การประยุกต์เอนไซม์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารกลุ่มโปรตีน

Application of Enzymes for Food Protein-Based Industry

สามารถ สายอุต

Samart Sai-Ut

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Food Science Department, Faculty of Science, Burapha University

Received : 11 May 2018

Accepted : 24 August 2018

Published online : 10 September 2018

บทคัดย่อ

เอนไซม์เป็นโมเลกุลโปรตีนที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาอย่างจำเพาะในปฏิกิริยาชีวเคมี ซึ่งถือว่าเป็นเครื่องมือที่สำคัญและมีศักยภาพในการปรับปรุงสมบัติเชิงหน้าที่ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหารได้มากมาย บทความนี้จึงรวบรวมข้อมูลของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารกลุ่มโปรตีน สรุปกลไกการทำงานของเอนไซม์และปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยา เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของเอนไซม์และตัวยับยั้ง นอกจากนี้ยังทบทวนการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์เทคโนโลยีเอนไซม์อันหลากหลายในผลิตภัณฑ์อาหารจากแหล่งโปรตีนประเภทต่าง ๆ เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ทางประมงและเนื้อสัตว์ มีการใช้เอนไซม์ไลเปส (lipases) โปรตีเอส (proteases) อะมิโนเปปติเดส (aminopeptidases) แลคแตส (lactases) ไลโซไซม์ (lysozyme) แลคโตสเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) และทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) ในอุตสาหกรรมนมเพื่อปรับปรุงรสชาตินม ช่วยย่อยแลคโตส เร่งการบ่มเนยแข็ง ควบคุมการเน่าเสียจากจุลินทรีย์และปรับเปลี่ยนสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนในนม สำหรับอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์ประมงนิยมใช้เอนไซม์กลุ่มโปรตีเอสในผลิตภัณฑ์ประมงหลากหลายเพื่อช่วยในการสกัดรงควัตถุและสารให้กลิ่นรสจากสัตว์น้ำ ใช้ผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสต ช่วยลอกหนังสัตว์น้ำและการแปรรูปไข่ปลา ขณะที่ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ใช้เอนไซม์เพื่อช่วยเรื่องเนื้อสัมผัสให้ความนุ่มมากขึ้น มีการใช้ทรานส์กลูตามิเนส เพื่อปรับปรุงเนื้อสัมผัส และใช้เอนไซม์อื่นอีกหลายชนิด เช่น ไลเปส กลูตามิเนสโปรตีเอสและเปปติเดส เพื่อปรับปรุงรสชาติ เพิ่มประโยชน์ในการแปรรูปจากเนื้อคุณภาพต่ำและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ให้มากขึ้น การประยุกต์เอนไซม์ในอาหารกลุ่มโปรตีนจึงเป็นโยชน์อย่างมากในเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์อาหารและเป็นการสร้างทางเลือกใหม่สำหรับผู้บริโภค

คำสำคัญ : เอนไซม์, จลนพลศาสตร์เอนไซม์, ผลิตภัณฑ์นม, ผลิตภัณฑ์ประมง, ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

***Corresponding author. E-mail** : samarts@go.buu.ac.th

Abstract

Enzymes are protein molecules working as particular catalysts for biochemical reactions. Enzymes have been widely used as potential tool to improve and modify the functional, nutritional and sensory properties of many food products. In this article, we first give a background of enzyme and summarize the mechanism of enzyme such as lock-and-key mechanism with substrate as well as brief the factors that affect the rate of reactions such as temperature, pH, concentration and inhibitors. The article also discusses the previous and present study of enzyme technology that has applications in many food products, including dairy, fish and meat product. Various enzymes such as lipases, non-coagulant proteases, aminopeptidases, lactases, lysozyme, lactoperoxidase and transglutaminase were applied in dairy foods sector to improve flavor enhancement, hydrolyze lactose, accelerate cheese ripening, control microbial spoilage, and modify protein functionality. For the fishery industry, proteases are commonly used as processing aids for many products, including extraction of pigment and flavoring compounds, production of fish protein hydrolysates, skin removal and roe processing. In meat sector, transglutaminases have been used to improve a texture. Lipases, glutaminases, proteases and peptidases were conducted to enhance flavor, to add value for low quality meat and to produce value added product. The application of enzymes in protein-based foods is a major contributor to increase the value added in food and consumer choice.

Keywords : enzyme, enzyme kinetics, dairy product, fishery product, meat product

บทนำ

เอนไซม์ทางด้านอาหารในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และถือเป็นเครื่องมือในการสรรสร้างผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มากมาย การแก้ปัญหาและปรับปรุงสมบัติหน้าที่ต่าง ๆ ของอาหารสามารถทำได้ด้วยการอาศัยเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีอยู่มากมายและหลากหลาย องค์ความรู้ด้านเอนไซม์ทางอาหารจึงมีความสำคัญ และถือเป็นกลยุทธ์อย่างหนึ่งเพื่อใช้ในการแข่งขันทางด้านอาหารโลก ณ ปัจจุบันเอนไซม์เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายว่าเป็นโปรตีนที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมีซึ่งเป็นส่วนสำคัญของกระบวนการสร้างและสลายในสิ่งมีชีวิต เช่น การย่อยอาหาร การหายใจ การเผาผลาญ และการเสริมสร้างเนื้อเยื่อ กล่าวอีกนัยหนึ่งคือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทางชีวภาพที่มีความจำเพาะ และทำงานได้ภายใต้-สภาวะที่ไม่รุนแรง ด้วยเหตุนี้จึงทำให้เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่เหมาะสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ผู้ผลิตสามารถปรับปรุงสมบัติบางประการของอาหารที่ต้องการอย่าง โดยเป็นการทำงานของเอนไซม์อย่างจำเพาะโดยไม่ทำลายสารอาหารที่จำเป็นหรือสมบัติหน้าที่อื่นที่ต้องการคงไว้ ตัวอย่างการประยุกต์เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์อาหารเช่น การใช้โปรติเอส (protease) ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เพื่อทำให้เนื้อนุ่มมากขึ้น การใช้เอนไซม์ไคโมซิน (chymosin) ผลิตเนยแข็งโดยทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีนนม การใช้ทรานส์กลูทามิเนสในผลิตภัณฑ์ซูริมิเพื่อทำให้การเกิดเจลของโปรตีนที่แข็งแรงและมีเนื้อสัมผัสที่เหนียวนุ่มมากขึ้น การประยุกต์ใช้เอนไซม์ตามที่กล่าวมานับเป็นตัวอย่างการประยุกต์ที่ดีและประสิทธิผลของการทำหน้าที่เอนไซม์ ซึ่งได้เปรียบในเรื่องเวลา การใช้พลังและความจำเพาะเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้สารสังเคราะห์ การ

ปรับปรุงคุณภาพอาหารด้วยเอนไซม์มีข้อดีเพราะมีความจำเพาะซึ่งไม่เกิดปฏิกิริยาหรือผลิตผลที่ไม่ต้องการและเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิไม่สูงมาก นอกจากนี้การควบคุมการทำงานของเอนไซม์ทำได้ง่ายอาจใช้สารยับยั้งหรือความร้อนจึงช่วยลดต้นทุนในกระบวนการผลิตและถนอมเครื่องมือการผลิตจากการใช้สารเคมีรุนแรง รวมทั้งความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ดังนั้นนักวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอาหารจึงต้องมีความรู้ความเชี่ยวชาญอย่างมากในการประยุกต์เอนไซม์แต่ละชนิดเพื่อให้บรรลุถึงความต้องการของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดที่มีความแตกต่างกัน หากเข้าใจกลไกการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิดสำหรับปรับปรุงอาหารที่ต้องการ ทดลองแล้วว่าใช้กับผลิตภัณฑ์ได้จริงในต้นทุนที่เหมาะสมและมีความปลอดภัยตามมาตรฐานอาหารสากล ความรู้เหล่านี้จะช่วยให้เกิดการต่อยอดการพัฒนาผลิตภัณฑ์และสร้างทางเลือกใหม่เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่กระหายสิ่งใหม่ตลอดเวลา

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับเอนไซม์

เอนไซม์เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางเคมีในสิ่งมีชีวิตและยังมีหน้าที่สำคัญในวงการเทคโนโลยีอาหารและชีวภาพ เอนไซม์มีความจำเพาะต่อซับสเตรต (substrate) การทำงานนี้เป็นที่ทราบกันดีในแบบจำลองอุปมานของแม่กุญแจและลูกกุญแจ (lock and key) เอนไซม์จึงต้องจับกับซับสเตรตอย่างจำเพาะก่อนจึงจะเร่งปฏิกิริยาต่าง ๆ ได้ และบ่อยครั้งการจับกับโคแฟกเตอร์ (cofactor) มีส่วนสำคัญต่อการเร่งปฏิกิริยาด้วย ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมเอนไซม์สามารถมีอัตราเร่งปฏิกิริยาเป็นทวีคูณเมื่อเทียบกับตัวเร่งสังเคราะห์อื่น เอนไซม์ปริมาณเพียงเล็กน้อยสามารถเปลี่ยนซับสเตรตเป็นผลิตภัณฑ์ได้อย่างมหาศาล ประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของเอนไซม์ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น ความเข้มข้นซับสเตรต ค่ากรดด่าง อุณหภูมิ โคแฟกเตอร์ ฯลฯ

การศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาและปัจจัยที่ส่งผลต่อความเร็วจึงมีความจำเป็น จลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ช่วยอธิบายให้เห็นกลไกและกิจกรรมของเอนไซม์ Michaelis และ Menten คิดค้นแบบจำลองการทำงานของเอนไซม์ดังสมการสรุปข้างล่างนี้ (สมการ 1)

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P \qquad (1)$$

ซึ่งอธิบายปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์อิสระ ([E]) เป็นตัวเร่งและมีซับสเตรต ([S]) เพียงหนึ่งตัวจับตัวรวมกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรต ([ES]) ซึ่งปฏิกิริยานี้สามารถเกิดย้อนกลับได้ จากนั้น [ES] จะเปลี่ยนเป็นผลิตภัณฑ์ ([P]) และ [E] โดยทั่วไปอัตราเร็วของการเกิดปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นเมื่อซับสเตรตมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นซับสเตรตสูงระดับหนึ่งอัตราเร็วจะเริ่มคงที่ (V_{max}) ในสภาวะคงที่ (steady-state) ความเข้มข้นของ [ES] คงที่ตลอดเวลา ขณะที่ความเข้มข้นของซับสเตรตและผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไปค่าอัตราเร็วปฏิกิริยาในการสร้างผลิตภัณฑ์ ค่า K_m (Michaelis–Menten constant) เป็นค่าคงที่ที่นิยมใช้ระบุกิจกรรมของเอนไซม์ใด ๆ ซึ่งแสดงความจำเพาะของซับเตรตสำหรับเอนไซม์ ซึ่งบ่งบอกถึงความเข้มข้นของซับสเตรตที่ส่งผลต่อความเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของความเร็วสูงสุด (V_{max}) ค่าคงที่ของ Michaelis-Menten หรือ K_m มีความสำคัญมากเพราะสามารถบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ นอกจากนี้ค่า K_m ยังสามารถใช้ทำนายอัตราเร็วปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์และซับสเตรต เมื่อทราบความเข้มข้นเอนไซม์และซับสเตรตอีกด้วย สำหรับค่าความเร็วปฏิกิริยาสูงสุด

ต่อเฉพาะซับสเตรตหรือ V_{max} เป็นค่าบ่งบอกถึงประสิทธิภาพของเอนไซม์ นอกจากนี้ค่าคงที่ k_{cat} ยังเป็นอีกค่าหนึ่งซึ่งบอกถึงจำนวนโมเลกุลของซับสเตรตที่สามารถเข้าไปในบริเวณแอกทีฟไซต์ของเอนไซม์ต่อวินาที ซึ่งประสิทธิภาพของเอนไซม์สามารถคำนวณได้จากค่า k_{cat}/K_m ซึ่งสะท้อนถึงความจำเพาะและการทำหน้าที่เร่งของเอนไซม์เมื่อต้องการเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างกันและมีการใช้ซับสเตรตต่างกัน และสำหรับค่าที่มักใช้เป็นหน่วยวัดของเอนไซม์บ่อยๆ คือ ตัวเลขเทอร์นโอเวอร์ (turnover number) ซึ่งเป็นค่าของจำนวนซับสเตรตที่ทำปฏิกิริยาต่อจำนวนเอนไซม์ในหนึ่งหน่วยเวลา ในความเป็นจริงความเข้มข้นที่แท้จริงของเอนไซม์เป็นสิ่งที่ไม่ทราบได้จึงได้กำหนดให้รายงานกิจกรรมของเอนไซม์ในหน่วยของ IU (International unit) หรือ U ซึ่ง 1 U คือปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเร่งปฏิกิริยาต่อเวลาในหน่วยนาที (1 ไมโครโมลต่อนาที) ภายใต้สภาวะที่กำหนด

ปัจจัยที่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์

อัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์จะมากหรือน้อยยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเข้มข้นของเอนไซม์ ความเข้มข้นของซับสเตรต อุณหภูมิ สภาวะกรดด่าง โคเฟกเตอร์ โคเอนไซม์ (coenzymes) และสารยับยั้งเอนไซม์ (inhibitors) หากจะศึกษาผลของการเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ต่ออัตราการเกิดปฏิกิริยาต้องแน่ใจว่ามีซับสเตรตอยู่ในปริมาณมากเกินพอเพื่อให้ปฏิกิริยาไม่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของซับสเตรต และการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ของปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เป็นผลจากระดับของเอนไซม์ ปฏิกิริยานี้คือปฏิกิริยาลำดับศูนย์ (zero order) ปริมาณเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาจะวัดจากกิจกรรมเอนไซม์ที่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง ฯลฯ และกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดวัดได้ภายใต้การมี ความเข้มข้นของซับสเตรตมากเกินพอ ซึ่งปัจจัยและสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ สรุปไว้ในตารางที่ 1

ส่วนใหญ่กิจกรรมของเอนไซม์ในการเร่งปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิทำให้สารในปฏิกิริยาถูกกระตุ้นให้มีพลังงานมากขึ้น ส่งผลต่อการเปลี่ยนจากสารตั้งต้นไปเป็นผลิตผลมากขึ้น การเพิ่มอุณหภูมิจึงทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น อุณหภูมิที่เหมาะสมทำให้โมเลกุลโปรตีนในโครงสร้างเอนไซม์จัดเรียงตัวอย่างเหมาะสม บริเวณเร่งเหมาะกับการจับซับสเตรทมากขึ้น อย่างไรก็ตาม เอนไซม์แต่ละชนิดมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกัน เช่น ปาเปนทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยามากที่สุดที่ 65 องศาเซลเซียส ขณะที่ เพปซินทำงานได้ดีที่สุดในช่วงอุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส ทั้งนี้แหล่งของเอนไซม์ที่แตกต่างกันนำมาซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยาที่ต่างกันเช่นกัน เมื่อมีอุณหภูมิสูงเกินไปเอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพบางส่วนทำให้กิจกรรมการเร่งปฏิกิริยาลดลงจนไม่มีกิจกรรมในที่สุด ในทางกลับกันเอนไซม์บางชนิดสูญเสียสภาพหรือมีกิจกรรมลดลงเมื่อแช่แข็ง ทั้งนี้เป็นเพราะการแช่เยือกแข็งทำให้แอกติวิตีของน้ำในเอนไซม์ลดลง การทำงานเอนไซม์จึงลดลง เนื่องจากน้ำไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวทำละลายเอนไซม์และซับสเตรทได้

ความเข้มข้นซับสเตรตส่งผลต่อความเร็วของปฏิกิริยา เมื่อทดลองโดยควบคุมปริมาณเอนไซม์ให้คงที่และเพิ่มความเข้มข้นซับสเตรตขึ้นเรื่อย ๆ ความเร็วของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นจนถึงที่สุดและเริ่มคงที่ จุดที่ความเร็วปฏิกิริยาคงที่นี้เป็นผลจากเอนไซม์ทั้งหมดจับกับซับสเตรต (ES) ค่า K_m สามารถบ่งชี้กิจกรรมของเอนไซม์ได้ หากค่า K_m น้อยนั่นหมายถึงเอนไซม์ต้องการซับสเตรตเพียงเล็กน้อยเพื่อให้เกิดการอิ่มตัวหรือมีความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ถ้าค่า K_m มากแสดงว่าเอนไซม์ต้องการซับสเตรตมากเพื่อให้ได้ความเร็วของปฏิกิริยาสูงสุด ซับสเตรตที่มีค่า K_m น้อยมักเชื่อว่าซับสเตรตนี้มีความจำเพาะต่อเอนไซม์มากถึงแม้ว่าอาจจะไม่เป็นเช่นนี้สำหรับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ (Daniel & Danson, 2013)

สภาวะกรดด่าง หรือ ค่า pH มีผลต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ การแตกตัวไอออนในภาวะกรดด่างที่เกิดขึ้นบริเวณแอกทีฟไซต์ของเอนไซม์ส่งผลต่อโครงสร้างสามมิติและการเข้าจับกับซับสเตรต เอนไซม์แต่ละชนิดจึงมีกิจกรรมที่ดีที่สุดในสภาวะกรดด่างที่แตกต่างกัน สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการทำงานเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพลังงานจลน์ในโมเลกุลของสารปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นการชนกันของสสารต่อหน่วยเวลาจึงมากขึ้นเป็นผลให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาหรือการจับกันของซับสเตรตและเอนไซม์ แต่เมื่ออุณหภูมิสูงมากเกินไปโครงสร้างของเอนไซม์เกิดการสูญเสียสภาพและไม่สามารถทำงานได้ต่อไป ตัวอย่างสภาวะเหมาะสมของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น เปปซิน (pepsin) เป็นเอนไซม์ที่ทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37-42°C ในภาวะกรดด่างเท่ากับ 2.0 และไม่ทำงานที่ pH 6.5 ส่วนทริปซิน (trypsin) มีค่า pH ที่เหมาะสมคือประมาณ 7.5-8.5 และอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 37°C (Shahidi & Kamil, 2001)

เอนไซม์จำนวนมากจำเป็นต้องมีสารประกอบอื่น ๆ เช่น โคเฟกเตอร์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นในการส่งเสริมการเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์จะจับกับโคเฟกเตอร์บริเวณแอกทีฟไซต์หรือใกล้เคียง โคเฟกเตอร์ที่เป็นธาตุโลหะ เช่น K^{+}, Fe^{++}, Fe^{+++}, Cu^{++}, Co^{++}, และ Zn^{+} เป็นต้น ซึ่งธาตุโลหะบางครั้งอาจรบกวนหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ ขณะที่โคเอนไซม์ที่เป็นโมเลกุลอินทรีย์ขนาดเล็กที่ไม่ใช่โปรตีน ทำหน้าที่ขนส่งกลุ่มสารเคมีจากเอนไซม์หนึ่งไปสู่อีกตัวหนึ่ง เพื่อช่วยในการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้น ตัวอย่างโคเอนไซม์ได้แก่ ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไทอะมิน (thiamine) และกรดโฟลิก (folic acid)

ตารางที่ 1 สภาวะเหมาะสมและปัจจัยสำคัญต่อกิจกรรมเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

เอนไซม์	ซับสเตรต	pH	อุณหภูมิ	สารยับยั้ง
alcalase (subtilisin)	โปรตีน	6.5-8.5	55-60°C	phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) และ diisopropylfluorophosphate
bromelain	โปรตีน	7.0	40-50°C	E-64 protease inhibitor
chymosin	เคซีน	6.6	45°C	กรด และ pepstatin
flavourzyme	โปรตีน	6.0-7.0	50°C	-
glutaminase	กลูตามีน	8.0	50°C	glutaminase inhibitor
lactase	น้ำตาลแลกโตส	6.0	37°C	กรด
lipase	ไขมัน	8.2	37°C	orlistat
papain	โปรตีน	6.0-7.0	65°C	E-64, cystamine dihydrochloride
pepsin	โปรตีน	1.6-3.0	37-42°C	pepstatin
transglutaminase	โปรตีน	6.0	40-45°C	monodansylcadaverine และ α -difluoromethylornithine
trypsin	โปรตีน	7.5-8.5	37°C	aprotinin และ pancreatic secretory trypsin inhibitor

สารยับยั้งเอนไซม์คือสารที่ทำให้ปฏิกิริยาของเอนไซม์ช้าลงหรือหยุดการเร่งปฏิกิริยา กลไกการยับยั้งขึ้นอยู่กับการรบกวนจับกันของสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรต (ES complex) การยับยั้งเอนไซม์บางครั้งเกิดจากการมีปริมาณ

ซับสเตรตมากเกินไป โดยทั่วไปการยับยั้งเอนไซม์แบ่งได้ 2 แบบ คือ การยับยั้งเอนไซม์แบบไม่ผันกลับ (irreversible Inhibition) ซึ่งเป็นการจับกันระหว่างสารยับยั้งและเอนไซม์ด้วยพันธะโคเวเลนต์ และการยับยั้งเอนไซม์แบบผันกลับ (reversible Inhibition) ซึ่งการยับยั้งแบบหลังสามารถแบ่งได้อีก 4 แบบ คือ การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibition) การยับยั้งไม่แข่งขันแบบ non-competitive inhibition การยับยั้งไม่แข่งขันแบบ uncompetitive inhinition และการยับยั้งแบบผสม (mixed inhibition) การยับยั้งแบบแข่งขันคือสภาวะที่สารยับยั้งแข่งขันกับซับสเตรตเพื่อแย่งจับเอนไซม์บริเวณแอกทีฟไซต์ การยับยั้งไม่แข่งขันแบบ non-competitive inhibition คือการที่สารยับยั้งจับกับเอนไซม์บริเวณอื่นที่ไม่ใช่แอกทีฟไซต์เพื่อรบกวนการเกิดสารเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรตโดยทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนไป ขณะที่การยับยั้งไม่แข่งขันแบบ uncompetitive inhibition เป็นภาวะที่สารยับยั้งจับกับสารเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรตเพื่อลดการเปลี่ยนซับสเตรตไปเป็นผลิตภัณฑ์ และการยับยั้งแบบผสมคือการยับยั้งของสารยับยั้งที่สามารถจับได้ทั้งเอนไซม์อิสระและสารประกอบเชิงซ้อนเอนไซม์-ซับสเตรท

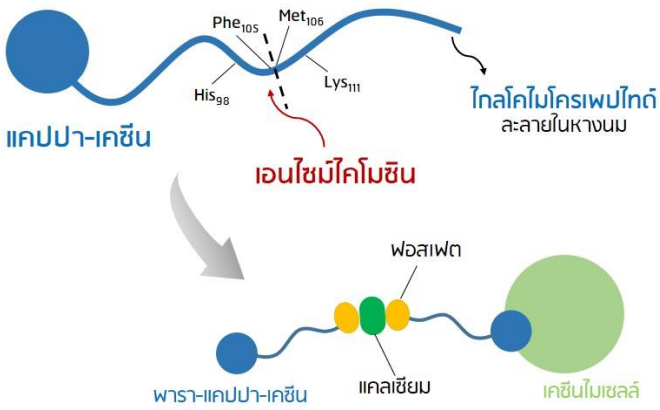
จากที่กล่าวมาทั้งหมดเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ควรรู้เกี่ยวกับเอนไซม์เพื่อใช้เป็นแนวทางในการประยุกต์เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ กับผลิตภัณฑ์อาหารให้เหมาะสม ซึ่งในบทความนี้ได้รวบรวมนำข้อมูลการประยุกต์เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทกลุ่มโปรตีนดังจะกล่าวต่อไปนี้

เอนไซม์ในการผลิตผลิตภัณฑ์นม

ภาคอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมมีการใช้เอนไซม์มาแต่ดั้งเดิมแล้ว การใช้เอนไซม์ในนมเป็นที่รู้จักกันดีคือ เอนไซม์เรนนิน (rennet) เรนนินใช้ผลิตเนยแข็งโดยตกตะกอนเคซีนในนมได้เป็นลิ่มนม (milk curd) ก่อนบีบน้ำออกจนได้เนยแข็งสดในที่สุด ทั่วไปเนยแข็งมีโปรตีนร้อยละ 30-40 น้ำร้อยละ 50-60 ไขมันร้อยละ 10 ที่เหลือเป็นน้ำตาลแลกโตส วิตามิน และแร่ธาตุ หากนำเนยแข็งไปบ่มด้วยจุลินทรีย์เนยแข็งจะมีกลิ่นรสแตกต่างออกไป (Kailasapathy & Lam, 2005) เรนนินเป็นชื่อเอนไซม์เชิงพาณิชย์ที่ใช้เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1874 ซึ่งผลิตและสกัดจากส่วนกระเพาะแท้ (abomasum) ของสัตว์เคี้ยวเอื้อง สารสกัดที่ได้ประกอบด้วยเอนไซม์ไคโมซินเป็นส่วนใหญ่ซึ่งจำเพาะต่อการย่อยแคปปา-เคซีน (*k*-casein) และคงสภาพเคซีนไว้ (casein destabilization) อาจพบเปปซิน (pepsin) และโปรติเอสที่ชอบสภาวะกรด (acid protease) ชนิดอื่น ๆ ที่มีเคซีนเป็นซับสเตรต เอนไซม์เหล่านี้ (chymosin และ pepsin) ล้วนจัดอยู่ในกลุ่มแอสปาติกโปรติเอส (aspartic protease) (E.C. 3.4.23) การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมสรุปได้ในตารางที่ 2 การเติมเอนไซม์ rennin ในนมเพื่อผลิตเนยแข็งเพิ่มขึ้นมากกว่า 0.2 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ไม่ส่งผลต่อความแน่นเนื้อหลังจากเติมไป (Okigbo *et al*., 1985)

เอนไซม์ chymosin (E.C. 3.4.23.4) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเนยแข็งเป็นส่วนใหญ่ chymosin จำเพาะต่อการตัด *k*-casein ที่ตำแหน่งระหว่างฟีนิลอะลานีน 105 ถึงเมไทโอนีน 106 (Phe_{105}-Met_{106}) ได้ผลผลิตเป็นพาราเคซีน หลังจากนั้นสายพาราเคซีนรวมตัวจับกันเป็นร่างแห ขั้นตอนนี้สำคัญมากต้องมีจำนวนแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ที่มากพอเพื่อช่วยเชื่อมระหว่างสายพาราเคซีนเพื่อทำให้เกิดลิ่มนมที่มีสเถียรภาพ (แสดงดังภาพที่ 1)

เอนไซม์ pepsin (EC 3.4.23.1) ที่พบรองลงมาเชื่อว่าช่วยในเรื่องของการบ่มเนยแข็งแต่ไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนสำหรับเรื่องนี้ ปัจจุบันการทำเนยแข็งสด (Cheddar) จะใช้ chymosin บริสุทธิ์ที่ผลิตจากยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces lactis* (Spohner *et al*., 2016) หรือเชื้อราสายพันธุ์ *Rhizomucor pusillus* ที่ดัดแปลงพันธุ์กรรมโดยอาศัยการตัดแต่งยีนที่แสดงออกของเอนไซม์ (pro) chymosin จากกระเพาะวัว (Henriksson *et al*., 1999)



ภาพที่ 1 เอนไซม์ไคโมซินตัดแคปา-เคซีนเป็นพารา-แคปา-เคซีนที่รวมตัวจับกันเป็นร่างแห

เอนไซม์ lactoperoxidase (EC 1.11.1.7) เกิดขึ้นตามธรรมชาติพบในน้ำนมดิบ นมน้ำเหลือง และน้ำลาย lactoperoxidase เป็นส่วนช่วยในระบบป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม Lactoperoxidase สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในการออกซิไดซ์ไอออนไทโอไซยาเนต (thiocyanate ion) ให้เป็นไฮโปไทโอไซยาเนต (hypothiocyanate) เพื่อทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ lactoperoxidase ใช้เป็นสารต้านเชื้อแบคทีเรียเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ในนมและผลิตภัณฑ์นม บ่อยครั้งมักใช้เอนไซม์ lactoperoxidase ร่วมกับสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ thiocyanate เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของน้ำนมดิบแช่เย็นให้มีประสิทธิภาพ (de Wit & Hooydonk,1996) ซึ่งสารเหล่านี้ค่อนข้างทนความร้อนและสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การใช้ความร้อนมากเกินไป หรือ overpasteurization ในกระบวนการผลิตนมด้วย (Marks *et al*., 2008)

การเกิด lipolysis ของ triacylglycerols ในนมระหว่างกระบวนการบ่มเนยแข็งเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่สำคัญ เพราะส่งผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง จึงมีการใช้เอนไซม์ lipases เพื่อดัดแปลงกลิ่นรสของเนยแข็ง ใช้ดัดแปลงโครงสร้างผลิตภัณฑ์ไขมันจากนม เพราะกรดไขมันอิสระ (free fatty acid, FFA) มีบทบาทต่อกลิ่นรสและเป็นสารตั้งต้นของสารระเหยอื่น ๆ เช่น เมธิลคีโตนและเอสเทอร์ (McSweeney & Sousa, 2000) การใช้ lipases จึงมีความสำคัญในอุตสาหกรรมนม ปริมาณความเหมาะสมของ FFA ขึ้นอยู่กับการใช้เอนไซม์ lipases และชนิดของเนยแข็ง ส่วนใหญ่เอนไซม์ lipases ทำงานได้ดีที่ pH 5 และปลดปล่อยกรดไขมันอิสระระหว่างการบ่ม อัตราการสลายไขมันสูงในเนยแข็งสีน้ำเงิน (blue cheeses) เป็นผลจาก lipases ของ *Penicillium* spp.

ไลโซไซม์ (Lysozyme: EC 3.2.1.17) เป็นเอนไซม์กลุ่ม hydrolase ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมลบและบวกหลายชนิดโดยการทำลายเมมเบรนของจุลินทรีย์ เอนไซม์นี้พบมากในไข่ขาวและผลิตได้จากเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* เอนไซม์ lysozyme มักใช้ในกระบวนการบ่มเนยแข็งเพื่อทำให้เนื้อสัมผัสมีความนุ่มที่เหมาะสม ทำให้มีการกระจายตัวของโพรงอากาศที่สม่ำเสมอ เนยแข็งที่มีลักษณะแบบนี้เป็นผลจากการเกิดกรด butyric ที่ผลิตจาก

Clostridium tyrobutyricum พบได้ในเนยแข็งชนิดเกาดา (Gouda) เดนโบ (Danbo) แกรนา (Grana) พาดาโน (Padano) และเอมเมนตัล (Emmental) การควบคุมจำนวนเชื้อ *C. tyrobutyricum* ทั่วไปทำโดยการเติมโพแทสเซียมไนเตรตในเนยแข็ง แต่เสี่ยงต่อการเป็นสารก่อมะเร็ง ดังนั้นการใช้ lysozyme เป็นตัวควบคุมการเกิดกรด butyric ถือเป็นทางเลือกที่ดีกว่า เอนไซม์ lysozyme ยังช่วยยับยั้งการเจริญของสปอร์จุลินทรีย์ และมีความเสถียรในระหว่างการบ่มเนยแข็งเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม lysozyme อาจทำลายแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกที่ใช้เป็นหัวเชื้อในการทำเนยแข็งได้ ถึงแม้จะมีความไวต่อการยับยั้งน้อยกว่า *C. tyrobutyricum* ก็ตาม

ตารางที่ 2 การใช้เอนไซม์ในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม

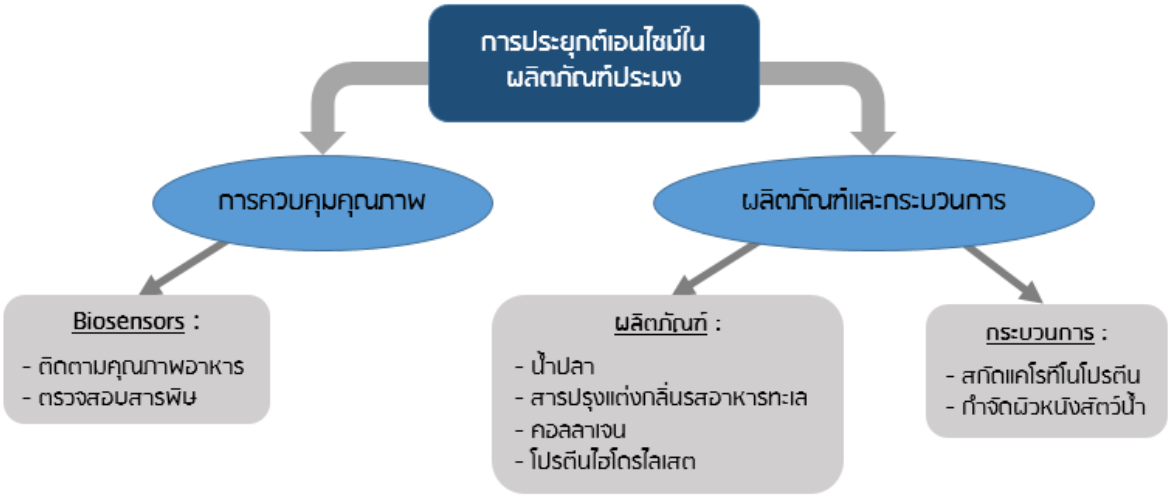
เอนไซม์	วัตถุประสงค์ในการประยุกต์ใช้เอนไซม์
acid proteinases	ใช้ในการตกตะกอนนม
neutral proteinases	เร่งการบ่มเนยแข็ง ลดความขมของเนยแข็งบ่ม ใช้ในการดัดแปลงเนยแข็ง ใช้ผลิตผลิตภัณฑ์
และ peptidases	สำหรับผู้แพ้นม (hypoallergenic milk-based foods)
lipases	การบ่มเนยแข็ง ดัดแปลงกลิ่นรสของเนยแข็ง ใช้ดัดแปลงโครงสร้าง ในผลิตภัณฑ์ไขมันจากนม
	(structurally modified milk fat products)
β-Galactosidase	ลดแลคโตสผลิตภัณฑ์เวย์โปรตีน
lactoperoxidase	ใช้ในกระบวนการการฆ่าเชื้อแบบเย็น
lactase	ย่อยน้ำตาลแลคโตสเพื่อผลิตนมสำหรับผู้แพ้นม (lactose intolerance)
lysozyme	ใช้ทดแทนไนเตรตในผลิตภัณฑ์เนยแข็งที่มีรู (Emmental cheese)

แลคเตส (lactase หรือ β-galactosidase; EC 3.2.1.23) เป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กาแลคโตสและกลูโคส) ซึ่งพบได้ในสิ่งมีชีวิต แต่แหล่งของเอนไซม์ที่ความสำคัญที่สุดคือมาจากจุลินทรีย์ เช่น *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida pseudotropicalis* และ *K. lactis* เอนไซม์ lactase ตอบโจทย์การผลิตนมสำหรับผู้มีอาการแพ้นม ผู้ป่วยอาการนี้หลายล้านคนทั่วโลกมีสาเหตุจากการขาดแลคเตสในระบบทางเดินอาหารทำให้มีอาการปวดท้อง ท้องอืด และท้องร่วง นอกจากนี้ lactase สามารถนำไปใช้ผลิตน้ำเชื่อมจากเวย์โปรตีนซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็งได้ด้วย เวย์โปรตีนจากผลิตภัณฑ์นมยังอุดมไปด้วยน้ำตาลแลกโตสร้อยละ 15-20 ขั้นตอนการไฮโดรไลซ์เวย์โปรตีนทำโดยการใช้ lactase ย่อยและกรองน้ำตาลที่ย่อยแล้วผ่านแผ่นเมมแบรนแบบอัลตราฟิลเตรชัน (ultrafiltration) หรืออาจผ่านกระบวนการย่อยภายในถังที่มีการตรึงเอนไซม์แลคเตส ซึ่งทั้งสองวิธีล้วนได้ปริมาณน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคสมากพอก่อนระเหยน้ำให้ได้น้ำเชื่อมเข้มข้นในที่สุด

เอนไซม์ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ประมง

เทคโนโลยีด้านเอนไซม์เริ่มนำมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมแปรรูปสัตว์น้ำโดยมีวัตถุประสงค์ในการเพิ่มผลผลิต สร้างความสะดวก และปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ทางประมงให้ดีขึ้น เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปประมงมักเป็นกลุ่มโปรติเอส (protease) การประยุกต์เอนไซม์ในผลิตภัณฑ์ประมงมีการใช้ประโยชน์ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ทางทะเลและเพื่อใช้ในการควบคุมติดตามคุณภาพของสัตว์น้ำ (แสดงดังภาพที่ 2) โดยทั่วไปโปรตีเอสมีบทบาทสำคัญในระบบการเผาผลาญ

พลังงานของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งในธรรมชาติโปรติเอสจะสลายพันธะเปปไทด์ของโปรตีนที่เชื่อมกัน เอนไซม์โปรติเอสสามารถแบ่งกลุ่มตามความคล้ายคลึงกันในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสลายโปรตีน ตัวอย่างเอนไซม์ ทริปซิน ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) ไคโมซิน และเอนไซม์กลุ่มที่มี กิจกรรมคล้ายคาเทปซิน (cathepsin-like enzyme) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันในระบบ E.C. เอนไซม์โปรติเอสทั้งหมด (หรือกลุ่ม peptide hydrolases) ซึ่งอยู่ในกลุ่ม 3.4 หากแบ่งย่อย สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มเอกโซเพปทิเดส E.C. 3.4.11-19 (exopeptidases) และกลุ่มเอนโดเพปทิเดส E.C. 3.4.21-24 (endopeptidases หรือ proteinase) กลุ่มเอนไซม์เอนโดเพปทิเดสจะตัดพันธะเปปไทด์ภายในสายโซ่ของโปรตีน ขณะที่เอนไซม์เอกโซเพปทิเดสจะไฮโดรไลซ์โปรตีนที่กรดอะมิโนจากทางปลายสายเอ็น (N) เช่น อะมิโนเพปทิเดส (amino peptidases) หรือจากทางปลายสายซี (C) เช่น คาร์บอซีเพปทิเดส (carboxypeptidases) สำหรับอุตสาหกรรมการประมง เอนไซม์โปรตีเอสเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิต การเก็บเกี่ยวสารสกัดที่ให้สีและกลิ่น (Sachindra & Mahendrakar, 2011) สารปรุงแต่งรสชาติจากสัตว์ทะเล การผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตจากปลา (Sai-Ut *et al*., 2014) การลดความหนืดของสารละลายโปรตีน การสกัดคอลลาเจน (Ahmed *et al*., 2018) และการกำจัดผิวหนังสัตว์น้ำ (Briki *et al*., 2016)



ภาพที่ 2 ภาพรวมการประยุกต์เอนไซม์ในการแปรรูปอาหารทะเล

การสกัดแคโรทีโนโปรตีน (carotenoprotein)

การสกัดแคโรทีโนโปรตีนด้วยวิธีการต่าง ๆ เป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือจากกระบวนการแปรรูปสัตว์น้ำ เช่น กุ้ง ปูและกั้ง ซึ่งเป็นกลุ่มสัตว์น้ำที่อุดมไปด้วยรงควัตถุสีแดง-ส้มพบได้ตรงบริเวณกระดองและเปลือกหุ้ม สารให้สีเหล่านั้นเป็นสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (carotenoid) หรือ แคโรทีโนโปรตีน โดยปกติการสกัดแคโรทีนอยด์จากเปลือกหุ้มสัตว์น้ำกลุ่มนี้มักใช้ตัวทำละลายหรือน้ำมันในการช่วยสกัด แต่วิธีนี้มีผลต่อคุณภาพของแคโรทีโนโปรตีน ทำให้โปรตีนไม่มีความเสถียร แคโรทีนอยด์ที่ได้ง่ายต่อการออกซิเดชันและลดคุณค่าทางสารอาหารได้ เนื่องจากหนึ่งในสามของเปลือกหุ้มสัตว์น้ำเป็นโปรตีน จึงมีการพัฒนาใช้เอนไซม์ในการเก็บเกี่ยวโปรตีนพร้อมกับแคโรทีนอยด์ในรูปแคโรทีโนโปรตีน (Simpson & Haard, 1985;

Manu-Tawiah & Haard, 1987) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สามารถใช้ย่อยเพื่อเก็บเกี่ยวสารให้สีอย่างแอสตาแซนทิน (astaxanthin) ได้ประมาณร้อยละ 80-90 และรงควัตถุร้อยละ 30-50 (Klomklao *et al*., 2009) การสกัดแคโรทีโนโปรตีนจากเปลือกกุ้งสามารถใช้เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น ทริปซิน ปาเปน และเปปซิน แต่ทริปซินให้ผลการเก็บเกี่ยวที่สูงกว่าการใช้เปปซินและปาเปนซึ่งได้ผลเก็บเกี่ยวประมาณร้อยละ 50 ในการสกัดที่อุณหภูมิห้องระยะนานเท่ากัน (Chakrabarti, 2002) แอสตาแซนทินในรูปโปรตีนที่สกัดด้วยทริปซินมีความทนทานต่อการเกิดออกซิเดชันได้มากกว่าแอสตาแซนทินรูปอิสระจึงทำให้การใช้ทริปซินเป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน (Sowmya *et al*., 2014)

ผลิตภัณฑ์น้ำปลา

น้ำปลาถือเป็นเครื่องปรุงรสที่นิยมอย่างหนึ่งในแถบประเทศเอเชีย น้ำปลาโดยทั่วไปผลิตจากการหมักปลา กุ้ง หมึก หรือเคยกับเกลือในสัดส่วน 3 ต่อ 1 ที่อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานอย่างน้อย 6 เดือนจนได้ของเหลวสีน้ำตาลใสที่มีกลิ่นรสเฉพาะ ระหว่างการหมักเอนไซม์ภายในปลาหรือสัตว์น้ำเกิดการย่อยสลายเนื้อเยื่อเหล่านั้นภายใต้ความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20-30 จนได้ของเหลวใสที่อุดมไปด้วยกรดอะมิโนอิสระ เปปไทด์สายสั้น และกลิ่นหอมของน้ำปลา กระบวนการผลิตน้ำปลาจะใช้พื้นที่การหมักและระยะเวลาหมักนานจึงมีความพยายามลดต้นทุนการผลิตโดยนำเอนไซม์ต่าง ๆ มาช่วยลดระยะเวลาการผลิตน้ำปลา การใช้ปาเปนจากยางมะละกอ โบรมีเลน (bromelain) จากสับปะรด และฟิซิน (ficin) จากยางผลมะเดื่อทำให้ลดเวลาการหมักลงเหลือ 2-3 สัปดาห์ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ซิสเตอินโปรติเอส (cysteine protease) และทำงานได้ดีในสภาวะกรดอ่อน อย่างไรก็ตามน้ำปลาที่ได้จากการหมักด้วยเอนไซม์เหล่านั้นมีสีน้ำตาลเข้มและมีกลิ่นรสที่แตกต่างออกไปจากน้ำปลาหมักแบบดั้งเดิม งานวิจัยหลายฉบับศึกษาการใช้ทริปซิน และไคโมทริปซินเพื่อช่วยไฮโดรไลท์โปรตีนในกระบวนการผลิตน้ำปลา บางงานวิจัยนำเครื่องในปลาที่อุดมไปด้วยเอนโดจีนัสโปรติเอส (endogenous protease) เพื่อช่วยลดเวลาการหมักน้ำปลา ซึ่งผลิตภัณฑ์น้ำปลาที่ใช้เอนไซม์ช่วยดังกล่าวจะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด โปรตีนที่ละลายน้ำ ปริมาณกรดอะมิโนและปริมาณกรดอะมิโนอิสระสูงกว่าน้ำปลาแบบดั้งเดิม (Klomklao *et al*., 2006)

สารปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารทะเล (Seafood flavoring)

กลิ่นรสอาหารทะเลเป็นที่ต้องการอย่างมากในผลิตภัณฑ์ปูเทียมและไส้กรอกปลา และ ณ ปัจจุบันยังไม่มีสารแต่งกลิ่นอาหารทะเลสังเคราะห์ใดทำหน้าที่ได้ดีกว่าสารปรุงแต่งกลิ่นอาหารทะเลสกัดจากธรรมชาติ ดังนั้นการสกัดกลิ่นรสอาหารทะเลด้วยเอนไซม์โปรติเอสจึงเป็นวิธีโดดเด่นที่ช่วยเพิ่มการสกัดปรุงแต่งกลิ่นอาหารทะเลอย่างมีประสิทธิภาพ การสารปรุงแต่งกลิ่นอาหารทะเลมักทำโดยใช้หัวกุ้งเป็นวัตถุดิบหลัก ก่อนกระบวนการต้มเคี่ยว มีการใช้เอนไซม์โคโรเลสเอ็น (Corolase N) ซึ่งผลิตจาก *A. oryzae* ช่วยย่อยโปรตีนจากหัวกุ้งเพื่อให้ได้ผลเก็บเกี่ยวมากที่สุด และจึงนำของเหลวที่สกัดได้ไปทำแห้งด้วยกระบวนการทำแห้งพ่นฝอย ผงปรุงแต่งกลิ่นอาหารทะเลประกอบไปด้วยกรดอะมิโนอิสระร้อยละ 9-12 ซึ่งส่วนใหญ่ คือ ทอรีน อาร์จินีน ไกลซีน และโพรลีน และมีอิโนซีนโมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate) เป็นกลุ่มนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ที่สำคัญ เครื่องปรุงแต่งกลิ่นรสจากกุ้งสามารถนำไปใช้เป็นผลิตภัณฑ์ซูริมิและเป็นที่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ข้าวเกรียบรสกุ้ง

การกำจัดผิวหนังสัตว์น้ำ

ปกติในอุตสาหกรรมแปรรูปทางประมงใช้วิธีการลอกหนังสัตว์น้ำออกด้วยเครื่องมือเชิงกลซึ่งโดยมากเป็นระบบอัตโนมัติ แต่สัตว์น้ำบางประเภท อย่างเช่น ปลากระเบนดาว (*Raja radiata*) มีลักษณะผิวหนังที่ยากต่อการลอกออกด้วยเครื่องมือ ดังนั้นการลอกด้วยมือคนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น อย่างไรก็ตามปัญหาการใช้แรงงานคนและต้นทุนการผลิตที่สูงขึ้นทำให้การประยุกต์เอนไซม์ในการกำจัดผิวหนังสัตว์น้ำเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ กระบวนการลอกหนังสัตว์น้ำด้วยเอนไซม์เริ่มต้นด้วยการทำให้คอลลาเจนของสัตว์น้ำเกิดการสูญเสียสภาพบางส่วนที่อุณหภูมิไม่สูงมาก ก่อนนำตัวอย่างไปแช่ในสารละลายที่มีเอนไซม์ที่อุณภูมิต่ำ (0-10°C) ผิวที่ติดอยู่กับสัตว์น้ำจะลอกและละลายออกมาจากผิวสัตว์น้ำ สารละลายแช่หนังสัตว์น้ำที่ใช้ประกอบไปด้วยเอนไซม์โปรติเอสที่ทำหน้าที่ย่อยโปรตีนไม่จำเพาะและเอนไซม์คาร์โบไฮเดรส (carbohydrases) ถึงแม้คาร์โบไฮเดรสดูเหมือนไม่จำเป็นต่อการกำจัดหนังสัตว์น้ำ แต่เอนไซม์ชนิดนี้จะทำงานร่วมกับโปรติเอสและช่วยให้หนังละลายน้ำได้มากขึ้น ผิวหนังเกิดการคลายตัวของชั้นคอลลาเจน ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของโปรติเอส หนังปลาทูน่า (*Thunnus* spp.) สามารถลอกออกได้โดยการลวกปลาในน้ำอุ่น (60°C) หลังจากนั้นด้วยแช่ตัวปลาในสารละลายที่มีส่วนผสมของโปรตีเอสและคาร์โบไฮเดรสเพื่อการย่อยสลายผิวหนัง ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส การลอกหนังปลาเฮร์ริง (*Clupea harengus*) สามารถทำได้โดยการใช้เอนไซม์เปปซินที่สกัดจากปลาค้อด (cod) (Haard, 1994) นอกจากนี้เอนไซม์ปาเปนสามารถใช้เพื่อช่วยลอกหนังหมึกได้ในสารละลายที่มีเกลืออ่อน ๆ การใช้เอนไซม์นั้นยังสามารถช่วยลอกเปลือกกุ้งให้ง่ายขึ้นอีกด้วย

ผลิตภัณฑ์คอลลาเจน

คอลลาเจนผลิตได้จากผิวหนัง กระดูก กระดูกอ่อน และเกล็ดของสัตว์น้ำซึ่งเป็นผลพลอยได้ในอุตสาหกรรมทางประมง การสกัดคอลลาเจนโดยทั่วไปใช้กระบวนการสกัดด้วยกรด ในขั้นตอนแรกของการสกัดมีจุดประสงค์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่ใช่คอลลาเจน รงควัตถุ และไขมันออกไปด้วยการแช่ในสารละลายด่าง ก่อนนำวัตถุดิบไปการสกัดคอลลาเจนหรือเจลาตินต่อด้วยกระบวนการใช้กรด กรดอะซิติกมักใช้กันอย่างแพร่หลายและคอลลาเจนที่ได้จะเรียกว่าคอลลาเจนที่ละลายด้วยกรด (acid soluble collagen) อย่างไรก็ตามกระบวนการใช้กรดมักให้ผลผลิตต่ำจึงมีการใช้เปปซินช่วยสกัดเพื่อเพิ่มผลผลิตของคอลลาเจน เปปซินตัดพันธะโควาเลนต์ที่เชื่อมโยงกันตรงบริเวณเทโลเปปไทด์ (telopeptide) ของโมเลกุลคอลลาเจนโดยไม่ทำลายโครงสร้างสายเกลียว ผลผลิตของคอลลาเจนที่ใช้เปปซินช่วยสกัดสูงถึงร้อยละ 45 ขณะที่การสกัดโดยใช้กรดให้ผลผลิตเพียงร้อยละ 11 (Nagai *et al*., 2002) อย่างไรก็ตามแหล่งของเปปซินที่ใช้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของคอลลาเจน โดยการใช้เอนไซม์เปปซินสกัดจากปลาทูน่าทำให้รูปแบบโปรตีนชนิด α และ β ของคอลลาเจนเกิดการย่อยสลาย ขณะที่เอนไซม์เปปซินจากสุกรไม่มีผลเสียต่อความสมบูรณ์ของคอลลาเจนที่สกัดได้

โปรตีนไฮโดรไลเสต (protein hydrolysate)

โปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์น้ำนิยมผลิตโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอสที่ทำหน้าที่ไฮโดรไลซ์หรือย่อยโปรตีนในมีขนาดเล็กลง การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์มีข้อดีมากกว่าการย่อยตัวเอง (autolysis) ที่เกิดจากเอนไซม์ภายในตัวปลาหรือการใช้สารเคมี การย่อยตัวเองอาจได้ผลผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตสูงแต่ใช้เวลานาน การเติมเอนไซม์เพิ่มช่วยให้ได้ผลผลิตที่สูงและเร็วขึ้น เอนไซม์ที่นิยมใช้ทางการค้า ได้แก่ เปปซิน ไคโมทริปซิน ทริปซิน ปาเปน คอลลาเจเนส แอลกาเลส (alcalase) นิวเตรส (neutrase) ฟลาโวไซม์ (flavourzyme) โปรทาเมกซ์ (protamex) และโปรเนสอี (pronase E) (Walker & Sweeney, 2002) โดยทั่วไปเอนไซม์แต่ละชนิดมีสภาวะการทำงานที่อุณหภูมิและค่า pH ที่เหมาะสมแตกต่างกัน ขนาดเฉลี่ยของน้ำหนัก

โมเลกุลของโปรตีนไฮโดรไลเสตเป็นปัจจัยมีที่สำคัญในแง่ของการทำหน้าที่เชิงชีวภาพ เปปไทด์ที่ได้จากโปรตีนไฮโดรไลเสตมีความหลากหลายในการออกฤทธิ์ต่างๆ การใช้ระบบอัลตราฟิลเตรชัน (ultra filtration) จะสามารถช่วยให้ได้กลุ่มของเปปไทด์ที่ต้องการนั้นแคบลง เช่น ได้ขนาดโมเลกุลที่ต้องการและมีฤทธิ์เฉพาะที่ต้องการ ซึ่งมักจะขึ้นอยู่กับแหล่งโปรตีนที่ใช้เริ่มต้น (Picot *et al.,* 2010) นอกจากนี้ระดับของการไฮโดรไลซ์ (degree of hydrolysis; DH) มีผลต่อไฮโดรไลเสตที่ได้ โดยค่า DH ที่ต่างกันเป็นผลให้สมบัติเชิงหน้าที่มีความแตกต่างกัน เช่น ไฮโดรไลเสตที่มีค่า DH สูงขึ้นการละลายของโปรตีนจะสูงขึ้น การใช้เอนไซม์ปริมาณมากทำให้ได้ค่า DH มาก แต่ระดับค่า DH ไม่อาจควบคุมผลลัพธ์ที่ไม่พึงประสงค์ได้ เช่น รสขมของโปรตีนไฮโดรไลเสตหรืออาจสูญเสียสมบัติเชิงหน้าที่บางอย่างไป ประโยชน์ที่สำคัญของโปรตีนไฮโดรไลเสต ได้แก่ การลดการแพ้อาหารจากโปรตีน การออกฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ ต้านออกซิเดชัน และต้านการอักเสบ และการลดภาวะความดันโลหิตสูง (Je *et al*., 2009) ซึ่งรายละเอียดกิจกรรมและการทำหน้าที่เชิงชีวภาพของโปรตีนไฮโดรไลเสตจากแหล่งต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 3

<u>การตรวจติดตามคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารทะเล</u>

เอนไซม์ไม่ได้นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ประมงเพียงเพื่อการปรับปรุงกระบวนการหรือแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเท่านั้น แต่เอนไซม์สามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นวิธีตรวจวิเคราะห์ ติดตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์ประมงได้ด้วย ตัวอย่างการประยุกต์ เช่น การวิเคราะห์หาสารพิษด้วยวิธีอีไลซา (Enzyme-linked immunosorbent assay: ELISA) ซึ่งเป็นการใช้ปฏิกิริยาที่จำเพาะของแอนติบอดี้ (antibody) และแอนติเจน (antigen) เอนไซม์ที่ใช้ในการตรวจติดตาม เช่น เพอร์ออกซิเดส และแอลคาไลน์ฟอสฟาเทส ซึ่งการตรวจวิเคราะห์จะสังเกตการเปลี่ยนสีที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดี้ ซึ่งความเข้มของสีสัมพันธ์กับปริมาณของแอนติเจนที่มีในตัวอย่างอาหาร ปัจจุบันชุดทดสอบอีไลซาประสิทธิภาพในการตรวจหาสารพิษในอาหารทะเล เช่น การตรวจสารพิษอัมพาต (paralytic shellfish poisoning) ในหอยทะเล (Garet *et al.,* 2010) และชุดตรวจสารพิษท้องร่วง (diarrhetic shellfish poisoning) ในปลาทะเล (Eberhart *et al.,* 2013) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบวิธีอีไลซากับวิธีทดสอบการยับยั้งเอนไซม์ฟอสฟาเตสสองเอ (phosphatase 2A) แล้ว วิธีที่สองให้ผลการตรวจพิษท้องร่วงที่ว่องไวและน่าเชื่อถือมากกว่า (Eberhart *et al.,* 2013)

การใช้วิธีตรวจสอบด้วยเอนไซม์สามารถบ่งชี้ความสดปลาและอาหารทะเล โดยติดตามปริมาณความเข้มข้นของ nucleotides (Aristoy *et al.,* 2010) โดยหลังจากสัตว์น้ำตายปริมาณอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate (ATP)) จะถูกย่อยสลายไปเป็นอะดีโนซีนโมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate (AMP)) และอิโนซีนโมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate (IMP)) อย่างรวดเร็วซึ่ง IMP ส่งผลต่อรสชาติที่ดีในสัตว์น้ำอย่างกุ้งและปลาทะเล (Luong & Male, 1992) การเปลี่ยนแปลงของ IMP ยังเกิดต่อไปโดยสลายเป็นอินซูลิน (inosine (INO)) อย่างช้า ๆ แต่กระบวนการนี้ชะลอได้ในสภาพอุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ INO ยังสามารถเปลี่ยนเป็นไฮโพแซนทีน (hypoxanthine (HX)) ซึ่งเป็นสารที่มีรสขมในสัตว์น้ำ ดังนั้นการตรวจวัดปริมาณของ IMP, INO และ HX จึงสะท้อนถึงความสดของอาหารทะเล ซึ่งสามารถตรวจวัดโดยการใช้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์อะดีโนซีนดีอะมิเนส (adenosinedeaminase (Ad)) เอนไซม์นิวคลีโอไซด์ ฟอสฟอเลส (nucleoside phosphorylase (Np)) และเอนไซม์แซนทีนออซิเดส (xanthine oxidase (Xo)) เพื่อใช้ทำปฏิกิริยาให้ได้กรดยูริคและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Cho *et al.,* 2000) ซึ่งสารทั้งสองบ่งบอกถึงความสดของอาหารทะเล และสามารถทดสอบความเข้มข้นด้วยการวัดการดูดกลืนแสง

ตารางที่ 3 ตัวอย่างโปรตีนไฮโดรไลเสตจากสัตว์น้ำที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

แหล่งโปรตีน	ลำดับกรดอะมิโน	เอนไซม์	กิจกรรมการออกฤทธิ์	อ้างอิง
โปรตีนจากหอย (*M. coruscus*)	Gly-Val-Ser-Leu-Leu-Gln-Gln-Phe-Phe-Leu	flavourzyme, neutrase, alcalase, papain, pepsin, α –chymotrypsin และ trypsin	-ยับยั้งการผลิต LPS-induced NO ใน RAW 264.7 macrophages	Kim *et al*. (2013)
เจลาตินหนังปลาฉลามน้ำเงิน (*Prionace glauca*)	Glu-Gly-Pro Gly-Pro-Arg Gly-Tyr Gly-Phe	collagenase และ trypsin	-ต้านอนุมูลอิสระ DPPH และการขจัดอนุมูล hydroxyl	Weng *et al*. (2014)
จลาตินกระเบนหลังหนาม	Gly-Phe-Pro-Gly-Gln-Asp-Gly-Leu Leu-Asn-Gly-Met-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Pro Gly-Val-Pro-Gly-Gln-Pro-Gly-Ser-Pro-Gly-Leu Leu-Asn-Gly-Met-Lys-Gly-Asp-Pro-Gly-Leu-Pro	proteases from *Bacillus subtilis* A26, alcalase และ neutrase	-ต้านอนุมูลอิสระ DPPH -Reducing powers -β-carotene bleaching -ยับยั้งการ scission ของ supercoiled plasmid DNA ที่เกิดจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล	Lassoued *et al*. (2015)
เจลาตินหนังปลาสเกต (*Okamejei kenojei*)	Leu-Gly-Pro-Leu-Gly-His-Gln Met-Val-Gly-Ser-Ala-Pro-Gly-Val-Leu	alcalase และ protease จาก *Aspergillus saitoi* ชนิด XIII	-ยับยั้งความดันโลหิต -ยับยั้งการทำงานเอนไซม์ ACE	Ngo *et al*. (2015)
โปรตีนกล้ามเนื้อหอยลาย (*Paphia undulate*)	Pro-His-Thr-Cys, Val-Gly-Try-Thr, Glu-Phe, Leu-Phe, and Glu-Gly-Ala-Lys, Trp-Ile or Trp-Leu	alcalase	-เพิ่มการตอบสนองของ lymphocyte ในหนูทดลอง	He *et al*. (2015)
โปรตีนปลาอลาสก้าพอลล็อค	Pro-Thr-Gly-Ala-Asp-Tyr	trypsin	-เพิ่มภูมิคุ้มกันในระบบร่างการและในเซลล์หนูทดลอง	Hou *et al*. (2016)

เอนไซม์ในการแปรรูปเนื้อสัตว์

ในอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์มีการประยุกต์เอนไซม์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและปรับปรุงคุณภาพเนื้อสัตว์ให้ดีขึ้น เนื้อสัตว์บางประเภทมีความเหนียวมากจึงต้องใช้เอนไซม์เพื่อทำให้เนื้อนุ่มหรือใช้เอนไซม์เพื่อเปลี่ยนหน้าตาของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ให้มีมูลค่าเพิ่มขึ้น ในอดีตในวงการอุตสาหกรรมแปรรูปเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่เน้นใช้เอนไซม์กลุ่มโปรติเอสเพื่อวัตถุประสงค์ในการย่อยสลายโปรตีน แต่ปัจจุบันเริ่มมีการใช้เอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนสเพื่อช่วยเชื่อมข้ามโปรตีนในเนื้อสัตว์มากขึ้น นอกจากนี้นวัตกรรมการใช้เอนไซม์ใหม่ ๆ อย่างเอนไซม์ไลเปส กลูทามิเนส และเปปทิเดสถูกนำมาใช้เพื่อปรับปรุงโครงสร้างโปรตีน กลิ่นรส และพัฒนาผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ มากขึ้น

โปรติเอสและเปปติเดส (proteases & peptidases)

การแปรรูปเนื้อสัตว์ส่วนใหญ่ผลิตจากส่วนของกล้ามเนื้อลาย (striated muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่ประกอบไปด้วยโปรตีนแอกทิน (actin) และไมโอซิน (myosin) โดยมีหน่วยย่อยของกล้ามเนื้อลาย คือ ซาร์โคเมีย (sarcomeres) ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ กล้ามเนื้อสัตว์บกจะมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากกว่าสัตว์น้ำ ซึ่งมีเอ็นสำหรับยึดมัดกล้ามเนื้อกับโครงกระดูก เอ็นประกอบไปด้วยโครงสร้างของคอลลาเจนและอิลาสทินซึ่งยากต่อการย่อยด้วยเอนไซม์และส่งผลต่อผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ที่มีความเหนียว ดังนั้นโปรตีเอสจึงมีบทบาทในการแปรรูปเนื้อสัตว์เพื่อทำให้เนื้อนุ่มมากขึ้นจึงมักนิยมนำมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมนี้ เอนไซม์โปรตีเอสที่นิยมใช้ ได้แก่ ปาเปน โปรมิเลน และฟิซิน นอกจากนี้โปรตีเอสยังช่วยกำจัดเศษกระดูกและปรับปรุงกลิ่นเนื้อสัตว์แปรรูปได้ด้วย

ปาเปนจากยางมะละกอ เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้ในการทำให้เนื้อนุ่ม เอนไซม์ปาเปนมักตัดพันธะเปปไทด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่เกี่ยวข้องกับกรดอะมิโนชนิดเบสและยังทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์เอสเตอเรส (esterase) ปาเปนสามารถย่อย myosin และ actin ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ในขณะที่โปรมิเลนย่อย myosin ได้ต่างออกไป ทั่วไปโปรตีเอสที่ได้จากพืชไม่สามารถย่อยคอลลาเจนได้ แต่สามารถย่อยเจลาตินซึ่งเป็นอนุพันธ์หนึ่งของคอลลาเจนที่สูญเสียสภาพความร้อนได้ (Ashie *et al*., 2002)

ค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ปาเปนนั้นแตกต่างกันไปตามลักษณะและความเข้มข้นของสารตั้งต้น ช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.0 ถึง 7.0 หากใช้สารตั้งต้นเป็นเจลาติน (gelatin) จะมีค่า pH ที่เหมาะสมคือ pH 5.0 หากใช้เคซิน (casein) และฮีโมโกลบิน (hemoglobin) เป็นสารตั้งต้นจะมี pH ที่เหมาะสมคือ pH 7.0 เอนไซม์ปาเปนมีเสถียรภาพสูงสุดในช่วง pH 5.0-9.0 และที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส และเมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์กลุ่มโปรตีเอสอื่น ๆ เอนไซม์ปาเปนมีความเสถียรในอุณหภูมิที่สูงกว่าซึ่งสามารถมีกิจกรรมได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-90 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่า 90 องศาเซลเซียสเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์ ไม่ว่าจะใช้วิธีการแช่เยือกแข็งหรือให้ความร้อนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้จึงป้องกันไม่ให้เกิดการย่อยเนื้อให้นุ่มมากเกินไปซึ่งทำให้เกิดข้อบกพร่องทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์ได้ (Whitehurst & Van Oort, 2009)

ไลเปส

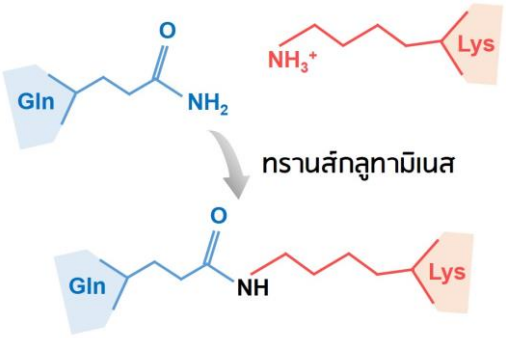
เอนไซม์ไลเปส (triacylglycerol lipase) เป็นเอนไซม์ที่สามารถใช้ในการสร้างกลิ่นของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกได้ ไม่ว่าจะเป็นเอนไซม์ไลเปสที่มาจากเชื้อจุลินทรีย์หรือได้จากการทำบริสุทธิ์ทางการค้าก็สามารถใช้ประยุกต์ได้เหมือนกัน เอนไซม์ไลเปสจัดเป็นกลุ่มเอนไซม์ esterases ที่พบได้ในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ในธรรมชาติ รวมทั้งสัตว์ พืช เห็ดและแบคทีเรีย เอนไซม์ไลเปสมีบทบาทสำคัญในการย่อยไขมันโดยการเปลี่ยน triacylglycerols ที่ไม่ละลายน้ำได้ให้เป็นกรดไขมันที่ละลายน้ำได้มากขึ้นและ di- หรือ monoacylglycerols ซึ่งสามารถดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้ เอนไซม์ไลเปสจัดอยู่ในกลุ่มเอนไซม์ α/β-hydrolases ที่มีองค์ประกอบกรดอะมิโน Ser-Asp/Glu-His ตรงตำแหน่งเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีความคล้ายคลึงกับลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์โปรตีเอส

ในเนื้อสัตว์มีเนื้อเยื่อไขมันซึ่งสามารถย่อยสลายได้เป็นกรดไขมันอิสระซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและเปลี่ยนเป็นสารระเหยจากการเกิดออกซิเดชัน คุณภาพกลิ่นของเนื้ออบแห้งได้รับผลอย่างมากจากปฏิกิริยาของเอนไซม์นี้ นอกจากนี้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสขึ้นอยู่กับคุณภาพวัตถุดิบเนื้อ ชนิดของเนื้อสัตว์ อายุการเก็บรักษาและส่วนผสมของเครื่องปรุง ตลอดจนสภาวะในกระบวนการเตรียมเนื้อสัตว์ก่อนการแปรรูป เช่น อุณหภูมิ เวลา ปริมาณน้ำอิสระ (water

activity) ศักยภาพการเกิดรีดักชัน (redox potential) และปริมาณเกลือ ดังนั้นการควบคุมระบบเอนไซม์ไลเปสในกล้ามเนื้อส่วนใหญ่เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการแปรรูปและเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ต่าง ๆ

ทรานส์กลูทามิเนส

เอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนส หรือ TGase สามารถใช้เป็นเครื่องมือปรับปรุงโครงสร้างของผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์แปรรูปได้ เอนไซม์ TGase จัดอยู่ในกลุ่ม acyltransferase ที่ทำหน้าที่สร้างพันธะโควาเลนต์ที่เชื่อมต่อโมเลกุลของโปรตีนในโครงสร้างอาหารผ่านปฏิกิริยา acyl-transfer โดยเป็นการเชื่อมประสานระหว่างหมู่ γ-carboxyamine ของกรดอะมิโน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้เอคิล (acyl-donor) และหมู่เอมีนปฐมภูมิ (primary amine group) ของกรดอะมิโน กลุ่มกรดอะมิโนหลัก หรือผู้ซึ่งท าหน้าที่เป็นตัวรับเอซิล (acyl-acceptor) (รวมถึงกลุ่ม ε-amino บนสายโปรตีนบางชนิด) การเชื่อมต่อที่เกิดขึ้นทำให้ได้พันธะ ε-γ-glutamyl-lysine (ดังภาพที่ 3) เอนไซม์ TGase จึงทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างพันธะภายในและภายนอกของโปรตีน ซึ่งการเกิดพันธะนี้ขึ้นอยู่กับการมีปริมาณกรดอะมิโน glutamic acid และ lysine ในอาหาร



ภาพที่ 3 เอนไซม์ทรานส์กลูทามิเนสทำหน้าที่เชื่อมต่อพันธะ ε-γ-glutamyl-lysine

เอนไซม์ TGase พบได้ในเซลล์เนื้อเยื่อและของเหลวในสิ่งมีชีวิต ซึ่งทำหน้าที่ช่วยให้เลือดแข็งตัว สมานแผล และกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับร่างกาย ในช่วงปี ค.ศ. 1980 เริ่มมีการนำเอนไซม์ TGase ที่สกัดได้จากจุลินทรีย์ *Streptomyces* และ *Streptoverticillium* มาประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารรวมถึงการแปรรูปเนื้อสัตว์ เอนไซม์ TGase จากแหล่งต่างกันจะทำหน้าที่แตกต่างกัน เอนไซม์ TGase จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถทำหน้าที่ดัดแปลงโปรตีนอย่าง myosin และ actin ได้ดีกว่าเอนไซม์จากจุลินทรีย์ น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ TGase จากสุกรมีขนาด 75 kDa ขณะที่เอนไซม์จากจุลินทรีย์มีขนาดน้ำหนักโมเลกุล 38 kDa แต่เอนไซม์ทั้งสองแหล่งจำเป็นต้องอาศัยโคเฟกเตอร์อย่าง Ca^{2+} ช่วยในการทำงาน และทำงานได้ดีที่สุดที่ค่า pH ระหว่าง 5-8 ณ อุณหภูมิ 40-70°C

กลูทามิเนส

กรดกลูตามิก (l-glutamic acid) เป็นกรดอะมิโนที่รู้จักกันดีว่าเป็นแหล่งของรสชาติในอาหาร ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ทั่วไปที่อุดมไปด้วยกรดกลูตามิก คือ ซอสถั่วเหลืองที่นิยมใช้เป็นเครื่องปรุงรสและประกอบอาหารต่าง ๆ ดังนั้นเอนไซม์กลูทามิเนส (glutaminase) จึงมีบทบาทสำคัญในการสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์อาหาร ในการผลิตไส้กรอกมีการเติม

เอนไซม์กลูทามิเนสเพื่อช่วยเพิ่มรสชาติ การใช้เอนไซม์กลูทามิเนสในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อเพิ่มปริมาณกรดกลูตามิกในผลิตภัณฑ์ทำให้รสชาติอาหารมีความอร่อย (umami) มากขึ้น ในกระบวนการแปรรูปเนื้อสัตว์จึงใช้เอนไซม์กลูทามิเนสเร่งการสลาย l-glutamine ให้ได้ l-glutamic acid เพิ่มรสชาติแก่ผลิตภัณฑ์มากขึ้น

เอนไซม์กลูทามิเนสพบได้หลายแหล่งทั้งในแบคทีเรียและยูคาริโอท ปัจจุบันมีเอนไซม์กลูทามิเนสทางการค้าผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* เอนไซม์นี้สามารถทำงานได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียสและที่ค่า pH เป็นกลาง แต่ในภาวะมีเกลือความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์กลูทามิเนสได้ ซึ่งอาจเป็นข้อจำกัดในเอนไซม์ชนิดนี้ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์เอนไซม์กลูทามิเนสจาก *A. oryzae* ไม่สามารถทำงานได้ที่ความเข้มข้นเกลือมากกว่า 3 โมลาร์ (Nandakumar *et al*., 2003) จึงมีความพยายามหาแหล่งเอนไซม์ที่มีความทนต่อเกลือจากแบคทีเรียในทะเล เช่น แบคทีเรีย *Micrococcus luteusm* K-3 ซึ่งสามารถทนเกลือได้ถึงร้อยละ 16 (w/v) จึงเป็นไปได้ที่จะพบเอนไซม์กลูทามิเนสที่ทนเกลือเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อาหารที่เกลือเข้มข้นสูง (Moriguchi *et al*., 1994)

บมสรุป

การพัฒนาและใช้เทคโนโลยีเอนไซม์มีอิทธิพลอย่างมากต่ออุตสาหกรรมอาหาร โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพหล่านี้มีความจำเพาะสูง ใช้งานในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นกระบวนการที่ยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ถือเป็นเครื่องมือที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในการแปรรูปอาหาร การเปลี่ยนแปลงของอาหารจากอิทธิพลของเอนไซม์เป็นสิ่งสำคัญในการพัฒนาและการขยายตัวของอุตสาหกรรมอาหารในหลากหลายประเภท เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ได้นำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์นม อาหารทะเลและเนื้อสัตว์เพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตอย่างมีประสิทธิภาพ ปรับปรุงคุณภาพและเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์อาหาร เอนไซม์แต่ละชนิดนั้นมีกลไกการทำงานและปัจจัยที่ส่งผลต่อการเกิดปฏิกิริยาแตกต่างกัน ดังนั้นจึงควรพิจารณาอย่างรอบครอบเพื่อเพิ่มผลประโยชน์สูงสุดของปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ใช้และเข้าใจอย่างลึกซึ้งเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์ในอาหารประเภทต่าง ๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาและตรวจสอบความปลอดภัยของเอนไซม์ชนิดใหม่สำหรับใช้แปรรูปอาหารเป็นสิ่งที่ต้องคำนึง และการประยุกต์เอนไซม์ในอาหารต้องสอดคล้องกับความต้องการของผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

Ahmed, R., Getachew A. T., Cho, Y. J., & Chun, B.-S. (2018). Application of bacterial collagenolytic proteases for the extraction of type I collagen from the skin of bigeye tuna (*Thunnus obesus*). *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 44-51.

Aristoy, M. C., Mora, L., Hernández-Cázares, A. S., & Toldrá, F. (2010). “Nucleotides and nucleosides,” in Handbook of Seafood and Seafood Products Analysis, eds Nollet L. M. L., Toldrá F., editors. (Boca Raton, FL: CRC Press, 58–68.

Ashie, I. Sorensen, T., & Nielsen P. (2002) Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *Journal of Food Science, 67*(6), 2138-2142.

Briki, S., Hamdi, O., & Landoulsi, A. (2016). Enzymatic dehairing of goat skins using alkaline protease from *Bacillus* sp. SB12. *Protein Expression and Purification, 121*, 9-16.

Chakrabarti, R. (2002). Carotenoprotein from tropical brown shrimp shell waste by enzymatic process. *Food Biotechnology, 16*, 81–90.

Cho, Y. J., Im, Y. S., Seo, D. H., Kim, T. J., Min, J. G., & Choi Y. J. (2000). Enzymatic method for measuring ATP related compounds in Jeotkals. *Journal of the Korean Fisheries Society, 33*, 16-19.

Daniel, R. M., & Danson, M. J. (2013). Temperature and the catalytic activity of enzymes: A fresh understanding. *FEBS Letters*, *587*(17), 2738-2743.

de Wit, J. N., & van Hooydonk, A. C. (1996). Structure, functions and applications of lactoperoxidase in natural antimicrobial systems. Netherlands Milk & Dairy Journal, *50,* 227–244.

Eberhart, B. T., Moore, L. K., Harrington, N., Adams, N. G., Borchert, J., Trainer, V. L. (2013) Screening tests for the rapid detection of diarrhetic shellfish toxins in Washington State. *Marine Drugs. 11*(10), 3718-34.

Garet, E., González-Fernández, A., Lago, J., Vieites, J. M., & Cabado, A. G. (2010) Comparative evaluation of enzyme-linked immunoassay and reference methods for the detection of shellfish hydrophilic toxins in several presentations of seafood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58*(3), 1410-1415.

Haard, N. F. (1994). Protein hydrolysis in seafoods. In F. Shahidi, & J.R. Botta. (Eds), *Seafood Chemistry Processing Techonology and Quality*. (pp. 10–33). New York: Chapman & Hall.

He, X. Q., Cao, W. H., Pan, G. K., Yang, L., & Zhang, C. H. (2015). Enzymatic hydrolysis optimization of *Paphia undulata* and lymphocyte proliferation activity of the isolated peptide fractions. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 95*, 1544-1553.

Henriksson, G., Akinb, D. E., Slomczynski, D., & Eriksson, K. L. (1999). Production of highly efficient enzymes for flax retting by *Rhizomucor pusillus*. *Journal of Biotechnology, 68*(2-3), 115-123.

Hou, H., Fan, Y., Wang, S., Si, L., & Li, B. (2016). Immunomodulatory activity of Alaska pollock hydrolysates obtained by glutamic acid biosensor – Artificial neural network and the identification of its active central fragment. *Journal of Functional Foods, 24*, 37-47.

Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., & Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, *42*, 1266-1272.

Kailasapathy, K., & Lam, S. H. (2005). Application of encapsulated enzymes to accelerated cheese ripening. *International Dairy Journal*, *15*, 929-939.

Kim, E. K., Kim, Y., Hwang, J., Kang, S. H., Choi, D., Lee, K., & Park P. (2013). Purification of a novel nitric oxide inhibitory peptide derived from enzymatic hydrolysates of *Mytilus coruscus*. *Fish & Shellfish Immunology, 34*, 1416-1420.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H. & Simpson, B. K. (2006). Effects of the addition of spleen of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) on the liquefaction and characteristics of fish sauce made from sardine (*Sardinella gibbosa*). *Food Chemistry*, *98*, 440-452.

Klomklao, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kishimura, H., & Simpson, B. K. (2009). Extraction of carotenoprotein from black tiger shrimp shell with the aid of bluefish trypsin. *Journal of Food Biochemistry*, *33*, 201-217.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M. C., Barkia, A., & Nasri, M. (2015). Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods, 13*, 225-238.

Luong, J. H. T., & Male, K. B. (1992). Development of a new biosensor system for the determination of the hypoxanthine ratio, an indicator of fish freshness. *Enzyme and Microbial Technology, 14*, 125–130.doi:10.1016/0141-0229(92)90169-O.

Manu-Tawiah, W., & Haard, N. F. (1987). Recovery of carotenoprotein from the exoskeleton of snow crab, Chionoecetes opilio. *Canadian Institute of Food Science and Technology, 20*, 31-35.

Marks, N. E., Grandison, A. S., & Lewis, M. J. (2008). Use of hydrogen peroxide detection strips to determine the extent of pasteurization in whole milk. *International Journal of Dairy Technology*, *54*(1), 20-22. doi:10.1111/j.0134-727X.2001.00008.x.

McSweeney, P. L. H., & Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening. *A review Le Lait, 80*(3), 293-324.

Moriguchi, M., Sakai, K., Tateyama, R., Furuta, Y., & Wakayama, M. (1994). Isolation and characterization of salt-tolerant glutaminases from marine *Micrococcus luteus* K-3. *Journal of Fermentation and Bioengineering, 77*, 621.

Nagai, T., Nagamori, K., Yamashita, E., & Suzuki, N. (2002). Collagen of octopus *Callistoctopus arakawai* arm. *International Journal of Food Science and Technology*, *37*, 285-289.

Nandakumar, R., Yoshimune, K., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (2003). Microbial glutaminase: biochemistry, molecular approaches and applications in the food industry. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *23*, 87-100.

Ngo, D. H., Kang, K. H., Ryu, B., Vo, T. S., Jung, W. K., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2015). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry, 174*, 37-43.

Okigbo, L. M., Richardson, G. H., Brown, R. J., & Ernstrom, C. A. (1985). Interactions of Calcium, pH, Temperature, and Chymosin During Milk Coagulatio. *Journal of Dairy Science*, *68*, 3135-3142.

Picot, L., Ravallec, R., Fouchereau-Péron, M., Vandajon, L., Jaouen, P., & Chaplain-Derouiniot, M. (2010). Impact of ultrafiltration and nanofiltration of an industrial fish protein hydrolysate on its bioactive properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 90*, 1819-1826.

Sachindra, N. M., & Mahendrakar, N. S. (2011). Effect of Protease Treatment on Oil Extractability of Carotenoids from Shrimp Waste. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, *20*(1), 22-31.

Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., & Kishimura, H. (2014). Antioxidant Activity of Gelatin Hydrolysate Produced from Fish Skin Gelatin Using Extracellular Protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Processing and Preservation*, *39*(4). 394-403.

Shahidi, F., & Kamil, J. Y. (2001). Enzymes from fish and aquatic invertebrate and their application in the food industry. *Trends in Food Science & Technology*, *12*, 435-464.

Simpson, B. K., & Haard, H. F. (1985). The use of proteolytic enzymes to extract carotenoproteins from shrimp wastes. *Journal of Applied Biochemistry, 7*, 212–222.

Sowmya, R., Ravikumar, T. M., Vivek, R., Rathinaraj, K., & Sachindra, N. M. (2014). Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology, 51*(11), 3199–3207. doi: 10.1007/s13197-012-0815-8.

Spohner, S. C., Schaum, V., Quitmann H., & Czermak, P. (2016). *Kluyveromyces lactis*: An emerging tool in biotechnology. *Journal of Biotechnology, 222*, 104-116. doi:10.1016/j.jbiotec.2016.02.023.

Walker, J. M., & Sweeney, P. J. (2002). Production of Protein Hydrolysates Using Enzymes. In J.M. Walker (Eds) *The Protein Protocols Handbook*. New York: Humana Press.

Weng, W., Tang, L., Wang, B., Chen, J., Su, W., Osako, K., & Tanaka, M. (2014). Antioxidant properties of fractions isolated from blue shark (Prionace glauca) skin gelatin hydrolysates. *Journal of Functional Foods, 11*, 342–351.

Whitehurst, R. J., & Van Oort, M. (2009). Enzymes in Food Technology (2th ed.), Oxford: Blackwell Publishing Ltd.