ผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่

Effect of pH and Temperature on Protease Activity from Duck and Chicken Intestine and Pancreas

พิมพ์พร ศรีสันติแสง[1] โสภิดา ปัญญานวล[1] สายพิณ ทานัชฌาสัย[1] และ วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร[1]

Pimporn Srisantisaeng[1] Sopida Panyanuan[1] Saipin Thanachasai[1] and Wunwiboon Garnjanagoonchorn[1]

บทคัดย่อ

เอนไซม์โปรตีเอสมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ทางเดินอาหารของสัตว์ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ด้วยน้ำกลั่น และทำแห้งด้วยการอบแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง นำมาศึกษาพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 และ 7.5 ตามลำดับ และอุณหภูมิ 60°ซ โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 103.96 และ 90.61 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที ตามลำดับ จากการตรวจสอบความคงตัวของเอนไซม์ที่พีเอช (6-9) และอุณหภูมิต่างๆ (30-70°ซ) พบว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่มีความคงตัวสูงที่พีเอช 6-8 เช่นเดียวกัน ขณะที่เอนไซม์จากเป็ดมีความคงตัวต่ออุณหภูมิสูงดีกว่าไก่ สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์จากเป็ดและไก่ใกล้เคียงกัน คือพีเอช 8 และ 7.5 ตามลำดับ และอุณหภูมิ 50°ซ โดยเอนไซม์มีความคงตัวค่อนข้างดีเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นระยะเวลา 30 วัน ดังนั้นไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมการแปรรูปเนื้อสัตว์ปีกจึงเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์โปรตีเอส

ABSTRACT

Proteases play an important role in food industry. Animal viscera contains different enzymes therefore in this study proteolytic enzymes from duck and chicken intestine including pancreas were extracted by distilled water and lyophilized as enzyme powder. As a result, protease from duck and chicken showed the highest activity at pH 8 and 7.5 at 60°C with specific activity equal to 103.96 and 90.61 microgram tyrosine/mg protein/min respectively. Moreover, proteolytic enzymes stability at different pH (6-9) and temperature (30-70°C) were analyzed. After incubation at pH 6-8, 25°C both proteases exhibited high activities. While protease from duck showed higher thermal stability than chicken. Hence, the optimum pH conditions of enzyme from duck and chicken were selected at 8 and 7.5 respectively and temperature were at 50°C considering from enzyme activity and thermal stability. Lyophilized enzymes showed good proteolytic activity after 30 days storage at -20°C. Therefore, duck and chicken intestine including pancreas by-products from duck and chicken processing industries have a potential to be used as raw material for proteolytic enzymes extraction.

Key Words: proteolytic enzyme, duck, chicken, intestine, pancreas

e–mail address: g521500085@ku.ac.th

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 50 ถ.งามวงศ์วาน เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University 50 Ngamwongwan Road Chatuchak, Bangkok 10900.

บทนำ

ในอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์ปีก เช่น เป็ด และไก่ มักจะส่งผลให้มีปริมาณของเหลือทิ้งจำนวนมาก ได้แก่ ขน หัว กระดูก และเครื่องใน เป็นต้น ซึ่งของเหลือบางส่วนจะนำมาบริโภค หรือใช้เป็นอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าเพิ่มต่ำ อย่างไรก็ตามจากการรายงานของ Jamroz *et al*. (2001) และ Kadhim *et al*. (2011) พบว่าในไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีก เป็นแหล่งเอนไซม์หลายชนิดโดยเฉพาะเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ ทริปซิน ไคโมทริปซิน คาร์บอกซีเปปติเดส และแอมิโนเปปติเดส โดยเอนไซม์โปรติเอสมีหน้าที่สลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีน (ปราณี, 2547) นิยมใช้ในกระบวนการต่างๆ เช่น การแปรรูปอาหาร การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต และสารซักฟอก เป็นต้น โดยส่วนใหญ่เอนไซม์โปรติเอสทางการค้ามักมีราคาสูง จึงทำให้ต้นทุนในกระบวนการผลิตเพิ่มขึ้น

จากการที่มีไส้และตับอ่อนที่เหลือจากกระบวนการแปรรูปเป็ดและไก่จำนวนมาก ซึ่งเป็นแหล่งของเอนไซม์ที่สำคัญจึงเหมาะที่จะนำวัตถุดิบดังกล่าวมาสกัดเอนไซม์โปรติเอสเพื่อใช้ประโยชน์ เอนไซม์ส่วนใหญ่ละลายได้ในน้ำ การสกัดเอนไซม์จากไส้ของสัตว์ปีกด้วยน้ำมีการใช้กว้างขวาง Rathinaraj *et al*. (2010) สกัดเอนไซม์จากไส้ไก่โดยใช้น้ำกลั่นเย็นเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในการผลิตอาหารสัตว์ ขณะที่ Mane *et al*. (2010) ก็ใช้น้ำกลั่นในการสกัดเอนไซม์แอมิโนเปปติเดส เอ็น จากไส้ไก่ และนำไปใช้ประโยชน์ในการลดรสขมในไฮโดรไลเสต จากการสืบค้นข้อมูล ในประเทศไทยไม่พบรายงานการสกัดเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของไก่มาใช้ประโยชน์ อีกทั้งการสกัดเอนไซม์จากเป็ดยังมีการศึกษาน้อยมาก ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจนำไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่มาสร้างมูลค่าเพิ่ม โดยนำมาสกัดเอนไซม์และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ในช่วงพีเอช 6-9 ซึ่งเป็นพีเอชของอาหารโดยทั่วไป รวมทั้งศึกษาผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมและความคงตัวของเอนไซม์เพื่อจะได้นำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตอาหารต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การเตรียมวัตถุดิบ

เครื่องในเป็ดได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ซีพีเอฟ ผลิตภัณฑ์อาหาร จำกัด ส่วนเครื่องในไก่ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท อาหารเบทเทอร์ จำกัด (เครือเบทาโกร) นำเครื่องในทั้งพวงมาแยกส่วนไม่ต้องการเหลือเฉพาะส่วนไส้และตับอ่อน จากนั้นนำมาทำความสะอาดโดยกำจัดเอาเศษอาหารด้านในออก ขูดไขมัน ผ่าตามยาวและล้างด้วยน้ำเย็น พักให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นบรรจุใส่ถุงพลาสติก เก็บที่อุณหภูมิ –20°ซ เพื่อใช้สำหรับการสกัดเอนไซม์โปรติเอส

2. การสกัดและการเตรียมเอนไซม์โปรติเอส

ใช้วิธีการสกัดเอนไซม์ด้วยน้ำตามวิธีของ Rathinaraj *et al*. (2010) โดยดัดแปลงวิธีการดังนี้ นำวัตถุดิบที่เตรียมได้มาปั่นผสมกับน้ำกลั่นเย็นที่ 4°ซ สำหรับเป็ดใช้อัตราส่วนวัตถุดิบต่อน้ำกลั่นเย็นเท่ากับ 1:2 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และไก่เท่ากับ 1:1 ปั่นอย่างต่อเนื่องด้วยเครื่องปั่นผสมอาหาร (HR2011/70, Philips) นาน 5 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้เข้าเครื่องเหวี่ยงแยกแบบควบคุมอุณหภูมิ (Sorval RC 6-Plus, Thermo Fisher) ด้วยอัตราเร็ว 10000*g* ที่ 4°ซ นาน 10 นาที นำสารละลายมากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 4 แล้วทำแห้งโดยการอบแห้งแบบระเหิดน้ำแข็ง (lyophilization) จากนั้นนำเอนไซม์แห้งมาร่อนผ่านตระแกรงขนาด 40 เมช เก็บรักษาเอนไซม์ผงแห้งที่ -20°ซ เพื่อใช้วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสและปริมาณโปรตีนต่อไป ในการศึกษานี้ ทำการสกัดเอนไซม์จำนวน 2 ซ้ำ

3. การศึกษากิจกรรมและปริมาณโปรตีนของเอนไซม์

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ศึกษาตามวิธีของ Cupp-Enyard (2008) โดยเจือจางเอนไซม์ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.5 นำไปวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์โดยใช้เคซีน ความเข้มข้น 0.65% เป็นสับสเตรท บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37°ซ และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตร

คลอโรอะซีติก ความเข้มข้น 10% นำสารละลายมากรองแล้วดูดส่วนใสมา 2 มล. จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต และสารละลายโฟลิน-ซีโอเคาทูลฟีนอล (Folin&Ciocalteu's Phenol reagent) วัดกิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Genesis 10 series, Thermo) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้ไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน ค่ากิจกรรมเอนไซม์แสดงเป็นค่ากิจกรรมจำเพาะ (ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที)

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน เจือจางเอนไซม์ด้วยน้ำกลั่น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry *et al*., 1951) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโบวายเซรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin)

4. การศึกษาพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

พีเอชที่เหมาะสม ศึกษาที่พีเอช 6, 7, 7.5, 8 และ 9 โดยวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37°ซ บ่มเป็นเวลา 10 นาที ตามวิธีวิเคราะห์กิจกรรมข้างต้น นำค่าพีเอชที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุด ไปศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

อุณหภูมิที่เหมาะสม ศึกษาที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 60 และ 70°ซ โดยวิเคราะห์ที่พีเอชที่เหมาะสมที่ศึกษาได้ก่อนหน้า บ่มเป็นเวลา 10 นาที แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์

5. การศึกษาผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

ผลของพีเอชต่อความคงตัวของเอนไซม์ ละลายเอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชในช่วง 6-9 นำไปบ่มที่ 25°ซ นาน 0-12 ชม. โดยไม่เติมสับสเตรท นำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ศึกษาในข้อ 4

ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ ละลายเอนไซม์ของเป็ดในบัฟเฟอร์พีเอช 8 และเอนไซม์ของไก่ที่พีเอช 7.5 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30-70°ซ นาน 0-12 ชม. โดยไม่เติมสับสเตรท แล้วทำการหยุดปฏิกิริยาโดยนำไปทำให้เย็นในอ่างน้ำแข็งทันที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมที่เหลืออยู่ที่พีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 4

6. การศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์

ในการศึกษาผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ นำเอนไซม์ที่เตรียมได้จากข้อ 2 ไปบรรจุถุงพลาสติก (PE) จากนั้นใส่ในถุงอลูมิเนียมฟลอยด์และปิดผนึกให้สนิท เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เมื่อครบ 30 วัน จึงสุ่มตัวอย่างมาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ที่พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ศึกษาได้จากข้อ 4 แล้วเปรียบเทียบผลที่ได้กับกิจกรรมของเอนไซม์ ณ วันที่ 0 โดยนำมาคำนวณตามสูตร

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ลดลง (%) = 100 – ((กิจกรรมของเอนไซม์ ณ วันที่ 30/ กิจกรรมของเอนไซม์ ณ วันที่ 0) × 100)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การสกัดเอนไซม์

ในการสกัดเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ ด้วยน้ำกลั่น พบว่าเอนไซม์แห้งที่เตรียมจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ มีปริมาณ 6.51 และ 2.71 ก.ต่อ ปริมาณไส้และตับอ่อน 100 ก. ตามลำดับ (Table 1) โดยในเอนไซม์แห้ง 1 มก. มีปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ย 0.60 และ 0.70 มก. ตามลำดับ โดยในการเตรียมไส้พบว่าไส้และตับอ่อนของเป็ดมีปริมาณไขมันมากกว่าไก่ ทำให้การสกัดด้วยอัตราส่วนไส้เป็ดต่อน้ำเท่ากับ 1:1 จะได้ของผสมที่มีความหนืดสูง รวมตัวกันเป็นอิมัลชัน ไม่สามารถกรองแยกของเหลวได้ แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของไส้ต่อน้ำเป็น 1:2 จึงกรองแยกได้ แต่สำหรับไส้ไก่ยังคงใช้อัตราส่วน 1:1 ในการสกัด โดยส่วนใหญ่เอนไซม์โปรติเอสที่พบในไส้และตับอ่อนของสัตว์ปีกอยู่ในกลุ่มของโปรติเอสซีรีน และโปรติเอสเมทัล เช่น ทริปซิน ไคโมทริปซิน และอะมิโนเปปติเดส เป็นต้น (Guyonnet *et al*., 1999; Mane *et al*., 2010; Kadhim *et al*., 2011)

Table 1 Weight of enzyme (g/100g intestine and pancreas) and protein content of protease powder from duck and chicken intestine and pancreas

Source of enzyme	Weight of enzyme (g) (from material 100 g)	Protein content (mg protein/mg enzyme powder)
duck	6.51±0.38	0.60±0.03
chicken	2.71±0.02	0.70±0.01

2. พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์

การศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเอสจากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่ที่อุณหภูมิ 37°ซ ในช่วงพีเอช 6-9 (Figure 1a และ 1b) พบว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ของเป็ดและไก่มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงคล้ายกัน โดยเอนไซม์จากเป็ดมีค่ากิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8 และเอนไซม์จากไก่มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 7.5 ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จากเป็ดมีค่าเท่ากับ 30.15 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที และไก่เท่ากับ 22.56 ไมโครกรัม ไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที ซึ่งค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากระบบทางเดินอาหารของสัตว์ปีกมีการรายงานโดย Jamadar *et al*. (2003), Damle *et al*. (2010) และ Mane *et al*. (2010) พบว่ามีค่าค่อนข้างเป็นกลางถึงเบสอ่อน ดังนั้นจึงเลือกใช้พีเอช 8 สำหรับเอนไซม์จากเป็ด และพีเอช 7.5 สำหรับเอนไซม์จากไก่ในการศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

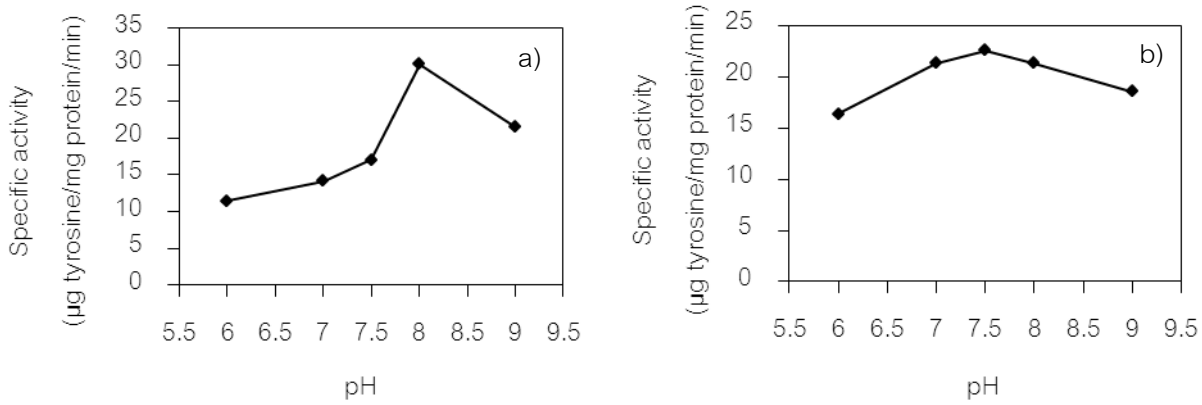

Figure 1 Effect of pH on protease specific activity at 37°C a) protease from duck intestine and pancreas b) protease from chicken intestine and pancreas

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสจากเป็ดและไก่ (Figure 2a และ 2b) เมื่อเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสพบรูปแบบเช่นเดียวกัน คือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 30 จนถึง 60°ซ เอนไซม์มีกิจกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่เมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60°ซ เอนไซม์จะสูญเสียกิจกรรม Neilands and Stumpf (1958) กล่าวว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่เสียสภาพที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°ซ เนื่องจากเกิดการสลายพันธะที่มีแรงยึดเหนี่ยวต่ำ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดการคลายเกลียว (unfolding) ของสายเปปไทด์ (Dixon and Webb, 1979; Whitaker, 1994; Fullbrook,1996) ดังนั้นที่อุณหภูมิ 60°ซ จึงเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์โปรติเอสของเป็ดและไก่มีกิจกรรมสูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Damle *et al*. (2010) และ Mane *et al*. (2010) ที่รายงานผลของอุณหภูมิที่เอนไซม์สกัดจากส่วนของไส้ไก่มีกิจกรรมสูงสุด

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าค่ากิจกรรมสูงสุดของเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ด เท่ากับ 103.96±7.04 และของไก่เท่ากับ 90.61±1.63 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที ความแตกต่างของกิจกรรมของเอนไซม์จากเป็ดและไก่ เกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ การเลี้ยงดู และสูตรอาหาร เป็นต้น โดย Kadhim *et al*. (2011) ระบุว่าสายพันธุ์ของสัตว์มีผลต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในตับอ่อน และ เพทาย (2538) ได้กล่าวว่าส่วนประกอบของอาหารมีผลต่อการหลั่งเอนไซม์ของตับอ่อน โดยเป็ดและไก่ มีการเลี้ยงและได้รับอาหารที่แตกต่างกัน

จากผลการทดลองในเรื่องของสภาวะการทำงานที่เหมาะสมของเอนไซม์ยังไม่เพียงพอต่อการพิจารณานำเอนไซม์ไปใช้ ซึ่งควรต้องมีการศึกษาความคงตัวของเอนไซม์ที่สภาวะต่างๆ ด้วย ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงเลือกศึกษาผลของพีเอชและอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้

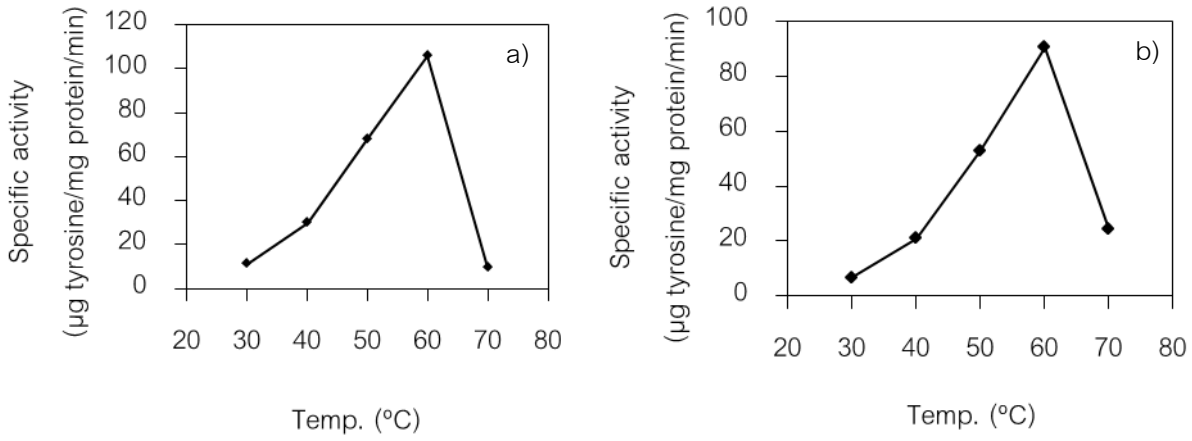

Figure 2 Effect of temperature on protease specific activity a) protease from duck intestine and pancreas analyzed at pH 8 b) protease from chicken intestine and pancreas analyzed at pH 7.5

3. ผลของพีเอช และอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์

เมื่อบ่มสารละลายเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้จากเป็ดและไก่ ที่พีเอช (6-9) และเวลาต่างๆ (0-12 ชม.) ที่ 25°ซ โดยไม่มีการเติมสับสเตรท และนำเอนไซม์ไปหาค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิ 60°ซ พีเอช 8 (เป็ด) และ 7.5 (ไก่) พบว่าเอนไซม์ทั้งสองชนิดมีความคงตัวดีมากในช่วงพีเอช 6-8 ตั้งแต่ 0-12 ชม. โดยเอนไซม์ของเป็ดมีกิจกรรมจำเพาะอยู่ในช่วง 85.57-94.94 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที และไก่มีกิจกรรมจำเพาะ 75.14-87.87 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที แต่ที่พีเอช 9 เอนไซม์จากเป็ดและไก่มีกิจกรรมจำเพาะลดลง เมื่อบ่มเอนไซม์นาน 12 ชม. (Figure 3a และ 3b) แสดงว่าเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดได้มีความคงตัวดีในสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกลางถึงเบสอ่อน และเอนไซม์สูญเสียกิจกรรมที่พีเอชสูง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนประจุทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างตามธรรมชาติของเอนไซม์ ส่งผลให้เอนไซม์สูญเสียกิจกรรม (Bisswanger, 2002)

ดังนั้น ในกรณีของเอนไซม์จากเป็ดมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดและมีความคงตัวดีที่พีเอช 8 จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงาน เช่นเดียวกับเอนไซม์โปรติเอสจากไก่ที่พบว่าพีเอช 7.5 ให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด และเอนไซม์มีความคงตัวดี ดังนั้นที่พีเอชนี้จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับนำเอนไซม์โปรติเอสจากไก่ไปใช้

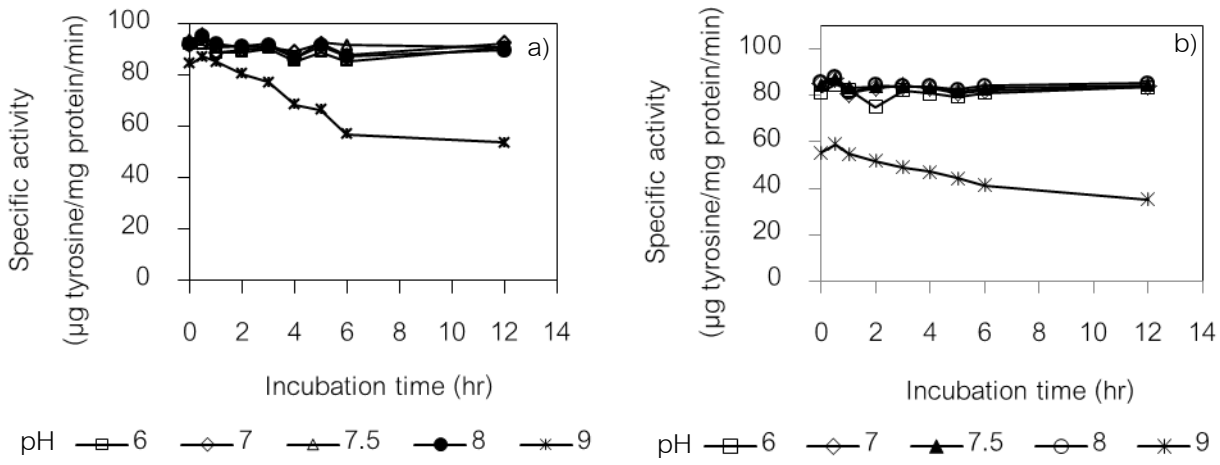

Figure 3 Effect of pH on protease stability a) protease from duck intestine and pancreas b) protease from chicken intestine and pancreas (analyzed activity at 60°C, pH 8 and 7.5 respectively)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของเอนไซม์ โดยบ่มสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ (30-70°ซ) และเวลาต่างๆ (0-12 ชม.) โดยไม่เติมสับสเตรท และนำเอนไซม์ไปหาค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิ 60°ซ พีเอช 8 (เป็ด) และ 7.5 (ไก่) พบว่าเอนไซม์ที่ไม่ผ่านการบ่ม (0 ชม.) ของเป็ดและไก่มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 91.07 และ 90.50 ไมโครกรัมไทโรซีน/มก.โปรตีน/นาที ตามลำดับ และเมื่อนำเอนไซม์ไปบ่มที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสของเป็ดและไก่มีกิจกรรมจำเพาะที่ตอบสนองต่ออุณหภูมิเป็นแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือที่อุณหภูมิ 30°ซ เอนไซม์มีความคงตัวสูง จากนั้นเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 และ 50°ซ กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อผ่านไป 12 ชม. โดยกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โปรติเอสที่สกัดจากไส้และตับอ่อนของไก่ลดลงค่อนข้างมากเมื่อได้รับความร้อนเป็นเวลานาน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ทนต่อความร้อนได้น้อยกว่า แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิจนถึง 60 และ 70°ซ เอนไซม์จากทั้งเป็ดและไก่ สูญเสียกิจกรรมทั้งหมดเมื่อเวลาผ่านไปเพียง 30 นาที (Figure 4a และ 4b) สอดคล้องกับการรายงานของ Neilands and Stumpf (1958) ที่กล่าวว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะสูญเสียกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงกว่า 60°ซ

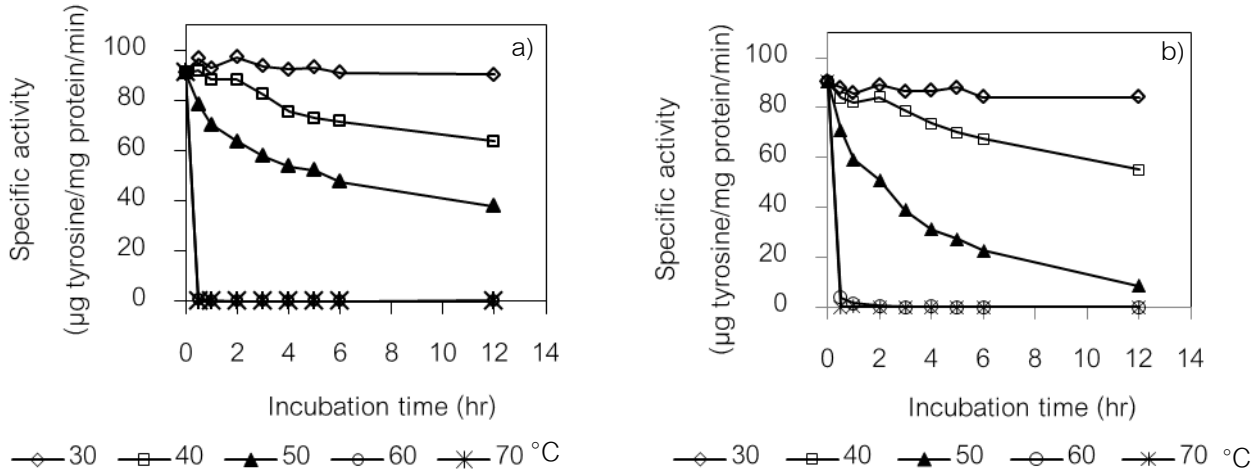

Figure 4 Effect of temperature on protease stability a) protease from duck intestine and pancreas b) protease from chicken intestine and pancreas (analyzed activity at 60°C, pH 8 and 7.5 respectively)

เมื่อพิจารณาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน (Figure 2) และความคงตัวของเอนไซม์ (Figure 4) ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าเอนไซม์ของเป็ด และไก่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50°ซ โดยใช้พีเอชที่เหมาะสม คือ 8 และ 7.5 สำหรับเอนไซม์ของเป็ดและไก่ตามลำดับ โดยเอนไซม์โปรติเอสที่เตรียมสามารถนำไปใช้ในแง่ต่างๆ ได้ ตามที่มีนักวิจัยหลายท่านได้ศึกษาไว้ เช่น Raju *et al*. (1997) ใช้เอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่ที่มีกิจกรรม 95 หน่วย/ก. ของเนื้อเยื่อ ในการย่อยวัสดุเศษเหลือจากการแปรรูปเนื้อไก่ เพื่อใช้เติมในอาหารสัตว์ ขณะที่ Jamdar and Harikumar (2005) นำเอนไซม์โปรติเอสจากไส้ไก่ที่มีกิจกรรมจำเพาะ 7 ไมโครโมลไทโรซีน/มก.โปรตีน/ชม. (ใช้เคซีนเป็นสับสเตรท) ไปทดลองย่อยโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลท (soybean protein isolate) ซึ่งมีผลทำให้มวลโมเลกุลของโปรตีนถั่วเหลืองไอโซเลทลดลง และ Damle *et al*. (2010) ใช้เอนไซม์อะมิโนเปปติเดสจากไส้ไก่ที่มีกิจกรรม 0.134 นาโนโมล/มก.มิวโคซา/ชม. เพื่อลดรสขมในโปรตีนถั่วเหลือง และเคซีนไฮโดรไลเสต เป็นต้น

4. ผลของระยะเวลาต่อการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมของเอนไซม์

จากการศึกษาผลของเวลาการเก็บรักษาต่อค่ากิจกรรมของเอนไซม์ โดยเก็บรักษาเอนไซม์แห้งที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นระยะเวลา 30 วัน แล้วจึงนำมาวิเคราะห์ค่ากิจกรรมจำเพาะ พบว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดมีกิจกรรมจำเพาะลดลงประมาณ 8.75% ส่วนเอนไซม์จากไก่ลดลงประมาณ 6.18% แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์จากไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่มีความคงตัวต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ อย่างไรก็ดีก่อนนำเอนไซม์ไปใช้ควรต้องมีการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ก่อนทุกครั้ง

สรุป

ไส้และตับอ่อนของเป็ดและไก่เป็นแหล่งที่ดีของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งเอนไซม์โปรติเอสที่พบมีกิจกรรมจำเพาะสูงสุดที่พีเอช 8 (เป็ด) และ 7.5 (ไก่) โดยที่อุณหภูมิ 60°ซ เอนไซม์ทั้งสองชนิดมีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงสุด อย่างไรก็ตามที่อุณหภูมิสูงเอนไซม์มีความคงตัวต่ำ ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากสภาวะที่เหมาะสมและความคงตัวของเอนไซม์ พบว่าเอนไซม์โปรติเอสของเป็ด และไก่ ควรใช้งานที่พีเอช 8 และ 7.5 ตามลำดับ และอุณหภูมิ 50°ซ เห็นควรศึกษาการนำเอนไซม์ไปใช้ประโยชน์ เนื่องจากการสกัดเอนไซม์ทำได้ง่าย และขั้นตอนไม่ยุ่งยากซับซ้อน โดยเอนไซม์ที่เตรียมได้มีความคงตัวค่อนข้างดี เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°ซ เป็นระยะเวลา 30 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ประจำปี 2553

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Jamdar, S.N. and P. Harikumar. 2005. Autolytic degradation of chicken intestinal proteins. **Bioresource Technol**. 99: 6934-6940.

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

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

Lowry, O.H., N.G. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.

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

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

Raju, A.A., C. Rose and N.M. Rao. 1997. Enzymatic hydrolysis of tannery fleshings using chicken intestine proteases. **Animal Feed Sci. Technol**. 66: 139-147.

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

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