ชื่อเรื่อง **การศึกษาการใช้โปรติเอสช่วยในการสกัดอะฟลาทอกซิน สำหรับการตรวจวัดด้วยอิไลซา**

ผู้วิจัย **นายครองศักดา ภัคธนกนก**

สาขาวิชา **เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร**

ปีการศึกษา **2561**

บทคัดย่อ

สารพิษอะฟลาทอกซินมีคุณสมบัติยึดจับได้ดีบนโมเลกุลโปรตีนบางชนิด ทำให้การสกัดอะฟลาทอกซินจึงทำได้ไม่สมบูรณ์ การวิจัยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการนำเอนไซม์โปรติเอสมาช่วยเสริมประสิทธิภาพในขั้นตอนการสกัดอะฟลาทอกซินออกจากวัตถุดิบอาหารชนิดโปรตีนสูง การทดลองได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดของโบรมิเลนและเซรีนโปรติเอส โดยศึกษาผลของเวลาการบ่ม อุณหภูมิ และพีเอช วัตถุดิบอาหารชนิดโปรตีนสูงจำนวน 6 ชนิดถูกเลือกมาเพื่อศึกษาความชอบในการยึดจับ การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินที่หลุดออกมาจากตัวอย่างใช้วิธีอิไลซาจากชุดทดสอบสำเร็จรูป ผลการศึกษาปริมาณสารได้กลับคืนชี้ว่าอะฟลาทอกซินยึดจับกากถั่วเหลืองได้ดีที่สุด โดยปริมาณสารได้กลับคืนของอะฟลาทอกซินน้อยที่สุดเท่ากับ 80.03% เอนไซม์โบรมิเลนและเซรีนโปรติเอสสามารถย่อยสลายกากถั่วเหลือง รำข้าว และนมได้ดี โดยปล่อยอะฟลาทอกซินออกมาได้มากขึ้น 17% และมีปริมาณสารได้กลับคืนมากขึ้น 97-98% ขึ้นไป ผลการศึกษาชี้ว่าประสิทธิภาพของโบรมิเลนและเซรีนโปรติเอสไม่แตกต่างกัน (p>0.05) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมคือเวลาบ่ม 60 นาที อุณหภูมิ 37°C pH=7 และเวลาบ่ม 60 นาที อุณหภูมิ 37°C pH=9 สำหรับเอนไซม์แต่ละชนิดตามลำดับ ผลการวิจัยนี้นำไปสู่การแนะนำว่าควรจะใช้เอนไซม์โปรติเอสเข้าไปเสริมในขั้นตอนการสกัดอะฟลาทอกซิน เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินด้วยวิธีอิไลซา

Research Title	Study on Protease Assisted Extraction for ELISA Determination of Aflatoxin
Researcher	Mr. Krongsakda Phakthanakanok
Program	Food Processing Technology
Academic Year	2018

Abstract

The aflatoxin had a characteristic of binding well on the protein molecules become to an extraction procedure was incomplete. The purpose of the research was to study the use of some proteases to improve efficiency in the step of extraction the aflatoxin out of the high-protein food materials. The methodologies were to compare efficiency of extraction between cysteine and serine proteases by evaluated the optimum of incubation time, temperature and pH. Six kinds of high-protein food materials were selected to study a binding preference. The released aflatoxins were evaluated by quantitative aflatoxin ELISA test kit. The results of a recovery percentage indicated that, soy bean meal are the best of binding sources by showed 80.03% of recovery. Soybean meal, rice bran and milk were good hydrolyzed by both of cysteine and serine proteases which showed that the aflatoxins were released increasingly up to 17% including they were showed increasing of recovery up to 97-98%. The results indicated the efficiency of cysteine and serine protease were not different significantly (p>0.05) by showed the optimum values; 60 minutes, 37°C and pH=7 and 60 minutes, 37°C and pH=9, in each enzyme, respectively. This research suggested that the quantitative evaluation of aflatoxin by ELISA from high-protein food materials should add another special procedure by using some protease in the aflatoxin extraction step for the best results of analysis.

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาเพื่อให้เข้าใจถึงลักษณะของการยึดเหนี่ยวอย่างแน่นแฟ้นของสารพิษอะฟลาทอกซินกับตัวอย่างอาหารชนิดโปรตีนสูง การศึกษาครั้งนี้อาจก่อให้เกิดความเข้าใจที่จะตระหนักมากขึ้นว่าปริมาณอะฟลาทอกซินที่ตรวจพบโดยวิธี ELISA แบบปกตินั้น อาจไม่ใช่ปริมาณที่แท้จริง บางส่วนอาจถูกยึดเหนี่ยวไว้กับโมเลกุลโปรตีน การนำเอนไซม์โปรติเอสมาประยุกต์ใช้ในขั้นตอนสกัด โดยย่อยสลายตัวอย่างโปรตีนในระดับหนึ่ง จะช่วยให้ปริมาณอะฟลาทอกซินที่ถูกโปรตีนยึดเหนี่ยวนั้นถูกปลดปล่อยออกมาได้เกือบทั้งหมด เมื่องานวิจัยนี้ถูกเผยแพร่ออกไป ผู้วิจัยเชื่อว่าในอนาคต อาจจะมีการพัฒนาชุดทดสอบอะฟลาทอกซินด้วยวิธี ELISA ที่ได้ประยุกต์นำเอนไซม์โปรติเอสเข้ามาเป็นส่วนหนึ่งที่สำคัญในขั้นตอนการสกัดตัวอย่างอาหารชนิดโปรตีนสูง ทำให้ชุดทดสอบมีประสิทธิภาพมากขึ้น แม่นยำมากขึ้นและเกิดความก้าวหน้าทางวิชาการ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ มหาวิทยาลัยราชภัฏหมู่บ้านจอมบึง สำหรับการสนับสนุนเครื่องแยกโปรตีน (FPLC) ในการศึกษาวิจัยนี้ และขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อนคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจในการทำงานวิจัยนี้ด้วยดีเสมอมา

ครองศักดา ภัคธนกนก

26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2561

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพประกอบ	ช

บทที่

1	**บทนำ**	1
	1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	3
	1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	3
	1.4 สมมุติฐาน	3
	1.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย	4
	1.6 ประโยชน์ที่จะได้รับ	4
2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	5
	2.1 สารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin)	5
	2.2 การปนเปื้อนอะฟลาทอกซินในผลผลิตทางการเกษตร	7
	2.3 การยึดเหนี่ยวของอะฟลาทอกซินกับสารชีวโมเลกุล	8
	2.4 วิธีวิเคราะห์อะฟลาทอกซินและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	10
3	**วิธีดำเนินการวิจัย**	15
	3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ	15
	3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย	16
	ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ที่มีต่อ Casein	16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	ตอนที่ 2 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ที่มีต่อตัวอย่างโปรตีน	17
	ตอนที่ 3 การศึกษาการยึดเหนี่ยวของอะฟลาทอกซินกับตัวอย่างโปรตีน	18
	ตอนที่ 4 การศึกษาการใช้เอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ช่วยในการสกัด	18
4	**ผลการวิเคราะห์ข้อมูล**	20
	4.1 ผลการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวอย่างโปรตีนชนิดต่างๆ ด้วยเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin	20
	4.2 ผลการศึกษาความสามารถในการยึดเหนี่ยวของอะฟลาทอกซินบนตัวอย่างโปรตีน	23
	4.3 ผลการศึกษาการปลดปล่อยอะฟลาทอกซินออกจากตัวอย่างโปรตีนโดยการใช้เอนไซม์โปรติเอสช่วยในขั้นตอนการสกัด	26
5	**สรุป อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ**	30
	5.1 สรุป	30
	5.2 อภิปรายผล	32
	5.3 ข้อเสนอแนะ	32
บรรณานุกรม		33
ภาคผนวก		36
	ภาคผนวก ก วิธีอ้างอิงมาตรฐานที่ใช้ในการทดลอง	37
	ภาคผนวก ข ข้อมูลดิบบางส่วนจากงานวิจัย	41
	ภาคผนวก ค ผลงานวิชาการจากงานวิจัย	47
ประวัติผู้วิจัย		55

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยกากถั่วเหลือง (soy bean meal)..... 21
4.2 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยรำข้าว..... 22
4.3 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยปลาป่น..... 22
4.4 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยสาหร่าย..... 22
4.5 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยเต้าหู้แข็ง..... 22
4.6 กิจกรรมเอนไซม์ Bromelain และ Trypsin ในการย่อยนม..... 23
4.7 วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินที่อาจมีปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างโปรตีน 24
4.8 วิเคราะห์ร้อยละปริมาณสารได้กลับคืน (%recovery) ของอะฟลาทอกซินที่เติม (spike) ลงไป 40 ppb..... 24
4.9 ร้อยละของการยืดเหนี่ยวอะฟลาทอกซินของตัวอย่างโปรตีน..... 25
4.10 วิเคราะห์ร้อยละปริมาณสารได้กลับคืน (%recovery) ของอะฟลาทอกซินที่เติม (spike) ลงไป 40 ppb และใช้เอนไซม์ Bromelain ช่วยในการสกัด..... 26
4.11 เปรียบเทียบร้อยละปริมาณสารได้กลับคืน (% recovery) ของอะฟลาทอกซินระหว่างวิธีปกติที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Normal method) กับวิธีใช้เอนไซม์ Bromelain (Protease method)..... 27
4.12 วิเคราะห์ร้อยละปริมาณสารได้กลับคืน (%recovery) ของอะฟลาทอกซินที่เติม (spike) ลงไป 40 ppb และใช้เอนไซม์ Trypsin ช่วยในการสกัด..... 27
4.13 เปรียบเทียบร้อยละปริมาณสารได้กลับคืน (% recovery) ของอะฟลาทอกซินระหว่างวิธีปกติที่ไม่ใช้เอนไซม์ (Normal method) กับวิธีใช้เอนไซม์ Trypsin (Protease method)..... 28
4.14 เปรียบเทียบปริมาณอะฟลาทอกซินที่ถูกปลดปล่อยออกมา (% Releasing) ระหว่างการใช้เอนไซม์ Bromelain และ Trypsin..... 28

สารบัญภาพประกอบ

ภาพประกอบที่ **หน้า**

1.1	กรอบแนวความคิดในการศึกษาวิจัย.....	4
2.1	แสดงโมเลกุลของอะฟลาทอกซินและอนุพันธุ์ของมันซึ่งปัจจุบันพบว่าอะฟลาทอกซินมีทั้งหมด 3 ชนิดหลักได้แก่ B G และ M ขณะที่มีอนุพันธุ์จำนวน 28 ชนิด.....	7
2.2	อะฟลาทอกซิน B1 ซึ่งมีความเป็นพิษสูงที่สุด.....	7
2.3	โครงสร้างและองค์ประกอบของวงแหวนอะฟลาทอกซิน.....	8
2.4	แสดงโครงสร้างสามมิติของอะฟลาทอกซินในขณะที่ยึดเหนี่ยวอยู่กับโปรตีน 3F88.....	9
2.5	วิธีทางภูมิคุมกัน Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) แบบแข่งขัน.....	10
2.6	ลักษณะของผลการวิเคราะห์อะฟลาทอกซินแต่ละชนิดด้วยวิธี HPLC....	12
3.1	เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (ซ้าย) และ ชุดทดสอบ Aflatoxin Veratox NEOGEN Corporation, USA. (ขวา) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้.....	15
3.2	กราฟมาตรฐานสารละลาย Tyrosine ที่ระดับความเข้มข้น 0.1-1.0 mg/mL.....	19
4.1	Optimum pH ของเอนไซม์ Bromelain.....	20
4.2	Optimum pH ของเอนไซม์ Trypsin.....	21
4.3	แผนภูมิแท่งจากตารางผลการทดลองที่ 4.14 เปรียบเทียบปริมาณ อะฟลาทอกซินที่ถูกปลดปล่อยออกมา (% Releasing) ระหว่างการใช้เอนไซม์ Bromelain และ Trypsin.....	29