บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จัดเป็นกุ้งทะเลในกลุ่ม Penaeid ชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจ ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ อลานีน ไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน เซอรีน และทรีโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสชาติดี (Pan, 1990) นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางอาหารสูงและเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ และมีความสำคัญต่อการพัฒนาประเทศของหลายประเทศทั่วโลก

สำหรับประเทศไทยกุ้งกุลาดำจัดเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญทำรายได้ให้กับประเทศเป็นอันดับต้นๆ โดยในแต่ละปีมีการส่งออกกุ้งปีละ 6-7 หมื่นล้านบาท กุ้งที่ใช้ในการแปรรูปส่วนใหญ่จะได้มาจากการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปริมาณกุ้งที่จับได้จากแหล่งธรรมชาติมีปริมาณที่ลดลง และประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูง โดยเฉพาะกุ้งทะเล เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง และยังมีอาหารกุ้งที่มากพอ ราคาถูก แรงงานหาง่าย และมีการใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยทำให้สามารถเพาะเลี้ยงกุ้งได้ในปริมาณมากและต้นทุนต่ำกว่าประเทศคู่แข่งอื่นๆ

อุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำ ส่วนใหญ่ร้อยละ 80-98 นิยมนำมาผลิตเป็นกุ้งกุลาดำสดแช่แข็ง ได้แก่ กุ้งเอาหัวออก (headless) หรือกุ้งปอกเปลือกแช่แข็ง ซึ่งมีปริมาณการส่งออกมากกว่า 4 พันล้านบาท (นิรนาม, 2540) นอกจากกุ้งกุลาดำสดแช่แข็งแล้วยังมีผลิตภัณฑ์กุ้งอื่นๆ ได้แก่ กุ้งแห้ง กุ้งต้มสุก และกุ้งบรรจุกระป๋อง เป็นต้น ปริมาณการส่งออกกุ้งสดแช่แข็งในปี 2540 และ 2541 มีค่า 137,080 และ 150,146 ตัน ตามลำดับ (นิรนาม, 2542) ส่วนปริมาณและมูลค่าการส่งออกกุ้งสดแช่แข็งในช่วง 5 เดือนแรกของปี 2543 มีค่า 50,794 ตัน และ 20,122.50 ล้านบาท ตามลำดับ (รายงานเศรษฐกิจธนาคารกรุงไทย, 2543) และในช่วงครึ่งปีแรกของปี 2544 มีมูลค่าการส่งออกกุ้งสดแช่แข็งเป็น 106,809 ตัน คิดเป็นมูลค่า 43,723.6 ล้านบาท เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเดียวกันกับปีก่อน พบว่าปริมาณและมูลค่าการส่งออกสูงขึ้นคิด

เป็นร้อยละ 62.0 และ 69.8 ตามลำดับ (รายงานเศรษฐกิจธนาคารกรุงไทย, 2544) จากอุตสาหกรรมการผลิตดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 37-40 โดยมีหัวกุ้งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเศษเหลือดังกล่าว (Bhuwapathapun, 1996) จากแนวโน้มการส่งออกกุ้งแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของวัสดุเศษเหลือเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ โดยวัสดุเศษเหลือดังกล่าวส่วนใหญ่จะนำมาใช้ประโยชน์หลายด้านเพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรง หรือใช้ผลิตเป็นเปลือกกุ้งป่นสำหรับผสมในอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าต่ำ การผลิตไคตินและอนุพันธุ์ของไคติน และไคโตแซน (Synowiecki and Al-Khateeb, 2000) และมีการนำหัวกุ้งไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตสารให้สีจากเปลือกกุ้ง (pigments) (Chen and Meyer, 1982) การผลิตสารให้กลิ่นรสจากหัวกุ้ง (Pan, 1990) การผลิตเปปโตนสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Adler–Nissen,1986) และการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และน้ำมันดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ (ไตรตะวัน คงแก้ว, 2542) เป็นต้น

นอกจากนี้มีรายงานการนำวัสดุเศษเหลือดังกล่าวมาศึกษาเพื่อใช้เป็นแหล่งของเอนไซม์ โดย Olsen และคณะ (1990) ศึกษาชนิดเอนไซม์ที่มีในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง พบว่ามีเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase), ไคติเนส (chitinase), อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และ เบต้า-เอน-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (β–N acetyl glucosaminidase) Chen และคณะ (1991) สกัดแยกเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) จากเปลือกของ Western Australian lobster (*Panulirus cygnus*) และ Florida Spiny lobster (*Penulirus argus*) Chen และ คณะ (1997) สกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจากเซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) จากกุ้ง 2 ชนิดคือ *Penaeus setiferus* และ *Penaeus duorarum* และ อุบลรัตน์ สมมะลวน (2540) ศึกษาเบื้องต้นชนิดของเอนไซม์ที่มีในตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบว่าเมื่อนำเอนไซม์สกัดทั้ง 4 ส่วนคือเอนไซม์สกัดในส่วนสารละลายของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง และส่วนอิมัลชั่นของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยงมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ดังต่อไปนี้ แอลฟา-อะมัยเลส (α–amylase), โปรติเอส (protease), ไลเปส (lipase), แคทาเลส (catalase), เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าเอนไซม์สกัดทั้ง 4 ส่วนดังกล่าวมีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสสูงสุดมีค่าเท่ากับ 1,702.34, 1,826.82, 4,985.29 และ 7,987.33 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 120.60, 98.85, 156.57 และ

135.98 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เอนไซม์ที่พบกิจกรรมรองลงมา ได้แก่ แอลฟา-อะมัยเลส และโปรติเอส สำหรับไลเปส เปอร์ออกซิเดส และ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสพบกิจกรรมในปริมาณน้อยมาก

งานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและปริมาณของเอนไซม์ที่มีในตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ที่มีปริมาณสูงสุด เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างเหมาะสม

2. ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์จากสัตว์น้ำ

2.1 เอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzymes)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย่อยสารตั้งต้นซึ่งประกอบด้วยพันธะเปปไทด์ที่ต่อกันเป็นโมเลกุลยาวให้ได้เป็นสารประกอบที่มีขนาดเล็กลงหรือเป็นกรดอะมิโนซึ่งเซลล์สามารถดูดซึมได้ (Loffler, 1986; Venugopal *et al*., 2000) โดยปกติเอนไซม์เหล่านี้จะถูกสังเคราะห์ให้อยู่ในรูปโปรเอนไซม์ (proenzyme) หรือไซโมเจน (zymogen) ซึ่งอยู่ในรูปที่ไม่สามารถทำงานได้ (Whitaker, 1994; Gildberg, 1988) เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มที่มีความสำคัญโดยมีการนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารและอุตสาหกรรมด้านอื่นๆ มากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมการทำเนยแข็ง เนื้อสัตว์ เบียร์ ไวน์ น้ำผลไม้ การปรับปรุงกลิ่นรสของอาหารหมักดั้งเดิม ธัญญพืช ซีอิ้ว น้ำปลา ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ฟอกหนัง ผงซักฟอก อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยา เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543; ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2537; Venugopal *et al*., 2000; Shin and Zall, 1986)

เอนไซม์จากสัตว์น้ำโดยเฉพาะจากเครื่องในปลาและกล้ามเนื้อปลาจะพบเอนไซม์ในกลุ่มเอนไซม์โปรติเอสในปริมาณสูง นอกจากนี้ได้มีการศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับเอนไซม์ในกลุ่มนี้จากอวัยวะภายในของปลาและจากสัตว์จำพวกไม่มีกระดูกสันหลัง (arthropod) เป็นจำนวนมาก (An and Visessanguan, 2000; Hernandez-Santoyo *et al*., 1998) เอนไซม์โปรติเอสที่พบในลำไส้ของปลา ได้แก่ ทริปซิน (trypsin) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) คอลลาจีเนส (collagenase) อีลาสเทส (elastase) คาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase) และคาร์บอกซิลเอสเทอเรส(carboxylesterase) โดยเอนไซม์เหล่านี้จะถูกขับออกมาจาก pyloric caeca และตับอ่อน (Haard, 1994 อ้างโดย An and Visessagnuan, 2000)

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์ (2541) ศึกษาการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ ครีบเหลือง และโอดำ พบว่าการใช้บัฟเฟอร์พีเอช 10.0 สามารถให้ค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอส เท่ากับ 72.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 3.09 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ และเมื่อทำการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในแต่ละส่วน (กระเพาะ ตับ ม้าม และตับอ่อน) ของปลาทูน่า ทั้ง 3 พันธุ์ แล้วเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์พบว่า ม้าม เป็นแหล่งที่มีกิจกรรมโปรติเอสสูงที่สุด โดยเอนไซม์สกัดจากม้ามปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลืองให้ค่ากิจกรรมสูง

สุดเท่ากับ 58.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของโปรติเอสเท่ากับ 2.56 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาได้แก่ ตับ ตับอ่อน และกระเพาะ ตามลำดับ

อุบลรัตน์ สมมะลวน (2540) ทำการศึกษาเบื้องต้นโดยสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และ Tween 80 ร้อยละ 0.2 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 (น้ำหนักต่อปริมาตร) พบว่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสจะพบมากในเอนไซม์สกัดส่วนที่เป็นสารละลายของกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง โดยมีค่าเท่ากับ 28.65 และ 32.52 หน่วยต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 2.03 และ 1.76 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เอนไซม์โปรติเอสสามารถจำแนกตามชนิดของอนุมูลที่บริเวณเร่ง (active site) ได้เป็น 4 กลุ่ม ซึ่งประกอบด้วย โปรติเอสชนิดซีรีน โปรติเอสชนิดซิสเตอีน โปรติเอสชนิดแอสปาร์ติก และโปรติเอสชนิดเมทธัลโล (Whitaker, 1994; Haard and Simpson, 1994; Dixon and Webb, 1979)

2.1.1 **โปรติเอสชนิดซีรีน** (Serine protease)

เป็นเอนไซม์กลุ่มที่สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่าพีเอชเป็นด่าง (alkaline protease) มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์อยู่ในช่วงพีเอชมากกว่า 7 (pH 7-11) เอนไซม์ทั้งหมดในกลุ่มนี้จะเป็นพวกเอนโดเปปทิเดส (endopeptidase) มีคุณสมบัติคือถูกยับยั้งโดย DFP (diisopropyl-phosphofluoridate) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของอนุมูลเซริล (seryl group) ในบริเวณเร่งของเอนไซม์ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือ มีอนุมูลเซริลอยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มเซรีน ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน อีลาสเทส ทรอมบิน (thrombin) ซับทิลิซิน (subtilisin) และ แอลฟา-ไลติก โปรติเอส (α-Lytic protease) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543; Martinez and Serra, 1989 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000)

การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเอสจากปลาหลายชนิดพบว่า เอนไซม์โปรติเอสชนิดเซรีนพบมากที่สุดในเครื่องในปลา (Heu *et al.*, 1995) โดยเฉพาะเอนไซม์ทริปซินมักจะพบได้จากลำไส้เล็ก และตับอ่อนของสัตว์ (Haard, 1992) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสทางด้าน physicochemical และ enzymatic จากปลาและสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ได้แก่

Jantaro (2000) ศึกษาเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ทริปซินซึ่งสกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน (ตับ ตับอ่อน กระเพาะ ม้าม และลำไส้) ของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) พบว่าม้ามเป็นแหล่งเอนไซม์ที่ดีที่สุดสำหรับทริปซินโดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดและกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 49.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 13.80 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ เครื่องในรวม ตับอ่อน ตับ ลำไส้ และกระเพาะ ตามลำดับ

Kim และคณะ (1992) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากตับอ่อนของ crayfish (*Procambarus clarkii*) พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมทั้งหมดของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 32,000 ยูนิต กิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 5.8 ยูนิตต่อมิลลิกรัม หลังจากทำเอนไซม์ทริปซินให้บริสุทธิ์โดยผ่าน Sephacryl S-200 พบว่าเอนไซม์สกัดประกอบด้วยเอนไซม์ทริปซิน 4 ชนิด ได้แก่ ทริปซิน A B C และ D

Gates และ Travis (1969) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์จากตับอ่อนของ white shrimp (*Penaeus setiferus*) พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมทั้งหมดและกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ทริปซินเท่ากับ 7.8 ยูนิต และ 0.48 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Doke และ Ninjoor (1987) ศึกษาการสกัดเอนไซม์จาก *Penaeus indicus* โดยใช้สารละลายจำนวน 10 ชนิดในการสกัด พบว่าการใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของอัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 642 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

Reece (1988) ศึกษาการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลา salmon (*Salmo sarda*) พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมทั้งหมดและกิจกรรมจำเพาะของอัลคาไลน์โปรติเอสเท่ากับ 38.7 มิลลิยูนิต และ 1.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

Shin และ Zall (1986) ศึกษาประเภทของเอนไซม์ย่อยโปรตีนจากไส้ติ่งของปลา cod ในเขตแอตแลนติก พบว่าเอนไซม์ที่ได้จัดเป็นซีรินโปรติเอส สามารถทำงานได้ดีที่สภาวะเป็นด่าง และเมื่อนำเอนไซม์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านโครมาโทกราฟีชนิด Biogel P-100 พบว่าเป็นเอนไซม์ที่แสดงคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน (trypsin–like enzyme) มีกิจกรรมทั้งหมดและกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 238,511 ยูนิต และ 52.4 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

สัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่สามารถพบเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ dogfish (Ramakrishna *et al*., 1987) anchovy (*Engraulis japonica*) (Martinez *et al*., 1988) และ poikilotherm (*Gadus morhua*) (Asgiersson *et al*., 1989)

ส่วนเอนไซม์ไคโมทริปซินผลิตได้จากตับอ่อนและกระเพาะของสัตว์ โดยผลิตออกมาในรูปโปรเอนไซม์ที่เรียกว่า ไคโมทริปซิโนเจน (chymotrypsinogen) (Walsh and Wilcox, 1970) ซึ่งพบได้จากปลา cod และ ตับอ่อนของปลา carp (Heu *et al*., 1995)

Jantaro (2000) ศึกษาเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์ไคโมทริปซินของเอนไซม์สกัดจากเครื่องในรวมและเครื่องในแต่ละส่วน (ตับ ตับอ่อน กระเพาะ ม้าม และลำไส้) ของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง (*Thunnus albacares*) พบว่าตับอ่อนเป็นแหล่งเอนไซม์ที่ดีที่สุดสำหรับไคโมทริปซินโดยให้ค่ากิจกรรมสูงสุดและกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 4.13 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 1.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ รองลงมาได้แก่ ม้าม กระเพาะ เครื่องในรวม ตับ และลำไส้ ตามลำดับ

Hernandez-Santoyo และคณะ (1998) ศึกษาเอนไซม์โปรติเอสในสารสะลายเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนของ blue abalone (*Haliotis fulgens*) พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์พบว่าได้เอนไซม์ 4 ชนิด คือ PH1 PH2 PH3 และ PH4 โดย PH1 PH2 และ PH3 แสดงคุณสมบัติคล้ายกับเอนไซม์โปรติเอสในกลุ่มเซรีน โดยที่เอนไซม์ PH1 มีคุณสมบัติคล้ายไคโมทริปซิน (chymotrypsin-like enzyme) ในขณะที่เอนไซม์ PH2 และ PH3 มีคุณสมบัติคล้ายทริปซิน (trypsin-like enzyme) ขณะที่เอนไซม์ PH4 มีคุณสมบัติคล้ายคาร์บอกซีเปปทิเดส (carboxypeptidase-like enzyme)

นอกจากนี้ไคโมทริปซิน สามารถนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตสารสกัดจากปลา (fish extract) ผลิตภัณฑ์ขนมอบ ไข่ และผลิตภัณฑ์จากไข่ และ การผลิตเนยแข็ง เป็นต้น (Haard, 1992)

2.1.2 **โปรติเอสชนิดซิสเตอีน** (Cysteine / thiol protease)

เป็นโปรติเอสกลุ่มที่มี sulphydryl group (-SH) เป็น active site และอาจมี histidyl รวมอยู่ด้วย สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 6.0-7.5) ทนความร้อนได้ดี (60-80 องศาเซลเซียส) เสียสภาพที่พีเอชน้อยกว่า 4 และถูกยับยั้งได้ด้วยสารกลุ่มซัลไฮดริล (sulphydryl group) หรือกลุ่มไธออล (thiol group) เช่น N-acethylmaleimide *p*-chloromercuribenzoate (*p*CMB) เป็นต้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คาเทปซิน บี (cathepsin B) จากเครื่องในของ surf clam (*Spisula solidissima*) (Chen and Zall, 1986) คาเทปซิน แอล (cathepsin L) ปลา salmon (Yamashita and Konagara, 1991 อ้างโดย Jantaro, 2000)

ปลา mackerel (Lee *et al*., 1993 อ้างโดย Jantaro, 2000) และปลา anchovy (Heu *et al*., 1997 อ้างโดย Jantaro, 2000) นอกจากนี้ยังสามารถพบเอนไซม์กลุ่มนี้ได้จากพืชชั้นสูงและจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ ปาเปน (papain) โบรมิเลน (bromelain) และฟิซิน (ficin) เป็นต้น (Haard and Simpson, 1994)

2.1.3 **โปรติเอสชนิดแอสปาติก** (Aspartyl / acidic protease)

เอนไซม์กลุ่มที่ทำงานได้ในช่วงที่มีพีเอชเป็นกรด โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมคือพีเอช 2-4 มีความจำเพาะกับกรดอะมิโนชนิดอะโรมาติก (aromatic amino acid) ถูกยับยั้งโดยสารประกอบ pepstatin และ diazoacetyl norleucinemethyl ester เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ เปปซิน (pepsin) จากปลา cod (*Boreogadus saida*) (Arunchalam and Haard, 1985) bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) (Tanji *et al*., 1988 อ้างโดย Jantaro, 2000) และ rainbow trout (Twining *et al*., 1983 อ้างโดย Jantaro, 2000) เรนนิน (rennin) แกสทริซิน (gastricin) ไคโมซิน (chymosin) และคาเทปซิน ดี (cathepsin D) จากเครื่องใน surf clam (*Spisula solidissima*)(Chen and Zall, 1986) และตับอ่อนของ blue abalone (*Haliotis fulgens*) (Hernandez-Santoyo *et al*., 1998) เป็นต้น

Arunchalam และ Haard (1985) สกัดเอนไซม์เปปซินจากส่วนของ gastric mucosa ปลา cod (*Boreogadus saida*) โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 7.3 พบว่าประกอบด้วยเปปซิน 2 ชนิดคือ เปปซิน A และ B มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 1,260 และ 2,798 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

2.1.4 **โปรติเอสชนิดเมทธัลโล** (Metallo protease)

เป็นเอนไซม์ที่มีอิออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ หรือร่วมอยู่ในปฏิกิริยาการย่อยสลาย เช่น Zn^{2+} โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยสลายสารตั้งต้นจากภายนอก (exopeptidase) เกือบทั้งหมด สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง (พีเอช 5.6-7.5) สามารถถูกยับยั้งโดยสารจับโลหะ เช่น EDTA 8-hydroxyquinoline และ *o*-phenanthroline เป็นต้น เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ คอลลาจีเนส (collagenase) เป็นต้น

Eisen และคณะ (1973) สกัดเอนไซม์คอลลาจีเนสจากตับอ่อนของ fiddler carb (*Uca pugilator*) เอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมทั้งหมดเท่ากับ 281 x 10^3 ยูนิต และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 125 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เป็นต้น

Nip และคณะ (1985) ศึกษาการสกัดเอนไซม์ย่อยคอลลาเจน (collagenolytic enzyme) จากตับอ่อนของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่าเอนไซม์มีกิจกรรมจำเพาะในการย่อยสลายโบวินคอลลาเจน (bovine collagen) เท่ากับ 0.03 ไมโครกรัมโบวินคอลลาเจนที่ถูกย่อยสลายต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและคอลัมน์โครมาโทกราฟี พบว่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 23.2 ไมโครกรัมโบวินคอลลาเจนต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.2 เอนไซม์ย่อยแป้ง (Amylolytic enzymes)

ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของสับสเตรตที่มีพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic bond) เช่น แป้ง เซลลูโลส และ เพคติน เป็นต้น เอนไซม์ย่อยสลายสับสเตรตเหล่านี้ได้แก่ อะมัยเลส เซลลูเลส และ เพคติเนส ตามลำดับ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

เอนไซม์อะมัยเลสเป็นเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิก ชนิด α-(1,4) ของพอลิแซกคาไรด์ เช่น แป้ง และ ไกลโคเจน (ดวงพร คันธโชติ, 2530; ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) เอนไซม์อะมัยเลสแบ่งได้ 3 ชนิดตามลักษณะการย่อยสลาย ได้แก่ แอลฟา-อะมัยเลส (α-amylase) เบตา-อะมัยเลส (β-amylase) และ แกมมา-อะมัยเลส (γ-amylase) หรือ กลูโคอะมัยเลส (glucoamylase) หรือ อะมัยโลกลูโคซิเดส(amyloglucosidase)

แอลฟา-อะมัยเลส สามารถพบได้ทั้งในพืช สัตว์ จุลินทรีย์ และในมนุษย์ โดยพบในตับและ ตับอ่อน (ดวงพร คันธโชติ, 2530; ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543) นอกจากนี้ยังพบได้ในน้ำลายอีกด้วย ส่วนในพืชสามารถพบได้จากข้าวมอลต์ และ ข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น (ดวงพร คันธโชติ, 2530) จากรายงานการศึกษาและการวิจัยจำนวนหนึ่งกล่าวว่าสามารถพบเอนไซม์ย่อยแป้งได้จากเครื่องในปลาน้ำจืด ปลาทะเลบางชนิด (Fernandez *et al*., 2001) และสามารถพบได้จากระบบทางเดินอาหารของกุ้ง Pacific brown (*Penaeus californiensis*) (Vega-Villasante *et al*., 1993) นอกจากนี้มีรายงานพบเอนไซม์เซลลูเลสจากอวัยวะย่อยอาหาร (digestive organ) ของสัตว์จำพวกครัสเตเซียนบางชนิดอีกด้วย (Yokoe and Yasusama, 1964 อ้างโดย Xue *et al*., 1999)

Fernandez และคณะ (2001) ศึกษาเปรียบเทียบเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส ซึ่งสกัดจากเครื่องในของปลา 5 ชนิด ได้แก่ *Pagrus pagrus Pagellus erytrhirus Pagrus bogaraveo Boops boops* และ *Diplodus annularis* พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลสของปลาแต่ละชนิดเท่ากับ $40.9x10^3$ $19.2x10^3$ $11.0x10^3$ $9.5x10^3$ และ $6.2x10^3$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Moreau และคณะ (2001) ศึกษาเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส ซึ่งสกัดจากช่องว่างในลำไส้เล็กของปลา 2 ชนิด ได้แก่ *Oreochromis niloticus* และ *Sarotherodon melanotheron* พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะเอนไซม์แอลฟา-อะมัยเลส เท่ากับ 20 และ 10 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Xue และคณะ (1999) ทำการแยกเอนไซม์เซลลูเลส (endogenous cellulase) จากน้ำย่อยจากกระเพาะอาหาร (gastric fluid) และ ต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ของ redclaw crayfish (*Cherax quadricarinatus*) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดจากส่วนของน้ำย่อยจากกระเพาะอาหารมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 8.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในขณะที่กิจกรรมเอนไซม์จากต่อมสร้างน้ำย่อยมีค่าเท่ากับ 0.7 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.3 **เอนไซม์ย่อยไขมัน** (Lipolytic enzymes)

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งในกลุ่มไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ในสภาวะที่มีน้ำ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไดกลีเซอไรด์ โมโนกลีเซอไรด์ กรดไขมัน และกลีเซอรอล ปฏิกิริยาสามารถเกิดย้อนกลับได้เมื่อสภาวะต่างๆ ในปฏิกิริยาเหมาะสม และสามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบที่มีหมู่คาร์บอกซิลที่ไม่ใช่ไตรกลีเซอไรด์ได้อีกด้วย (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543; Macrae, 1983; Malcata *et al*., 1992)

เอนไซม์ย่อยไขมันจากสัตว์พบได้ทั่วไปในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น ตับอ่อน ไต หัวใจ สมอง กล้ามเนื้อ และซีรัม เอนไซม์ย่อยไขมันจากตับอ่อน มีการศึกษาอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะเอนไซม์ย่อยไขมันที่ได้จากตับสุกร เนื่องจากมีความเข้มข้นและนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแพร่หลาย นอกจากนี้สามารถการแยกเอนไซม์ย่อยไขมันจากตับอ่อนของหนู ตับอ่อนโค และตับอ่อนกระบือ อีกด้วย (Shahani, 1975)

เอนไซม์ไลเปสมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะพวกอาหารหมัก เช่น เนยเนยแข็ง เนื่องจากไลเปสเป็นตัวให้กลิ่น รส ทำให้อาหารมีรสเฉพาะตัว หรือใช้ในการปรับปรุงคุณภาพน้ำมัน การผลิตไขมันและน้ำมันดัดแปลงตลอดจนอุตสาหกรรมผงซักฟอก และเครื่องสำอาง เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

ฐิรารัตน์ ประชุมรัตน์ (2541) ศึกษาการสกัดเอนไซม์ไลเปสจากเครื่องในรวมปลาทูน่าพันธุ์โอแถบ ครีบเหลือง และโอดำ มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสเท่ากับ 1.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.054 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อทำการสกัดเอนไซม์จากเครื่องในแต่ละส่วน (กระเพาะ ม้าม ตับ และตับอ่อน) พบว่าแหล่งที่ดีที่สุดของไลเปสคือตับอ่อนของปลาทูน่าพันธุ์ครีบเหลือง ซึ่งมีค่ากิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 0.03 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

อุบลรัตน์ สมมะลวน (2540) ศึกษาเบื้องต้นการสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสซึ่งสกัดจากกุ้งกุลาดำทั้ง 2 ชนิด มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 0.066 และ 0.068 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

Asgeirsson และ Bjarnason (1991) ศึกษาชนิดของเอนไซม์สกัดได้จากปลา cod พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้ประกอบด้วยทริปซิน ไคโมทริปซิน และ อีลาสเทส แต่พบเอนไซม์ย่อยไขมันและเอนไซม์ย่อยแป้งในปริมาณต่ำ

2.4 เอนไซม์ชนิดอื่น ๆ

2.4.1 อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase)

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (EC 3.1.3.1) เป็นเอนไซม์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Shaw and Chen, 1994) ในส่วนพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Chuang and Shih, 1990; Lee and Chuang, 1991) มีหน้าที่ในการขนส่งสารบางชนิดในร่างกายได้แก่ กรดไขมัน โคลีน แคดเมียม (Norman *et al*., 1970; Pekarthy *et al*., 1972; Koyama *et al*., 1983 อ้างโดย Shaw and Chen, 1994) และการสร้างกระดูก (Matsuzawa and Anderson *et al*., 1982 อ้างโดย Shaw and Chen, 1994) นอกจากนี้สามารถพบได้จากรกในครรภ์ ลำไส้เล็ก ตับ และไตของมนุษย์ เป็นต้น (McComb *et al*., 1980 อ้างโดย Chuang and Shin, 1990)

Shaw และ Chen (1994) กล่าวว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และด้านอิมมูโนเทคนิค (immunotechniques) มีรายงานว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีปริมาณสูงในสัตว์พวกครัสเตเซียน ได้แก่ crayfish (Denuce, 1967 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) spiny lobster (Travis, 1955 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) และ hermit (Chockalingam, 1971 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) นอกจากนี้พบว่าของเสียจากการแปรรูปอาหารทะเล เช่น ลำไส้ของปลา และส่วนของเซฟาโลทอแรกซ์ของกุ้งเป็นแหล่งที่มีเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า (Shaw and Chen, 1994)

เอนไซม์ในกลุ่มฟอสฟาเตส แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase) และ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษาควบคู่กับแอซิดฟอสฟาเตส โดยเฉพาะในทางฮีสโตเคมีจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีผู้ศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่ง บทบาทของเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการรักษาระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตภายในเซลล์ให้ปกติ มีบทบาทเกี่ยวกับกระบวนการดูดซึมและขนส่งสารอาหารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะกระบวนการดูดซึมและขนส่งแบบ active transport (Danielli, 1953 อ้างโดยจินตมาศ สุวรรณจรัส, 2537) นอกจากนี้ยังมีส่วนในกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic process) โดยช่วยให้ phosphohexoses แตกตัวได้น้ำตาล เนื้อเยื่อที่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูง ได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารอาหาร เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เป็นอวัยวะคัดหลั่ง (scretory organ) และเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต (Fernley, 1971 อ้างโดยจินตมาศ สุวรรณจรัส, 2537) เป็นต้น

Chuang และ Shih (1990) ศึกษาการสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้ง (*Penaeus japonicus*) โดยใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิ-โมลาร์ พีเอช 7.2 ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ และ Triton X-100 ร้อยละ 0.1 พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 4.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DE-52, Concanavalin A-Sepharose, AcA 34 และ Gel elution พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์หลังจากผ่านคอลัมน์สุดท้ายเท่ากับ 25,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 40 กิโลดาลตัน

Olsen และคณะ (1990) ทดลองนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูป Northern shrimp (*Pandalus borealis*) เพื่อศึกษาชนิดของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าน้ำทิ้งเริ่มต้นมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1,600 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน หลังผ่านการกรองแบบอุลตราฟิวเตรชั่น พบว่าส่วนของน้ำทิ้งที่เหลืออยู่ด้านบน (retentate) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 2,300 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

Shaw และ Chen (1994) ศึกษาการสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 จากส่วนของเซฟาโลทอแรกซ์ของ bighead shrimp (*Solenocera melantho*) black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) sword shrimp (*Parapenaeopsis hardwickii*) และ white whisker shrimp (*Trachypenaeus curvirostris*) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สกัดได้จากกุ้งแต่ละชนิด พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก bighead shrimp (*Solenocera melantho*) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (98 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งชนิดอื่นๆ ที่ทำการทดลอง เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิด DEAE-Sepharose CL-6B Ultragel AcA 34 และ eletroendosmotic elution พบว่ามีเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 3 ชนิด คือ APase - I, APase - II และ APase - III มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 221 3,780 และ 532 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตามลำดับ และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 88.6 53 และ 20 ตามลำดับ

2.4.2 **แคทาเลส** (Catalase)

แคทาเลส (Hydrogen-peroxide: hydrogen-peroxide oxidoreductase; EC 1.11.1.6) เป็นเอนไซม์ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (subunit) ที่มีขนาดเท่ากันประกอบไปด้วย hemin prosthetic groups (Aebi, 1974) สามารถเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ผลผลิตเป็นน้ำและโมเลกุลของออกซิเจน

$$2\ H_2O_2 \xrightarrow{\text{catalase}} 2H_2O_2 + O_2$$

แคทาเลสจะเร่งปฏิกิริยา 2 แบบ คือ

- catalatic reaction

$$2\ H_2O_2 \longrightarrow H_2O + O_2$$

- peroxidatic reaction

$$H_2O_2 + 2\ H_2A \longrightarrow 2HA + 2\ H_2O$$

ในภาวะปกติ แคทาเลสจะเร่งปฏิกิริยาแบบ catalatic reaction และ สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidatic reaction โดยใช้ peroxide ปริมาณต่ำมาก และใช้ตัวให้ไฮโดรเจน (hydrogen donors) (AH_2) เป็น methanol ethanol หรือ phenols แม้ว่าแคทาเลสจะเร่งปฏิกิริยา peroxidation ได้ แต่จะต่ำกว่าเปอร์ออกซิเดส และ ขณะเดียวกันเปอร์ออกซิเดสก็เร่งปฏิกิริยา catalatic ได้ไม่ดีเช่นกัน (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543; Aebi, 1974; Havir *et al*., 1996; Guwy *et al*., 1999; Kruger, 1977; Costa *et al*., 2001; Vainshtein *et al*., 1981)

เอนไซม์แคทาเลสสามารถแยกได้ครั้งแรกในรูปผลึกจากตับวัว นอกจากนี้ยังสามารถพบได้จากเลือด ตับ ไต และ แหล่งอื่นๆ เช่น พืช และ จุลินทรีย์ แต่พบว่ามีปริมาณน้อยในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Aebi, 1974) เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรมอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พีเอชมากกว่า 9 เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์ออกซิเดส พบว่าเปอร์ออกซิเดส สามารถทนความร้อนได้สูงกว่า (65 - 70 องศาเซลเซียส) ที่พีเอช 7

เอนไซม์แคทาเลสมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเกิดพิษของเนื้อเยื่อเนื่องมาจากผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Aebi, 1974) นอกจากนี้ยังสามารถช่วยลดปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการฆ่าเชื้อนม (Scott, 1975b)

Aksnes and Njaa (1981) ศึกษาเอนไซม์แคทาเลสในปลาชนิดต่างๆ 9 ชนิด ได้แก่ saithe mackerel cod capelin rainbow trout sprat Norway pout blue whiting และ great silver smelt พบว่าปลาชนิดที่มีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสในปริมาณสูงได้แก่ saithe mackerel Norway pout และ blue whiting ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์เท่ากับ 1,523 1,128 1,057 และ 801 ยูนิตต่อกรัมของน้ำหนักปลา ตามลำดับ โดยในปลา saithe และ mackerel พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสสูงในส่วนของตับ ส่วนปลาชนิดอื่นๆ พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์แคทาเลสในปริมาณน้อยกว่า

อุบลรัตน์ สมมะลวน (2540) ทำการศึกษาเบื้องต้นการสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสมากที่สุด เมื่อนำไปทำ

การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 40 พบว่าเอนไซม์สกัดจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แคทาเลสสูงสุดเท่ากับ 100.35 และ 110.03 ยูนิตมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

2.4.3 เปอร์ออกซิเดส (Peroxidase)

เปอร์ออกซิเดส (EC.1.11.1.7) เป็น haemoproteins สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นตัวรับอิเลกตรอนและออกซิไดซ์สารประกอบอินทรีย์หรือสารประกอบพวกอะโรมาติก (aromatic compound) (Aruna and Lali, 2001; Srinivas *et al*., 1999) กลายเป็นผลผลิตที่ให้สี (Rehn and Reed, 1987) ดังสมการ

$$H_2O_2 + 2H_2A \longrightarrow 2HA + 2H_2O$$

เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสแบ่งได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ใช้สารตั้งต้นจำเพาะ เช่น NAD-peroxidase, NADP-peroxidase, fatty acid peroxidase, cytochrome peroxidase และกลุ่มที่ใช้สารตั้งต้นไม่จำเพาะ เช่น ฮอสเรดิสเปอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase) โดยเปอร์ออกซิเดสนี้สามารถกระตุ้นการดึงอะตอมของไฮโดรเจน (dehydrogenation) ของสารประกอบอินทรีย์หลายชนิดเช่น phenol, aromatic amines, hydroquinones, hydroquinoid amine และ อนุพันธ์ของ benzidine เป็นต้น (Putter, 1974; Mliki and Zimmermann, 1992) เอนไซม์นี้พบได้ทั่วไปในธรรมชาติจาก พืช สัตว์ และ จุลินทรีย์ (Mliki and Zimmermann, 1992)

มีการนำเปอร์ออกซิเดสมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ได้แก่ ใช้ในงานวินิจฉัยทางการแพทย์และชีวเคมีคลินิก ใช้เป็นเอนไซม์เชื่อมบนแอนติบอดี้ในเทคนิค ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (Aruna and Lali, 2001; Srinivas *et al*., 1999) ใช้ในการกำจัดสารพิษและสารก่อมะเร็งบางชนิด (phenol and aromatic compounds) ที่มีในน้ำทิ้งโรงงานอุตสาหกรรมทำพลาสติกและเรซิน สิ่งทอ และผลิตสบู่ เป็นต้น (Aruna and Lali, 2001; Srinivas *et al*., 1999)

อุบลรัตน์ สมมะลวน (2540) ทำการศึกษาเบื้องต้นการสกัดเอนไซม์จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำทะเลและกุ้งกุลาดำเลี้ยง พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 3.0 และ 2.16 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.21 และ 0.12 ยูนิตมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

2.4.4 **พอลิฟีนอลออกซิเดส** (Polyphenol oxidase)

พอลิฟีนอลออกซิเดส (*o*-diphenol : oxygen oxidoreductase; EC 1.10.3.1) และมีชื่อสามัญต่างๆ กัน ได้แก่ tyrosinase polyphenolase phenolase catechol oxidase cresolase และ catecholase ซึ่งชื่อเหล่านี้เรียกตามชนิดของสับสเตรตที่ใช้ สามารถพบได้จากพืชชั้นสูงและรา ได้แก่ เห็ด หัวมันฝรั่ง ลูกพีช แอปเปิ้ล กล้วย อะโวกาโด ใบชา เมล็ดกาแฟ และใบยาสูบ เป็นต้น (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543; Scott, 1975a)

เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสสามารถเร่งการออกซิไดซ์สารกลุ่ม monophenolic และ *o*-diphenolic การเกิดปฏิกิริยามี 2 ลักษณะคือ hydroxylation และ dehydrogenation (oxidation of *o*-diphenol)

1. Hydroxylation

เป็นปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ให้กับสารกลุ่ม monophenol เกิดเป็น *o*-diphenol ดังปฏิกิริยา :

$$A + O_2 + BH_2 \longrightarrow AO + B + H_2O \quad (A= \text{phenolic compound})$$

2. Dehydrogenation (oxidation of o-diphenol)

เป็นปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ *o*-diphenol กลายเป็น *o*-quinone ดังปฏิกิริยา :

$$2AH_2 + O_2 \longrightarrow 2A + 2H_2O$$

การใช้เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส มีการใช้ตามลักษณะกิจกรรมของเอนไซม์ กล่าวคือ ในปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสารประกอบที่มีสี ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์นี้ใช้ในการบ่มชา ใบกาแฟ ใบยาสูบ เพื่อให้เกิดสีน้ำตาล ตลอดทั้งใช้ในการพิจารณาคุณภาพของผักและผลไม้ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2543)

Chen และคณะ (1997) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจากเซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) ของกุ้ง *Penaeus setiferus* และ *Penaeus duorarum* โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และ Brij 35 ร้อยละ 0.2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที พบว่าปริมาณโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์จากกุ้ง *Penaeus setiferus* มีค่าเท่ากับ 171 มิลลิกรัม 856 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 5.01 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่กุ้ง *Penaeus duorarum* มีปริมาณโปรตีน 166 มิลลิกรัม กิจกรรมเอนไซม์และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 231 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และ 1.39 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Chen และคณะ (1991) ศึกษาสกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจากเปลือกของ Western Australian lobster (*Panulirus cygnus*) และ Florida spiny lobster (*Panulirus argus*) โดยใช้สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ที่ประกอบด้วย โซเดียมคลอไรด์ 1 โมลาร์ และ Brij 35 ร้อยละ 0.2 พบว่าเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากกุ้งทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 0.03 และ 0.36 ยูนิตต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

Yan และคณะ (1990) ศึกษาเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจาก Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) พบว่าเมื่อทำการสกัดเอนไซม์โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 6.4 พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสเท่ากับ 11.3×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนและการใช้โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography) ชนิด DEAE-cellulose พบว่ามีเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส 2 ชนิดคือ PPO (I) และ PPO (II) ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 270×10^{-3} และ 19.3×10^{-3} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 23.89 และ 1.71 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์สกัดเริ่มต้น ตามลำดับ

Rolle และคณะ (1990) ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสจาก Taiwanese black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) พบว่ากิจกรรมจำเพาะเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสในเอนไซม์สกัดเท่ากับ 0.023 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิด phenyl Sepharose CL-4B พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 58 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 1.33 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

2.4.5 ไคติเนส (Chitinase)

ไคติเนสคือกลุ่มของเอนไซม์ซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายไคตินให้กลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Wang and Chang, 1997) โดยย่อยสลายพันธะ β-1,4 ของ N-acetyl-β-D-glucosamine ของไคตินและไคโตแดรกทริน (chytodexstrin) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น N-acetylglucosamine (GlcNAc) และ N,N'-diacetylchitobiose $(GlcNAc)_2$ (Mitsutomi *et al*., 1995; Okazaki *et al*., 1995) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ เป็นต้น จากการรายงานส่วนใหญ่พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไคติเนสได้มักใช้ไคติน หรือ colloidal chitin เป็นแหล่งคาร์บอน (Wang *et al*., 1995 อ้างโดย Wang และ Chang, 1997)

Esaiassen และคณะ (1996) คัดแยกเอนไซม์ไคติเนสจากตับอ่อนของ Northern shrimp (*Pandalus borealis*) และผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ Q-Sepharose Sepharose S-200 Phenyl-Sepharose และ Superdex 75 พบว่ามีเอนไซม์ไคติเนส 5 ชนิดได้แก่ chitinase I IIa IIb III และ IV ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 61 69 39 57 และ 54 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

Funke และ Spindler (1989) คัดแยกเอนไซม์ไคติเนสจาก brine shrimp *Artemia* พบว่าเมื่อทำบริสุทธิ์โดยการผ่านคอลัมน์ Concanavalin A ได้เอนไซม์ไคติเนสที่มีขนาด 32 กิโลดาลตัน

Kono และคณะ (1990) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ไคติเนสจากท้องของ Japanese eel (*Anguilla japonica*) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุล 50 กิโลดาลตัน

Lynn (1990) ศึกษาเอนไซม์ไคติเนสจากน้ำย่อยจากกระเพาะ (gastric juice) ของ American lobster (*Homarus americanus*) พบว่าเป็น exochitinases ซึ่งมี 3 ชนิด คือ exochitinase-A, B sub (1) และ B sub (2) มีน้ำหนักโมเลกุลแต่ละชนิดเท่ากับ 66 กิโลดาลตัน มีค่า pI (Isoelectric point) สูงกว่า 9.3

Matsumiya และ Mochizuki (1997) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสจากตับของ Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านคอลัมน์ Chitopearl Basic BL-03, CM–Toyopearl

650S และ Bio–gel HTP พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 38 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 8.3

Matsumiya และ Mochizuki (1995) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไคติเนสจากท้องของ common mackerel (*Scomber japonnicus*) พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 50 กิโลดาลตัน

Olsen และคณะ (1990) ศึกษาชนิดของเอนไซม์จากน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง (*Pandalus borealis*) พบว่าจากน้ำทิ้งเริ่มต้นมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไคติเนส เท่ากับ 5.9 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการกรองแบบอุลตราฟิวเตรชั่น พบว่าส่วนของน้ำทิ้งที่เหลืออยู่ด้านบน (retentate) มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 7.7 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

2.4.6 **ไฮยาลูโรนิเดส** (Hyaluronidase)

ไฮยาลูโรนิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถย่อยสาร hyaluronate เป็น oligosaccharide สายสั้นๆ ใช้ประโยชน์ในการทำความสะอาด isochaemic tissues หลังจาก myocardial infraction (Saltissi *et al*., 1982; Sanders, 1988) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการทำให้เนื้อนุ่ม (Wu *et al*., 1988) เอนไซม์ชนิดนี้พบมากในอัณฑะของวัว (Borders and Raffery, 1968) และปลิง (Yuki and Fishmann, 1962) เป็นต้น

Olsen และคณะ (1990) ศึกษาชนิดเอนไซม์ที่มีในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง (*Pandalus borealis*) พบว่าน้ำทิ้งเริ่มต้นมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไฮ-ยาลูโรนิเดส เท่ากับ 4.1 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการกรองแบบอุลตราฟิวเตรชั่น พบว่าส่วนของน้ำทิ้งที่เหลืออยู่ด้านบน (retentate) มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 5.3 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

Krishnapillai และคณะ (1999a) สกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) พบว่าเอนไซม์สกัดมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 0.074 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตนและผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 56.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีความความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 763 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

Krishnapillai และคณะ (1999b) ศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สกัดได้จากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) กับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากอัณฑะวัว และแกะ พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) รองลงมาเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากอัณฑะวัว และแกะ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 33 และ 25 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Poh และคณะ (1992) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษของ stonefish (*Synanceia horrida*) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสภายหลังการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะสูงมาก ($1.6x10^6$ ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 9

Ramanaiah และคณะ(1990) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษแมงป่อง (*Heterometrus fulvipes*) มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0 และมีน้ำหนักโมเลกุล 82 กิโลดาลตัน นอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส

Yang และคณะ (1975) ศึกษาเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากสเปิร์มของวัวตัวผู้ พบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2,370 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 182 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 62 กิโลดาลตัน

3. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติและกิจกรรมของเอนไซม์จากสัตว์น้ำ

3.1 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีทั่วไป คือ มีผลต่อการละลายของสับสเตรต การแตกตัวของบัฟเฟอร์ และการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต เอนไซม์กับโคแฟคเตอร์ และเอนไซม์กับตัวยับยั้ง นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (Ionization of active site) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

การสกัดเอนไซม์ควรทำที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการสกัด เช่น การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลา cod ในเขตแอตแลนติก (*Gadus Morhua*) โดยใช้น้ำเย็นในอัตราส่วน 1:2 ของน้ำหนักเครื่องในต่อปริมาณน้ำ ปั่นด้วย

เครื่องปั่นความเร็วสูง นาน 2 นาที นำส่วนที่ปั่นได้มาเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000*g* เป็นเวลา 30 นาที (Shin and Zall,1986) แต่การสกัดที่อุณหภูมิสูง (35-40 องศาเซลเซียส) ในช่วงเวลาสั้นๆ (15–30 นาที) อาจช่วยในการสกัด ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) มักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิในช่วงนี้

สุนันทา ภิญญาวัชน์ (2535) รายงานว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะถูกทำให้เสียสภาพ (denature) ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ยกเว้นจากแบคทีเรียประเภทเทอร์โมฟิลิก ที่สามารถทนร้อนได้ถึง 85 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ (2528) กล่าวว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สมในการเร่งปฏิกิริยา เช่น การเร่งปฏิกิริยาในระบบทางเดินอาหารจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเอนไซม์กับสับสเตรตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าคุณสมบัติการละลายของเอนไซม์จะลดลงก็ตาม (Palmer, 1985) ส่วนการแช่เยือกแข็งทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนไม่สามารถทำงานได้ และอาจทำให้เกิดการเสียสภาพ ดังนั้นไม่ควรเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ไว้ในระยะเวลานานๆ (Scopes, 1978)

Reece (1988) สามารถแยก acidic protease และ alkaline protease จากเครื่องในปลา salmon (*Salmon sarda*) และ acidic protease จากเครื่องในปลา cod (*Gadus morhua*) และ ปลา mackerel (*Scomba scombrus*) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อะซิดิก (acidic protease) ของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากันคือ 37 องศาเซลเซียส ในกรณีของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) จากเครื่องในปลา salmon นั้นมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากกุ้งโดยทั่วไปจะมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30 และ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่สกัดได้จากปูทะเลน้ำลึกจะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Chen *et al*., 1991)

Chuang และ Shih (1990) สกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้ง (*Penaeus japonicus*) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ทำให้บริสุทธิ์มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ จากสัตว์น้ำ แสดงดังตารางที่ 1

3.2 **พีเอช** (pH)

โดยปกติแล้วเอนไซม์จะถูกยับยั้งที่พีเอชต่ำกว่า 5 หรือ พีเอชสูงกว่า 9 ยกเว้นเอนไซม์บางกลุ่ม ในการปรับพีเอชควรเติมโดยการหยดให้ของเหลวไหลลงไปตามขอบด้านในของภาชนะและควรคนโดยใช้เครื่องกวนและควรทำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Dixon and Wabb, 1979; Scopes, 1978)

Doke และ Ninjoor (1987) สกัดเอนไซม์จากกล้ามเนื้อกุ้ง (*Penaeus monodon*) โดยใช้โปแตสเซียมคลอไรด์ร้อยละ 0.5 เมื่อศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสในช่วงพีเอช 4.0–12.0 พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์คือพีเอช 8.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

Reece (1988) สามารถแยกอะซิดิกโปรตีเอส และอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเครื่องในปลา salmon (*Salmon sarda*) และอะซิดิกโปรตีเอสจากเครื่องในปลา cod (*Gadus morhua*) และปลา mackerel (*Scomba scombrus*) พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของอะซิดิกโปรตีเอสจากเครื่องในปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากันคือ พีเอช 2.6 ส่วนอัลคาไลน์โปรตีเอสจากเครื่องในปลา salmon มีค่าพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 8.5

Matsumiya and Mochizuki (1997) พบว่าเอนไซม์ไคติเนสจากตับของ Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) มีความคงตัวดีในช่วงพีเอช 4.0-6.0 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Shin และ Zall (1986) ศึกษาผลของพีเอชต่อความคงตัวของกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสชนิดซีรีนซึ่งมีคุณลักษณะคล้ายทริปซิน (trypsin-like enzyme) สกัดจากเครื่องในปลา cod ในช่วงพีเอช 5-10 เป็นเวลา 60 นาที พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะมีความคงตัวดีที่ พีเอชช่วง 8.8-9.6

3.3 **ความดัน** (Pressure)

การสกัดเอนไซม์บางวิธีจำเป็นต้องใช้ความดันสูง ซึ่งอาจจะมากกว่า 50,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แต่การใช้ความดันสูงประมาณ 10,000 และ 100,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอาจมีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ได้ อาจเนื่องมาจากความดันสูงทำให้โครงสร้างตติยภูมิและทุติยภูมิของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Laidler and Bunting, 1973; Dixon and Webb, 1979) แต่ในสภาวะที่มีความดันต่ำชั้นของเมมเบรนและเจลจะมีความแข็งแรงน้อยลงส่งผลทำ

ให้การไหลผ่านของสารละลายเกิดได้เร็วขึ้นและไม่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ (Chen and Zall, 1985)

3.4 **สับสเตรต** (Substrates)

ความสามารถในการละลายของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรต เช่น การเติม glycero-phosphate เพื่อป้องกันการออกซิเดชั่นของกลุ่ม sulfhydryl แต่อาจส่งผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ (Palmer, 1985)

3.5 **เกลือ** (Salts)

เกลือมีผลต่อการละลายและการตกตะกอนของโปรตีนหรือเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ เกลือโซเดียมซัลเฟต และ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยความเข้มข้นของเกลือที่ใช้มีผลต่อการละลายของเอนไซม์ ความสามารถในการละลายของเกลือเป็นดังนี้ (Colowick and Kaplan, 1955)

Cation: $Li^{+} > Na^{+}$ (ที่สภาวะเป็นกลางหรือด่าง)

Anion: $P_2O_7 > P_4O_7 > PO_4^{-3} > CNS^{-} > HCO_3^{-} > I^{-} > Cl^{-}$ (ในสภาวะเป็นด่าง)

การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Frazier, 1978) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการละลายของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งสกัดได้จาก Norway lobster โดยพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ มีผลทำให้เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีกิจกรรมสูงสุด (Krishnapillai *et al*., 1999a)

Heu และคณะ (1995) ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ทริปซินและไคโมทริปซินจากเครื่องในปลา anchovy (*Engraulis japonica*) โดยการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวร้อยละ 30-70 จะให้กิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด

Table 1 Optimum temperature and optimum pH of enzymes from some aquatic animals

Type of enzyme	Source	Optimum temparature (°C)	Optimum pH	Reference
1. Protease				
Trypsin	White shrimp	49	7.0-9.5	Gate and Travis (1969)
	Cod	46-48	9.0-9.6	Shin and Zall (1986)
	Yellowfin tuna	50	8.0	Jantaro (2000)
	Anchovy	45	8.0	Heu *et al*. (1995)
	Atlantic cod	55	8.0	Asgeirsson and Bjarnason (1991)
Chymotrypsin	Yellowfin tuna	50	8.0	Jantaro (2000)
	Anchovy	45	8.0	Heu *et al*. (1995)
	Atlantic cod	40	7.8	Asgeirsson and Bjarnason (1991)
Collagenase	Freshwater prawn	37	6.5-7.5	Nip *et al*. (1985)
	Fiddler crab	-	8.0	Eison *et al*. (1973)
Cathepsin B-like	Surf clam	44-46	3.0-7.0	Chen and Zall (1986)
2. Amylase	Pacific brown shrimp	30-40	7.5	Vega-Villasante *et al*. (1993)
3. Lipase	neon frying squid	25	7.0	Sukarno *et al*. (1996)
4. Alkaline phosphatase	bighead shrimp	37	7.0-8.0	Shaw and Chen (1994)

Table 1 (continued)

Type of enzyme	Source	Optimum temparature (°C)	Optimum pH	Reference
5. Polyphenol oxidase	Taiwanese black tiger - shrimp	45 .	6.0	Rolle *et al*. (1990)
	Western Australian lobster	-	6.0-8.0	Chen *et al*. (1991)
	Florida spiny lobster	-	6.5	Chen *et al*. (1991)
	Norway lobster			
	- PPO form I	40	-	Yan *et al*. (1990)
	- PPO form II	45	-	Yan *et al*. (1990)
6. Chitinase	Brine shrimp *Artemia*	55	5.8	Funke and Spindler (1989)
	Japanese common squid	50	-	Matsumiya and Mochizuki (1997)
7. Hyaluronidase	Norway lobster	-	5.4	Krishnapillai *et al*. (1999a)

3.6 **อิออนของโลหะและสารจับโลหะ** (Metal ions and chelating agent)

อิออนของโลหะหนัก เช่น เหล็ก สังกะสี ตะกั่ว ทองแดง และ ปรอท มีผลสามารถยับยั้งหรือส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดได้ต่างๆ ได้ เช่นเอนไซม์ทริปซินจากปลา cod ซึ่งมีความต้องการแคลเซียมอิออนในการทำให้เอนไซม์มีความคงตัวและเป็นการป้องกันการเกิดการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์ (Asgiersson *et al*., 1989) ต่างจากเอนไซม์ทริปซินสกัดจาก white shrimp (*Penaeus setiferus*) ซึ่งแคลเซียมอิออนไม่มีผลต่อความคงตัว แต่มีผลต่อความทนทานต่อการย่อยสลายตัวเอง (Gates and Travis, 1969) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแคลเซียมอิออนมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา cod ได้ (Asgiersson and Bjarnason, 1991)

Risk (1974) พบว่าความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซินลดลง เนื่องมาจากผลของปริมาณแคลเซียมอิออน นอกจากนี้แคลเซียมสามารถป้องกันการเกิด aggregation ของโมเลกุลของเอนไซม์ทริปซินอีกด้วย

ผลกระทบจากอิออนของโลหะเหล่านี้สามารถป้องกันได้โดยการเติมสารจับโลหะ (chelating agent) เช่น การเติม EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้น 1-2 มิลลิโมลาร์ โดยสารจับโลหะเหล่านี้มีผลต่ออิออนที่มีประจุ 2 ตัว (divalent) (Deutscher, 1990)

Poh และคณะ (1992) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษของ stonefish (*Synanceia horrida*) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์มีกิจกรรมจำเพาะสูงมากคือ 1.6×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 9.2 แต่พบว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่ทนต่อความร้อน และสามารถถูกยับยั้งโดยอิออน Cu^{2+} และ Hg^{2+}

3.7 **ตัวยับยั้ง** (Inhibitors)

สารเคมีบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น เอนไซม์ทริปซินจากตับอ่อนของ crayfish (*Procambarus clarkii*) ถูกยับยั้งโดย TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-amidoheptanone), DFP และ PMSF (Kim *et al*., 1992)

เอนไซม์ทริปซินจาก white shrimp (*Penaeus setiferus*) พบว่าถูกยับยั้งได้โดย TLCK DFP และ soybean trypsin inhibitor แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย L-tosylamido-2-phenyl-ethylchlorometyl ketone (Gates and Travis, 1969)

นอกจากนี้ตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น สาร detergent และแอลกอฮอล์ เมื่อมีการเติมสารเหล่านี้ลงไปจะช่วยปลดปล่อยเอนไซม์ให้ออกมาในสารละลาย แต่บางครั้งก็ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ (Dixon and Webb, 1979)

4. วิธีการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลส

การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์มีขั้นตอนในการแยกหลายขั้นตอน เริ่มต้นจากการนำสารละลายส่วนใสที่ได้จากการสกัดเอนไซม์มาตกตะกอนเอนไซม์ที่ต้องการออกจากโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยจะอาศัยหลักการการเปลี่ยนแปลงของค่าความแข็งแรงของอิออน (Ionic strength) ของสารละลาย เอนไซม์ซึ่งโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีประจุมักจะละลายได้น้อยในน้ำบริสุทธิ์แต่เมื่อเติมอิออนลงไปจะทำให้การละลายของโปรตีนนั้นดีขึ้น เรียกลักษณะเช่นนี้ว่า salting in แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของไอออนให้มากขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งสารโมเลกุลขนาดใหญ่เหล่านี้จะตกตะกอนออกมาซึ่งเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า salting out (ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์, 2530; Scopes, 1978) สารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีนสามารถแบ่งได้เป็น 3 พวก (Scopes ,1978) ได้แก่

1. เกลือบางชนิด ได้แก่เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) เกลือโซเดียมฟอสเฟต (disodium phosphate)
2. ตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvents) เช่น เมทานอล (methanol) เอธานอล (ethanol) โพรพานอล (propanol) และอะซิโตน (acetone)
3. สารชนิดอื่นๆ เช่น polyethylene glycol (PEG) เคซีน (casein) และ diatomaceous earth เป็นต้น

การใช้สารตกตะกอนพวกนี้อาจใช้สารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือใช้ร่วมกันในความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเอนไซม์ชนิดนั้นๆ สารที่นิยมใช้มากในการตกตะกอนโปรตีนคือ เกลือแอมโมเนียม-ซัลเฟต เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการลดความสามารถในการละลายของโปรตีน สามารถละลายได้สูงถึง 4 โมลาร์ ราคาไม่แพง และเมื่ออยู่ในสภาวะอิ่มตัวจะมีความหนืดและความหนาแน่นต่ำ

เอนไซม์ที่ได้จากขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนจะมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ต้องนำมาผ่านกระบวนการทำให้มีความบริสุทธ์เพิ่มขึ้น โดยเทคนิคโครมาโทกราฟี เช่น โครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน (ion-exchange chromatography) และเจลฟิวเตรชัน (gel filtration chromatography) โดยมีหลักการต่างกันคือ โครมาโทกราฟีชนิดแลกเปลี่ยนอิออน ทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างของประจุโปรตีนซึ่งจะมี 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรกการทำให้โปรตีนจับกับเรซิน (resin) ที่มีประจุซึ่งอยู่ในคอลัมน์ โดยประจุที่ใช้เกาะจะมี 2 ชนิดคือ ตัวแลกเปลี่ยนแอนอิออน (anion-exchanger) เช่น DEAE (diethylaminoethyl) ซึ่งเรซินที่ใช้มีประจุบวกที่สามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุลบ และตัวแลกเปลี่ยนแคทอิออน (cation-exchanger) เช่น CM (carboxymethyl) ซึ่งเรซินที่ใช้มีประจุลบและสามารถจับกับโปรตีนที่มีประจุบวกได้ ขั้นตอนที่ 2 คือ การชะเอาโปรตีนที่จับกับเรซินภายในคอลัมน์ออกมา โดยชะด้วยสารที่มีความแรงของประจุสูงกว่า เพื่อเข้าแทนที่การจับกันของโปรตีนกับเรซินทำให้โปรตีนถูกชะออกจากคอลัมน์ ส่วนเทคนิคการทำเจลฟิวเตรชันเป็นการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์โดยอาศัยการแยกตามขนาดของโมเลกุลโปรตีนเป็นสำคัญ คือให้โมเลกุลของโปรตีนเคลื่อนที่ผ่านรูพรุนของตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ซึ่งเป็นของแข็ง (stationary phase) ภายในคอลัมน์ โปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะเคลื่อนที่ผ่านช่องหว่างระหว่างเม็ดเจลซึ่งเป็นตัวกลางของแข็งที่ไม่เคลื่อนที่ และออกจากคอลัมน์ก่อน ส่วนโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะเข้าไปในเม็ดเจลจึงออกมาภายหลัง ตัวอย่างตัวกลางที่ไม่เคลื่อนที่ซึ่งเป็นของแข็งที่นิยมใช้กัน ได้แก่ Sephadex Bio-Gel และ Sepharose เป็นต้น (Scopes,1978)

สำหรับการศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งต่างๆ เช่น พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ สามารถทำได้โดยการใช้เทคนิคที่แตกต่างกัน ได้แก่

Miyahara และคณะ (1978) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสจากตับแพะ ซึ่งสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่นที่เย็นจัด พบว่าเอนไซม์สกัดที่ได้มีกิจกรรมของเอนไซม์แคทาเลสเท่ากับ 0.016 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการทำบริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยอะซิโตนและแอมโมเนียมซัลเฟต ตามด้วยการใช้คอลัมน์โครมาโทกราฟีชนิด DEAE-cellulose และ Bio-Gel A-1.5m พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ได้ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อยโดยแต่ละหน่วยย่อย (subunit) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 60 กิโลดาลตัน มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับเอนไซม์แคทาเลสจากตับวัว

Chatterjee และ Sanwal (1993) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์แคทาเลสจากปอดของแพะ (*Capra capra*) โดยตกตะกอนด้วยอะซิโตนแล้วผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose Sephadex G-100 Blue Sepharose CL-6B และ Ultragel AcA-34 พบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 339 กิโลดาลตัน และมีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 5.2-7.8

Mullen and Gifford (1993) สกัดเอนไซม์แคทาเลสจาก loblolly pine (*Pinus teada* L.) โดยสกัดด้วยอะซิโตน ตามด้วยตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วผ่านโครมาโทกราฟีชนิด DE-52 cellulose, Superdex G-200, hydroxylapatite และ phenyl-Sepharose CL-6B พบว่าเอนไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ได้มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2,215 มิลลิโมลต่อนาทีต่อมิลลิกรัมโปรตีน

เอนไซม์แคทาเลสที่ได้จากพืชบางชนิด เช่น Tsagareli และ Pruidze (1991) แยกและทำบริสุทธิ์เอนไซม์แคทาเลสจากใบชา (*Camellia sinensis* L.) ตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วกรองแบบอุลตราฟิวเตรชั่น พบว่ามีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์แคทาเลสสกัดที่ได้เท่ากับ 0.26 ไมโครโมลของออกซิเจนต่อมิลลิกรัมของโปรตีนต่อนาที และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์เท่ากับ 6.0 ไมโครโมลของออกซิเจนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที ซึ่งมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

เอนไซม์แคทาเลสจากแหล่งต่างๆแสดงดังตารางที่ 2

Table 2 Optimum pH and optimum temperature of catalase from difference sources

Source	Optimum pH	Optimum temperature (^{o}C)	Reference
1. Animals			
goat liver	7.0	-	Miyahara *et al*. (1978)
goat lung	5.2-7.8	-	Chatterjee and Sanwal (1993)
bovine liver	7.0	-	Maehly and Chance (1954)
2. Plants			
tea plant	6.4	37	Tsagareli and Pruidze (1991)
	5.6	40	
papaya	6.1	-	Chan *et al*. (1978)
wheat germ	7.0	-	Garcia *et al*. (2000)
sweet potato root	6.5-8.5	-	Esaka and Asahi (1982)
3. Microorganisms			
Halophilic bacterium	7.0	-	Brown-Peterson and Salin (1995)
Bacillus YN-2000	6.0	-	Yumoto *et al*. (1990)
Escherichia coli	7.5	-	Claiborne and Fridovich อ้างโดย Yumoto *et al*. (1990)

Table 2 (continued)

Source	Optimum pH	Optimum temperature (^{o}C)	Reference
Rhodobacter capsulatus	6.0-7.5	-	Hochman and Shemesh (1987) อ้างโดย Yumoto *et al*.(1990)
Neurospora crassa	4.0-10.0	-	Fukumori *et al*.(1987) อ้างโดย Yumoto *et al*. (1990)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของแหล่งกุ้งกุลาดำต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*)
2. ศึกษาการทำบริสุทธิ์เอนไซม์ที่มีปริมาณมากจากตับอ่อนกุ้งกุลาดำ
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของเอนไซม์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์