูปที่ 5 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ พบว่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดมีผลต่อค่าแอคทิวิตี้ที่ได้ โดยค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสและไลเปสมีค่าเพิ่มขึ้นตามพีเอชที่เพิ่มขึ้น และมีค่าสูงสุดที่พีเอช 10.0 จากปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (รูปที่ 6, ตารางภาคผนวกที่ ค1) และปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (รูปที่ 7,ตารางภาคผนวกที่ ค2) ส่วนปลาทูน่าพันธุ์โอดำ ให้แอคทิวิตี้สูงสุดของเอนไซม์ทั้งสองชนิดจากการสกัดด้วยบัฟเฟอร์

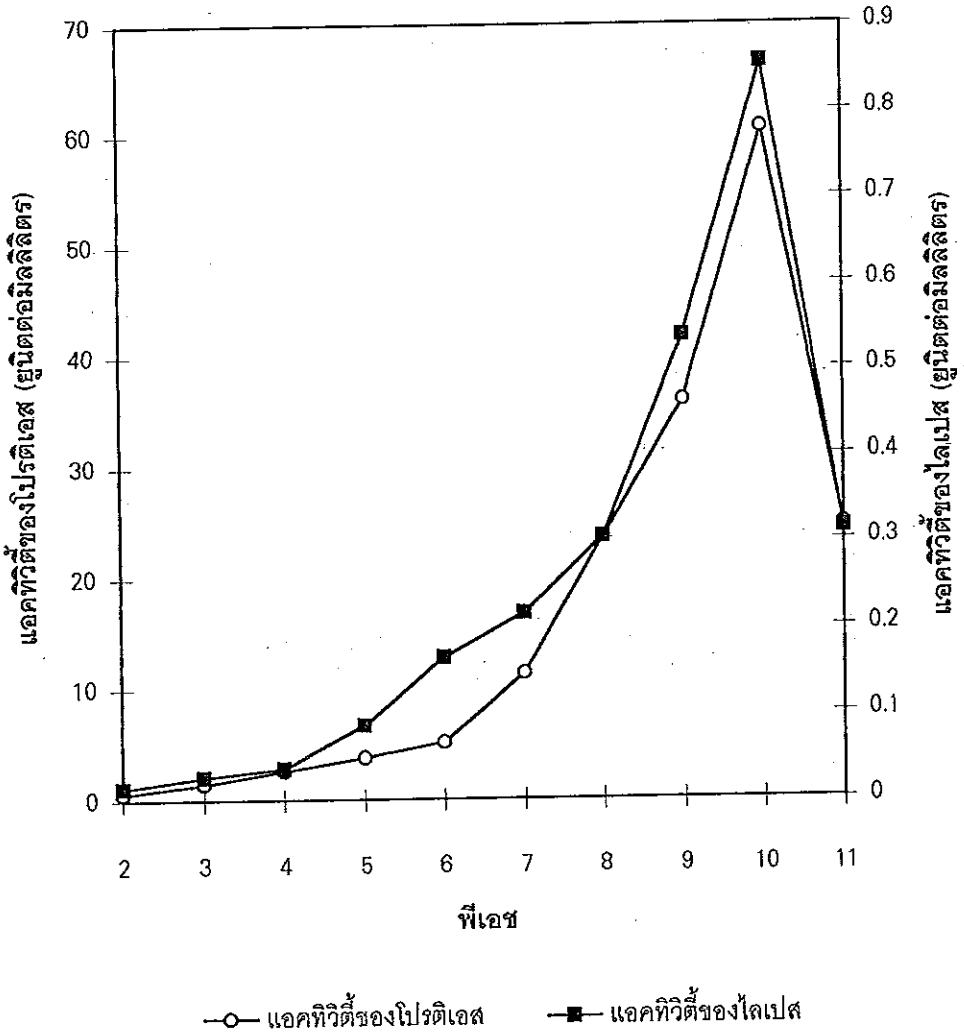
ตารางที่ 3 น้ำหนักปลาทั้งตัวและน้ำหนักเครื่องในของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*), พันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) และพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

พันธุ์โอแถบ		พันธุ์ครีบเหลือง		พันธุ์โอดำ	
น.น.ปลาทั้งตัว (กิโลกรัม)	น.น.เครื่องในปลา (กิโลกรัม)	น.น.ปลาทั้งตัว (กิโลกรัม)	น.น.เครื่องในปลา (กิโลกรัม)	น.น.ปลาทั้งตัว (กิโลกรัม)	น.น.เครื่องในปลา (กิโลกรัม)
2.0	0.105	1.7	0.110	1.2	0.064
2.0	0.105	2.1	0.148	1.4	0.068
2.8	0.172	2.3	0.172	1.1	0.058
2.9	0.190	2.4	0.180	1.2	0.058
2.2	0.120	2.2	0.164	1.2	0.060
2.6	0.148	2.1	0.152	1.1	0.058
2.8	0.170	2.3	0.170	1.5	0.074
2.6	0.152	2.6	0.192	1.5	0.078
2.1	0.116	2.3	0.168	1.3	0.066
2.8	0.170	2.6	0.190	1.2	0.064
ค่าเฉลี่ย 2.47±0.44	0.142±0.024	2.47±0.44	0.142±0.024	2.47±0.44	0.142±0.024

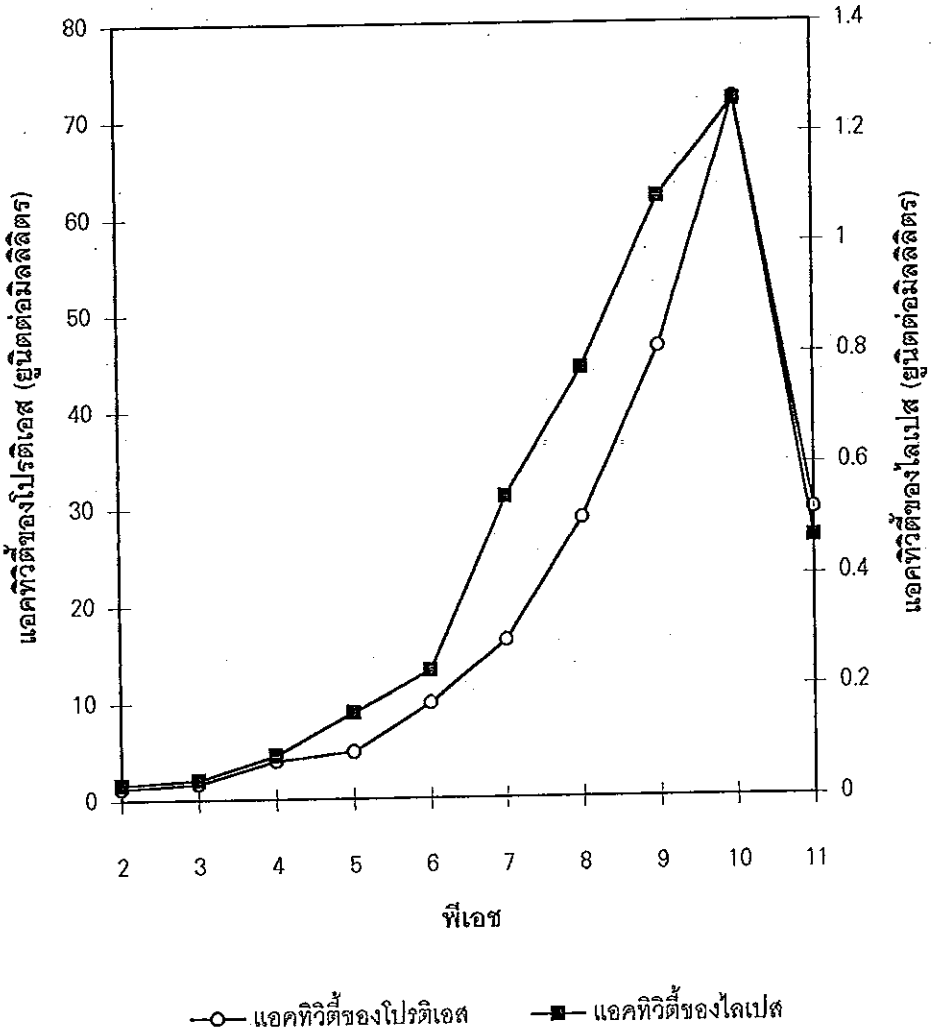
หมายเหตุ : ข้อมูลแต่ละค่าเป็นค่าเฉลี่ยจากปลาจำนวน 3 ตัว ดังนั้นค่าเฉลี่ยทั้งหมดได้จากปลาจำนวน 30 ตัว



รูปที่ 5 สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่า, (1) พันธุ์โอแถบ , (2) พันธุ์ครีบเหลือง และ (3) พันธุ์โอดำ



รูปที่ 6 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)



รูปที่ 7 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

ที่พีเอช 9.0 (รูปที่ 8, ตารางภาคผนวกที่ ค3) และเมื่อวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลสแต่ไม่สามารถตรวจพบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลสของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์

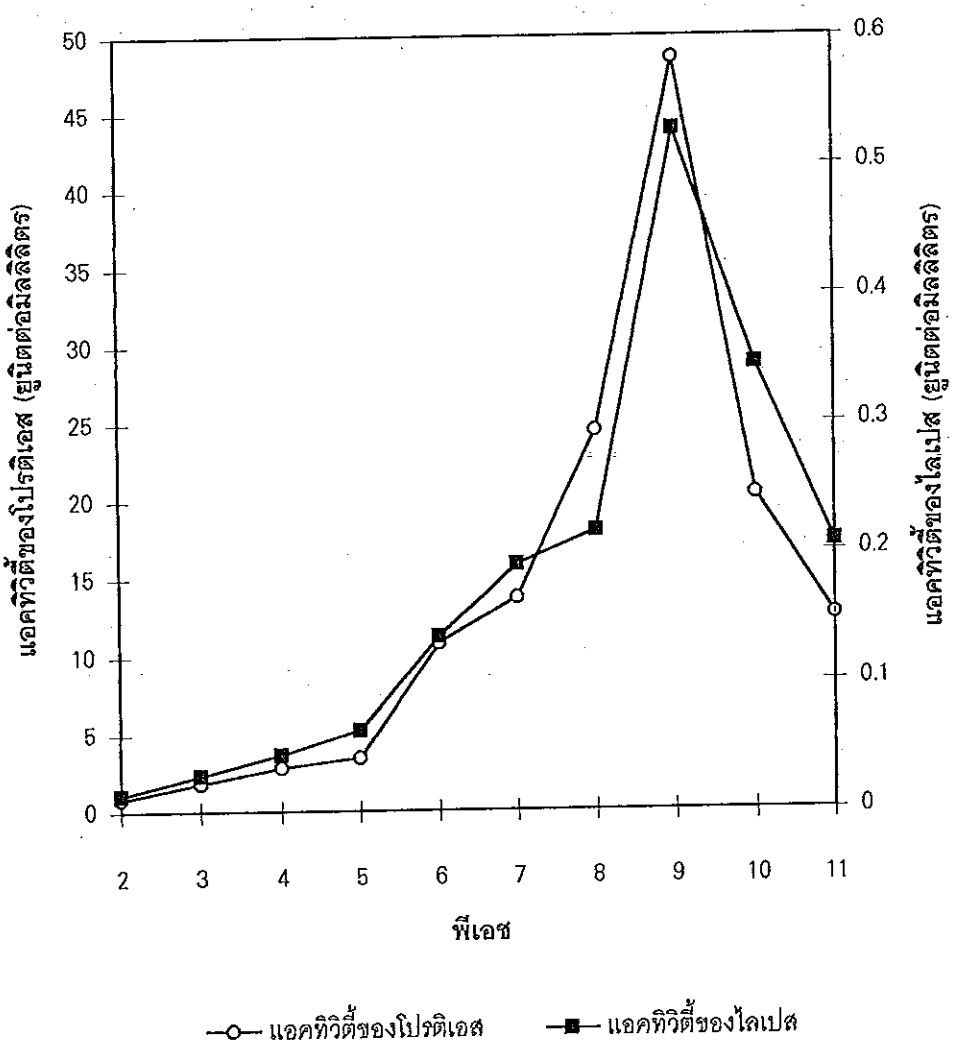
เมื่อเปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ ที่สกัดโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (ให้ค่าแอคทิวิตี้สูงสุด) ผลแสดงดังรูปที่ 9 และตารางที่ 4 พบว่าปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุด (จากการสกัดด้วยบัฟเฟอร์ พีเอช 10.0) มีค่าเท่ากับ 72.17 และ 1.258 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสและไลเปสมีค่าเท่ากับ 3.089 และ 0.054 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ รองลงมาคือปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเท่ากับ 60.53 และ 0.855 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 2.399 และ 0.034 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนปลาทูน่าพันธุ์โอดำ ซึ่งสกัดด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 9.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเท่ากับ 48.53 และ 0.527 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แอคทิวิตี้จำเพาะเท่ากับ 2.304 และ 0.022 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ (2.3 - 3.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) มีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากเอนไซม์ไคโมทริปซินที่สกัดจากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) ซึ่งให้ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสเท่ากับ 0.64 ยูนิตต่อมิลลิกรัม (Kristjansson and Nielson, 1991) แต่ต่ำกว่าค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอส (5.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ของเอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของกุ้ง (crayfish : *Procambarus clarkii*) (Kim, *et al.*,1992)

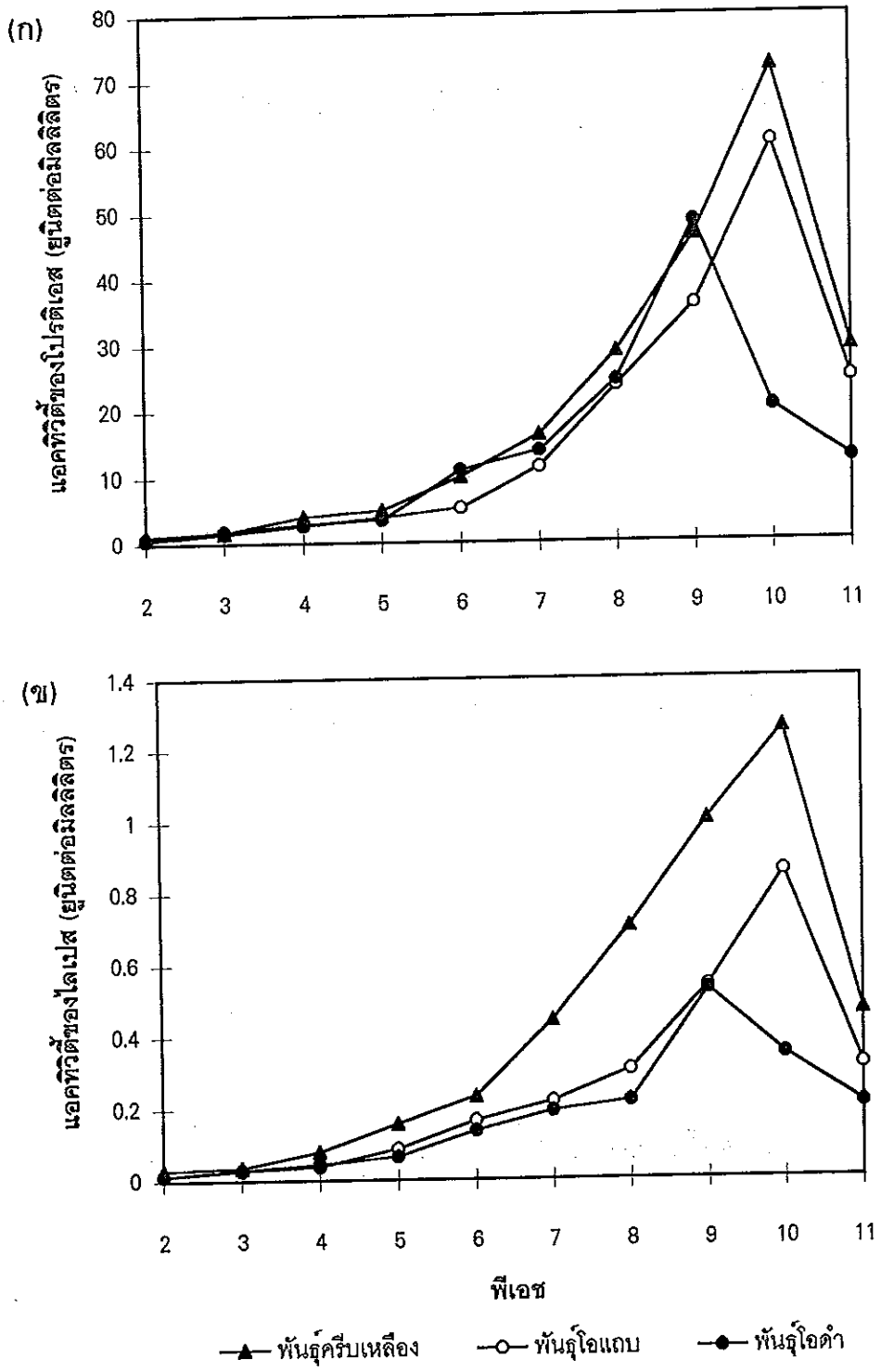
2. ผลของเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าและพีเอชของบัฟเฟอร์ต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์

2.1 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

ตัวอย่างปลาทูน่าที่นำมาทดลอง มีแหล่งจับอยู่ที่ฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก ช่วงเวลาในการจับอยู่ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2540 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 2.15 ± 0.50 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.11 ± 0.05 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 5.12 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว



รูปที่ 8 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)



รูปที่ 9 ผลของพันธุ์ปลาทูน่าต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่า 3 พันธุ์โดยใช้บัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะสูงสุด ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่า 3 พันธุ์ โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม

พันธุ์ปลา	พีเอชที่เหมาะสม	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
		แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
พันธุ์โอแถบ	พีเอช 10.0	60.53±0.06	2.399±0.002	0.855±0.008	0.0338±0.0003
พันธุ์ครีบเหลือง	พีเอช 10.0	72.17±0.05	3.089±0.003	1.258±0.011	0.0538±0.0007
พันธุ์โอดำ	พีเอช 9.0	48.53±0.08	2.304±0.005	0.527±0.008	0.0221±0.0004

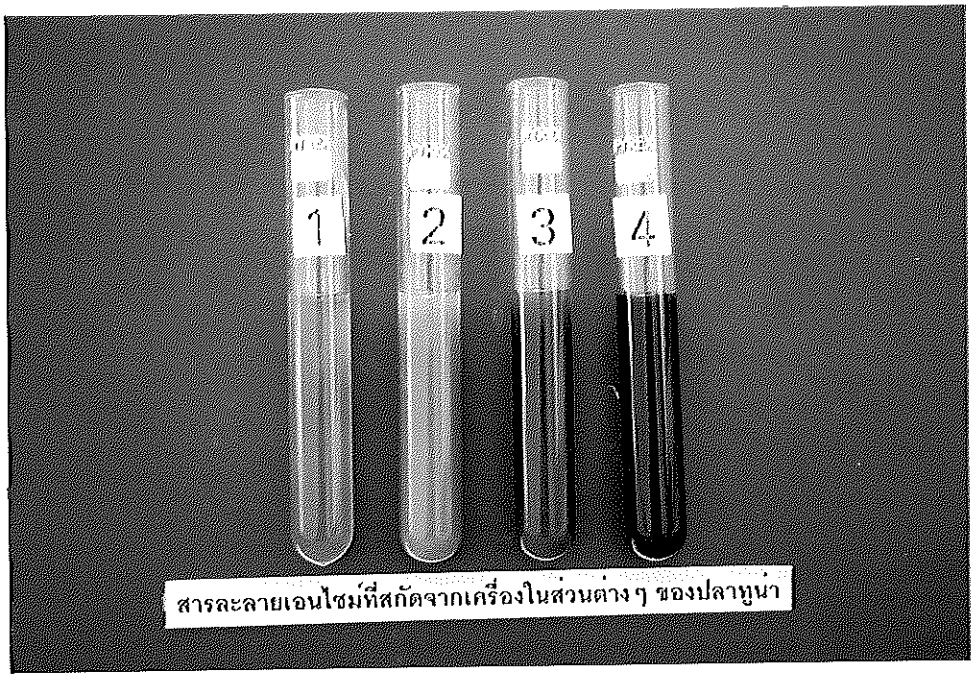
แยกเครื่องในของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบออกเป็นส่วนต่างๆ คือ กระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อน ทำการสกัดเอนไซม์จากส่วนต่างๆเหล่านี้ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอช ในช่วง 2.0 - 11.0 โดยสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในต่างๆของปลาทูน่า แสดงดังรูปที่ 10 นำสารละลายเอนไซม์สกัดที่ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส (แสดงผลการวิเคราะห์ไลเปสในช่วง พีเอช 6.0 - 11.0 เท่านั้น เนื่องจากช่วงพีเอช 2.0 - 5.0 ค่าแอคทิวิตี้ของไลเปสต่ำมาก) ผลแสดงในรูปที่ 11 (ตารางภาคผนวกที่ ค4, ค5, ค6 และ ค7) พบว่าเอนไซม์จากแต่ละส่วนของเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์สูงสุดที่พีเอช 10.0 โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสของม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะเท่ากับ 46.25, 34.81, 34.19 และ 24.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสมีค่าเท่ากับ 2.272, 1.706, 1.429 และ 1.280 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.301, 0.186, 0.148 และ 0.096 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของ ไลเปสมีค่าเท่ากับ 0.0147, 0.0091, 0.0073 และ 0.0051 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่า เอนไซม์ที่สกัดจากม้ามด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 46.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 2.272 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.301 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.0147 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

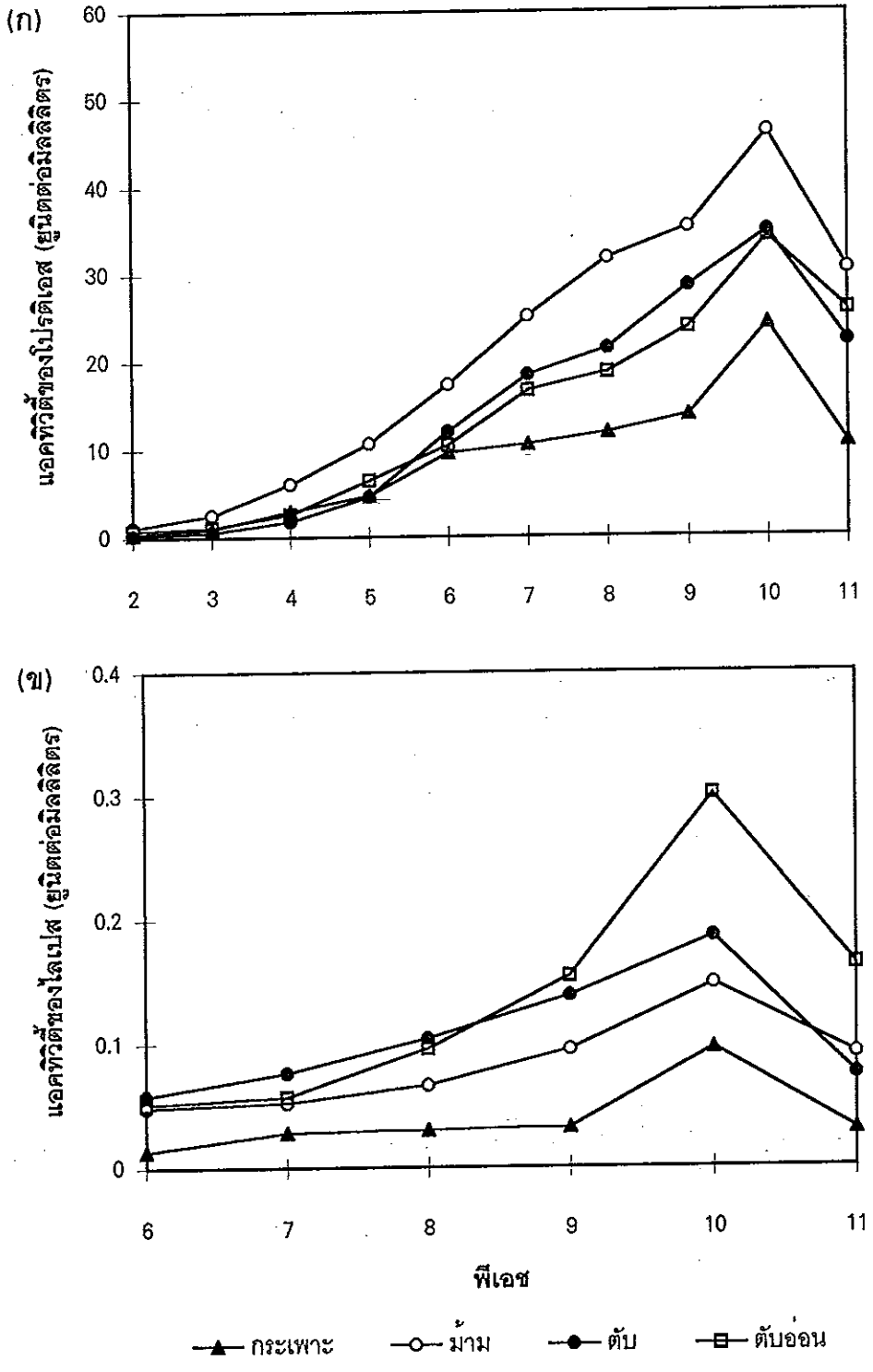
2.2 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

ตัวอย่างปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองที่นำมาทดลอง มีแหล่งจับอยู่ที่ฝั่งตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิก ช่วงเวลาในการจับอยู่ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2540 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 2.10 ± 0.14 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.15 ± 0.03 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 7.14 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว

เมื่อสกัดเอนไซม์จากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2.0 - 11.0 นำสารละลายเอนไซม์สกัดที่ได้วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (พีเอช 2.0 - 11.0) และแอคทิวิตี้ของ



รูปที่ 10 สารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในต่างๆของปลาทูน่า
(1) กระเพาะปลาทูน่า, (2) ม้ามปลาทูน่า (3) ตับปลาทูน่า และ (4) ตับอ่อนปลาทูน่า



รูปที่ 11 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ(*Katsuwonus pelamis*)

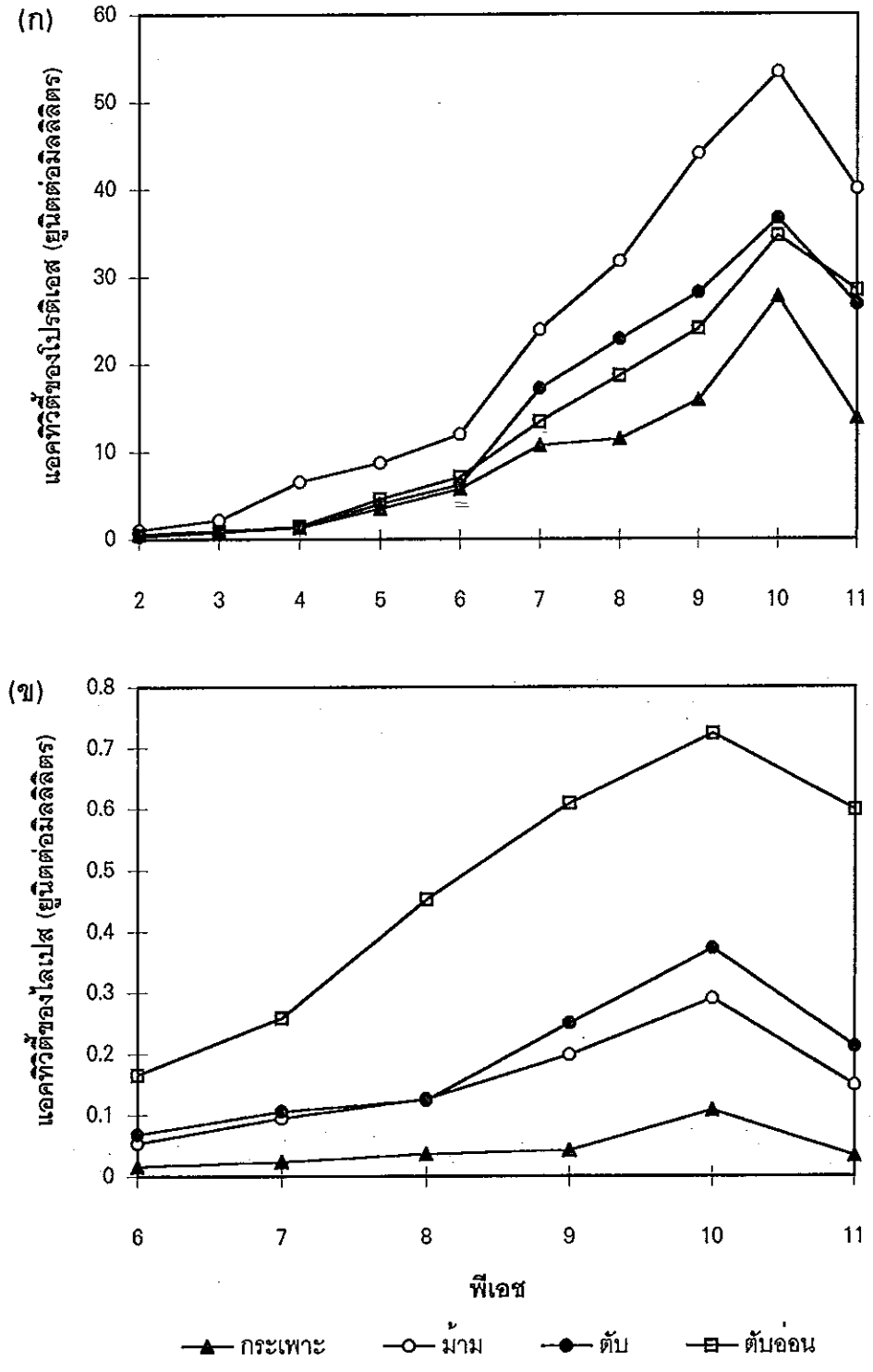
เอนไซม์ไลเปส (พีเอช 6.0 - 11.0) ผลแสดงในรูปที่ 12 (ตารางภาคผนวกที่ ค8, ค9, ค10 และ ค11) พบว่าเอนไซม์จากส่วนของกระเพาะ ม้าม ตับ และ ตับอ่อนของเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุดที่พีเอช 10.0 โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสของม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะเท่ากับ 53.38, 36.59, 34.65 และ 27.63 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ 2.559, 1.742, 1.531 และ 1.455 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.723, 0.371, 0.2891 และ 0.107 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 0.0319, 0.0177, 0.0139 และ 0.0056 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่า เอนไซม์ที่สกัดจากม้ามด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 53.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 2.559 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.723 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.0319 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

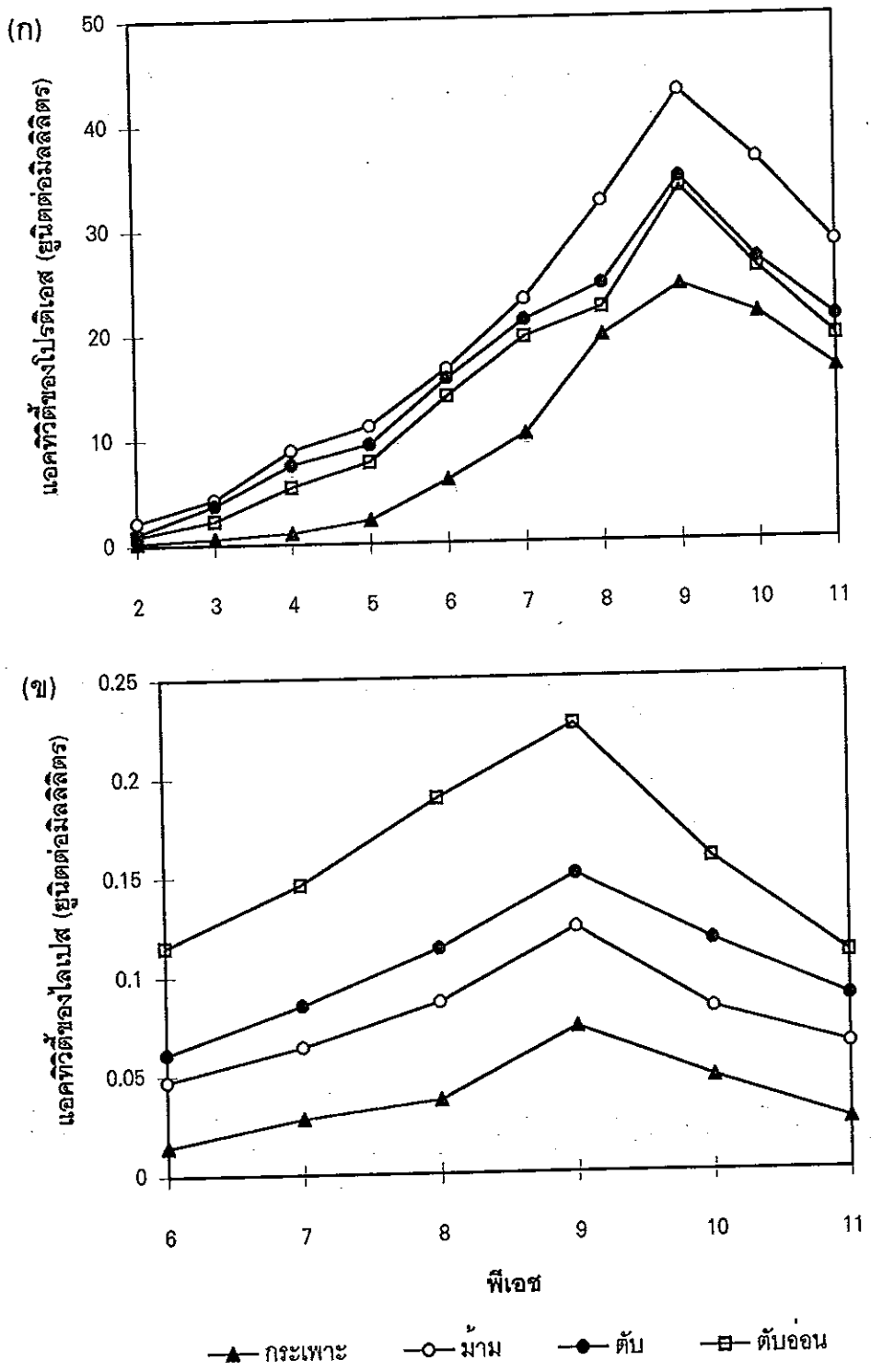
2.3 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

ตัวอย่างปลาทูน่าพันธุ์โอดำที่นำมาทดลอง มีแหล่งจับอยู่ที่อ่าวไทย ช่วงเวลาในการจับอยู่ในเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2540 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำมีน้ำหนักปลาทั้งตัวเฉลี่ย 1.32 ± 0.15 กิโลกรัม น้ำหนักเครื่องในรวมเฉลี่ย 0.068 ± 0.004 กิโลกรัม คิดเป็นร้อยละ 5.15 ของน้ำหนักปลาทั้งตัว

จากการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 2.0 - 11.0 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (พีเอช 2.0 - 11.0) และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส (พีเอช 6.0 - 11.0) ผลแสดงในรูปที่ 13 (ตารางภาคผนวกที่ ค12, ค13, ค14 และ ค15) พบว่าเอนไซม์จากแต่ละส่วนของเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุดที่พีเอช 9.0 ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสของม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะเท่ากับ 42.79, 34.55, 33.64 และ 24.25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส มีค่าเท่ากับ 2.103, 1.641, 1.362 และ 1.265 ยูนิตต่อมิลลิกรัม



รูปที่ 12 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)



รูปที่ 13 ผลของพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรตีเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสของตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.227, 0.150, 0.123 และ 0.073 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสมีค่าเท่ากับ 0.0108, 0.0071, 0.0060 และ 0.0039 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่า เอนไซม์ที่สกัดจากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 9.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 42.79 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 2.103 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 9.0 ให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงสุดเท่ากับ 0.227 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.0108 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาแหล่งของเอนไซม์ที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วน (กระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อน) จากปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าเอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 จะให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอสสูงสุด (53.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ 2.559 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) รองลงมาคือเอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ และพันธุ์โอดำด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 และพีเอช 9.0 ตามลำดับ ส่วนแหล่งที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 จะให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของไลเปสสูงสุด (0.723 ยูนิตต่อมิลลิลิตรและ 0.0319 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) รองลงมาคือเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบและพันธุ์โอดำด้วยบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 และพีเอช 9.0 ตามลำดับ โดยไม่สามารถตรวจพบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ การที่ม้ามและตับอ่อนเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าอาจเป็นเพราะว่า ม้ามและตับอ่อนเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการผลิตและสร้างน้ำย่อยหรือเอนไซม์ จึงเป็นแหล่งโดยตรงของเอนไซม์ หรืออาจเป็นเพราะม้ามและตับอ่อนเป็นอวัยวะสำคัญที่ทำหน้าที่ในการเก็บเอนไซม์ที่อวัยวะส่วนอื่นๆภายในตัวปลาผลิตหรือสร้างออกมา จึงทำให้มีปริมาณเอนไซม์อยู่มากกว่าเครื่องในส่วนอื่นๆ (วิมล เหมะจันทร์, 2528)

การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวม (ผลจากข้อ 1) และเครื่องในแต่ละส่วน (ผลจากข้อ 2) ของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ โดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ พบว่า เมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอช 10.0 เหมาะสมสำหรับการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบและพันธุ์ครีบเหลือง ส่วนบัฟเฟอร์พีเอช 9.0 เหมาะสมกับการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ โดยให้ผลการทดลองสอดคล้องและใกล้เคียงกับรายงานของ Meinke และคณะ (1972) ซึ่งกล่าวว่า การสกัดโปรตีนในสภาวะเป็นด่างโดยเฉพาะที่พีเอช 10.0 จะเสริมแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ในเครื่องในปลาและทางเดินอาหาร แต่จากการศึกษาของ Aruchalam และ Haard (1984) ซึ่งสกัดเอนไซม์จาก gustric mucosa ของปลาค็อดในเขตขั้วโลก (Polar cod : *Boreogadus saida*) โดยใช้ 0.2 โมลาร์ของโซเดียม-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.3 จะให้ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (210 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ในขณะที่ Doke และ Ninjoor (1987) รายงานว่าการสกัดเอนไซม์จากกล้ามเนื้อกุ้ง (*Penaeus indicus*) โดยใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในการสกัดจะให้ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุด (642 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ผลการทดลองดังกล่าวใกล้เคียงกับการสกัดเอนไซม์คาเทปซิน-ดีจากไข่ปลา (sea urchin egg : *Tetrapygus niger*) โดยใช้ 0.5 โมลาร์ของโปแตสเซียมคลอไรด์ จะให้ค่าแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์สกัดสูงสุด (138 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) (Sanchez-Chiang,*et al.*,1985)

จากการศึกษาของ Kinsella (1982) รายงานว่า การใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำจะส่งผลให้เกิดการสกัดโปรตีนได้สูง อาจเกิดจากคลอไรด์อิออนเป็นตัวที่เพิ่มประจุลบแก่โปรตีนทำให้เกิดแรงผลักกันระหว่างสายโซ่เปปไทด์ที่ติดกัน โมเลกุลของน้ำจึงแทรกเข้าไปได้ทำให้โปรตีนละลายได้มากขึ้น และการใช้สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ที่มีค่าพีเอชในช่วงที่เป็นกรดสามารถสกัดโปรตีนได้ต่ำกว่าเมื่อใช้สารละลายสกัดที่มีค่าพีเอชเป็นด่าง ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่ค่าพีเอชต่ำโมเลกุลโปรตีนที่มีประจุบวกถูกทำให้เป็นกลางด้วยคลอไรด์อิออน ทำให้ความสามารถในการจับน้ำลดลง (Meinke, *et al.*,1972)

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ มากกว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปลาทูน่าเป็นปลาที่กินอาหารประเภทแพลงค์ตอนพืชและสัตว์ ตลอดจนปลาขนาดเล็ก ปลาหมึก และกุ้งเป็นอาหาร (วิมล เหมะจันทร์, 2528) อีกทั้งองค์ประกอบ

ทางเคมีของปลาทูน่าเป็นปลาที่มีปริมาณไขมันต่ำ (น้อยกว่าร้อยละ 5) แต่มีปริมาณโปรตีนสูง (มากกว่าร้อยละ 20) (Heen and Kreuzer, 1962) จึงทำให้มีปริมาณการผลิตและเก็บเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ประเภทโปรตีนมากกว่าสารโมเลกุลใหญ่ประเภทไขมัน และทำการทดสอบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ด้วย แต่ไม่สามารถตรวจพบแอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลส

สรุปได้ว่า จากการศึกษาชนิดและแหล่งของเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ (ผลจากข้อ 1 และ 2) พบว่าปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองเป็นแหล่งของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่ดีที่สุดทั้งการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน เมื่อต้องการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในแต่ละส่วน (กระเพาะม้าม ตับ และตับอ่อน) ควรคัดเลือกม้ามเป็นแหล่งของเอนไซม์ ส่วนในการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วน ควรคัดเลือกตับอ่อนเป็นแหล่งของเอนไซม์ แต่เครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองเป็นแหล่งที่ดีที่สุดในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเมื่อเทียบกับเครื่องในแต่ละส่วน ทั้งนี้การคัดเลือกแหล่งของเอนไซม์ (พันธุ์ปลาและชิ้นส่วนของเครื่องในปลาทูน่า) อาจจะต้องพิจารณาถึงปริมาณของวัตถุดิบที่ในการผลิตเอนไซม์ ฤดูกาลที่จับและการนำเข้าปลาทูน่า อีกทั้งควรพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตและการนำวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมปลาทูน่าแปรรูปบรรจุกระป๋องมาใช้ประโยชน์ให้คุ้มค่ามากที่สุด ตลอดจนควรพิจารณาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ เช่น พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ ความคงตัวต่อพีเอช ความคงตัวต่ออุณหภูมิ เป็นต้น ซึ่งจะทำการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3. คุณสมบัติของเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของเครื่องในปลาทูน่า

เมื่อสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชที่ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์สูงสุด (จากข้อ 1 และข้อ 2) นำเอนไซม์สกัดมาศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ดังนี้

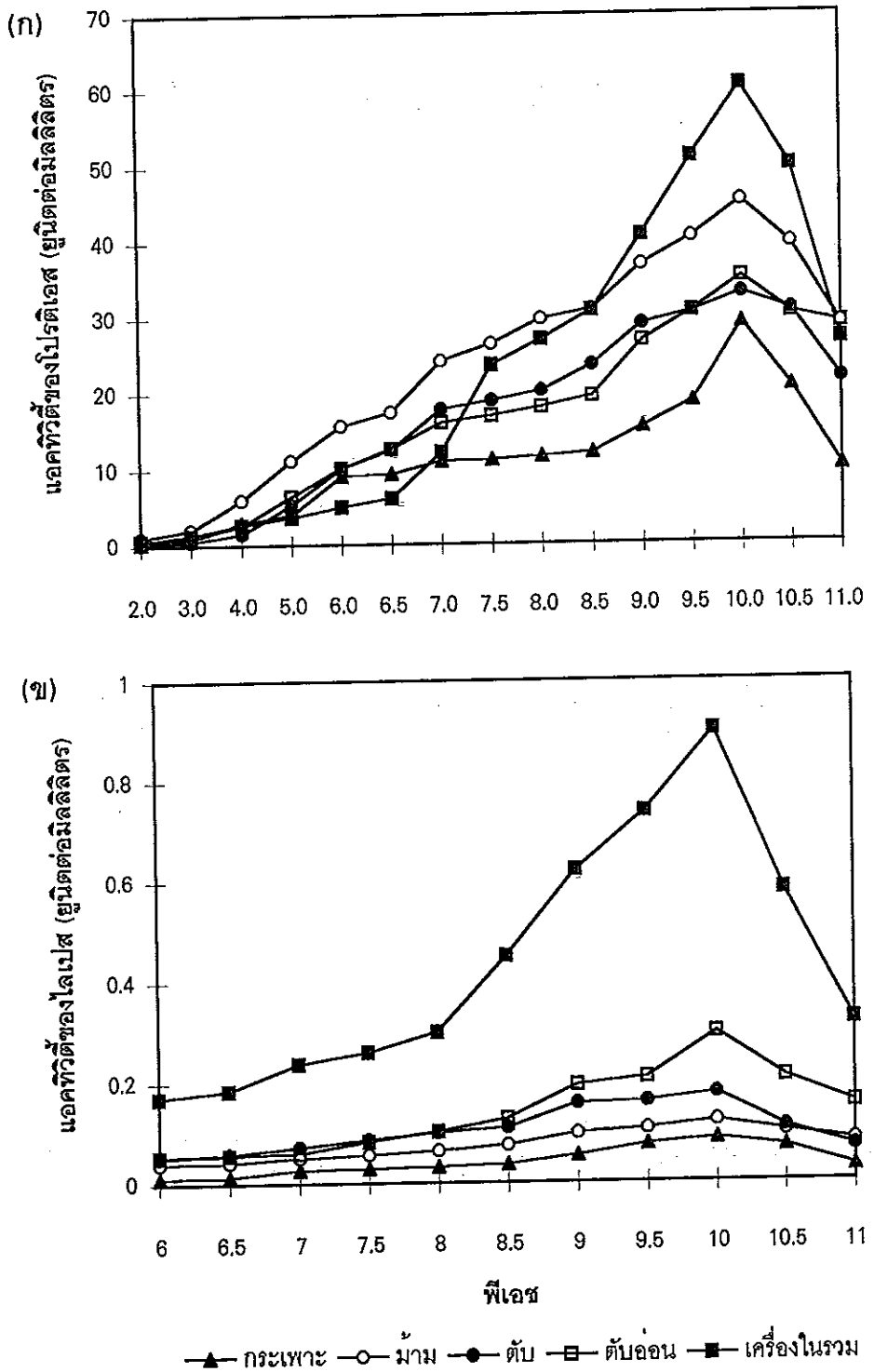
3.1 พีเอชที่เหมาะสม

3.1.1 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

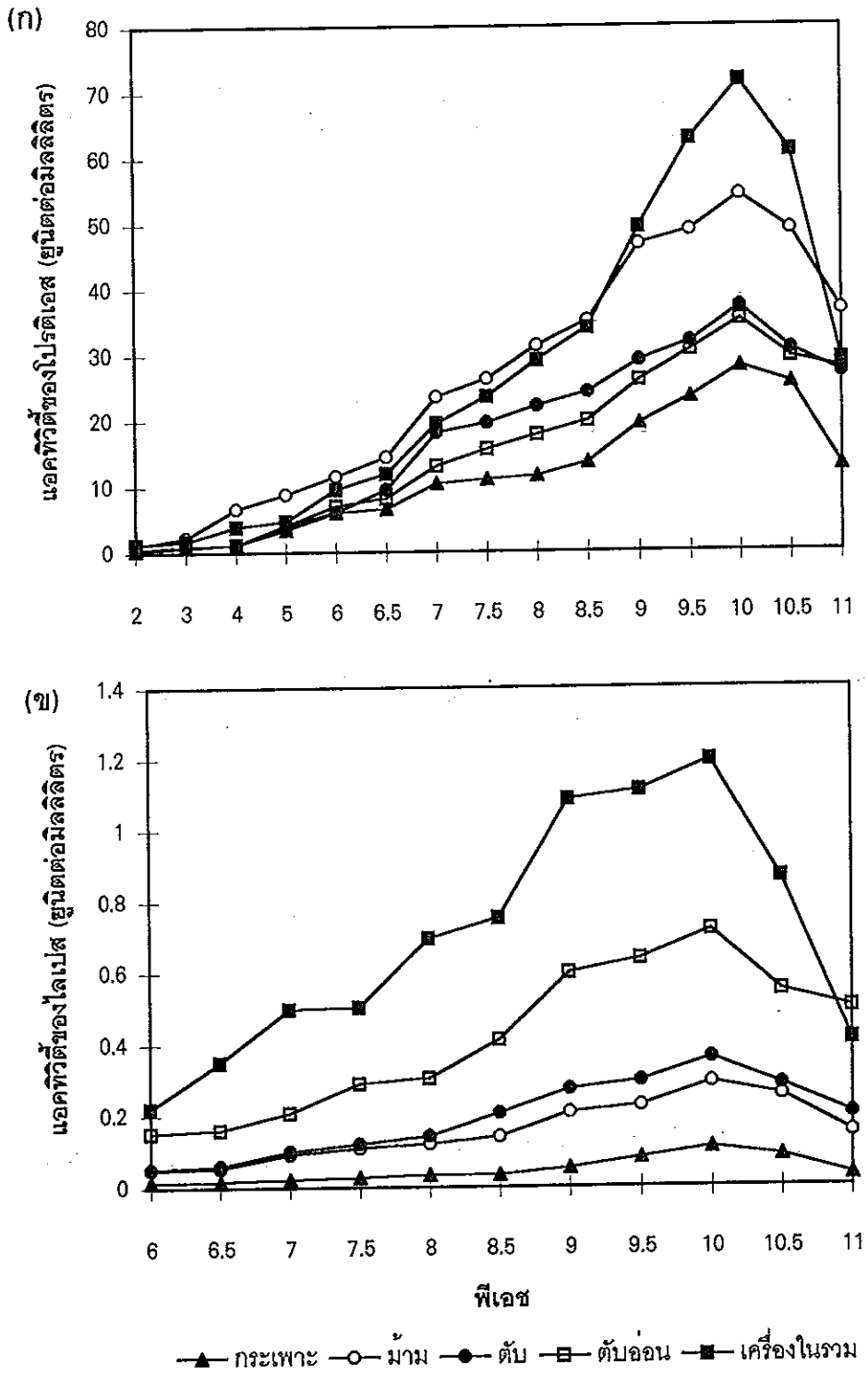
สกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบด้วยพีเอช 10.0 และวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในช่วงพีเอช 2.0 - 11.0 และพีเอช 6.0 - 11.0 ตามลำดับ (เนื่องจากช่วงพีเอช 2.0 - 5.0 ค่าแอคทิวิตี้ของไลเปสต่ำมาก) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนคือ พีเอช 10.0 (รูปที่ 14) โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสจากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะเท่ากับ 60.53, 45.16, 32.93, 35.07 และ 28.99 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าแอคทิวิตี้ของไลเปสเท่ากับ 0.90, 0.12, 0.175, 0.296 และ 0.085 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่า 10.0 จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลง โดยที่พีเอช 9.5 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 64 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่พีเอช 10.5 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 70 และ 61 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบสามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (พีเอช 10.0)

3.1.2 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

สกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองด้วยพีเอช 10.0 และวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส (เช่นเดียวกับข้อ 3.1.1) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนคือ พีเอช 10.0 (รูปที่ 15) โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสจากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะเท่ากับ 71.54, 54.16, 37.07, 35.07 และ 27.96 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าแอคทิวิตี้ของไลเปสเท่ากับ 1.194, 0.291, 0.360, 0.718 และ 0.109 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่า 10.0 จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลง โดยที่พีเอช 9.5 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของ



รูปที่ 14 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จาก กระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)



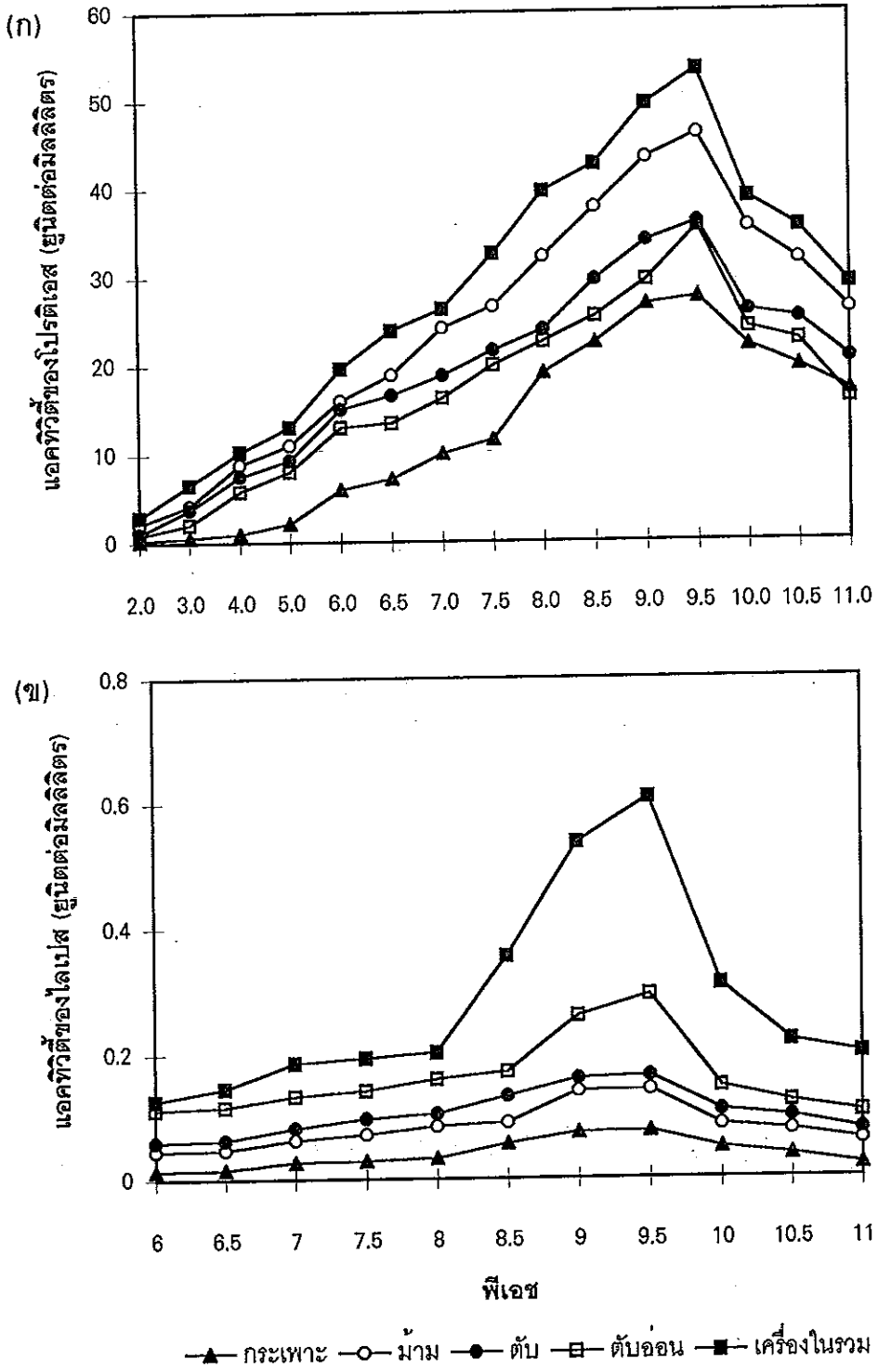
รูปที่ 15 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จาก กระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

เครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 83 และ 74 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่พีเอช 10.5 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 82 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองสามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (พีเอช 10.0)

3.1.3 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

สกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำด้วยพีเอช 9.0 และวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสในช่วงพีเอช 2.0 - 11.0 และพีเอช 6.0 - 11.0 ตามลำดับ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนคือ พีเอช 9.5 (รูปที่ 16) โดยมีค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสจากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ เท่ากับ 53.36, 46.08, 38.05, 35.62 และ 27.52 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และค่าแอคทิวิตี้ของไลเปส เท่ากับ 0.607, 0.141, 0.163, 0.293, และ 0.075 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยพบว่าที่พีเอชสูงหรือต่ำกว่า 9.5 จะให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลง โดยที่พีเอช 9.0 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 82 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่พีเอช 10.0 แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน มีมากกว่า 67 และ 49 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำสามารถทำงานได้ดีในสภาวะเป็นด่าง (พีเอช 9.5)

จากผลการทดลองของปลาทูน่าแต่ละพันธุ์ดังกล่าวข้างต้น จะเห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ พันธุ์ครีบเหลือง และพันธุ์โอดำ คือพีเอช 10.0, 10.0 และ 9.5 ตามลำดับ ซึ่งเป็นพีเอชเดียวกันหรือใกล้เคียงกับพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดเอนไซม์ โดยทั่วไปเอนไซม์จะมีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ โดยพีเอชจะมีผลต่อความคงตัวและแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535) แต่การศึกษาของ Martinez และคณะ (1988) พบว่าเอนไซม์ทริปซินจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลาไส้ตัน



รูปที่ 16 ผลของพีเอชต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จาก กระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

(*Engraulis encrasicholus*) มีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ คือพีเอช 9.0 เมื่อใช้ BAPNA (benzamidine *N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide) เป็นสับสเตรต บ่มที่อุณหภูมิ 25 ^{0}ซ แต่เมื่อใช้เคซีนเป็นสับสเตรตพบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทริปซินสูงสุดที่พีเอช 9.5 ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซินที่ได้จากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) มีแอคทิวิตี้สูงสุดที่พีเอช 9.0 และเมื่อพีเอชสูงกว่า 9.0 แอคทิวิตี้ของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับที่พีเอชต่ำกว่าพีเอช 5.0 (Kristjanson and Nielson, 1991) ในขณะที่ Kim และคณะ (1994) รายงานว่า พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทริปซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่สกัดจากตับอ่อนของกุ้ง (crayfish : *Procambarus clarkii*) โดยใช้สับสเตรต คือ TAME (*N*-*p*-tosyl-L-aranine methyl ester) อยู่ในช่วงพีเอช 7.5 -8.0 โดยพบว่าที่พีเอช 8.0 การบ่มเอนไซม์ในทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ต่ำกว่าการบ่มใน TES-NaTES บัฟเฟอร์

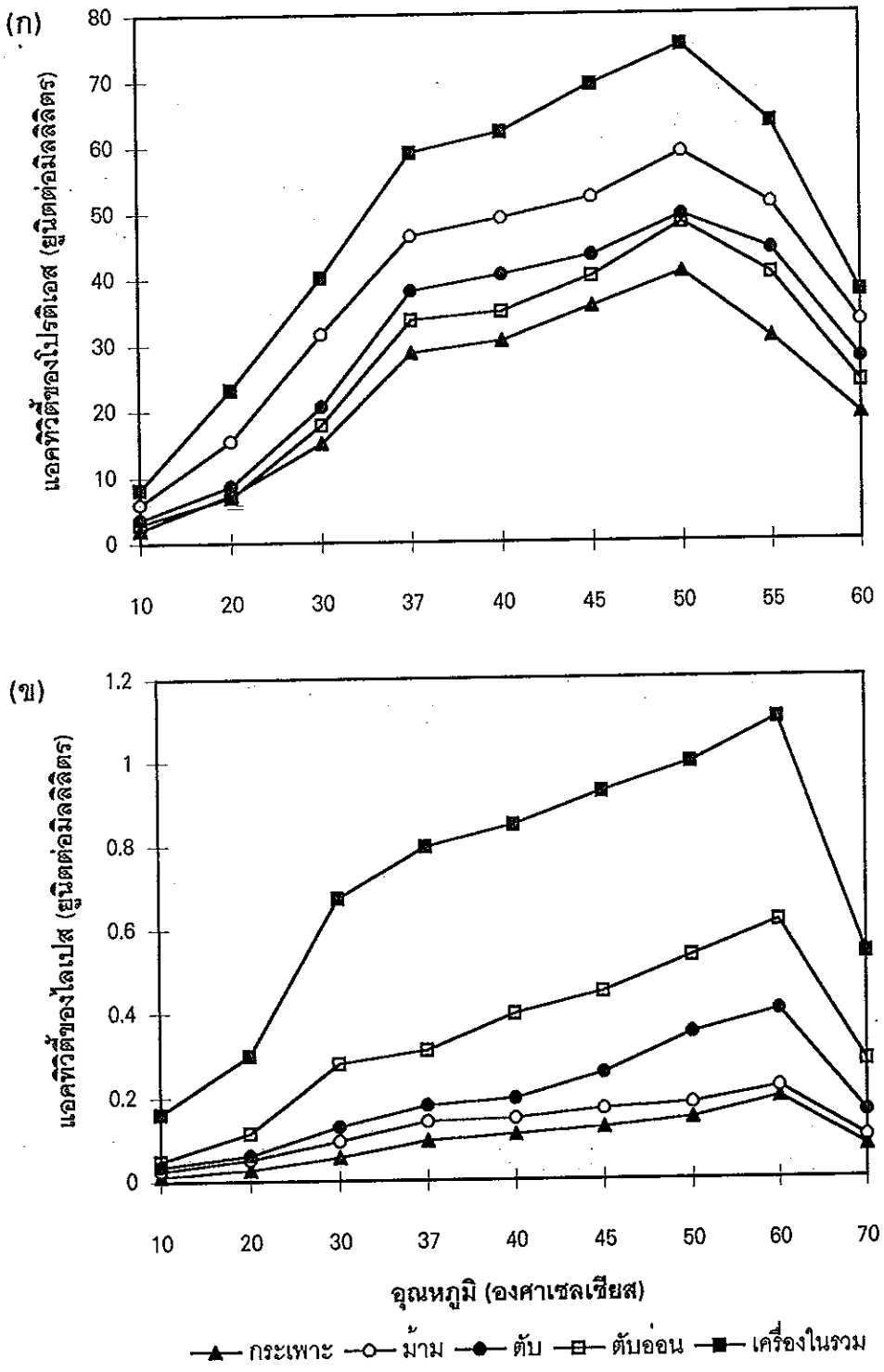
สรุปได้ว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ เป็นอัลคาไลน์โปรติเอสเพราะมีพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ในช่วงพีเอชเป็นด่าง (พีเอช 9.5 - 10.0) เช่นเดียวกับเอนไซม์จากเครื่องในและทางเดินอาหารของปลา ซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่พีเอชมากกว่า 7 (พีเอช 7.0 - 11.0) (Meinke, *et al.*,1972)

3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เติมเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์จากแต่ละแหล่ง และวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โดยบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน วิเคราะห์แอคทิวิตี้ที่อุณหภูมิ 10 - 60 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์โปรติเอส และที่อุณหภูมิ 10 - 70 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ไลเปส ผลการศึกษาเป็นดังนี้

3.2.1 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

นำเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 มาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ตามอุณหภูมิที่กำหนด ผลแสดงดังรูปที่ 17(ก) จะเห็นว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 75.38, 58.94, 49.41, 48.25 และ 40.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ



รูปที่ 17 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

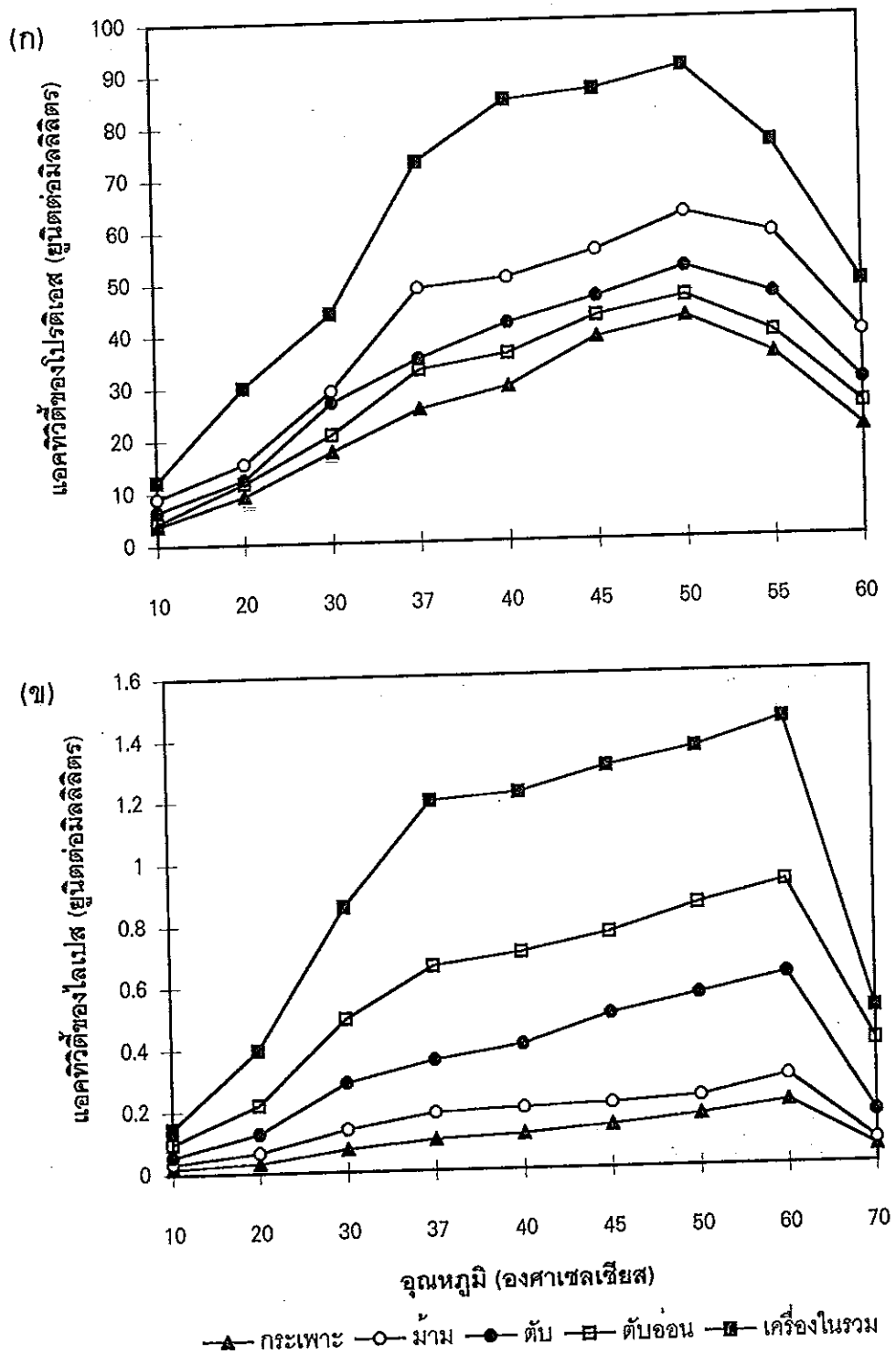
เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่านี้แอคทิวิตี้ของโปรติเอสจะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของโปรติเอสมีค่าประมาณ 50 , 56, 55, 49 และ 46 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ ตามลำดับ และพบว่าที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของโปรติเอสยังสามารถทำงานได้ โดยมีแอคทิวิตี้จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ มีค่าประมาณ 11, 10, 7, 6 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

แอคทิวิตี้ของไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวม ตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ (รูปที่ 17(ข)) โดยมีค่าเท่ากับ 1.099, 0.619, 0.401, 0.218 และ 0.193 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของไลเปสจะมีค่าประมาณ 48, 45, 39, 45 และ 39 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของไลเปสยังสามารถทำงานได้เช่นเดียวกับแอคทิวิตี้ของโปรติเอส โดยมีแอคทิวิตี้จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ มีค่าประมาณ 14, 11, 9, 8 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

3.2.2 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

นำเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 10.0 มาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ตามอุณหภูมิที่กำหนด ผลแสดงดังรูปที่ 18(ก) จะเห็นว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ ค่าเท่ากับ 90.61, 62.31, 51.95, 46.42 และ 42.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่านี้แอคทิวิตี้ของโปรติเอสจะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของโปรติเอสมีค่าประมาณ 54, 62, 57, 58 และ 48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ ตามลำดับ และพบว่าที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของโปรติเอสยังสามารถทำงานได้ โดยมีแอคทิวิตี้ประมาณ 13, 14, 12, 9 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

แอคทิวิตี้ของไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวม ตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ (รูปที่ 18(ข)) โดยมีค่าเท่ากับ 1.446, 0.916, 0.618, 0.287 และ 0.203 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของไลเปสจะมีค่าประมาณ 35, 26, 27, 43 และ 27 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ



รูปที่ 18 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus tonggol*)

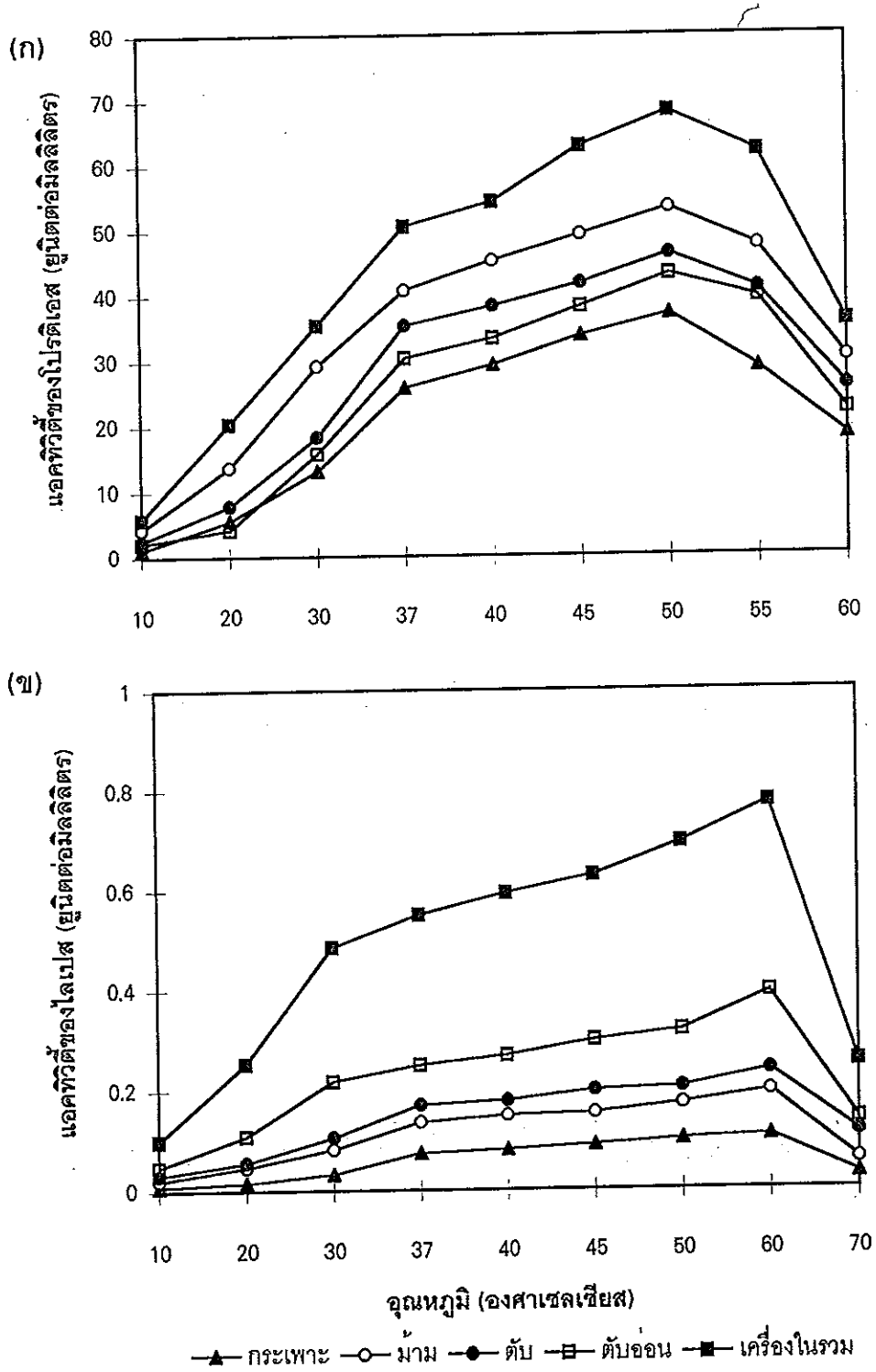
60 ^{0}ซ และที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของไลเปสยังสามารถทำงานได้เช่นเดียวกับแอคทิวิตี้ของโปรติเอส โดยมีแอคทิวิตี้จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ มีค่าประมาณ 10, 14, 9, 11 และ 9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

3.2.3 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

นำเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พีเอช 9.5 มาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์ตามอุณหภูมิที่กำหนด ผลแสดงดังรูปที่ 19 (ก) จะเห็นว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ มีค่าเท่ากับ 68.18, 53.35, 46.26, 43.11 และ 37.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงกว่านี้แอคทิวิตี้จะลดลง โดยที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ แอคทิวิตี้มีค่าประมาณ 53, 56, 56, 52 และ 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ 50 ^{0}ซ ตามลำดับ และพบว่าที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของโปรติเอสยังสามารถทำงานได้ โดยมีแอคทิวิตี้มีค่าประมาณ 9, 8, 5, 5 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

แอคทิวิตี้ของไลเปสจากส่วนของเครื่องในรวม ตับอ่อน ตับ ม้าม และกระเพาะ มีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ (รูปที่ 19(ข)) โดยมีค่าเท่ากับ 0.774, 0.393, 0.238, 0.196 และ 0.107 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้มีค่าประมาณ 37, 30, 45, 35 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ และที่อุณหภูมิ 10 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของไลเปสยังสามารถทำงานได้เช่นเดียวกับแอคทิวิตี้ของโปรติเอสโดยมีแอคทิวิตี้จากส่วนของเครื่องในรวม ม้าม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ มีค่าประมาณ 13, 10, 13, 12 และ 7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (เมื่อเทียบกับผลที่ 50 ^{0}ซ)

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ เท่ากับ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงหรือสูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่เหมาะสม (60 - 65 ^{0}ซ) ในการย่อยสลายเคซีนของอัลคาไลน์โปรติเอสจากปลาน้ำจืด 4 ชนิดและปลาทะเล 21 ชนิด (Iwata, *et al.*,1974) รวมทั้งเอนไซม์ทริปซินที่สกัดจากตับอ่อนกุ้ง (crayfish : *Procambarus clarkii*) โดยแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทริปซินที่พีเอช 6.8 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 60 ^{0}ซ



รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะ ม้าม ตับ ตับอ่อน และเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

(มี TAME = *N-p*-tosyl-L-arginine methyl eater เป็นสับสเตรต) แต่การศึกษาที่พีเอช 8.1 แอคทิวิตี้ของทริปซินมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 - 60 ^{0}ซ (Kim, *et al.*, 1994) ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซินจากไส้ติ่งของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) ที่พีเอช 7.8 มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 55 ^{0}ซ (Suc-AAPF-Na เป็นสับสเตรต) (Kristjansson and Nielson,1991)

จากการที่ผลการทดลองดังกล่าวมาทั้งหมดมีความแตกต่างกันนั้น อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของปัจจัยต่างๆ ที่ใช้ในการศึกษาแตกต่างกัน เช่น แหล่งของเอนไซม์ พีเอช ชนิดของสับสเตรต และระยะเวลา เป็นต้น

จากผลการศึกษาข้างต้นยังพบอีกว่า เอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่ได้จากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำ (ต่ำกว่า 20 ^{0}ซ) เช่นเดียวกับการทำงานของเอนไซม์ไคโมทริปซินจากไส้ติ่งของปลาค็อด (Atlantic cod : *Gadus morhua*) ซึ่งมีแอคทิวิตี้สูงกว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม 1.5 เท่า ที่อุณหภูมิ 2.8 - 8.0 ^{0}ซ โดยเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความแตกต่างของแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ทั้งสองจะลดลงและแอคทิวิตี้จะไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิห้อง (20 - 25 ^{0}ซ) (Raa,1990) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเอนไซม์ที่สกัดจากสัตว์น้ำจะมีอัตราการเร่งปฏิกิริยาสูงที่อุณหภูมิต่ำกว่าเอนไซม์จากสัตว์เลือดอุ่น (Hultin, 1980 ; Hochachka and Semero, 1984 ; Simpson and Haard, 1987) ซึ่งเป็นคุณสมบัติเด่นจำเพาะของเอนไซม์ที่สกัดจากสัตว์น้ำ

3.3 ความคงตัวต่อพีเอช

เมื่อเก็บสารละลายเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าในบัฟเฟอร์เดียวกันกับพีเอชที่เหมาะสมและพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสม (พีเอชเหมาะสม ± 1) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 30, 60, 90 และ 120 นาที และวิเคราะห์แอคทิวิตี้ที่เหลือของเอนไซม์ ผลการศึกษาเป็นดังนี้

3.3.1 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

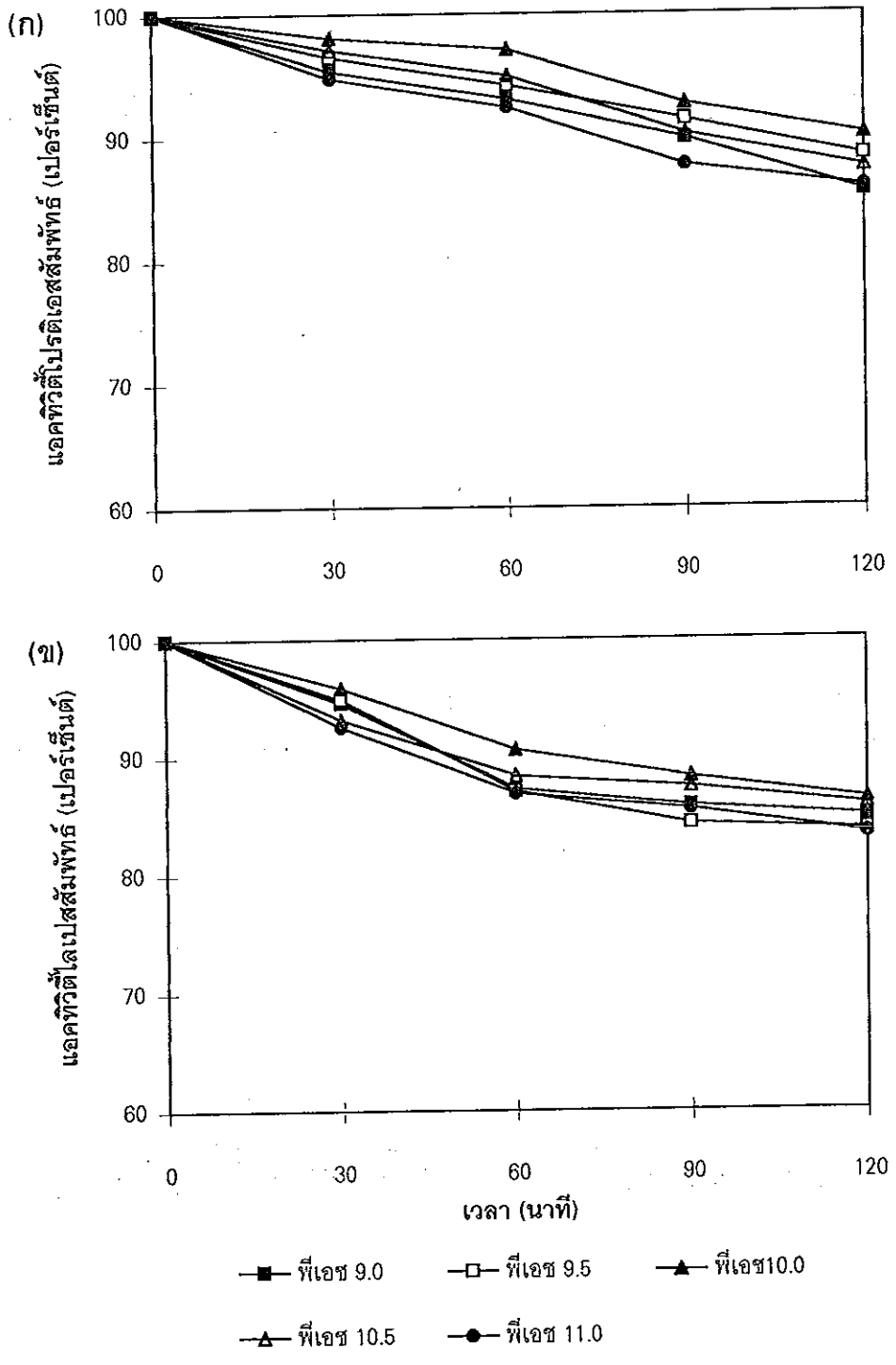
พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบคือ พีเอช 10.0 (จากข้อ 3.1.1) ดังนั้นจึงศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 9.0 - 11 (10 ± 1) พบว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (เครื่องในรวม กระเพาะ ม้าม ตับและตับอ่อน) มีความคงตัวดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสม

และจากรูปที่ 20 - 24 จะเห็นว่าการเก็บเอนไซม์สกัดไว้ที่พีเอชที่เหมาะสมและพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสม (อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ) ที่เวลาต่างๆ มีผลกระทบต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสน้อยมาก ซึ่งเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที (ในทุกพีเอช) เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบมีแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบดังต่อไปนี้

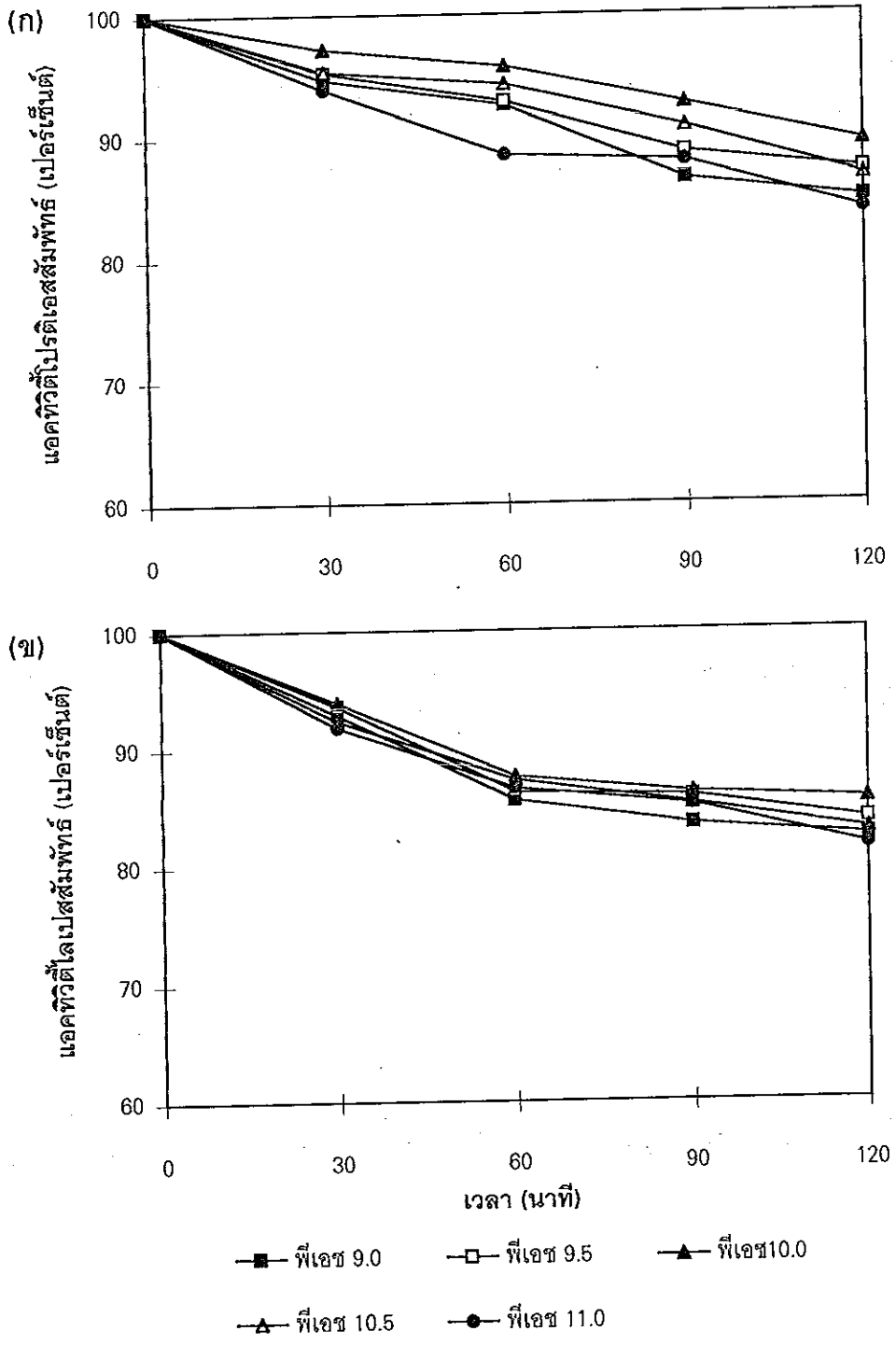
ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงดังรูปที่ 20 พบว่า ที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 97.1 และ 90.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 90.2 และ 86.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (85.9 และ 83.4 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (85.5 และ 84.9 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงดังรูปที่ 21 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 95.8 และ 87.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 89.5 และ 85.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (84.9 และ 82.4 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (83.9 และ 81.6 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

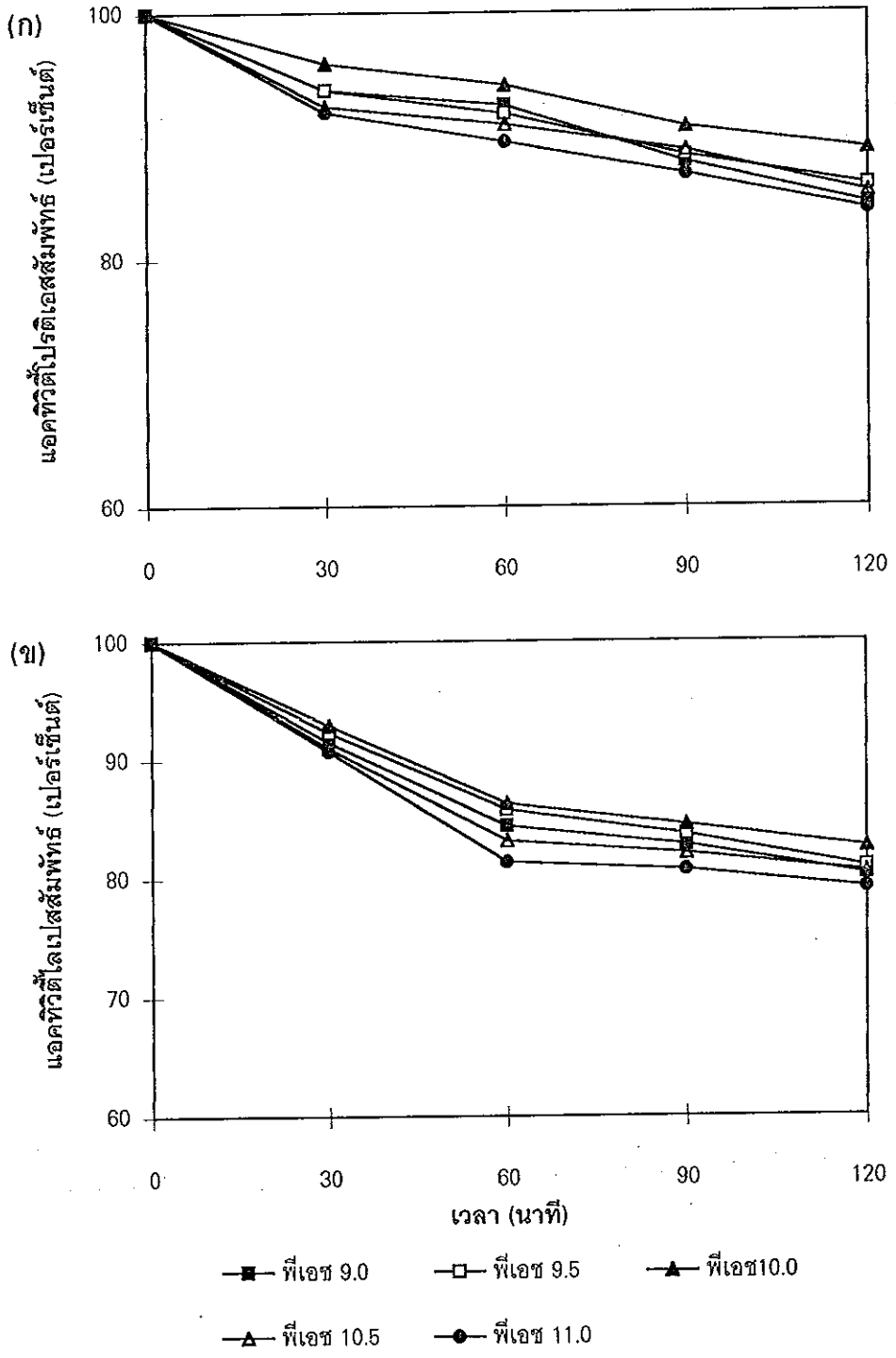
ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงดังรูปที่ 22 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 94.1 และ 86.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 88.9 และ 82.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (84.5 และ 80.3 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (84.0 และ 79.2 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน



รูปที่ 20 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรตีเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)



รูปที่ 21 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ *(Katsuwonus pelamis)*



รูปที่ 22 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ *(Katsuwonus pelamis)*

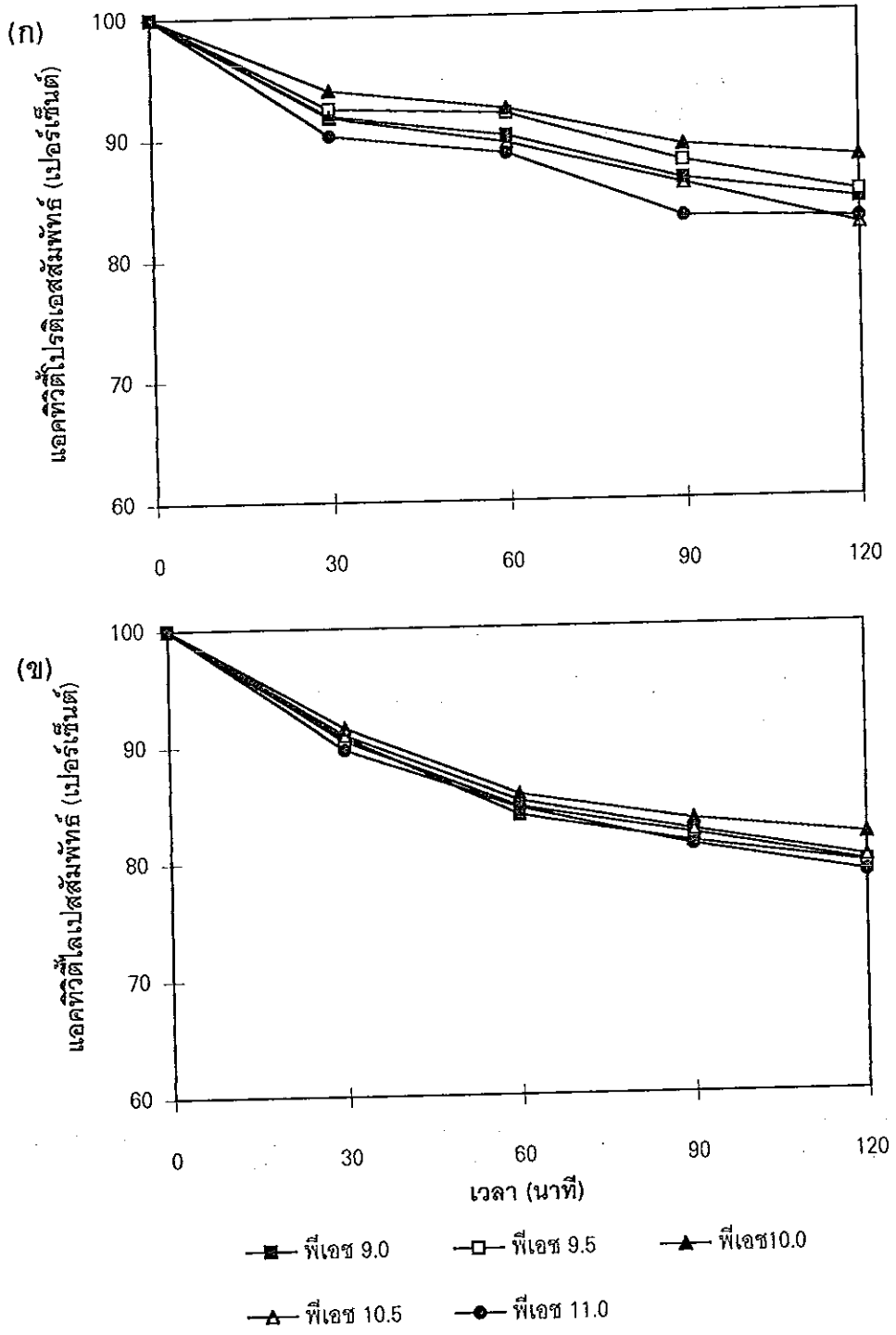
ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงดังรูปที่ 23 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 92.3 และ 85.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 88.0 และ 81.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (84.5 และ 79.4 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (82.9 และ 78.6 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงดังรูปที่ 24 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 89.9 และ 83.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 85.5 และ 80.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (82.1 และ 80.4 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (81.1 และ 78.1 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

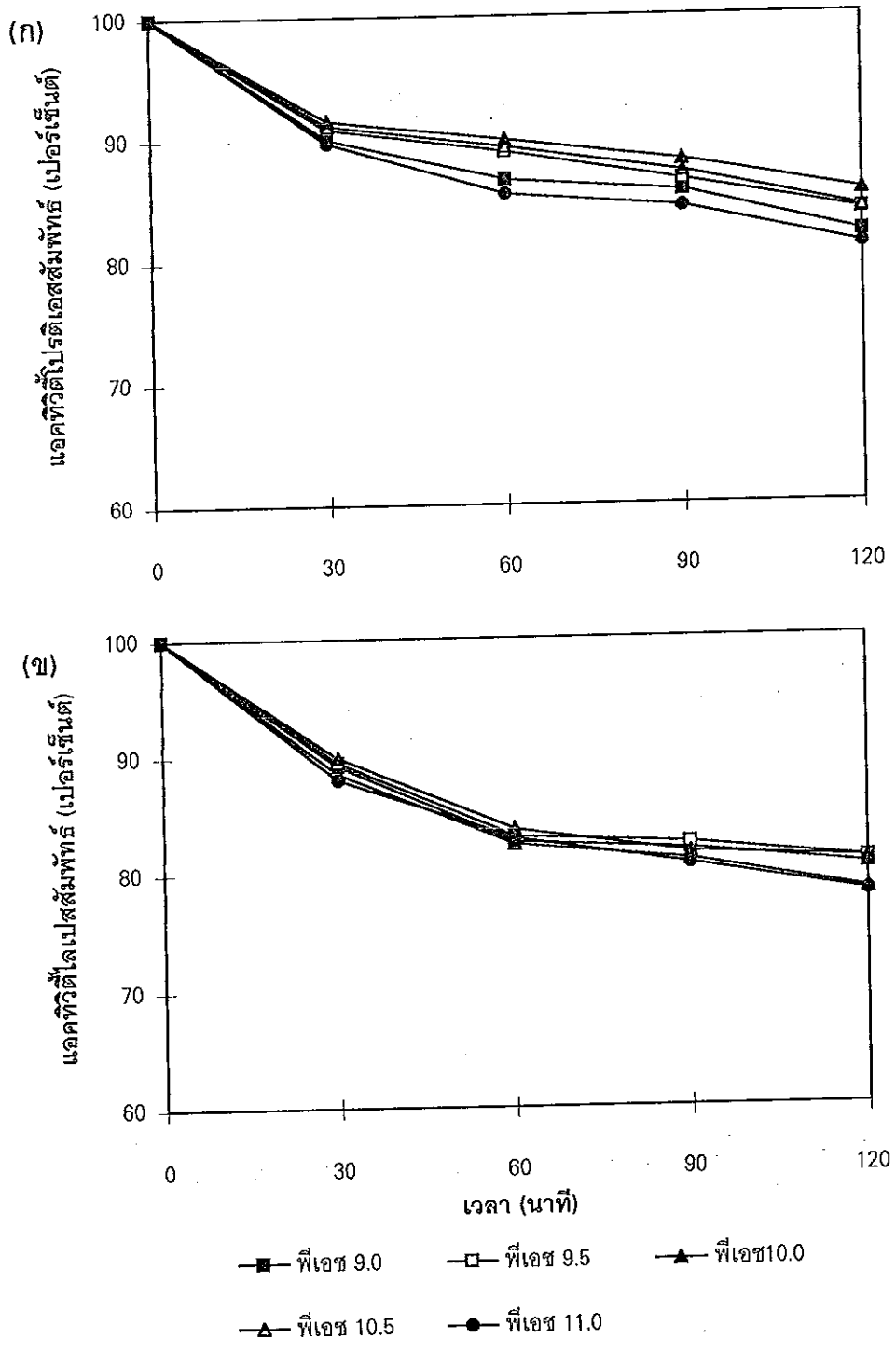
3.3.2 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองคือ พีเอช 10.0 (จากข้อ 3.1.2) ดังนั้นจึงศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนในช่วงพีเอช 9.0 - 11 (10 ± 1) ผลการศึกษาเป็นดังนี้

พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง คือ พีเอช 10.0 (จากข้อ 3.1.1) ดังนั้นจึงศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 9.0 - 11 (10 ± 1) พบว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (เครื่องในรวม กระเพาะ ม้าม ตับและตับอ่อน) มีความคงตัวดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสม และจากรูปที่ 25 - 29 จะเห็นว่าการเก็บเอนไซม์สกัดไว้ที่พีเอชที่เหมาะสมและพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสม (อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ซ) ที่เวลาต่างๆ มีผลกระทบต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสน้อยมาก ซึ่งเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที (ในทุกพีเอช) เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง มีแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 85 และ 80 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ



รูปที่ 23 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ *(Katsuwonus pelamis)*



รูปที่ 24 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ *(Katsuwonus pelamis)*

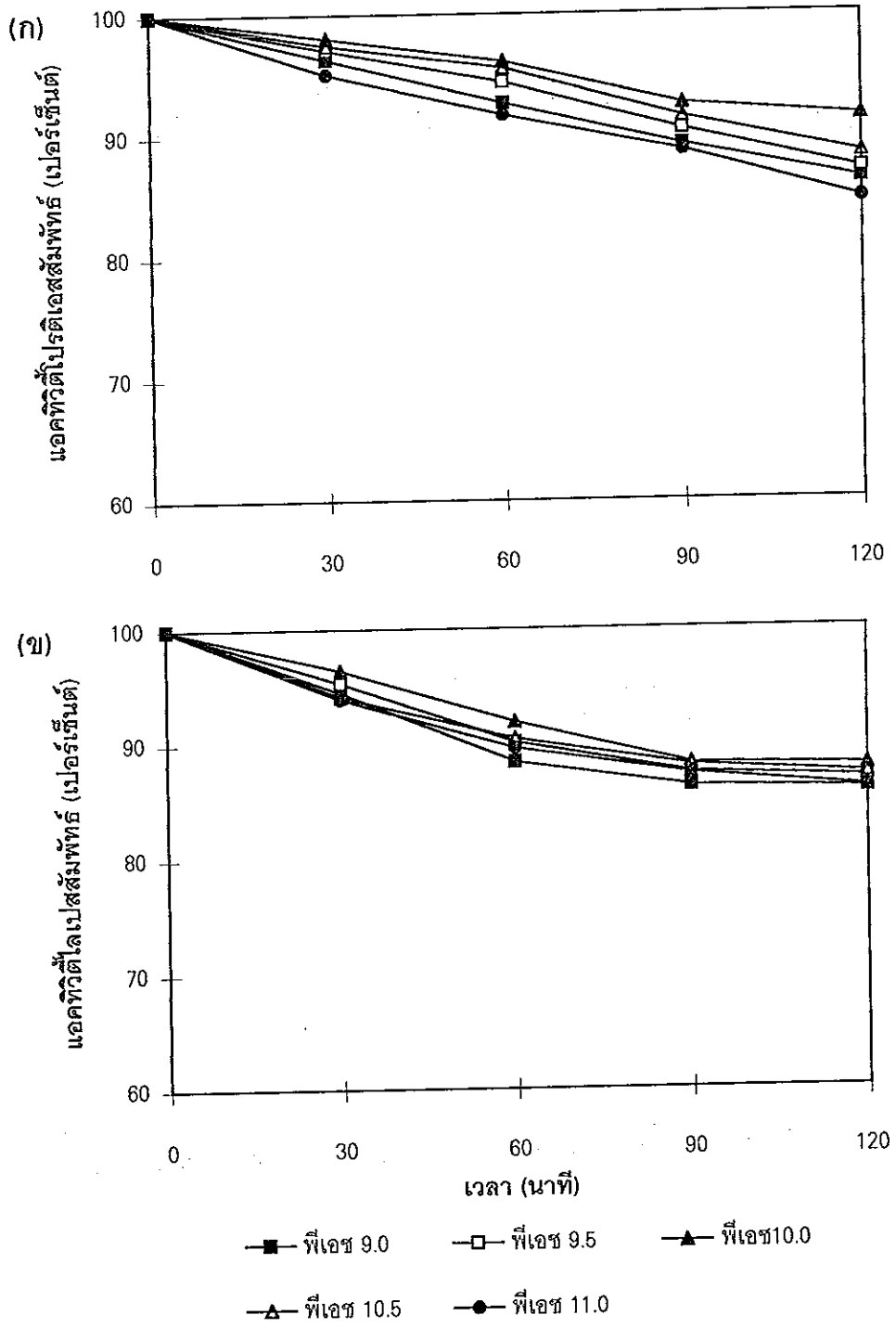
โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ดังต่อไปนี้

ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงดังรูปที่ 25 พบว่า ที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 96.1 และ 91.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 91.5 และ 87.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (86.3 และ 85.9 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (84.7 และ 86.0 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

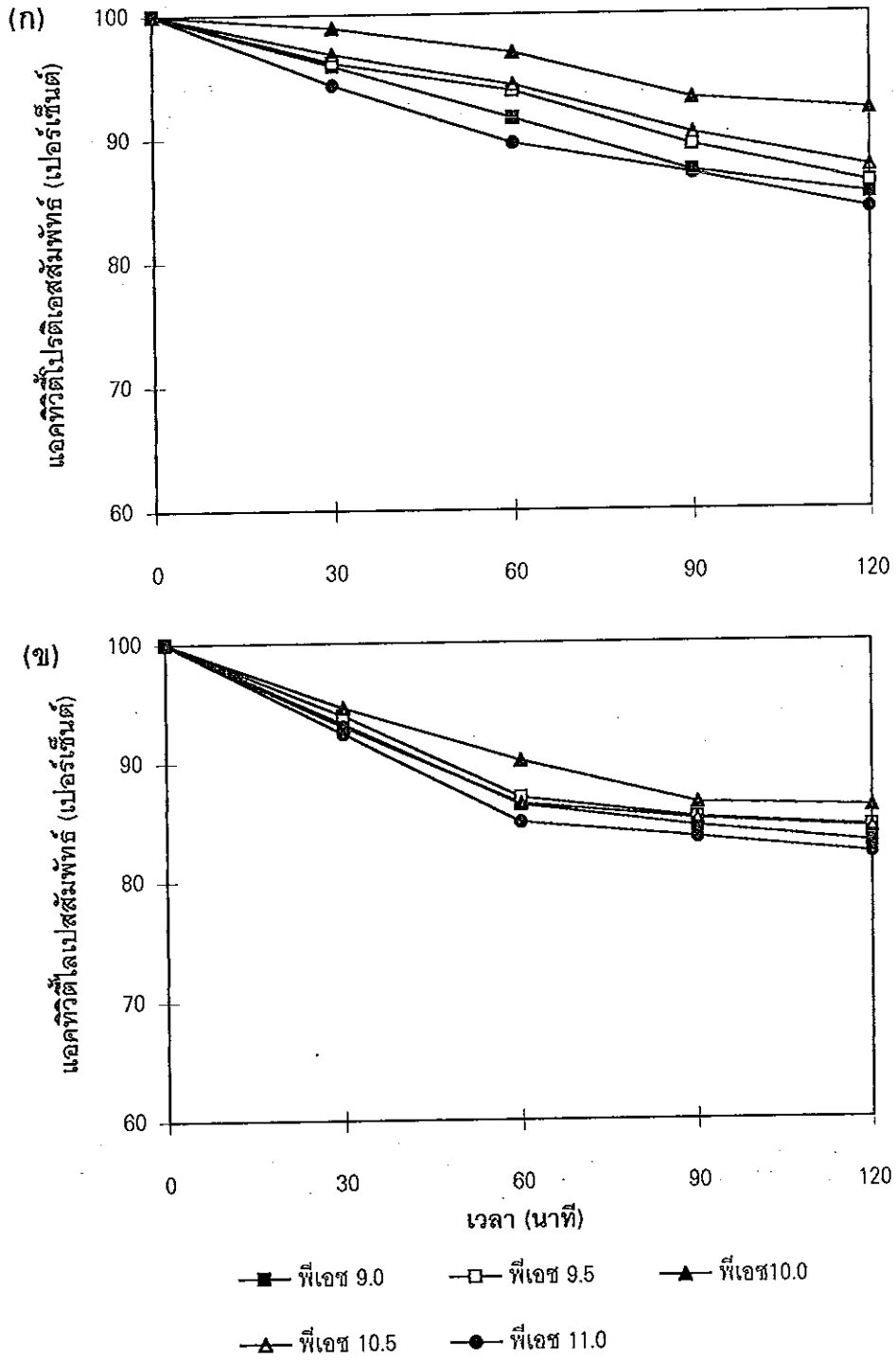
ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงดังรูปที่ 26 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 96.8 และ 90.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 92.2 และ 86.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (85.4 และ 83.1 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (84.2 และ 82.2 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงดังรูปที่ 27 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 95.4 และ 86.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 89.0 และ 84.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (84.3 และ 85.0 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (83.9 และ 81.4 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

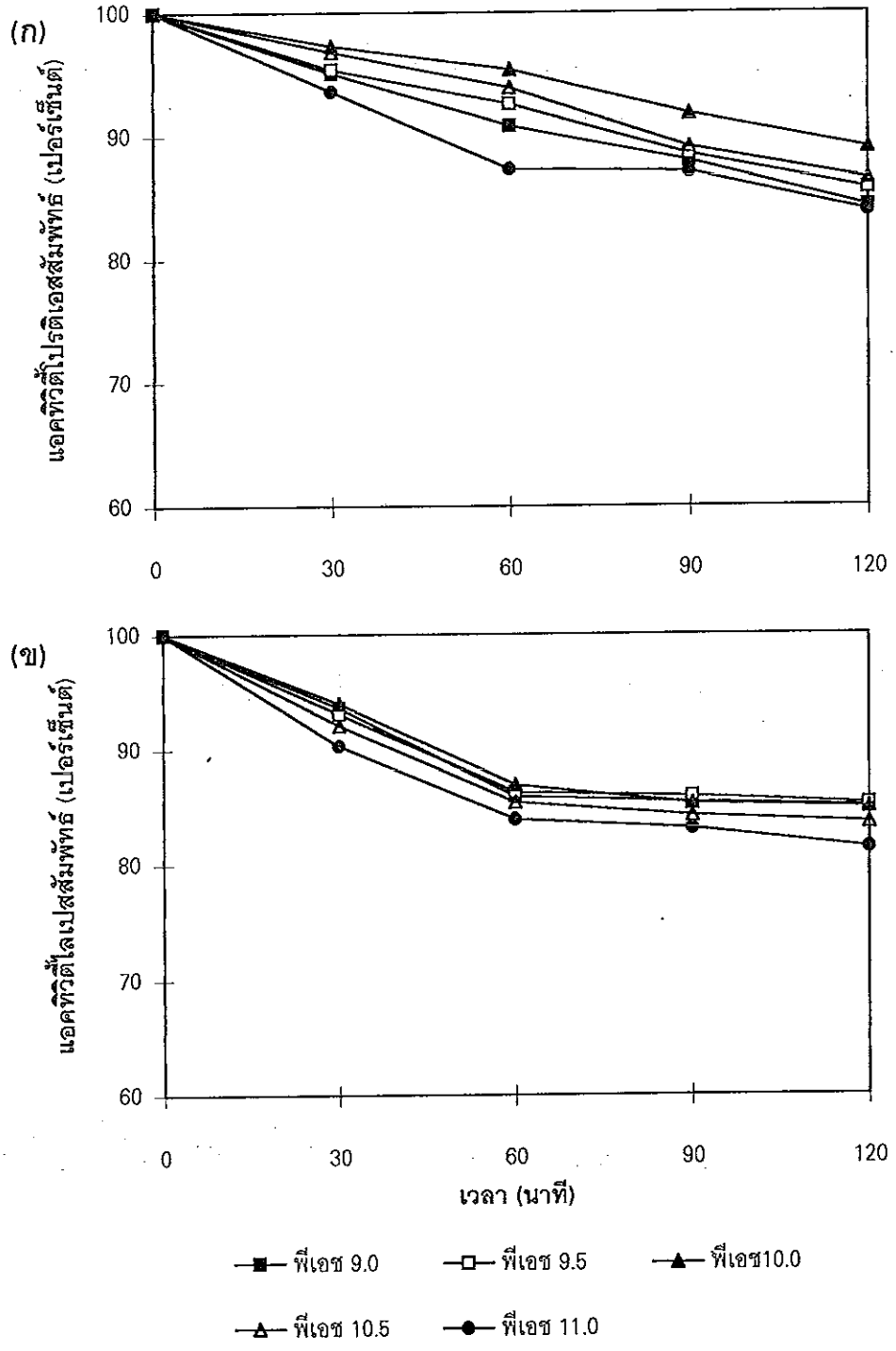
ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงดังรูปที่ 28 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 94.5 และ 86.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 87.9 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (85.9 และ 81.6 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (81.5 และ 80.5 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน



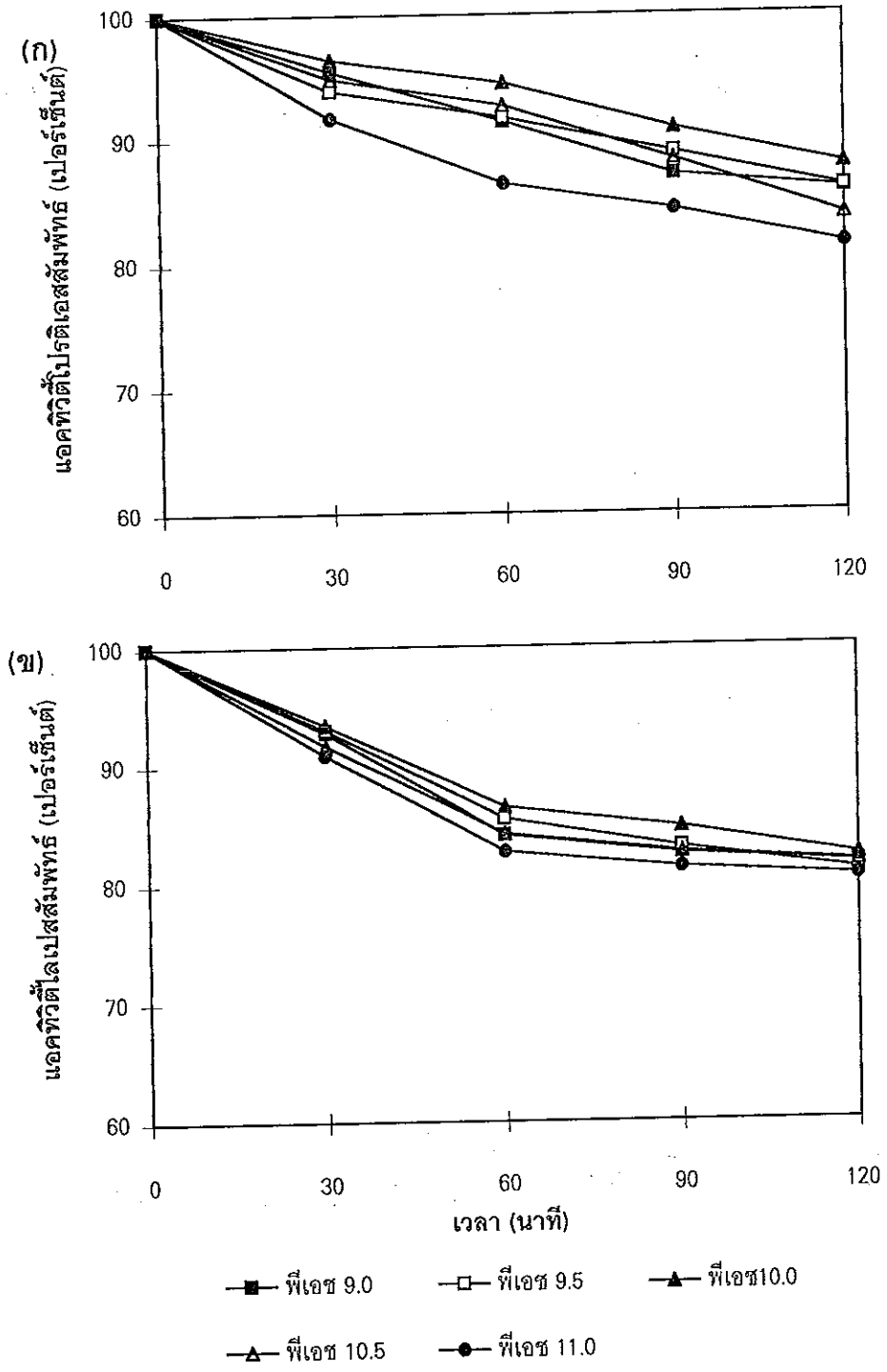
รูปที่ 25 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง *(Thunnus albacares)*



รูปที่ 26 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง *(Thunnus albacares)*



รูปที่ 27 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง *(KThunnus albacares)*



รูปที่ 28 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง *(Thunnus albacares)*

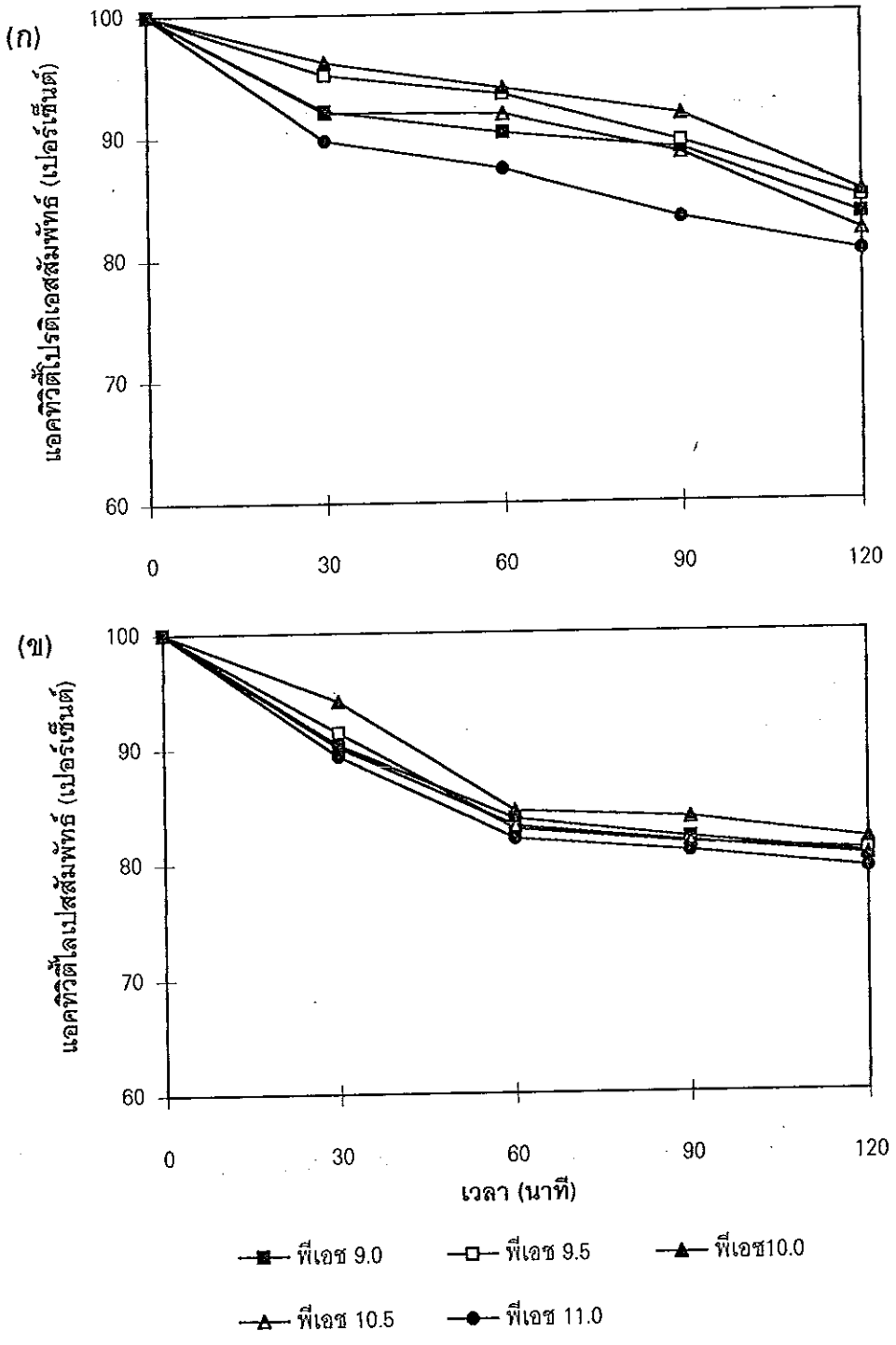
จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงดังรูปที่ 29 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 10.0) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุด โดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 93.9 และ 84.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 85.3 และ 81.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 11.0 (83.4 และ 80.6 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 9.0 (80.4 และ 79.3 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

3.3.3 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

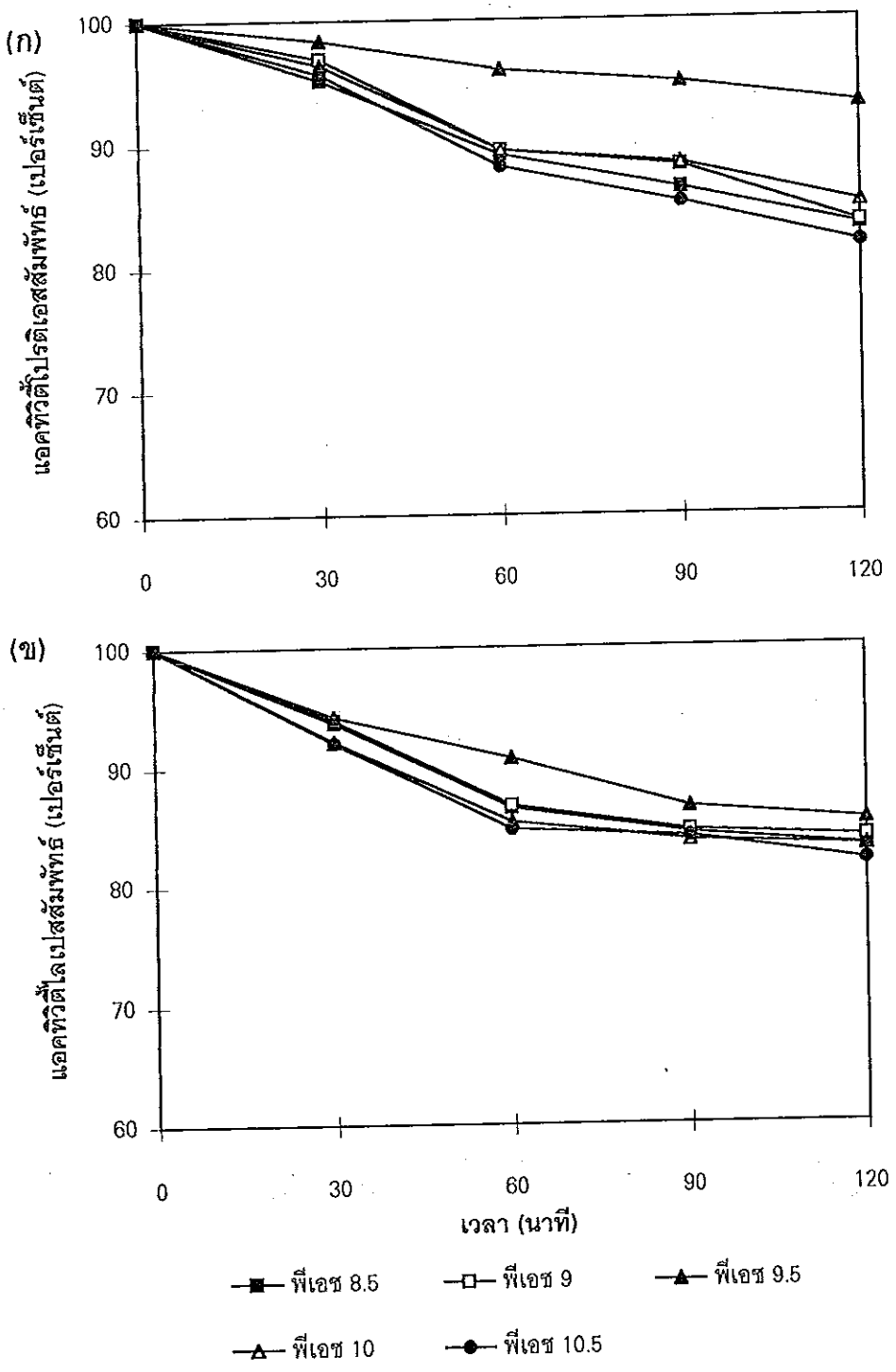
พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำคือ พีเอช 9.5 (จากข้อ 3.1.3) ดังนั้นจึงศึกษาความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนในช่วงพีเอช 8.5 - 10.5(9.5 ± 1) ผลการศึกษาเป็นดังนี้

พีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำ คือ พีเอช 9.5 (จากข้อ 3.1.1) ดังนั้นจึงศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 8.5 - 10.5 (9.5 ± 1) พบว่าเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (เครื่องในรวม กระเพาะ ม้าม ตับและตับอ่อน) มีความคงตัวดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสม และจากรูปที่ 30 - 34 จะเห็นว่าการเก็บเอนไซม์สกัดไว้ที่พีเอชที่เหมาะสมและพีเอชใกล้เคียงกับพีเอชที่เหมาะสม (อุณหภูมิ 4 ^{0}ซ) ที่เวลาต่างๆ มีผลกระทบต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสน้อยมาก ซึ่งเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที (ในทุกพีเอช) เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ มีแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 80 และ 78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยมีรายละเอียดของผลการศึกษาความคงตัวต่อพีเอชของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำ ดังต่อไปนี้

ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงดังรูปที่ 30 พบว่า ที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 9.5) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุดโดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 96.0 และ 90.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาทีและที่เวลา 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 93.1 และ 81.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 10.5 (83.2 และ 83.1 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 8.5 (81.8 และ 81.9 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน



รูปที่ 29 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง *(Thunnus albacares)*



รูปที่ 30 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

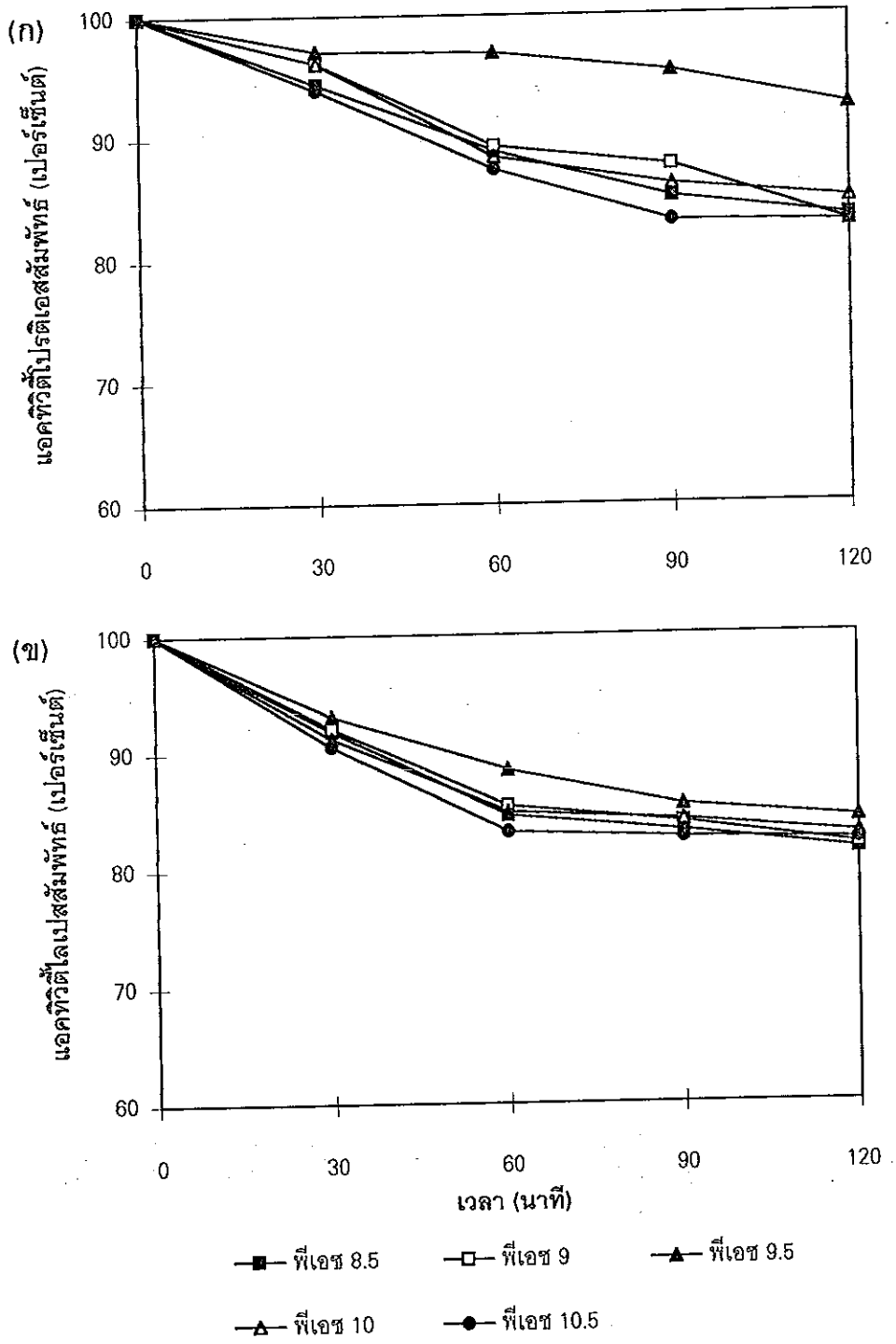
ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงดังรูปที่ 31 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 9.5) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุดโดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 96.9 และ 88.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 92.5 และ 84.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 10.5 (83.4 และ 81.5 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 8.5 (82.9 และ 82.3 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงดังรูปที่ 32 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 9.5) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุดโดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 92.7 และ 85.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 89.6 และ 81.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 10.5 (82.5 และ 79.5 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 8.5 (81.6 และ 78.7 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

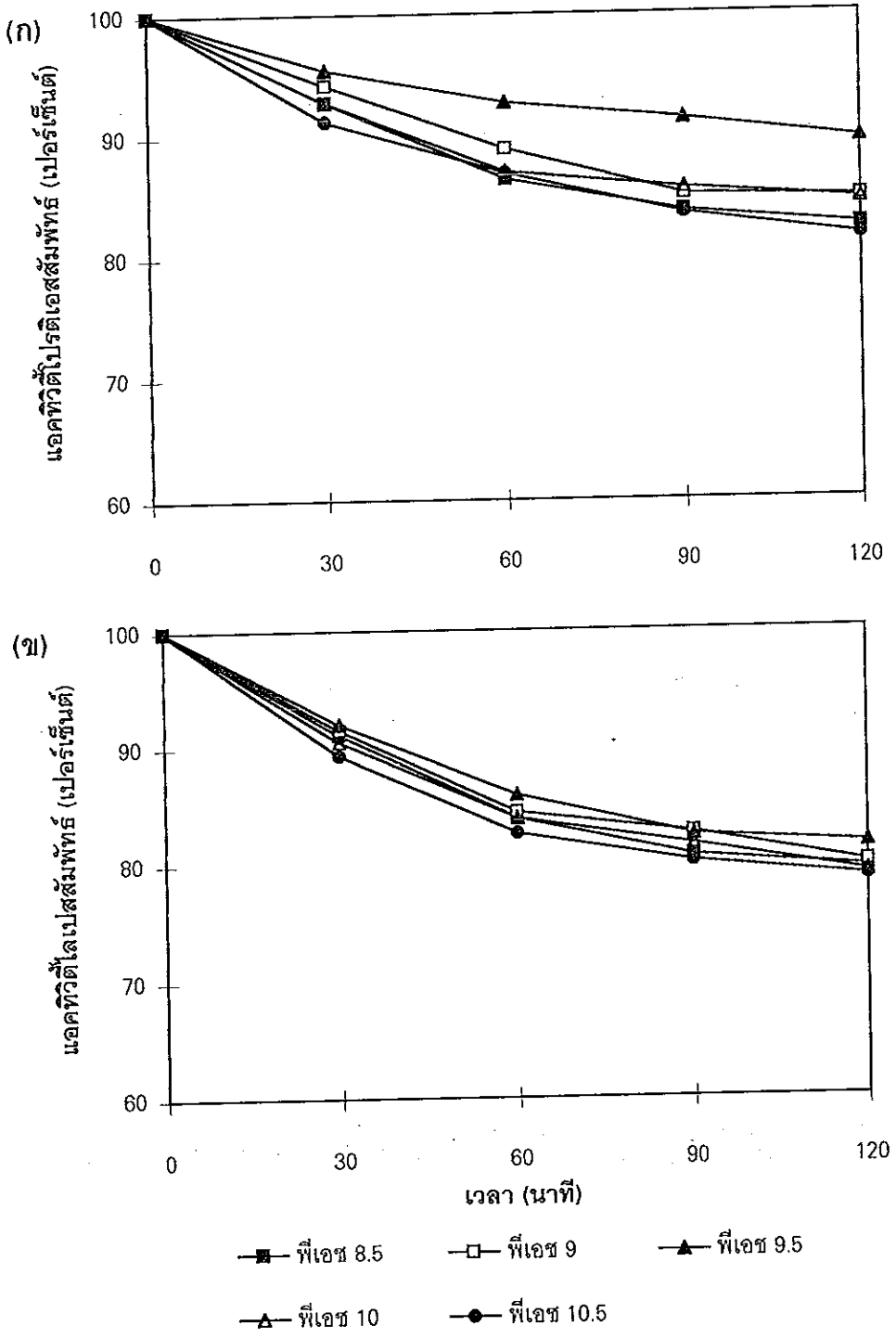
ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงดังรูปที่ 33 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 9.5) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุดโดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 90.4 และ 84.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 83.9 และ 80.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 10.5 (81.9 และ 78.0 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 8.5 (81.4 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงดังรูปที่ 34 พบว่าที่พีเอชที่เหมาะสม (พีเอช 9.5) แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสมีความคงตัวดีที่สุดโดยมีแอคทิวิตี้เหลืออยู่เท่ากับ 89.3 และ 82.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังการเก็บ 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 83.4 และ 79.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเก็บที่พีเอช 10.5 (80.4 และ 77.6 เปอร์เซ็นต์) และพีเอช 8.5 (80.1 และ 76.6 เปอร์เซ็นต์) ที่เวลาเดียวกัน

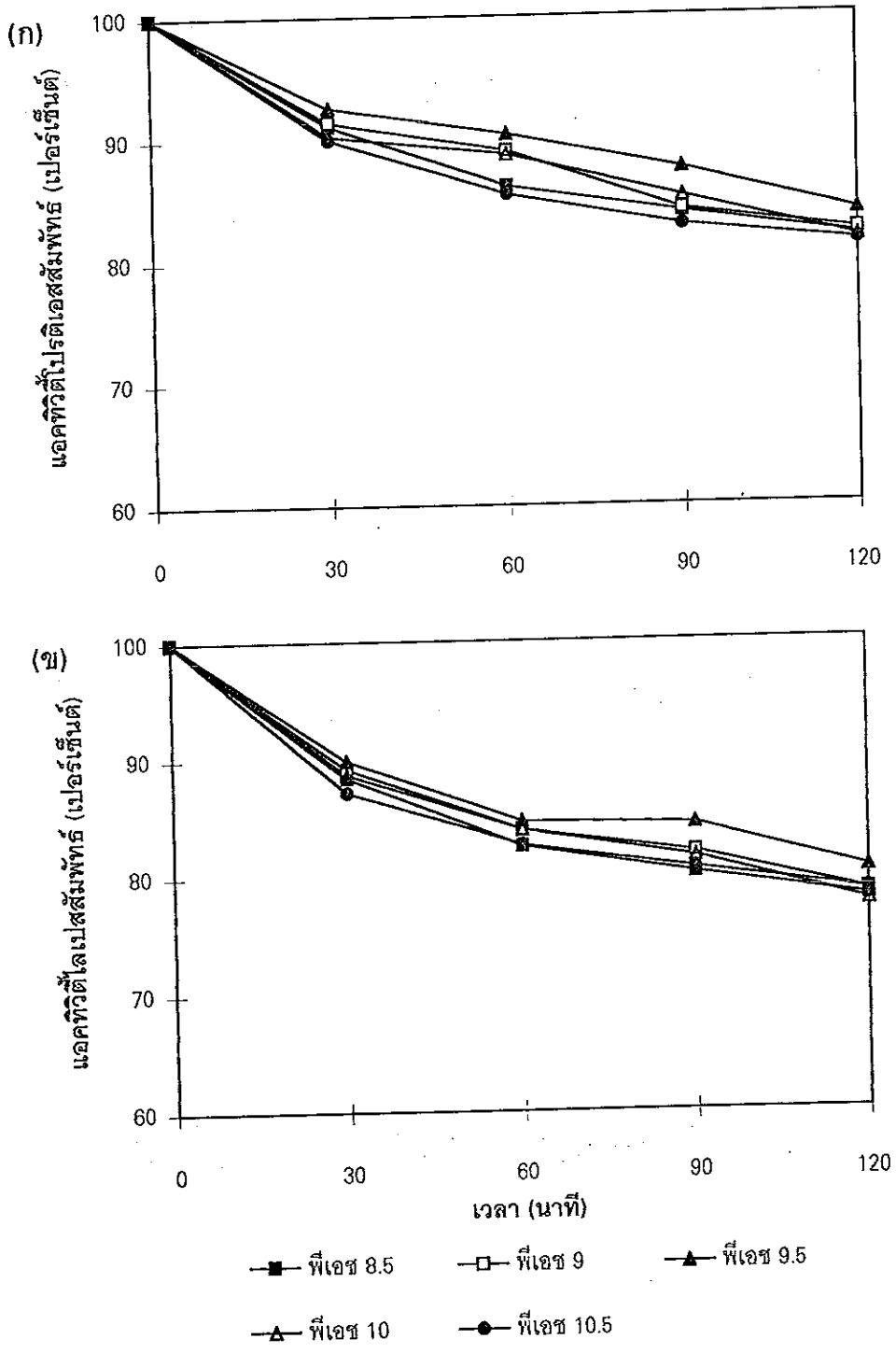
จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น (ข้อ 3.3.1 - 3.3.3) สรุปว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ มีความคงตัวต่อพีเอชดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (ในช่วงพีเอช



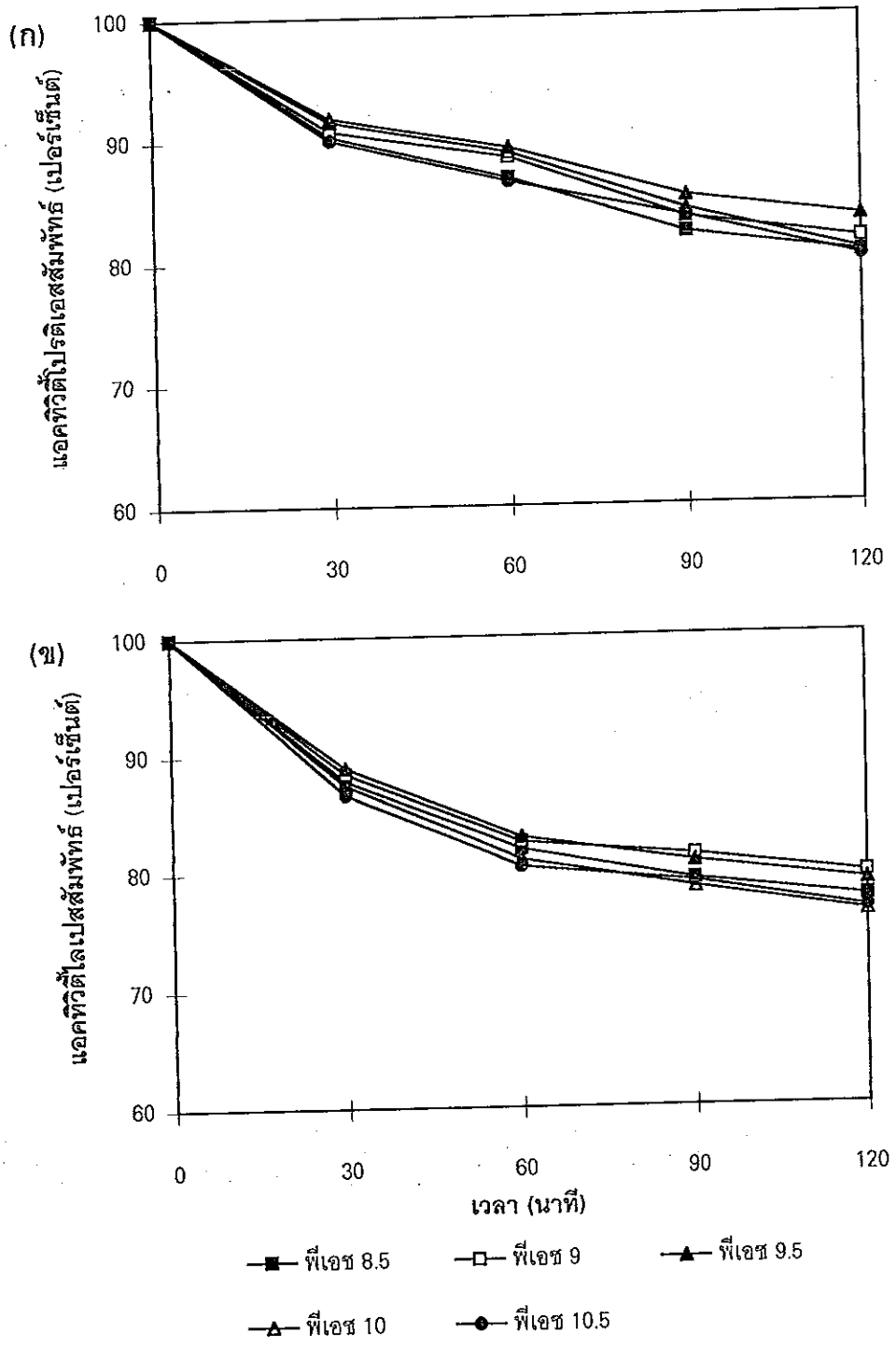
รูปที่ 31 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรตีเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)



รูปที่ 32 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ *(Thunnus tonggol)*



รูปที่ 33 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)



รูปที่ 34 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ *(Thunnus tonggol)*

9.5 - 10.0) เช่นเดียวกับเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนกุ้ง (crayfish : *Procambarus clarkii*) ซึ่งมีความคงตัวต่อพีเอชดีที่สุดที่พีเอชเดียวกับพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ (พีเอช 6.8 และ 8.1) (Kim, *et al.*,1992) แต่การศึกษาของ Shin และ Zall (1986) พบว่าซีรีนโปรติเอสจากไส้ติ่งปลาค็อด มีพีเอชที่เหมาะสมคือ 9.6 และคงตัวที่ช่วงพีเอช 8.8 - 9.6

3.4 ความคงตัวต่ออุณหภูมิ

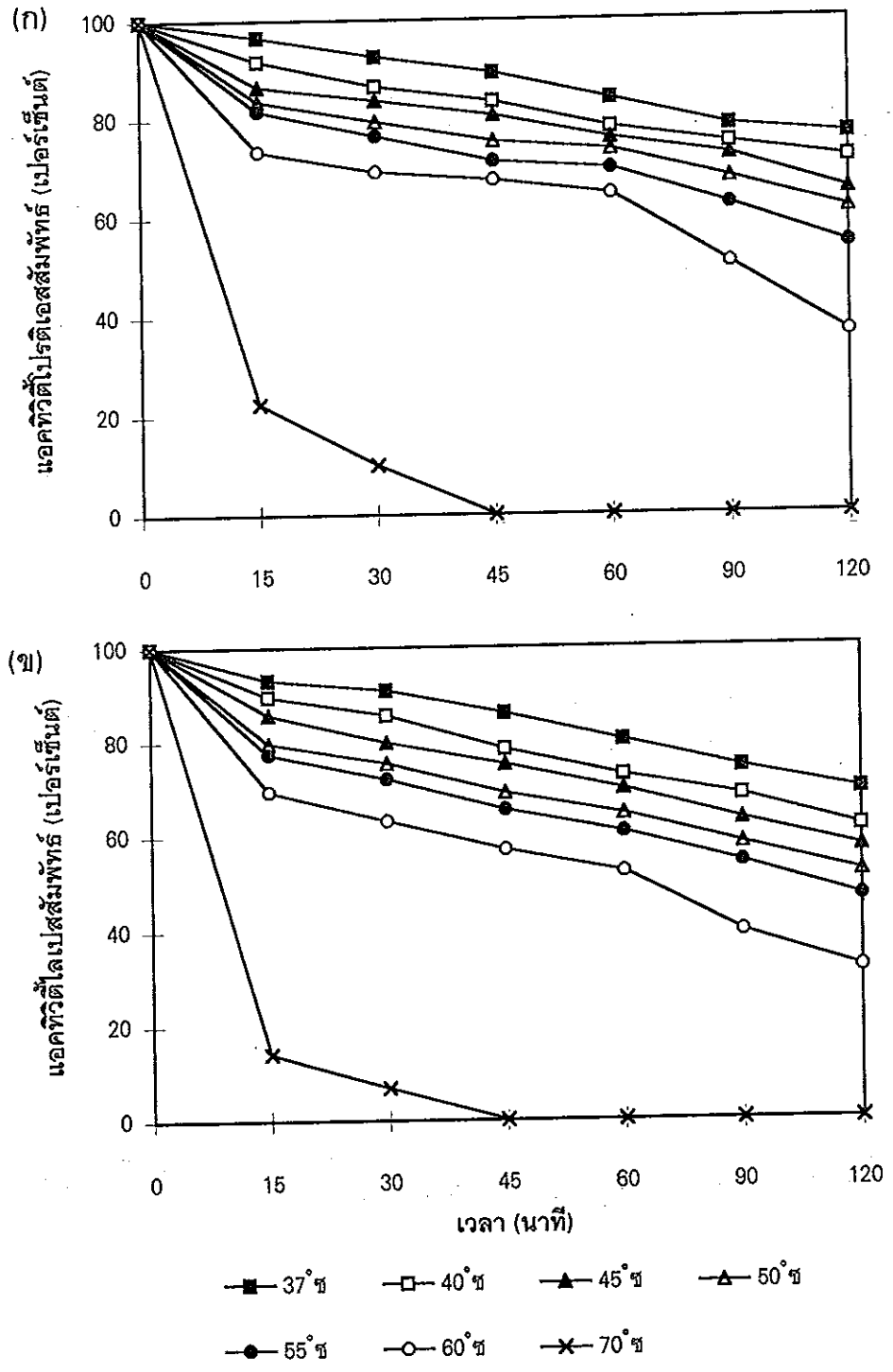
เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนที่อุณหภูมิ 37, 40, 45, 50, 55, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที โดยเก็บตัวอย่างทุก 30 นาที นำมาวิเคราะห์แอคทิวิตี้ที่เหลือ ผลการวิเคราะห์เป็นดังนี้

3.4.1 ปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

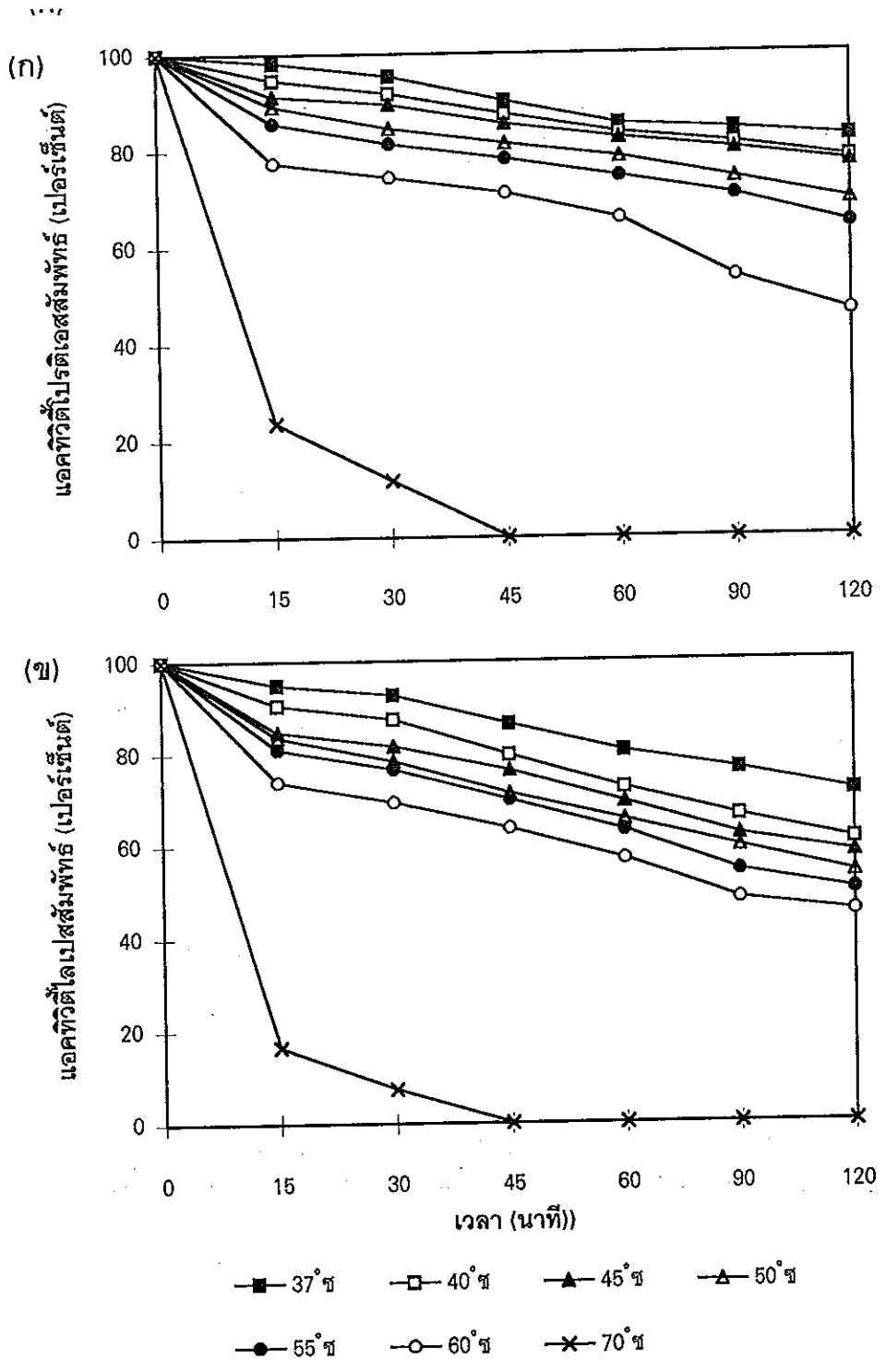
ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงใน รูปที่ 35 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 83.9 และ 80.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 76.5 และ 69.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 64.7 และ 52.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 36.4 และ 31.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 69 และ 50 เปอร์เซ็นต์

ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงในรูปที่ 36 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 85.4 และ 80.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 82.6 และ 71.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 68.8 และ 57.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของ



รูปที่ 35 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)



รูปที่ 36 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

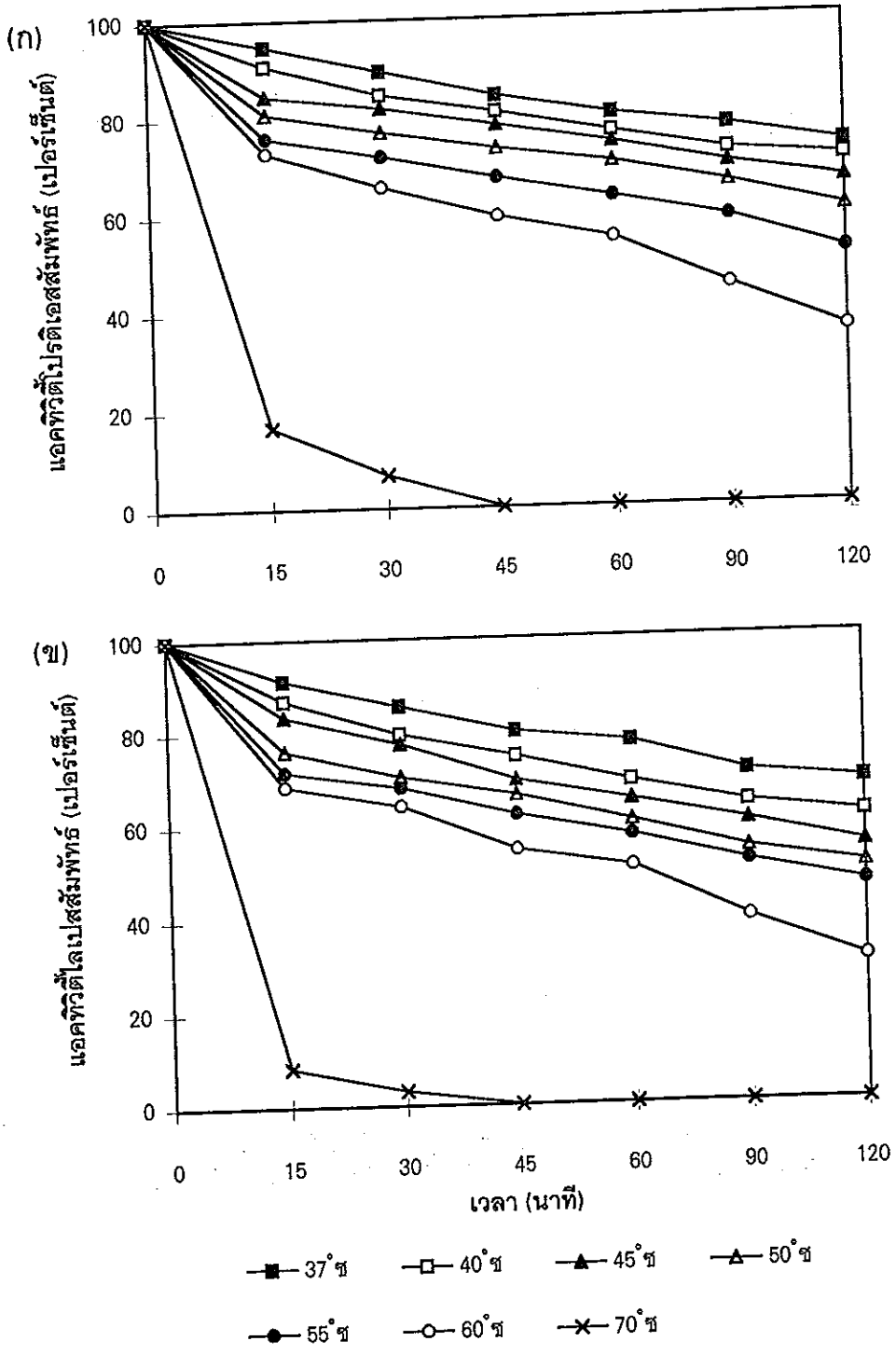
เอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 46.4 และ 45.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 60 และ 45 เปอร์เซ็นต์

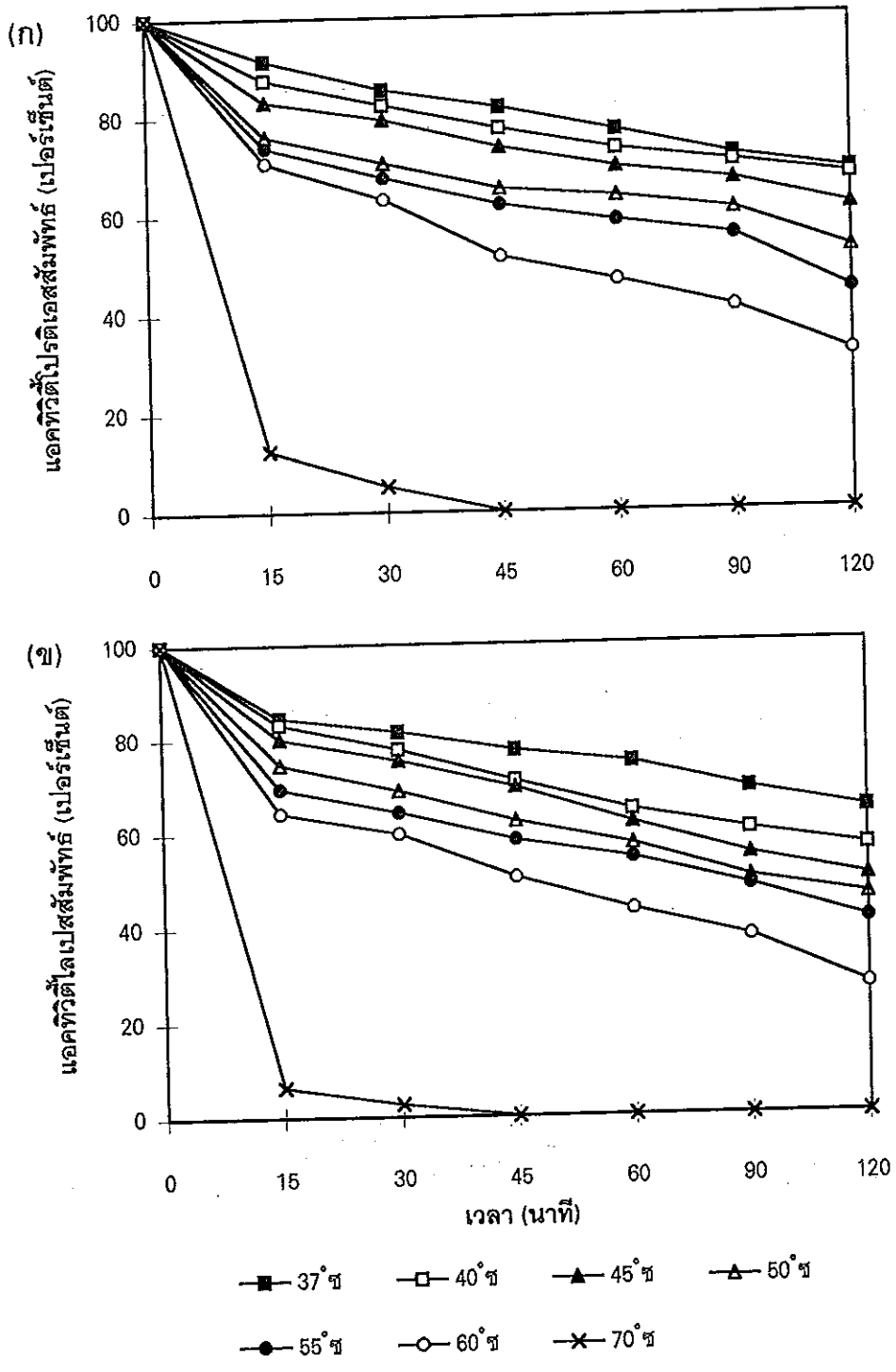
ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงในรูปที่ 37 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 80.3 และ 77.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 73.6 และ 68.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 54.7 และ 50.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 35.6 และ 30.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์

ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงในรูปที่ 38 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 76.9 และ 74.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 68.5 และ 64.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 46.5 และ 43.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 31.7 และ 27.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย



รูปที่ 37 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ(*Katsuwonus pelamis*)



รูปที่ 38 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 40 และ 25 เปอร์เซ็นต์

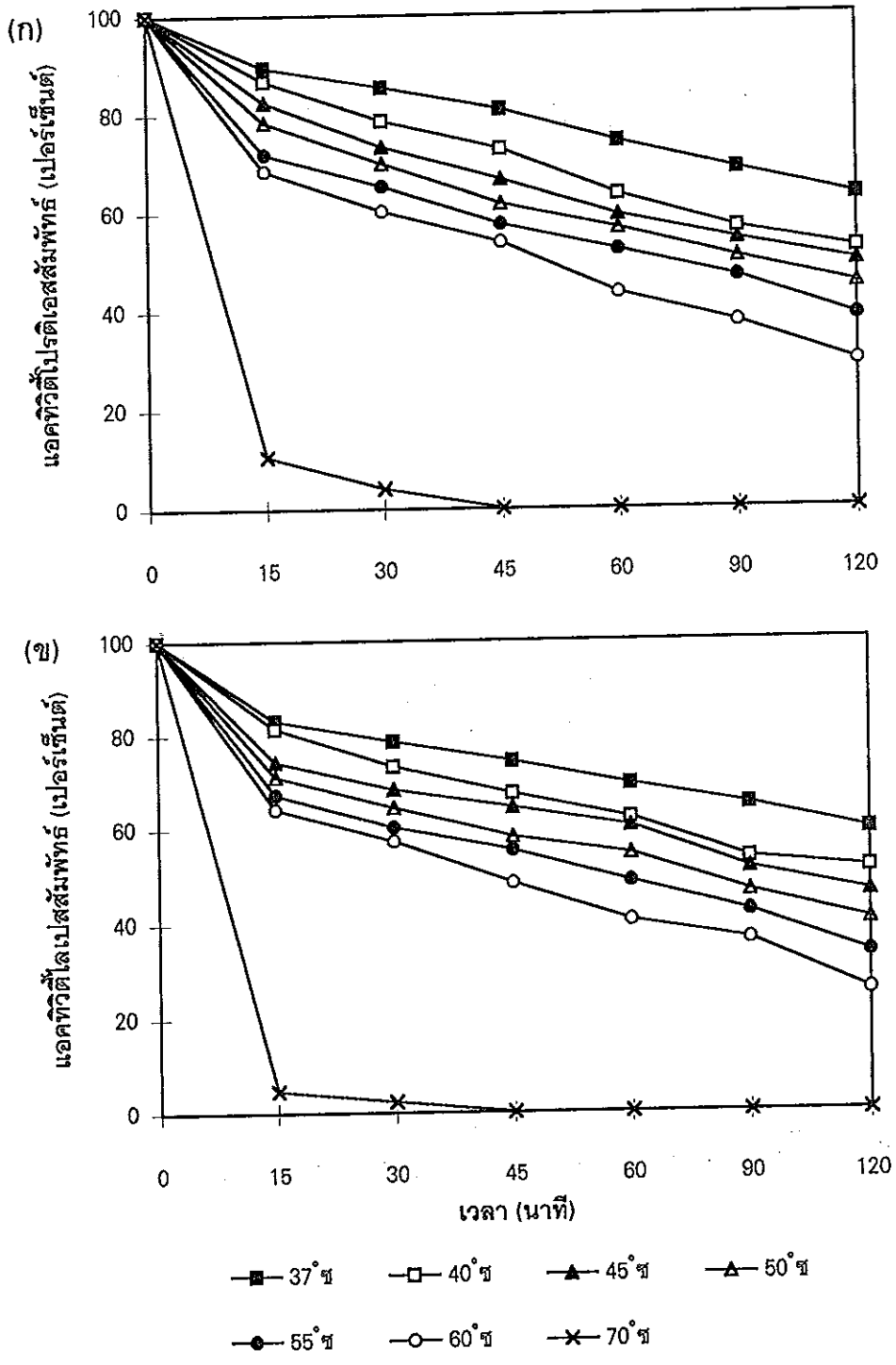
จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงในรูปที่ 39 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 74.3 และ 69.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 63.2 และ 59.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 43.6 และ 40.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 29.4 และ 25.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 35 และ 25 เปอร์เซ็นต์

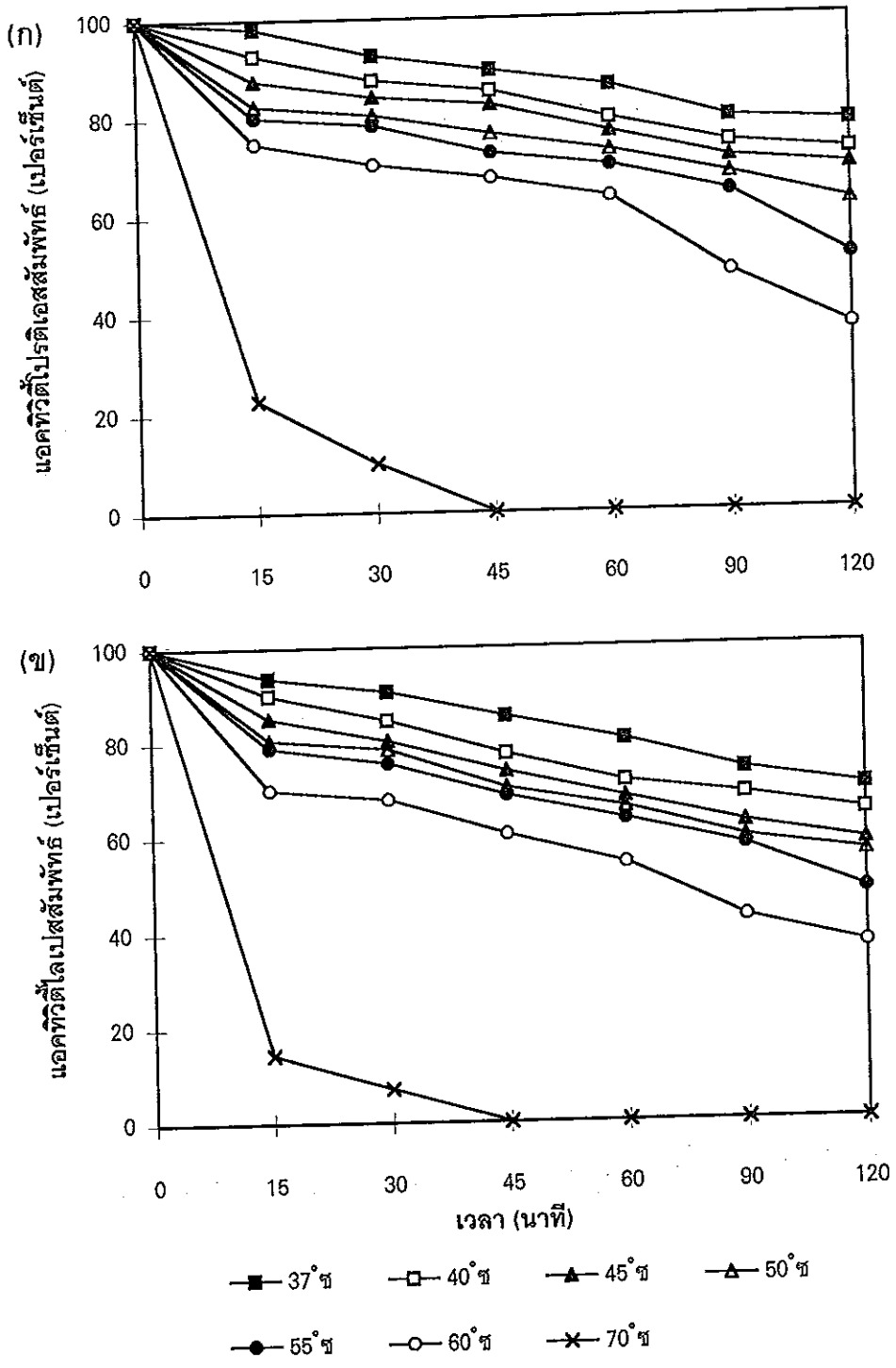
จากการศึกษาข้างต้นพบว่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอแถบลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลามากกว่า 120, 90, 60, 45 และ 45 นาที จากเอนไซม์ที่สกัดจากม้าม เครื่องในรวม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของไลเปสจะลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มเป็นเวลามากกว่า 90, 60, 60, 45 และ 45 นาที ที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลงครึ่งหนึ่ง หลังจากการบ่มเป็นเวลาน้อยกว่า 15 นาที อาจสรุปได้ว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่สกัดจากม้าม มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเครื่องในส่วนอื่นๆ

3.4.2 ปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงในรูปที่ 40 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 86.1 และ 80.3 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 39 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)



รูปที่ 40 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

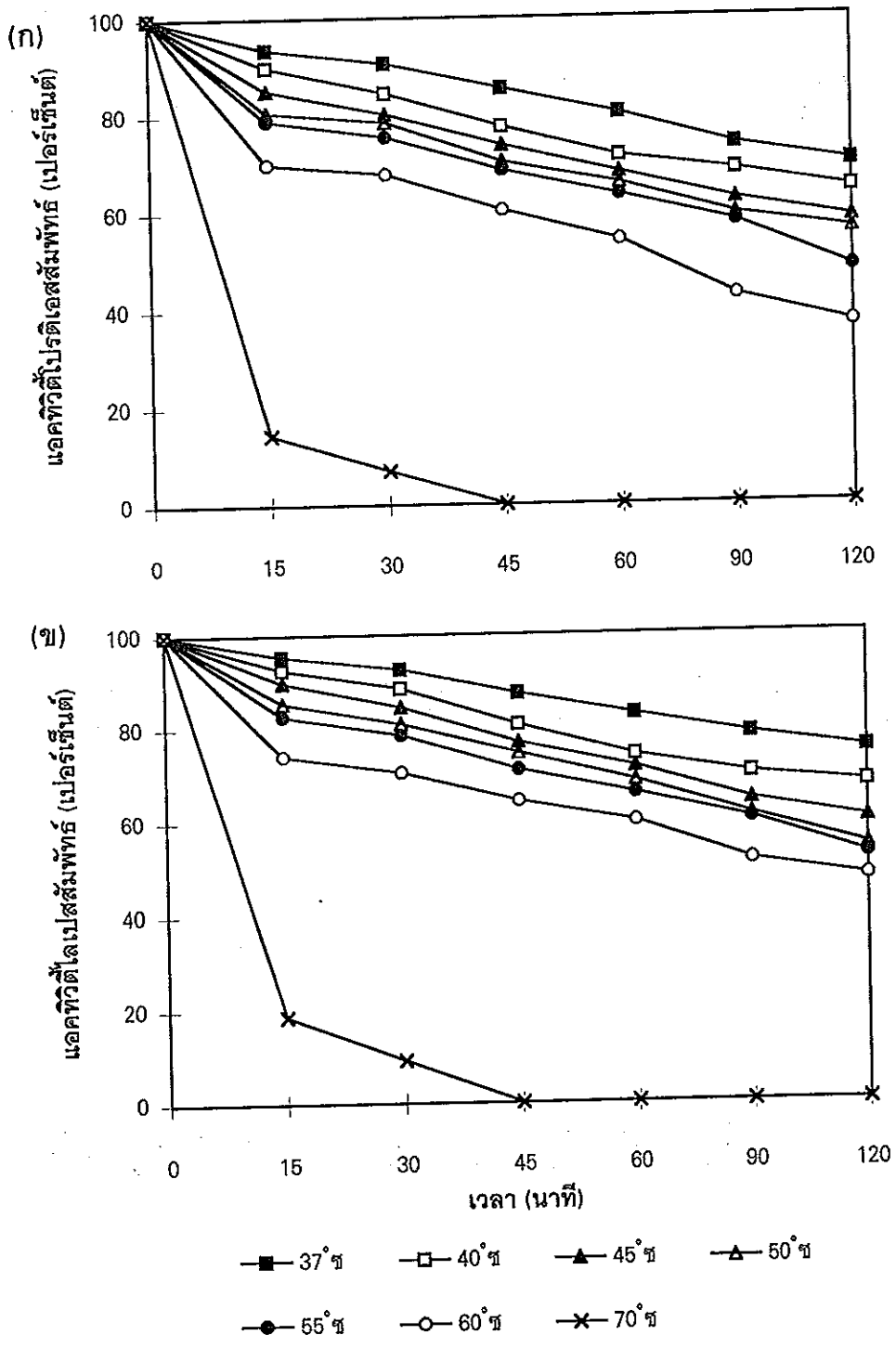
ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 78.4 และ 70.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 63.6 และ 54.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 37.1 และ 36.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 50 และ 35 เปอร์เซ็นต์

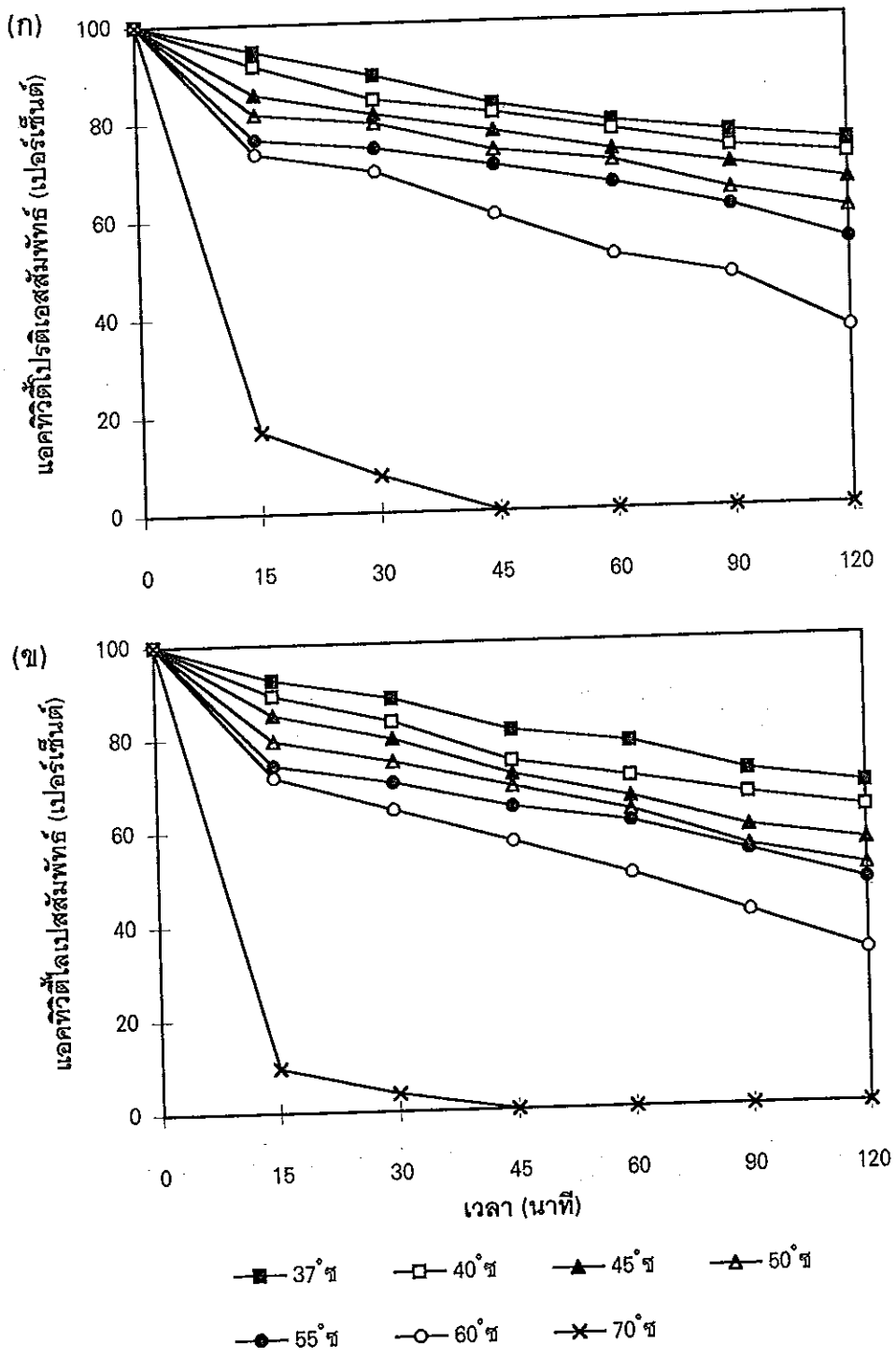
ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงในรูปที่ 41 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 86.5 และ 82.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 83.2 และ 75.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 64.2 และ 59.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 48.5 และ 47.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 65 และ 45 เปอร์เซ็นต์

ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงในรูปที่ 42 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 79.1 และ 78.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 74.4 และ 68.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 51.8 และ 49.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของ



รูปที่ 41 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)



รูปที่ 42 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares)*

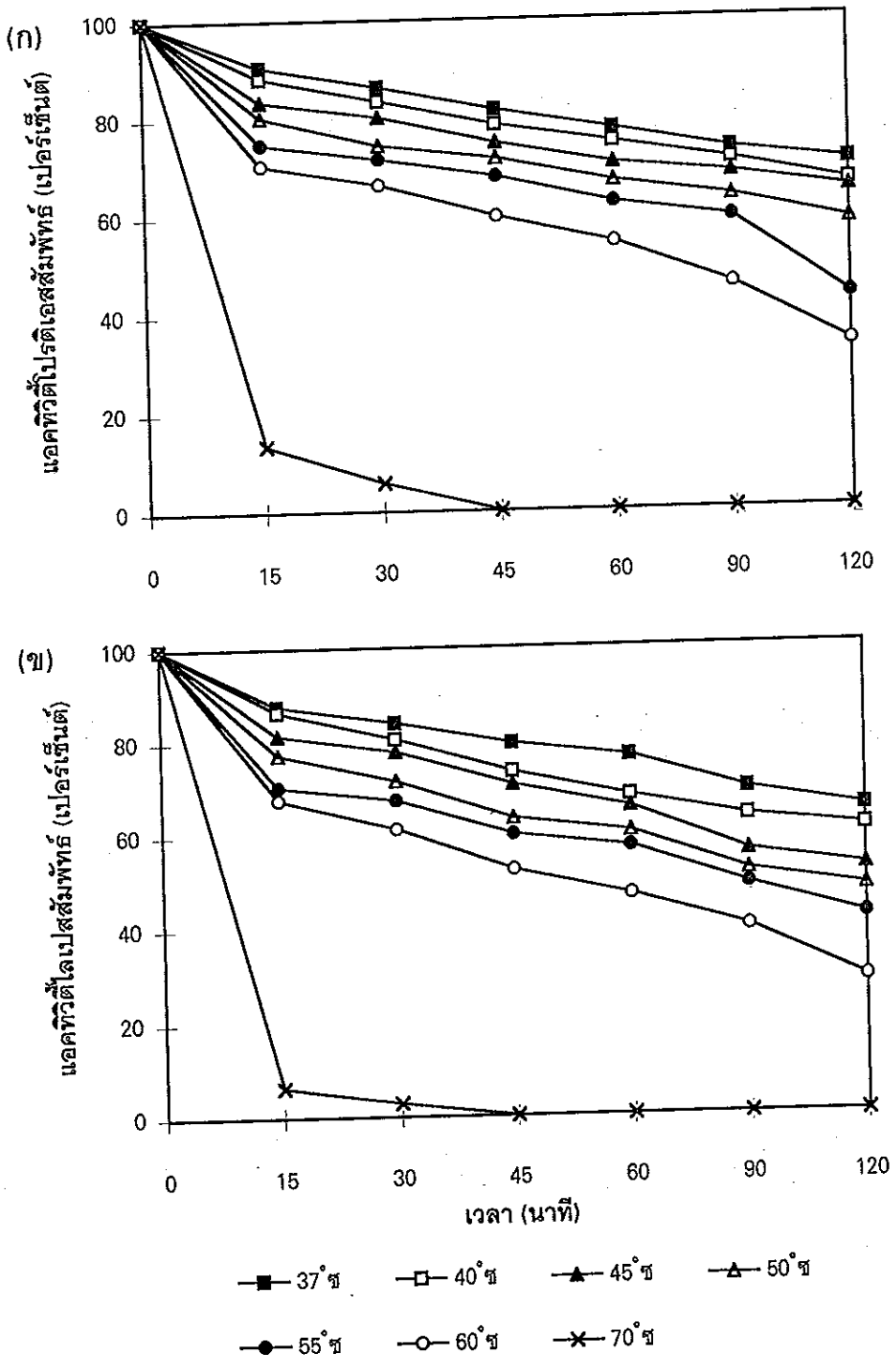
เอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 36.1 และ 32.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์

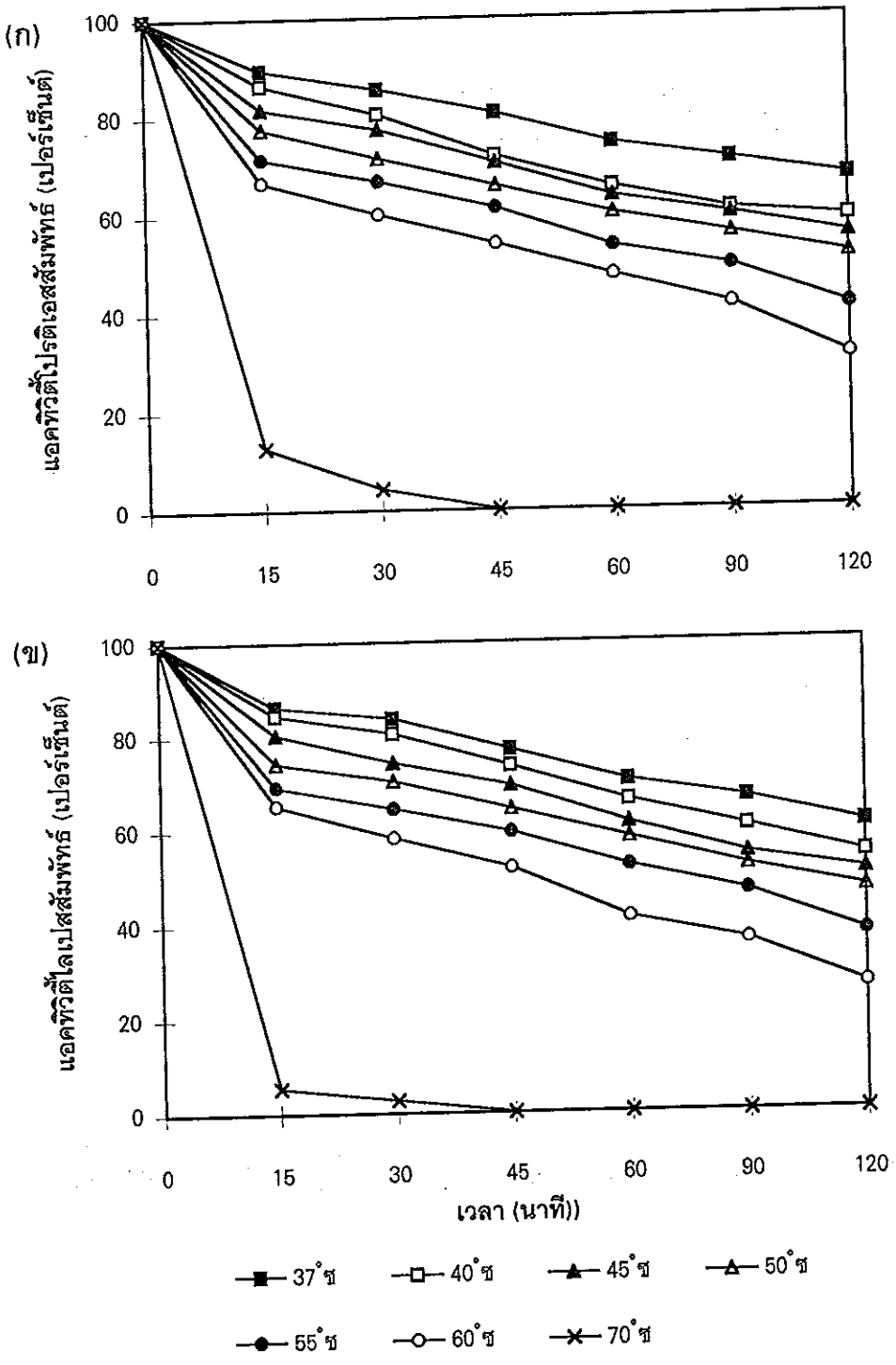
ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงในรูปที่ 43 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 77.5 และ 76.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 70.5 และ 65.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 54.3 และ 46.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 33.5 และ 28.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 40 และ 25 เปอร์เซ็นต์

จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงในรูปที่ 44 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 74.3 และ 70.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 67.3 และ 60.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 47.5 และ 41.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 30.8 และ 26.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย



รูปที่ 43 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)



รูปที่ 44 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*)

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 40 และ 25 เปอร์เซ็นต์

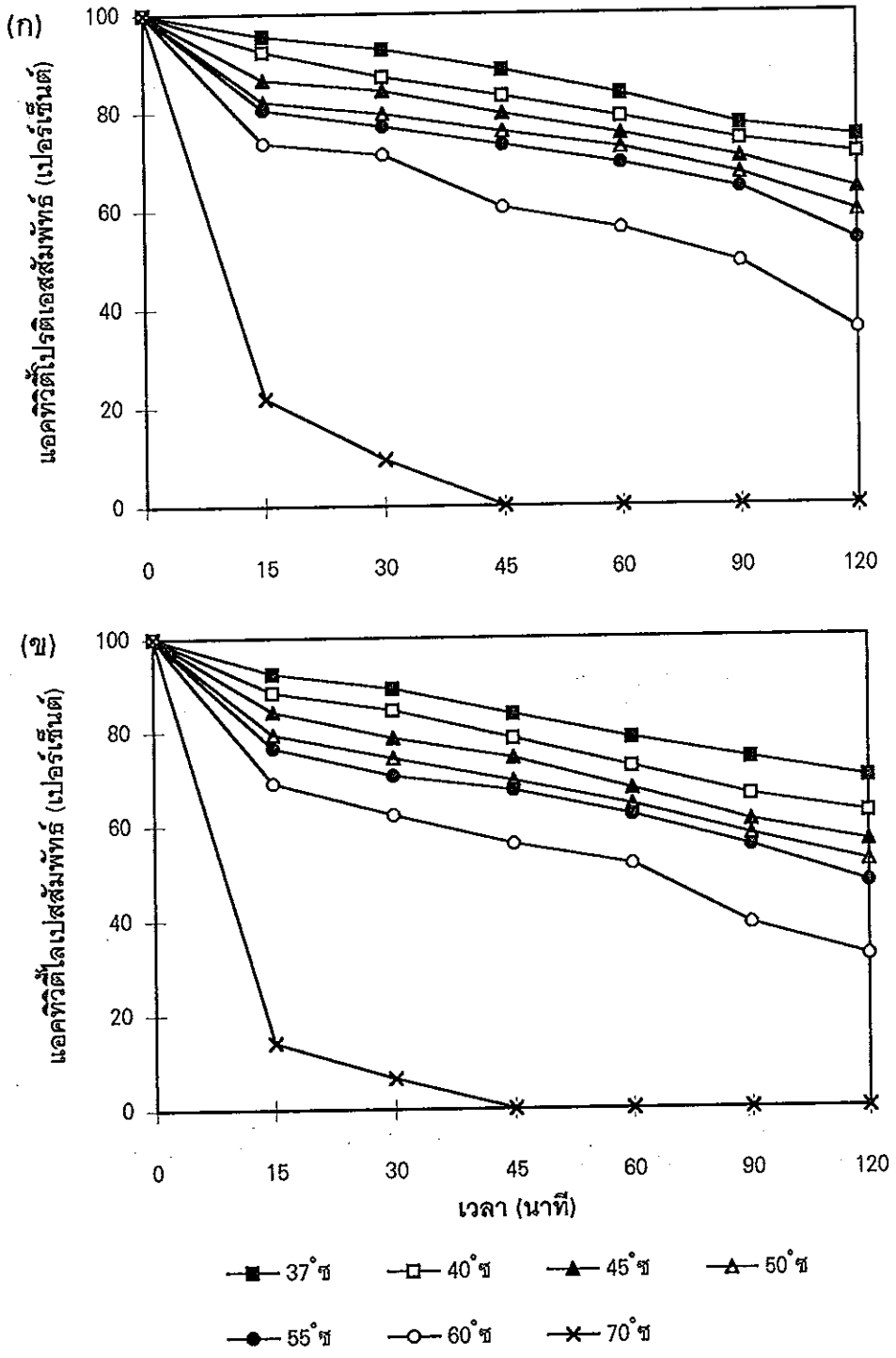
จากการศึกษาข้างต้นพบว่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลามากกว่า 120, 60, 60, 45 และ 45 นาที จากเอนไซม์ที่สกัดจากม้าม เครื่องในรวม ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของไลเปสจะลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มเป็นเวลามากกว่า 60, 60, 60, 45 และ 45 นาที ที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลงครึ่งหนึ่ง หลังจากการบ่มเป็นเวลาน้อยกว่า 15 นาที อาจสรุปได้ว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่สกัดจากม้าม มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเครื่องในส่วนอื่นๆ

3.4.3 ปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

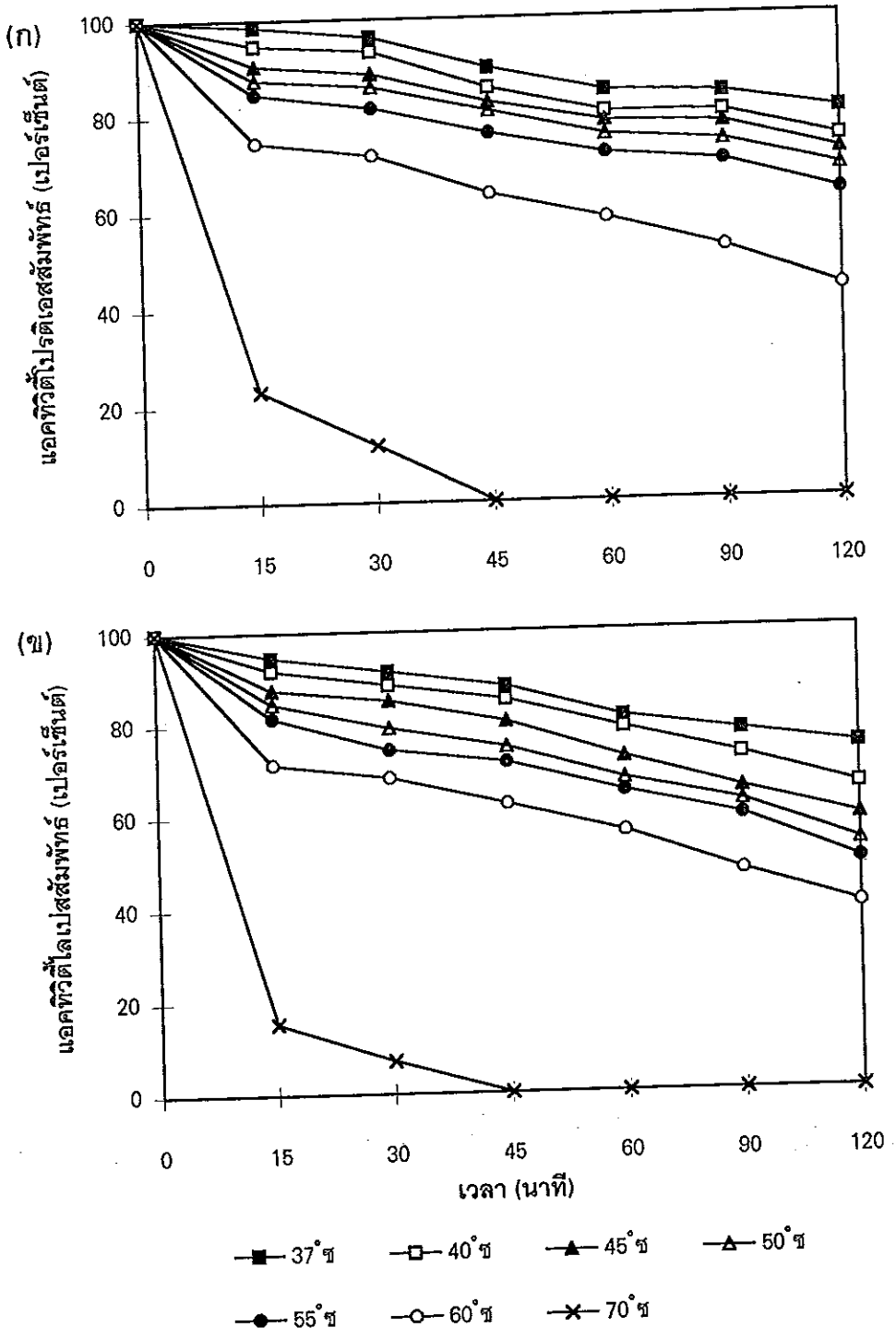
ก. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวม ผลแสดงในรูปที่ 45 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 83.6 และ 78.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 74.6 และ 69.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 56.2 และ 51.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 35.4 และ 31.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์

ข. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากม้าม ผลแสดงในรูปที่ 46 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 84.5 และ 81.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อ



รูปที่ 45 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรตีเอส (ก) และไลเปส (ข) จากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)



รูปที่ 46 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

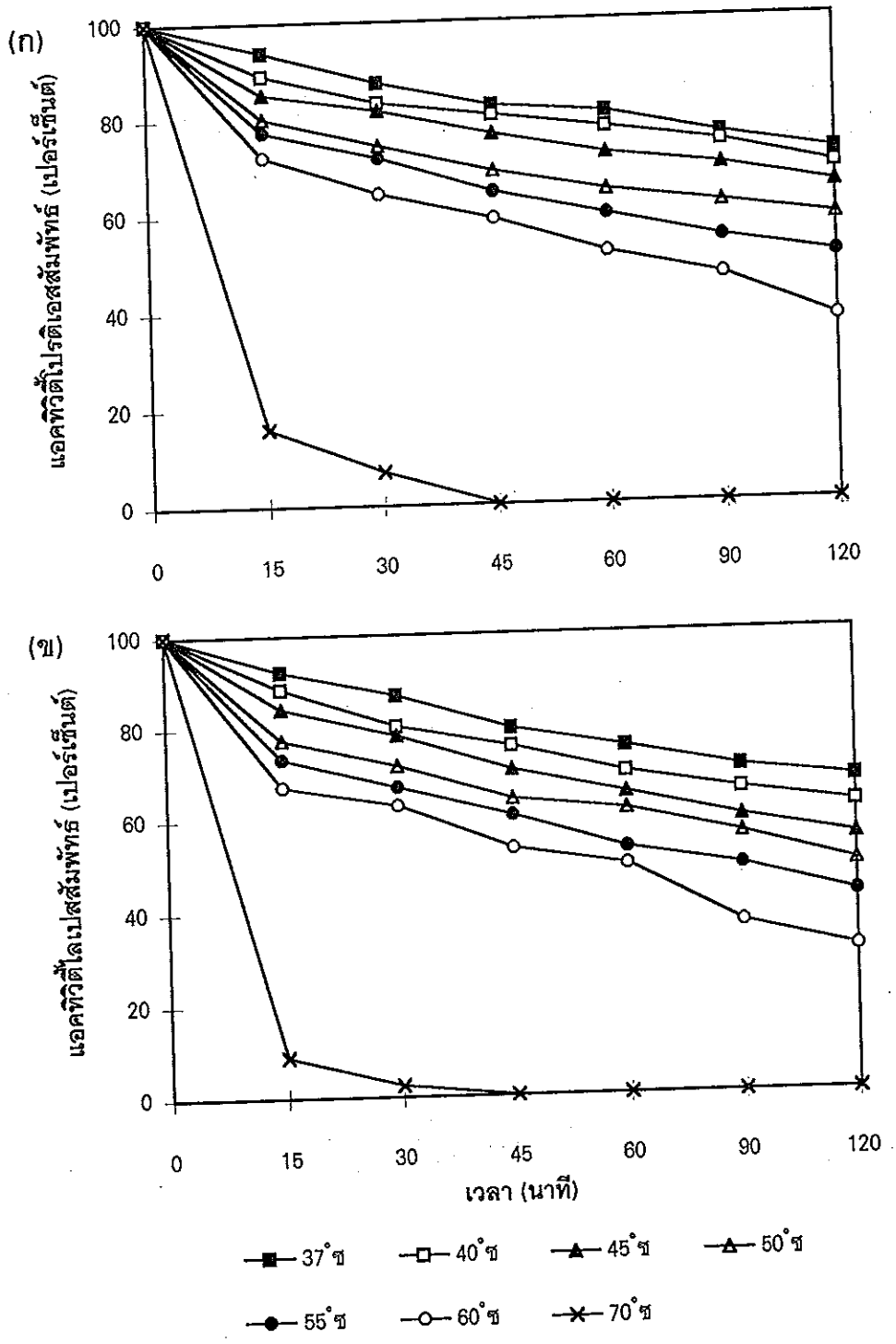
เก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 80.1 และ 74.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 58.1 และ 56.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 43.4 และ 39.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 60 และ 35 เปอร์เซ็นต์

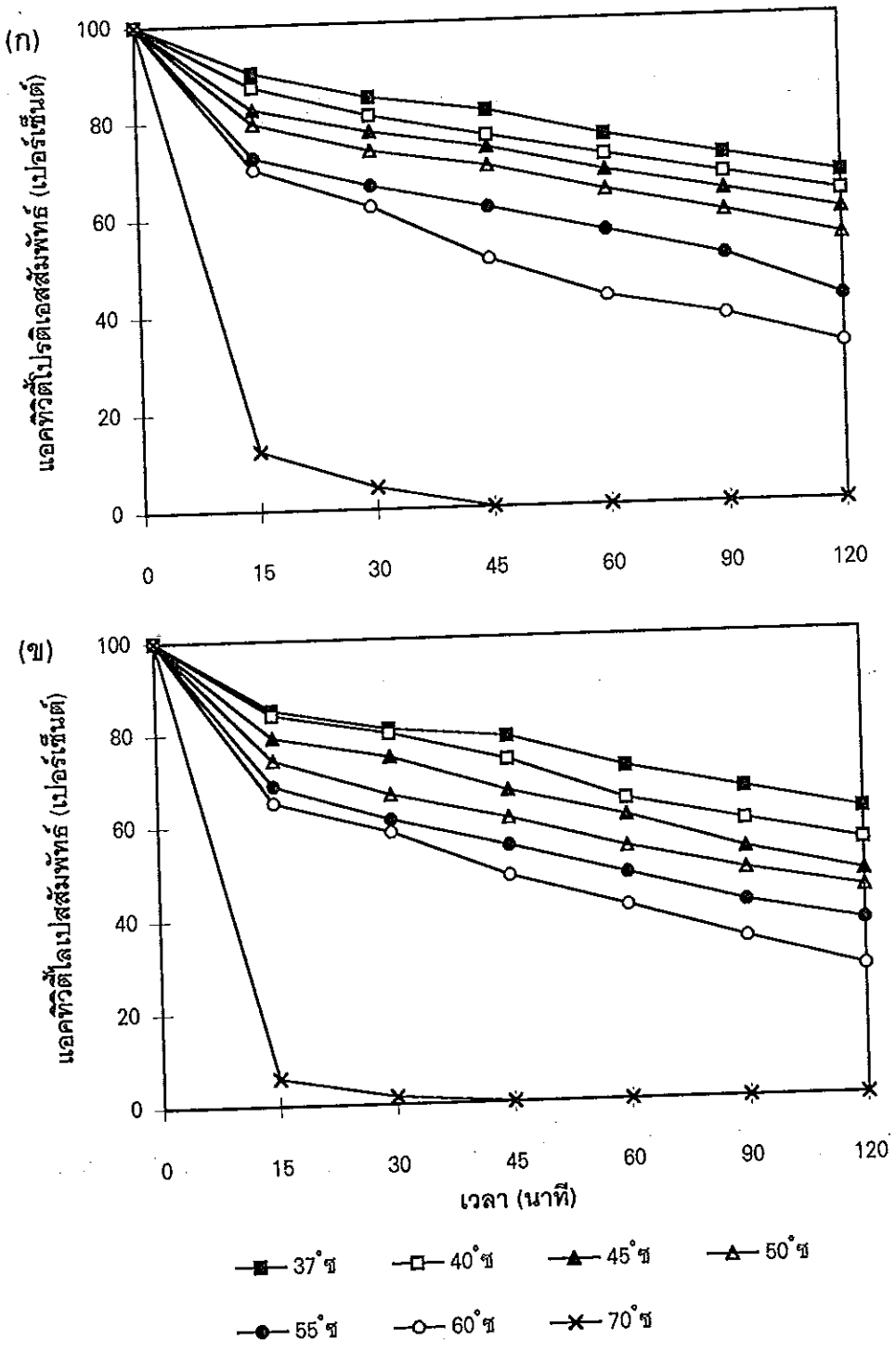
ค. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับ ผลแสดงในรูปที่ 47 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 80.7 และ 75.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 72.1 และ 67.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 51.6 และ 49.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 37.6 และ 30.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 50 และ 30 เปอร์เซ็นต์

ง. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากตับอ่อน ผลแสดงในรูปที่ 48 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 76.0 และ 71.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 67.3 และ 61.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 42.7 และ 41.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120



รูปที่ 47 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)



รูปที่ 48 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

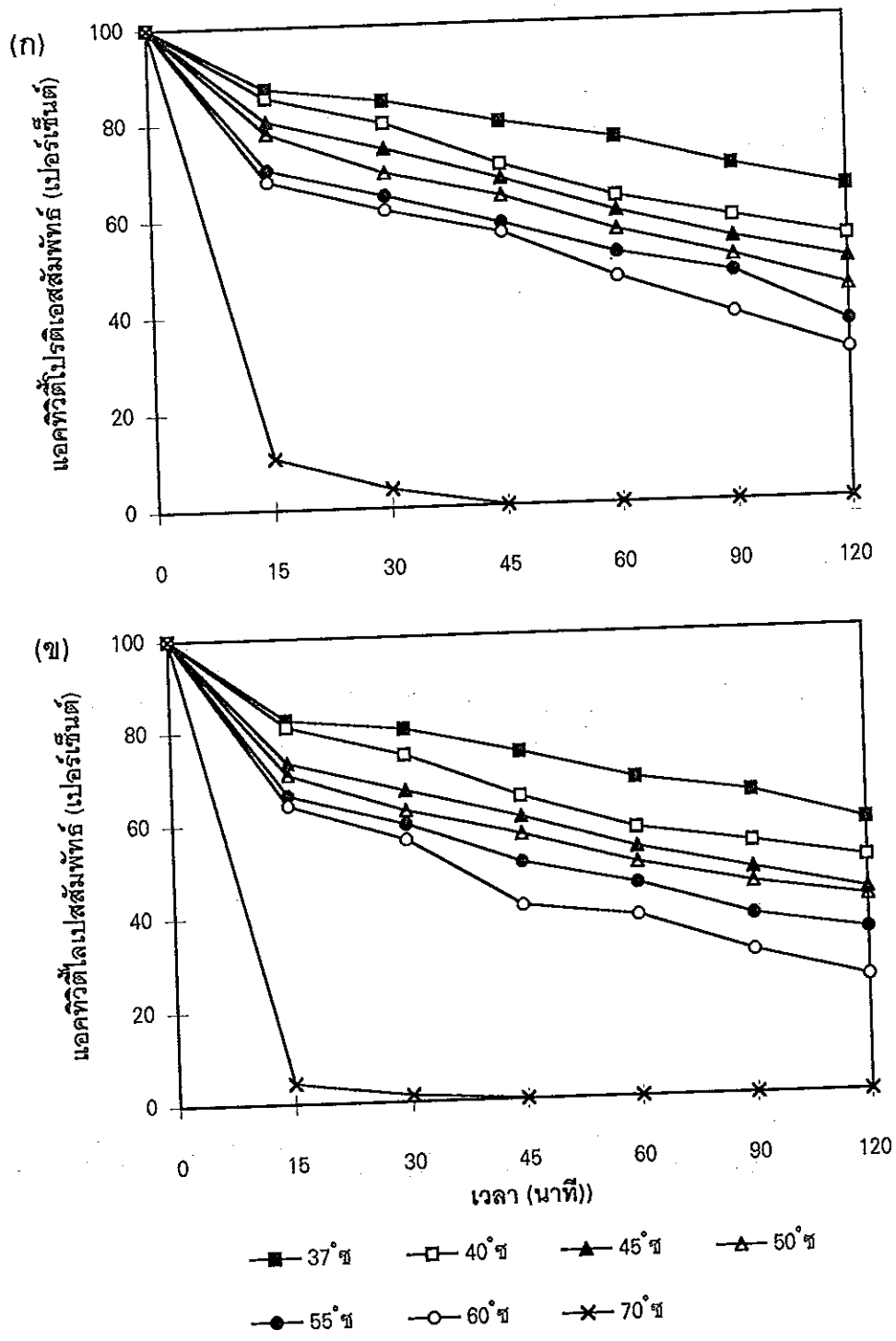
นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 32.1 และ 27.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 40 และ 25 เปอร์เซ็นต์

จ. แอคทิวิตี้ของเอนไซม์สกัดจากกระเพาะ ผลแสดงในรูปที่ 49 พบว่าเอนไซม์มีความคงตัวดีที่สุด ที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ โดยเมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่เท่ากับ 75.6 และ 68.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเก็บเป็นเวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 64.5 และ 58.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 46.6 และ 38.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเก็บเอนไซม์เป็นเวลา 60 นาที และที่เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เท่ากับ 30.7 และ 24.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การเก็บที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลือเพียงเล็กน้อยเท่านั้น หลังการบ่ม 30 นาที และเมื่อบ่มเป็นเวลา 45 นาที พบว่าไม่มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลืออยู่เลย

สำหรับที่อุณหภูมิ 50 และ 60 ^{0}ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปติเอสและไลเปส พบว่าเมื่อบ่ม 120 นาที มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสเหลืออยู่มากกว่า 35 และ 20 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาข้างต้นพบว่า แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสจากเครื่องในปลาทูน่าพันธุ์โอดำลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลามากกว่า 90, 90, 90, 45 และ 45 นาที จากเอนไซม์ที่สกัดจากม้าม เครื่องในรวม ตับ ตับอ่อน และ กระเพาะ ตามลำดับ ส่วนแอคทิวิตี้ของไลเปสจะลดลงครึ่งหนึ่งหลังจากการบ่มเป็นเวลามากกว่า 60, 60, 60, 45 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 70 ^{0}ซ แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสลดลงครึ่งหนึ่ง หลังจากการบ่มเป็นเวลาน้อยกว่า 15 นาที อาจสรุปได้ว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสที่สกัดจากม้าม มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์จากเครื่องในส่วนอื่นๆ



รูปที่ 49 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอส (ก) และไลเปส (ข) จากกระเพาะของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*)

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น (ข้อ 3.4.1 - 3.4.3) พบว่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสของเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ มีความคงตัวต่ออุณหภูมิในช่วง 37 - 40 ^{0}ซ โดยที่อุณหภูมิ 37 ^{0}ซ เวลา 120 นาที แอคทิวิตี้สัมพัทธ์ของเอนไซม์จากปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ ที่สกัดจากเครื่องในรวม ม้าม ตับ และตับอ่อน มีค่ามากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเอนไซม์จากกระเพาะมีแอคทิวิตี้เหลือมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Kristjanson และ Nielson (1991) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไคโมทริปซินจากไส้ติ่งและลำไส้ของปลาเทรา (rainbow trout : *Oncorhynchus mykiss*) มีความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่า 40 ^{0}ซ เมื่อบ่ม 30 นาที ที่พีเอช 8.0 และเอนไซม์จากปลาค็อด (Atlantic cod : *Gadus morhua*) ในเขตแอตแลนติก ซึ่งคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 35 ^{0}ซ เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 35 ^{0}ซ แอคทิวิตี้จะลดลงอย่างรวดเร็ว และที่ 60 ^{0}ซ มีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์เหลือเพียงเล็กน้อย (Asgeirson and Bjarnason, 1991) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของ Shin และ Zall (1986) ซึ่งพบว่าซีรินโปรติเอสจากไส้ติ่งของปลาค็อดคงตัวต่ออุณหภูมิ 37 ^{0}ซ ได้ดีกว่า 57 ^{0}ซ โดยที่ 37 ^{0}ซ เมื่อบ่ม 60 นาที ที่พีเอช 9.6 มีแอคทิวิตี้เหลืออยู่มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และจากการทดลองข้างต้นพบว่า เอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุดเมื่อเทียบกับเอนไซม์สกัดจากเครื่องในส่วนอื่นๆ และพบว่าม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองมีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุด โดยแอคทิวิตี้ลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์สกัดมากกว่า 120 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ ส่วนม้ามของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบมีแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุดโดยแอคทิวิตี้ลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง เมื่อใช้เวลาในการบ่มเอนไซม์สกัดมากกว่า 90 นาที ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เช่นเดียวกัน

บทที่ 4

สรุป

1. เอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (Skipjack tuna : *Katsuwonus pelamis*) พันธุ์ครีบเหลือง (Yellowfin tuna : *Thunnus albacares*) และพันธุ์โอดำ (Tonggol tuna : *Thunnus tonggol*) มีค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสสูงสุดเมื่อใช้บัฟเฟอร์พีเอช 10.0, 10.0 และ 9.0 ตามลำดับ โดยปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสเท่ากับ 72.17 และ 1.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

2. เมื่อเปรียบเทียบแอคทิวิตี้ของแอนไซม์สกัดจากเครื่องในแต่ส่วน คือ กระเพาะม้าม ตับ และตับอ่อน ของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่า เอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้ (53.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และแอคทิวิตี้จำเพาะของโปรติเอส (2.56 ยูนิตต่อมิลลิกรัม)สูงสุด รองลงมาคือเอนไซม์สกัดจากตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ

3. แหล่งของเอนไซม์ไลเปสที่ดีคือ ตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ให้ค่าแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด รองลงมาคือ ตับ ม้าม และกระเพาะ ตามลำดับ โดยเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่าแอคทิวิตี้และแอคทิวิตี้จำเพาะของไลเปสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 0.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

4. การศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ พันธุ์ครีบเหลือง และพันธุ์โอดำ คือ พีเอช 10.0, 10.0 และ 9.5 ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดมีความคงตัวต่อพีเอชดีที่สุดตามพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ (พีเอช 9.5 - 10.0) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อแอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสจากเครื่องในและเครื่องในแต่ละส่วนของปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ คือ 50 และ 60 ^{0}ซ ตามลำดับ และเอนไซม์สกัดมีความคงตัวต่ออุณหภูมิในช่วง 37 - 40 ^{0}ซ โดยเอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าทั้ง 3 พันธุ์ มีความคงตัวต่ออุณหภูมิดีที่สุด แอคทิวิตี้ของโปรติเอสและไลเปสของเอนไซม์สกัดจากม้ามลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง หลังการบ่มเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ เป็นเวลามากกว่า 120 และ 90 นาที ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากชิ้นส่วนของเครื่องในปลาทูน่าที่ได้จากแหล่งที่มีความเหมาะสม (คัดเลือกตามความเหมาะสมของพันธุ์ปลาและชิ้นส่วนของเครื่องในปลา) เพื่อให้ได้เอนไซม์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะ และทำการศึกษาเกี่ยวกับรายละเอียดอื่นๆของเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้ว เช่น ความจำเพาะต่อสับสเตรต ผลของสารยับยั้งต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ และคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ เป็นต้น รวมทั้งการเปรียบเทียบคุณสมบัติของเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากเครื่องในปลาทูน่ากับเอนไซม์ทางการค้า

2. ศึกษาการเก็บรักษาเอนไซม์ในรูปแบบต่างๆ เช่นการทำแห้งด้วยวิธีการพ่นฝอย หรือการแช่เยือกแข็ง ตลอดจนทำการทดสอบประสิทธิภาพเอนไซม์หลังการเก็บรักษาในรูปแบบต่างๆ ที่ระยะเวลาต่างๆกัน

3. นำเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้จากเครื่องในปลาทูน่าไปใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น ใช้ในขั้นตอนการผลิตโปรตีนปลาสกัดทดแทนการใช้สารเคมี หรือการสกัดแคโรทีนอยด์จากเปลือกกุ้งที่เป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำต่างๆ เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

กรุงศรีอยุธยา จำกัด มหาชน.,ธนาคาร. 2537. อุตสาหกรรมปลาทูน่ากระป๋อง. : ปัญหากีดกันการค้า. ว.ปราสาทสังข์. 12(6) : 12 - 17.

กสิกรไทย.,ธนาคาร. 2534. ปลาทูน่ากระป๋อง : ร่วมลงทุนต่างชาติ ปัญหาพึงระวัง. สรุปข่าวธุรกิจ. 22 (14) : 1 - 7.

กองพัฒนาอุตสาหกรรม. 2534. อุตสาหกรรมเกษตรสินค้าเศษเหลือ (by product) จากโรงงานปลาทูน่าบรรจุกระป๋อง. เอกสารเผยแพร่กองพัฒนาอุตสาหกรรม กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

กองเศรษฐกิจกรมประมง. 2537. ตลาดสินค้าประมงระหว่างประเทศ ไตรมาสที่ 1-2 ปี 2537. ว.กรมประมง. 47 : 429 - 448.

จิตรวดี ไตรเรกพันธุ์. 2540. การผลิตโปรตีนปลาสกัดจากหัวปลาและเครื่องในปลาทูน่า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ดวงพร คันธโชติ. 2530. ผลิตภัณฑ์เอนไซม์จากจุลินทรีย์ ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. หน้า 46 - 66. กรุงเทพฯ. : โอเดียนสโตร์.

นงลักษณ์ สุทธิวนิช. 2531. คุณภาพสัตว์น้ำ. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประเสริฐ ศรีไพโรจน์. 2528. เอนไซม์และโคเอนไซม์. ใน ชีวเคมี. หน้า 180 - 224. กรุงเทพฯ : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทร์วิโรฒประสานมิตร.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์อาหาร 1. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ.: ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร. คณะวิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิมล เหมะจันทร์. 2528. ชีววิทยาปลา. กรุงเทพฯ. : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มาหวิทยาลัย.

สุนันทา ภิญญาวัธน์. 2535. เอนไซม์. ใน ชีวเคมี 2. หน้า 1 - 70. กรุงเทพฯ. : ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

สุวิทย์ สุวรรณโณ. 2535. การเลี้ยงแบคทีเรียสังเคราะห์แสงในน้ำเสียของโรงงานแปรรูปอาหารทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Arunchalam, K. and Haard, N. F. 1985. Isolation and characterization of pepsin from polar cod (*Boreogadus saida*). Comp. Biochem. Physiol. 80B : 467 - 473.

Asgeirsson, B. 1988. Aspartic protenases in fishes and aquatic invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 91B : 425 - 435.

Asgeirson, B. and Bjarnason B. J. 1991. Structural and kinetic properties of chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua*) comparison with bovine chymotrypsin. Comp. Biochem. Physiol. 99B : 327 - 335.

Brewer, P., Helbig, N. and Haard, N.F. 1984. Atlantic cod pepsin characterization and use as a rennet substitute. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 17 : 38 - 43.

Chen, H.C. and Zall, R.R. 1985. Concentration and fractionation of clam viscera proteinases by ultrafitration. Proc. Biochem. 20 : 46 - 50.

Chullasorn, S. and Martosubroto, P. 1986. Geographic distribution of habitat, spawing and fishing groups of majar species groups. Roam. : Food and Agriculture Organization of the Nations.

Dixon, M. and Weeb, E.C. 1979. Enzyme. London : Longman.

Doke, N. S. and Ninjoor V. 1987. Characteristes of an alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeus indicus*) muscle. J. Food Sci. 52 : 1203 - 1208.

Eisen, Z. A., Henderson, O. K., Jeffrey, J. J. and Bradshaw, A. R. 1973. A collagenolytic protease from the hepatopancreas of the fiddler carb (*Uca pugilator*) purification and properties. Biochemistry. 12 : 1814 - 1822.

Fox, J.W., Shannon, J.D. and Bjarnason, J. B. 1991. Proteinase and their inhibitor in biotechnology. In Enzymes in Biomass Conversion. (edited G.F. Leatham and M. E. Himmel), Washington, D.C. : ACS.

Frazier, W. C. 1958. Food Microbiology Data. New Deihi : Mc - Graw Hill Publishing Company.

Gates, B.J. and Trauis J. 1969. Isolation and comparative properties of shrimp trypsin. Biochemistry. 8 : 4483 - 4489.

Gildberg, A. and Xian - Quan, S. 1994. Recovery of tryptic enzyme from fish sauce. Proc. Biochem. 29 : 151 - 155.

Haard, N. F., Helbig, N. and Feltham, L. A. W. 1981. The temperature characteristies of pepsin from two stocks of American Smelt (*Osmerus mordax*) in processings. Workshop of the babrador coasting offshore region, Newfoundland Institute of cold Ocean Science, St Johns, pp. 174 - 196.

Haard, N. F. and Simpson B. K.. 1994. Fisheries Processing : Biotechnology applications. London : Chapman & Hall Publishing.

Hagihara, B., Matsubara, H., Nakai, M. and Okunuki, K. 1958. Crystalline bacterial proteinase I. preparation of crystalline protease of *B. subtilis*. J.Biochem. (Tokyo) 45 : 185 - 194

Heen, E. and Kreuzer, R. 1962. Fish in Nutrition. London : Fishing New (Book) Ltd.,

Hochachka, P. W. and Semero, G. N. 1984. Biochemical adaption. Princeton New Jersey : Princeton University Press. pp.377 - 422.

Hultin, H. O. 1980. Enzymes from organisms acclimated to low temperature. *In* Enzymes. The Interface between Technology and Economics (Edited by Dekker) New York. pp. 161 - 178.

Iwata, K., Kobashi, K. and Hase, J. 1974. Studies on muscle alkaline protease-III. Distribution of alkaline protease in muscle of fresh water fish, marine fish and internal organ of carp. Bull,Jap.Soc.Sci. 40 : 201 - 213.

Keil, B. 1971. Trypsin in The Enzymes (Edited by Boyer P.D.). Vol.III, pp. 249 - 275. New York. : Academic Press.

Kim, H. R., Meyers, P. S., Pyeun, H. J. and Godber, S. J. 1992. Purification and Characterization of anionic trypsins from the heptopancreas of crayfish *Procambarus clarkill*. Comp. Biochem. Physiol. 103B:391-398.

Kim, H. R., Meyers, P. S., Pyeun, H. J. and Godber, S. J. 1994. Enzymatic properties of anionic trypsins from the heptopancreas of caryfish, *Procambarus clarkill*. Comp. Biochem. Physiol. 107B : 197 - 203.

Kinsella, J.E. 1982. Relationships between structure and functional properties of food protein. *In* Food Protein. Fox, P.F. and Condon, J.J. (Eds.) London. : Applied Scicenc publisher. pp. 50 - 101.

Kristjansson, M. M. and Nielson, H. H. 1991. Purification and characterization of two trypsin-like proteases from the pyloric caeca of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp. Biochem. Physiol. 101B : 247 - 253.

Laidler, K. J. and Bunting, P. S. 1973. The chemical kinetics of enzyme action. Bristol : Arrowsmith.

Loffler, A. 1986. Proteolytic Enzymes. : Sources and Application. J. Food Tech. 21 : 63 - 70.

Lowry, O. H., Rosebrough, H. J., Faww, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 193 : 265 - 275.

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

Meinke, W. W., Rahman, M. A. and Marttil, K. F. 1972. Autolysis as factor in the production of protein isolates from whole fish. J. Food Sci. 38 : 864 - 866.

Nettleton, J. A. 1985. Seafood Nutrition. NewYork. : Ospry Books.

Nord, F. F. 1960. Advanced in Enzymology. London. : Interscience Publishers.

Palmer, T. 1985. Understanding Enzyme. West Susex. : Fillis Horwood.

Pongsawadi, P. and Yagisawa, M. 1988. Purification and some properties of cyclomaltodextrin glucanotransferase from *Bacillus circulans*. Agric. Biol. Chem. 52 (5) : 1099 - 1103.

Prasertsan, P., Wuttijumnong, P., Sophanodora, p. and Choorit, W. 1988. Seafood processing industries within Songkhla-Hatyai region : The survey of basic data emphasis on wastes. Songklanakarin. J. Sci. Technol. 10 : 447 - 451.

Raae, J. A. 1990. Effect of low and high temperature on chymotrypsin from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) comparison with bovine chymotrypsin. Comp. Biochem. Physiol. 97B : 145 - 149.

Reece, P. 1988. Recovery of protease from fish wastes. Proc. Biochem. 23 : 62 - 66.

Sanchez-Chiang, L., Ponce, O., Landsberger, E. and Enriquez, S. 1985. Cathepsins D from sea urchin egg *Tetrapygus niger* - Isolation by affinity chromatography and properties. Comp. Biochem. Physiol. 85B : 81 - 87.

Scopes, R. K. 1978. Technique for protein purification in Technique in the Life Science. Vol.B 1/1, section B 101, Elservier : Nort - Holland Scientific Publishers, Shannon. B 101/1 - B 101/19.

Shahani, K. M. 1975. Lipase and esterasea in Enzyme in food Processing, 2nd (ed G.Reed), pp. 182 - 214. Wisconsin : Universal Food Corporation, Milwaukee.

Shin, D. H. and Zall, R. R. 1986. Purification and identification of trypsin like enzyme from the pyrolic caeca of cod. Process. Biochem. 21 : 11 - 15

Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1984. Trypsin from Greenland cod as a food processing aid. J. Appl. Biochem. 6 : 135 - 143.

Simpson, B. K. and Haard, N. F. 1987. Cold-adapted enzymes from fish. *In* Food Biotechnology (ed. D, Knorr) New York :Marcel Decker.

Stansby, M. E. 1967. Fish Oil. Westport comn. : The AVI Publishing.

Stefansson, G. and Steingrimsdottir, U. 1989. Application of enzyme for fish processing in Iceland - Present and Future Aspects. Advances in Fisheries Technology and Biotechnology for Increased Profitability. Fisheries Technological conference and Seafood Biotechnology Workshop, August 27 to September 1, 1989. pp.237 - 250.

Stoll, V.S. and Blanchard, J.S. 1990. Buffer : Principles and Practice. *In* Method in Enzymology (ed. Deutscher, M.P.) Vol. 182, pp. 24 - 38, New York : Academic Press.

Sugihara, A., Tani, T. and Tomina, Y. 1988. Purification and characterization of *Aspergillus niger* lipase. Agric. Biol. Chem. 52 (6) : 1591 - 1592.

Winkler, U.K. and Stuckmann, M. 1979. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. J. Bacteriol. 138 : 663 - 670.

ภาคผนวก ก
วิธีการวิเคราะห์

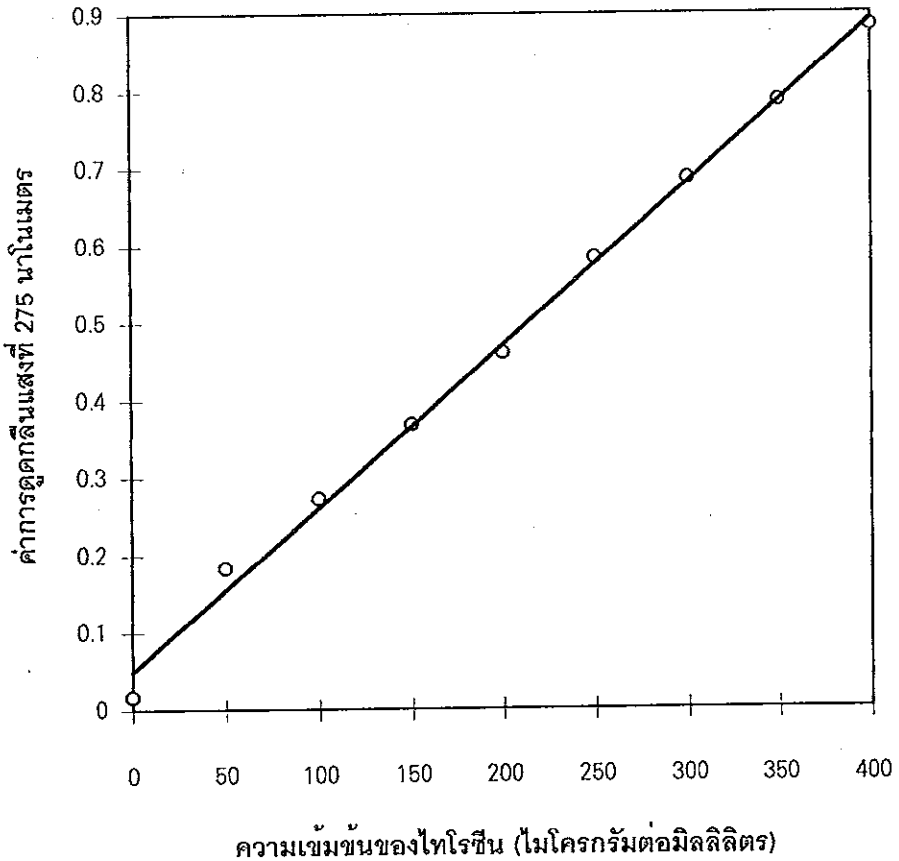
1. การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส

1. ชั่งไทโรซีน 100 มิลลิกรัม (ผลิตโดย Fluka) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เตรียมสารละลายไทโรซีนเข้มข้น 50 100 150 200 300 350 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร

4. เขียนกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 275 นาโนเมตร (รูปภาคผนวกที่ ก1)



รูปภาคผนวกที่ ก1 กราฟมาตรฐานไทโรซีน

2. การคำนวณหาแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ไลเปส

คำนวณความเข้มข้นของ *p* - nitrophenol จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปคโตรโฟโตมิเตอร์

จาก Beer's law $C = \frac{A}{Eb}$

C = ความเข้มข้น

A = ค่าการดูดกลืนแสง

E = extinction coefficient

b = ความยาวที่แสงผ่าน

การคำนวณความเข้มข้นของ *p* - nitrophenol เมื่อ $E = 15\ L.mmol^{-1}.cm^{-1}$

$b = 1\ cm$

$$C = \frac{A_{410}}{E_{410} \cdot b}$$

$$= \frac{A_{410}}{(15\ L.\ mmol^{-1}\ .\ cm^{-1})\ (1\ cm)}$$

$$= \frac{A_{410}\ mmol}{15\ L}$$

$$= \frac{A_{410}}{15}\ u\ mol.\ ml^{-1}$$

3. ปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry และคณะ (1951)

สารเคมี

สารละลาย alkali copper ซึ่งเตรียมโดยผสมสารละลาย Na_2CO_3 ร้อยละ 2 ใน NaOH 0.1 นอร์มอล 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ ร้อยละ 0.5 ใน sodium potassium tartrate ร้อยละ 1

วิธีการ

นำสารละลายตัวอย่างที่เจือจางอย่างเหมาะสม 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบ เติมสารละลาย alkali copper 3.0 มิลลิลิตร (ควรเตรียมในวันที่ใช้) เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่

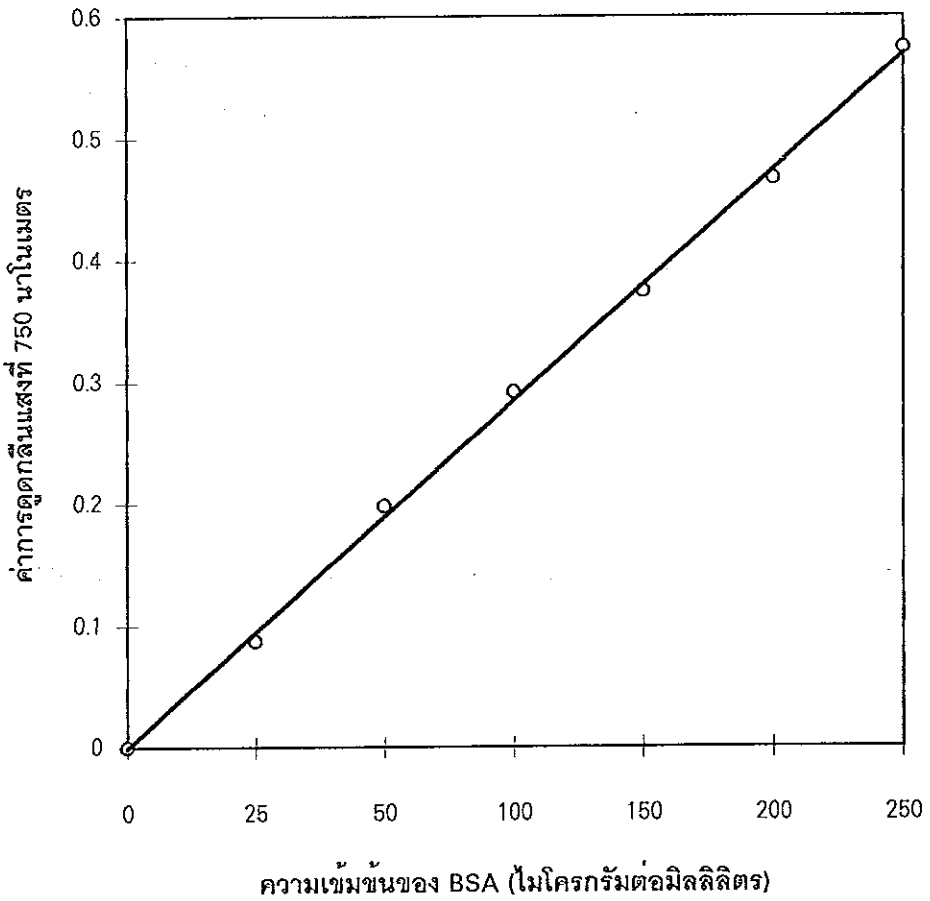
อุณหภูมิห้อง เวลา 10 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย Folin-ciocateus phenol reagent ที่เจือจางกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร เตรียมกราฟมาตรฐานโปรตีนโดยใช้ bovine albumin protein

การเตรียมกราฟมาตรฐาน

1. ชั่ง BSA 100 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้คือ สารละลาย BSA เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้เป็น stock solution

2. เตรียมสารละลาย BSA เข้มข้น 25 50 100 150 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

3. เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BSA กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร (รูปภาคผนวกที่ ก2)



รูปที่ภาคผนวกที่ ก2 กราฟมาตรฐานโปรตีน

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. การเตรียมสารละลายซิเตรต-ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (citrate-phosphate buffer) ตามวิธีของ Gomori (1955 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M citric acid ($C_6H_8O_7.H_2O$ 10.51 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ 13.398 กรัม ในน้ำ 1 ลิตรหรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ 17.898 กรัมในน้ำ 1 ลิตร)

พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B
2.6	44.6	5.4
3.0	39.8	10.2
3.4	35.9	14.1
3.8	32.3	17.7
4.0	30.7	19.3
4.4	27.8	22.2
4.8	25.2	24.8
5.0	24.3	25.7
5.4	22.2	27.8
5.8	19.7	30.3
6.0	17.9	32.1
6.4	15.4	34.6
6.8	9.1	40.9
7.0	6.5	43.6

2. การเตรียมสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ (Tris-HCl buffer) ตามวิธีของ Bates and Bower (1956 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A 50 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M Tris (hydroxymethyl) aminomethane

สารละลาย B : 0.05 M HCl

พีเอช	สารละลาย B
7.0	46.6
7.1	45.7
7.2	44.7
7.3	43.4
7.4	42.0
7.5	40.3
7.6	38.5
7.7	36.6
7.8	34.5
7.9	32.0
8.0	29.2
8.1	26.2
8.2	22.9
8.3	19.9
8.4	17.2
8.5	14.7
8.6	12.4
8.7	10.3
8.8	8.5
8.9	7.0
9.0	5.7

3. การเตรียมสารละลายคาร์บอเนต-ไบคาร์บอเนตบัฟเฟอร์ (carbonate-bicarbonate buffer) Bates and Bower (1956 อ้างโดย Stoll and Blanchard, 1990)

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ตามพีเอชที่ต้องการ

สารละลาย A : 0.05 M anhydrous sodium carbonate

สารละลาย B : 0.05 M sodium bicarbonate

พีเอช	สารละลาย A	สารละลาย B
9.2	4.0	46.0
9.3	7.5	42.5
9.4	9.5	40.5
9.5	13.0	37.0
9.6	16.0	34.0
9.7	19.5	30.5
9.8	22.0	28.0
9.9	25.0	25
10.0	27.5	22.5
10.1	30.0	20.0
10.2	33.0	17.0
10.3	35.5	14.5
10.4	38.5	11.5
10.5	40.5	9.5
10.6	42.5	7.5
10.7	45.0	5.0

4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์โปรติเอส

บัฟเฟอร์ที่ใช้ในการหยุดปฏิกิริยา (stop buffer) เตรียมโดยใช้ tris-chloroacetic acid 0.1 M (1.6339 กรัมต่อ 100 มล.), sodium acetate 0.22 M (ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 12.87 กรัม เติมกรดอะซิติก 1.32 มล. ปรับปริมาณเป็น 100 มล.), acetic acid 0.33 M ในอัตราส่วน 1:1:1

5. สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์แอคทิวิตี้ของเอนไซม์อะไมเลส

สารละลายไอโอดีน เตรียมโดย ชั่งไอโอดีน 1.2 กรัม ใน 5 มิลลิลิตร ของโปแตสเซียมไอโดไดด์ร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เติมน้ำให้ครบ 100 มิลลิลิตร เตรียมเป็น stock solution เมื่อนำมาใช้เจือจาง iodine stock 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร)

ภาคผนวก ค
ตารางผลการทดลอง

ตารางภาคผนวกที่ ค1 ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	ปริมาตร * (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
			แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต						
พีเอช 2.0	241	19.95±0.06^{i}	0.59±0.05^{j}	0.029±0.002^{j}	0.014±0.007^{h}	0.0007±0.0003^{i}
พีเอช 3.0	245	20.84±0.06^{h}	1.45±0.07^{i}	0.700±0.002^{i}	0.027±0.005^{g}	0.0013±0.0002^{h}
พีเอช 4.0	270	21.68±0.06^{g}	2.62±0.06^{h}	0.121±0.002^{h}	0.037±0.006^{g}	0.0017±0.0002^{h}
พีเอช 5.0	330	26.60±0.08^{b}	3.78±0.05^{g}	0.142±0.002^{g}	0.086±0.007^{f}	0.0032±0.0003^{g}
พีเอช 6.0	286	27.56±0.08^{a}	5.12±0.06^{f}	0.186±0.002^{f}	0.165±0.006^{e}	0.0060±0.0002^{f}
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์						
พีเอช 7.0	220	26.69±0.06^{b}	11.33±0.06^{e}	0.424±0.002^{e}	0.216±0.008^{d}	0.0081±0.0003^{e}
พีเอช 8.0	265	25.10±0.04^{e}	23.64±0.06^{d}	0.942±0.002^{d}	0.300±0.009^{c}	0.0121±0.0003^{d}
พีเอช 9.0	260	25.91±0.04^{c}	35.94±0.05^{b}	1.387±0.002^{b}	0.537±0.007^{b}	0.0206±0.0004^{b}
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต						
พีเอช 10.0	280	25.23±0.06^{d}	60.56±0.06^{a}	2.399±0.002^{a}	0.855±0.008^{a}	0.0338±0.0003^{a}
พีเอช 11.0	272	22.79±0.05^{f}	24.68±0.06^{c}	1.084±0.002^{c}	0.313±0.007^{c}	0.0138±0.0003^{c}

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

ตารางภาคผนวกที่ ค2 ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	ปริมาตร * (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	เอนไซม์โปรติเอส แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	เอนไซม์ไลเปส แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	เอนไซม์ไลเปส แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต						
พีเอช 2.0	172	20.19±0.15^{j}	1.18±0.09^{j}	0.058±0.004^{j}	0.028±0.004^{i}	0.0014±0.0001^{h}
พีเอช 3.0	256	21.25±0.08^{i}	1.65±0.06^{i}	0.077±0.003^{i}	0.036±0.004^{i}	0.0017±0.0002^{h}
พีเอช 4.0	302	22.75±0.15^{f}	3.97±0.06^{h}	0.175±0.003^{h}	0.079±0.009^{h}	0.0035±0.0004^{g}
พีเอช 5.0	306	22.20±0.17^{a}	4.85±0.08^{g}	0.219±0.005^{g}	0.156±0.010^{g}	0.0007±0.0005^{f}
พีเอช 6.0	258	25.24±0.07^{a}	9.83±0.11f	0.380±0.005^{f}	0.231±0.015^{f}	0.0090±0.0006^{e}
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์						
พีเอช 7.0	244	24.81±0.10^{b}	16.23±0.06^{e}	0.654±0.003^{e}	0..443±0.016^{d}	0.0179±0.0006^{d}
พีเอช 8.0	296	24.24±0.08^{c}	28.79±0.06^{d}	1.188±0.004^{d}	0.705±0.013^{c}	0.0291±0.0006^{c}
พีเอช 9.0	330	23.86±0.11^{d}	46.39±0.06^{b}	1.194±0.003^{b}	1.003±0.008^{b}	0.0420±0.0001^{b}
คาร์บอเนต ไบคาร์บอเนต						
พีเอช 10.0	274	23.37±0.11^{e}	72.17±0.05^{a}	3.089±0.003^{a}	1.258±0.011^{a}	0.0538±0.0007^{a}
พีเอช 11.0	286	21.55±0.07^{h}	29.54±0.05^{c}	1.371±0.004^{c}	0.466±0.012^{e}	0.0216±0.0006^{d}

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

ตารางภาคผนวกที่ ค3 ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากเครื่องในรวมของปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	ปริมาตร * (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
			แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต						
พีเอช 2.0	136	19.97±0.12^{j}	0.84±0.07^{j}	0.042±0.005^{i}	0.013±0.003^{i}	0.0007±0.0001^{i}
พีเอช 3.0	149	20.23±0.09^{i}	1.84±0.06^{i}	0.091±0.006^{h}	0.028±0.003^{h}	0.0014±0.0001^{h}
พีเอช 4.0	120	21.65±0.08^{h}	2.83±0.10^{h}	0.131±0.005^{g}	0.044±0.004^{g}	0.0020±0.0001^{g}
พีเอช 5.0	126	23.46±0.11^{e}	3.45±0.07^{g}	0.147±0.004^{f}	0.063±0.005^{f}	0.0027±0.0002^{f}
พีเอช 6.0	130	26.17±0.08^{a}	10.83±0.08^{f}	0.414±0.004^{e}	0.135±0.006^{e}	0.0051±0.0002^{e}
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์						
พีเอช 7.0	120	24.85±0.09^{b}	13.75±0.07^{d}	0.553±0.004^{d}	0.190±0.006^{d}	0.0077±0.0002^{d}
พีเอช 8.0	164	24.46±0.10^{c}	24.45±0.05^{b}	1.000±0.006^{b}	0.216±0.009^{c}	0.0088±0.0004
พีเอช 9.0	172	23.86±0.09^{d}	48.53±0.08^{a}	2.304±0.005^{a}	0.527±0.008^{a}	0.0221±0.0004^{a}
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต						
พีเอช 10.0	148	22.83±0.10^{f}	20.36±0.10^{c}	0.892±0.008^{c}	0.345±0.013^{b}	0.0151±0.0006^{b}
พีเอช 11.0	140	22.62±0.12^{g}	12.53±0.08^{e}	0.547±0.007^{d}	0.207±0.010^{c}	0.0091±0.0004^{c}

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

ตารางภาคผนวกที่ ค4 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักกระเพาะ* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	62	102	19.86	0.31	0.016	-	-
พีเอช 3.0	62	102	20.04	0.92	0.046	-	-
พีเอช 4.0	62	106	20.58	2.89	0.140	-	-
พีเอช 5.0	62	102	21.35	4.69	0.220	-	-
พีเอช 6.0	72	128	21.72	9.51	0.438	0.013	0.0006
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	78	136	20.59	10.46	0.508	0.028	0.0014
พีเอช 8.0	60	100	19.47	11.79	0.606	0.030	0.0015
พีเอช 9.0	62	108	19.02	13.77	0.724	0.032	0.0017
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	60	102	18.95	24.25	1.280	0.096	0.0051
พีเอช 11.0	60	100	16.95	10.65	0.628	0.030	0.0018

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค5 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*)โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักม้าม* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	50	110	20.61	1.09	0.053	-	-
พีเอช 3.0	52	110	21.19	2.51	0.118	-	-
พีเอช 4.0	50	110	21.82	6.07	0.278	-	-
พีเอช 5.0	50	114	22.14	10.59	0.478	-	-
พีเอช 6.0	74	140	22.57	17.32	0.767	0.048	0.0021
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	60	118	21.27	25.10	1.180	0.052	0.0024
พีเอช 8.0	60	120	20.58	31.78	1.544	0.066	0.0032
พีเอช 9.0	60	120	20.43	35.32	1.729	0.095	0.0047
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	70	134	20.37	46.29	2.272	0.148	0.0073
พีเอช 11.0	60	120	19.98	30.45	1.524	0.091	0.0046

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค6 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักตับ * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	70	120	20.53	0.21	0.010	-	-
พีเอช 3.0	70	120	21.86	0.53	0.024	-	-
พีเอช 4.0	70	120	22.07	1.76	0.080	-	-
พีเอช 5.0	70	126	22.59	4.53	0.201	-	-
พีเอช 6.0	70	170	23.43	11.96	0.510	0.058	0.0025
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	66	156	21.01	18.39	0.875	0.076	0.0036
พีเอช 8.0	60	138	20.96	21.45	1.023	0.104	0.0050
พีเอช 9.0	72	140	20.52	28.56	1.392	0.138	0.0067
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	72	160	20.41	34.81	1.706	0.186	0.0091
พีเอช 11.0	72	138	19.67	22.29	1.133	0.074	0.0038

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค7 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักตับอ่อน * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	20	36	22.61	0.75	0.033	-	-
พีเอช 3.0	20	36	22.89	1.09	0.048	-	-
พีเอช 4.0	20	36	24.57	2.59	0.105	-	-
พีเอช 5.0	20	36	24.98	6.43	0.257	-	-
พีเอช 6.0	22	44	26.46	10.39	0.393	0.051	0.0022
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	26	52	25.29	16.60	0.656	0.057	0.0027
พีเอช 8.0	28	52	24.83	18.75	0.755	0.096	0.0046
พีเอช 9.0	30	60	24.44	23.84	0.975	0.154	0.0075
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	30	60	23.93	34.19	1.429	0.301	0.0147
พีเอช 11.0	30	60	20.12	25.87	1.286	0.163	0.0083

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค8 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Katsuwonus pelamis*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักกระเพาะ* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	50	86	19.59	0.51	0.026	-	-
พีเอช 3.0	50	88	20.27	0.98	0.048	-	-
พีเอช 4.0	48	86	21.98	1.26	0.057	-	-
พีเอช 5.0	50	90	21.31	3.48	0.163	-	-
พีเอช 6.0	50	90	22.46	5.67	0.252	0.016	0.0007
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	50	90	20.14	10.63	0.528	0.023	0.0011
พีเอช 8.0	50	95	20.07	11.40	0.568	0.036	0.0018
พีเอช 9.0	65	104	19.87	15.78	0.794	0.042	0.0021
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	80	168	18.99	27.63	1.455	0.107	0.0056
พีเอช 11.0	65	122	18.96	13.73	0.724	0.033	0.0017

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

\- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค9 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักม้าม * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	40	86	21.44	1.04	0.049	-	-
พีเอช 3.0	42	82	21.87	2.19	0.100	-	-
พีเอช 4.0	42	82	22.02	6.54	0.297	-	-
พีเอช 5.0	42	92	22.53	8.68	0.385	-	-
พีเอช 6.0	40	92	22.81	11.95	0.524	0.054	0.0024
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	40	86	22.52	23.87	1.060	0.095	0.0042
พีเอช 8.0	65	132	22.26	31.71	1.425	0.126	0.0057
พีเอช 9.0	70	178	21.40	44.04	2.058	0.198	0.0093
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	80	180	20.86	53.38	2.559	0.289	0.0139
พีเอช 11.0	65	150	18.59	39.97	2.150	0.148	0.0080

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค10 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์พีเอช	น้ำหนักตับ * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	40	90	23.37	0.26	0.011	-	-
พีเอช 3.0	40	86	24.93	0.75	0.030	-	-
พีเอช 4.0	40	92	24.59	1.26	0.051	-	-
พีเอช 5.0	40	92	24.15	3.98	0.165	-	-
พีเอช 6.0	40	94	23.06	6.14	0.266	0.068	0.0029
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	40	96	22.29	17.17	0.770	0.105	0.0047
พีเอช 8.0	40	80	21.59	22.75	1.054	0.164	0.0076
พีเอช 9.0	40	82	21.47	28.13	1.310	0.249	0.0116
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	45	112	21.00	36.59	1.742	0.371	0.0177
พีเอช 11.0	40	72	20.54	26.75	1.302	0.211	0.0103

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค11 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักตับอ่อน* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	20	44	23.15	0.45	0.019	-	-
พีเอช 3.0	20	46	23.99	0.86	0.036	-	-
พีเอช 4.0	20	46	24.07	1.39	0.058	-	-
พีเอช 5.0	20	46	24.44	4 .53	0.185	-	-
พีเอช 6.0	20	44	25.81	7.05	0.273	0.166	0.0072
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	20	44	24.78	13.35	0.546	0.218	0.0088
พีเอช 8.0	20	72	24.11	18.64	0.773	0.325	0.0135
พีเอช 9.0	35	78	22.93	23.98	1.046	0.531	0.0232
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	50	126	22.63	34.65	1.531	0.723	0.0319
พีเอช 11.0	35	72	20.95	28.43	1.357	0.528	0.0252

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค12 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากกระเพาะปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักกระเพาะ* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	50	80	20.01	0.21	0.010	-	-
พีเอช 3.0	50	80	20.18	0.58	0.029	-	-
พีเอช 4.0	50	80	22.94	0.99	0.043	-	-
พีเอช 5.0	50	80	22.63	2.18	0.096	-	-
พีเอช 6.0	50	80	21.30	6.01	0.282	0.014	0.0007
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	50	85	20.62	10.26	0.498	0.028	0.014
พีเอช 8.0	50	86	19.94	19.58	0.982	0.037	0.0019
พีเอช 9.0	84	167	19.17	24.25	1.265	0.073	0.0038
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	80	150	19.99	21.53	1.077	0.047	0.0024
พีเอช 11.0	80	148	20.23	16.29	0.805	0.025	0.0012

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค13 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักม้าม * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	40	72	19.96	2.16	0.108	-	-
พีเอช 3.0	40	74	20.14	4.29	0.213	-	-
พีเอช 4.0	40	72	20.53	8.88	0.433	-	-
พีเอช 5.0	40	72	20.96	11.16	0.532	-	-
พีเอช 6.0	40	72	21.62	16.51	0.764	0.047	0.0220
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	60	132	21.49	23.09	1.074	0.064	0.0030
พีเอช 8.0	60	136	20.67	32.35	1.565	0.086	0.0042
พีเอช 9.0	82	180	20.35	42.79	2.103	0.123	0.0060
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	48	110	19.31	36.33	1.881	0.082	0.0042
พีเอช 11.0	40	86	19.44	28.29	1.455	0.063	0.0032

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค14 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์ พีเอช	น้ำหนักตับ * (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	40	86	19.94	1.06	0.053	-	-
พีเอช 3.0	40	86	20.91	3.73	0.178	-	-
พีเอช 4.0	40	86	21.54	7.54	0.350	-	-
พีเอช 5.0	40	80	22.99	9.39	0.408	-	-
พีเอช 6.0	40	86	22.93	15.62	0.681	0.061	0.0027
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	40	86	22.65	21.11	0.932	0.085	0.0038
พีเอช 8.0	42	86	21.77	24.50	1.125	0.113	0.0052
พีเอช 9.0	64	165	21.05	34.55	1.641	0.150	0.0071
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	40	80	20.97	26.78	1.277	0.116	0.0055
พีเอช 11.0	40	80	20.53	21.14	1.030	0.087	0.0042

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ตารางภาคผนวกที่ ค15 น้ำหนักเครื่องใน ปริมาตร ปริมาณโปรตีน และแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ที่สกัดจากตับอ่อนปลาทูน่าพันธุ์โอดำ (*Thunnus tonggol*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์พีเอชต่างๆ

ชนิดบัฟเฟอร์พีเอช	น้ำหนักตับอ่อน* (กรัม)	ปริมาตรเอนไซม์ (มล.)	โปรตีน (มก./ มล.)	เอนไซม์โปรติเอส		เอนไซม์ไลเปส	
				แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)	แอคทิวิตี้ (ยูนิต / มล.)	แอคทิวิตี้จำเพาะ (ยูนิต / มก.)
ซิเตรต-ฟอสเฟต							
พีเอช 2.0	20	40	22.08	0.83	0.038	-	-
พีเอช 3.0	20	40	22.14	2.25	0.102	-	-
พีเอช 4.0	20	40	23.52	5.41	0.230	-	-
พีเอช 5.0	20	38	24.16	7.77	0.322	-	-
พีเอช 6.0	20	42	25.86	13.89	0.537	0.115	0.0050
ทริส-ไฮโดรคลอไรด์							
พีเอช 7.0	20	40	25.64	19.53	0.762	0.146	0.0065
พีเอช 8.0	20	48	24.93	22.24	0.892	0.189	0.0096
พีเอช 9.0	46	85	24.70	33.64	1.362	0.227	0.0108
คาร์บอเนต -ไบคาร์บอเนต							
พีเอช 10.0	30	62	23.89	25.88	1.083	0.158	0.0066
พีเอช 11.0	30	60	23.43	19.32	0.825	0.109	0.0053

หมายเหตุ : * อัตราส่วนน้ำหนักปลาต่อปริมาตรบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด เท่ากับ 1:2

- ค่าต่ำมาก

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์

วัน เดือน ปีเกิด 14 สิงหาคม 2511

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์-ประมง)	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล	2534

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์