รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพความสดของกั้งตั๊กแตนภายหลังการจับ

Changes in Postharvest Quality of Mantis Shrimp (*Harpiosquilla raphidea*)

นางสาวจันทิรา วงศ์วิเชียร

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

บทคัดย่อ

การศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดการเก็บรักษา ($p<0.05$) และหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ($p<0.05$) ผลการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน โดยการบ่มกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่อุณหภูมิ (30–80 องศาเซลเซียส) และ pH ต่างๆ (2.0–12.0) พบว่าการย่อยสลายตัวสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเท่ากับ 4.0 และ 9.0 และพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A และ E-64 สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุดทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในเนื้อกั้งตั๊กแตนบดเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและชนิดแอสปาติก

Abstract

Autolytic activity of mantis shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) muscle during 10-day iced storage was characterized. Autolytic degradation of mantis shrimp muscle increased throughout 10 days of iced storage ($p<0.05$). After day 4, mantis shrimp muscle showed sharply increases in TCA-soluble peptide content ($p<0.05$). Proteases of mantis shrimp mince was characterized. Mantis shrimp mince were incubated at different temperatures (30–80°C) and pH (2.0-12.0). The highest autolysis activity was exhibited at 60 °C. The optimum pH for the autolysis of mantis shrimp mince was found at 4.0 and 9.0. The proteinase inhibitors, E-64 and Pepstatin A showed the greatest inhibition of autolysis at both acid and alkali pHs revealing that proteinases found in mantis shrimp mince are cysteine proteinases and aspartic proteinases.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

จันทิรา วงศ์วิเชียร
ผู้วิจัย
สิงหาคม 2557

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	i
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	ii
กิจติกรรมประกาศ	iii
สารบัญเรื่อง	iv
สารบัญภาพ	v
สารบัญตาราง	vi
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ข้อมูลทั่วไปของกั้งตั๊กแตน	5
2.2 โปรตีน	6
2.3 เอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase)	10
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนส	15
2.5 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	25
4.1 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง เป็นเวลา10 วัน	25
4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน	27
4.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน	28
4.4 การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน	30
บทที่ 5 สรุป วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ	34
บรรณานุกรม	39
ภาคผนวก	46
ภาคผนวก ก การวิเคราะห์ทางเคมี	47
ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางสถิติ	53
ประวัตินักวิจัย	56

สารบัญภาพ (List of illustrations)

ภาพที่		หน้า
2.1	กั้งตั๊กแตน (*Harpioguila raphidea*)	5
2.2	ภาพโครงสร้างไมโอซิน	7
2.3	ภาพโครงสร้างจี-แอกตินตัวเลขแสดงโดเมน	8
2.4	ภาพแสดงการจัดเรียงตัวของเอฟ-แอกตินโทรโปไมโอซินและโทรโปนิน	9
4.1	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 วัน	26
4.2	รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง เป็นเวลา 10 วัน ในน้ำแข็ง	26
4.3	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที	27
4.4	รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที	28
4.5	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2-12 อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	29
4.6	รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2-12 อุณหภูมิ 60 องศเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	29
4.7	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	31
4.8	ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	31
4.9	รูปแบบโปรตีนของเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	32
4.10	รูปแบบโปรตีนของเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที	32

สารบัญตาราง (List of tables)

ตารางที่		หน้า
2.1	สภาวะที่เหมาะสมและการย่อยของโปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ	13
2.2	ตัวอย่างของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเนส	17
4.1	ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 60 นาทีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นของกั้งตั๊กแตน	33

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กั้งตั๊กแตนมีชื่อสามัญว่า *Mantis shrimp* (สุภาวดี, 2525; นงนุช, 2551) กั้งตั๊กแตนมีลักษณะแบนแบบบนลงล่างและมีลำตัวยาวส่วนท้องแบนกว้างมีเปลือกคลุมเฉพาะส่วนหัวและ 4 ปล้องแรกของส่วนอกหางแบนกว้างและมักมีสันตรงกลางตาเป็นก้าน หนวดคู่แรกใหญ่และแยกออกเป็น 2 แฉก แมกซิลลิเปด คู่ที่ 2 มีขนาดใหญ่และมีลักษณะเป็นก้ามสับเรียกว่า แรบทอเรียลคลอ (Raptorial claw) รยางค์ของส่วนท้องไม่ได้ใช้อุ้มไข่แต่ใช้สำหรับหายใจ (นงนุช, 2551) กั้งตั๊กแตนสามารถว่ายน้ำได้เช่นเดียวกับกุ้งโดยอาศัยรยางค์ส่วนท้องโบกพัด แต่ปกติจะคลานไปมาหาอาหารบริเวณหน้าดินเป็นส่วนใหญ่ (สุรินทร์, 2547) เนื่องจากกั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์จำพวกครัสเตเชียนดังนั้นการเจริญเติบโตจึงมีการเพิ่มขนาดโดยการลอกคราบแบบเดียวกับกุ้งและปูหลังจากการลอกคราบเนื้อจะโพรก เมื่อได้กินอาหารและเจริญเติบโตไประยะหนึ่งเนื้อจะแน่นเต็มคราบใหม่อีกครั้งหมุนเวียนเช่นนี้เรื่อยไป (บังอร, 2537) กั้งตั๊กแตนที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติมักกินพวกครัสตาเชียนหมึก หอย และปลาเป็นอาหารเมื่อถึงระยะเจริญพันธ์ ขนาดของกั้งตั๊กแตนเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ขนาดต่ำสุดที่พบและได้ผ่านการจับคู่ผสมพันธุ์แล้วมีความยาวประมาณ 20 เซนติเมตร น้ำหนัก 130 กรัม และขนาดใหญ่ที่สุดที่เคยพบมีความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร น้ำหนัก 330 กรัม (บังอร, 2537)

ในปัจจุบันกั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ตลาดต้องการทั้งบริโภคในประเทศและส่งออกต่างประเทศได้แก่ จีน, ฮ่องกง, ไต้หวัน และสิงคโปร์ บางครั้งมีการสั่งจากประเทศญี่ปุ่นมีราคาค่อนข้างแพง ราคาซื้อขาย ณ จุดซื้อ-ขาย อำเภอดอนสัก จังหวัดสุราษฎร์ธานี ประจำเดือนสิงหาคม 2555 กั้งตั๊กแตนมีชีวิต ขนาด 3-4 ตัว/กิโลกรัม ราคากิโลกรัมละ 1,300 บาท มีปริมาณการส่งออกมากถึงปีละ 700-800 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 40 ล้านบาท (หน่วยงานกรมประมงโดยศูนย์สารสนเทศ, 2555) ที่สำคัญกั้งตั๊กแตนที่จับมาขายนั้นทั้งหมดจับมาจากธรรมชาติซึ่งมีอยู่มากในเขต จ. นครศรีธรรมราช, สุราษฎร์ธานีและสตูล (ทวีศักดิ์, 2556) กั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์น้ำที่มีโปรตีนสูงและเป็นที่นิยมของตลาดและจะต้องเป็นกั้งตั๊กแตนที่อยู่ในสภาพที่มีชีวิตเท่านั้น ส่วนกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วจะไม่เป็นที่นิยมของตลาดเนื่องจากเนื้อจะมีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วไม่เป็นที่นิยมบริโภค ซึ่งได้มีนักวิจัย

ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตาย เพื่อศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องและสภาวะที่เหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของสัตว์น้ำ เพื่อรักษาคุณภาพของสัตว์น้ำระหว่างการขนส่งหรือการเก็บรักษาเพื่อลำเลียงสู่ตลาดทั้งในและต่างประเทศ จากรายงานวิจัยของสุทธวัฒน์ (2011) ศึกษาการเปรียบเทียบคุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายและการรักษาคุณภาพของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกุ้งระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง พบว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อกุ้งมี 3 ชนิด คือ เอนไซม์โปรตีเนสมีผลต่อการสูญเสียสภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อ เอนไซม์คอลลาจีเนสมีผลต่อการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อ และเอนไซม์โพลีฟีนอลออกซิเดสมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อตามลำดับ จากรายงานวิจัยของ สวามินี, นงนุช และมยุรี (2549) ศึกษาคุณลักษณะบางประการของเอนไซม์โปรตีเนสเพื่อการเก็บรักษาปูนิ่มก่อนการแปรรูปโดยศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ (25-65 องศาเซลเซียส) และ pH (3-6) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6 ส่วนสารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในปูนิ่มมากที่สุดได้แก่ EDTA โดยคิดเป็น ร้อยละ 41.72 รองลงมาได้แก่ soybean trypsin inhibitor, Pepstatin A และ E-64 ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเนสได้ร้อยละ 29.04, 18.26 และ 9.03 ตามลำดับ และจากการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่าสับสเตรทของ metallo-protease มีความจำเพาะเจาะจงสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ trypsin, trypsin-like protease, cathepsin B, cathepsin L, chymotrypsin และ cathepsin D ตามลำดับ จากรายงานวิจัยของ ทัศนีย์ และ จิราพร (2009) ศึกษาการย่อยสลายตัวเองในกุ้งเคอยโดยศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิ (30-80 องศาเซลเซียส) และpH (3-10) พบว่ากลุ่มของเอนไซม์โปรตีเนสในกุ้งเคยมีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส และpH 5-8 จากรายงานวิจัยของ นิสากร และศุภวรรณ (2011) ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาโมงบดโดยการบ่มเนื้อปลาโมงบดที่อุณหภูมิ (45–65 องศาเซลเซียส) และ pH (2–12) พบการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 4 และ 9 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส E-64 และ Pepstatin A สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาโมงบดได้ทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในเนื้อปลาโมงบดเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและชนิดแอสปาติกจากรายงานวิจัยของ Saborowski และคณะ (2004) ศึกษาเอนไซม์โปรตีเนสจากกระเพาะของปูทะเล พบกิจกรรมการย่อยสลายสูงสุดที่ pH 5-7 รายงานวิจัยของ พวงชมพู (2545)

ศึกษากิจกรรมของกล้ามเนื้อกุ้งแชบ๊วยพบว่าอัลคาไลน์โปรตีเนสมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 8 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส รายงานวิจัยของ Cao และคณะ (2008) ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของหัวกุ้งขาวแวนาไมพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่ pH 6.5-7.5 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส การย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกุ้งขาวแวนาไมพบกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีและมีเกลือ NaCl ร้อยละ 2.5 ตามลำดับ และในที่สภาวะเป็นกรดมีการย่อยสลายของไมโอซินสายหนักอย่างสมบูรณ์ (Eakpetch *et al.*,2008) จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษา

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นที่จะศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของกั้งตั๊กแตนในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนและผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่มีผลต่อกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเพื่ออธิบายคุณลักษณะรวมทั้งปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาถึงวิธีการชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายจึงเป็นการเพิ่มศักยภาพกั้งตั๊กแตนหลังการเก็บเกี่ยวให้ดียิ่งขึ้นรวมทั้งพัฒนาองค์ความรู้และภูมิปัญญาท้องถิ่นเพื่อเป็นพื้นฐานในการพัฒนาเศรษฐกิจของชุมชน และสร้างมูลค่าเพิ่มเพื่อนำไปสู่การแข่งขันและพึ่งพาตนเองต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เนื่องจากกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองเร็วกว่าสัตว์ชนิดอื่นจึงทำการศึกษาเพื่อ

1) ศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

2) ศึกษาสภาวะที่เหมะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

3) ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่มีผลต่อกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาทำให้สามารถทราบสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงคุณภาพอย่างรวดเร็วที่เกิดขึ้นกับสัตว์น้ำชนิดนี้และเมื่อทราบถึงสาเหตุแล้วจะสามารถเชื่อมโยงไปสู่การศึกษาหาวิธีชะลอการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่เกิดขึ้นซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวิจัยเพื่อต่อยอดในการสร้างความหลากหลายของผลิตภัณฑ์จากสัตว์น้ำชนิดนี้

เนื่องจากการบริโภคกั้งตั๊กแตนในปัจจุบันจะนิยมบริโภคสดเท่านั้น จะไม่นิยมบริโภคกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วเพราะเป็นสัตว์น้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพการบริโภคอย่างรวดเร็ว

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกกั้งตั๊กแตนสายพันธุ์ *Harpioguila raphidea* มา 2 ขนาด คือ ขนาดกลางมีความยาวของลำตัวอยู่ในช่วง 8- 10 นิ้ว และขนาดใหญ่มีความยาวของลำตัวมากกว่า 10 นิ้ว

สถานที่เก็บตัวอย่าง: บริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทย อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช จากนั้นนำตัวอย่างกั้งตั๊กแตนมาศึกษา ดังนี้

1. ศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

2. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อโดยผันแปรอุณหภูมิดังนี้ 30 40 50 55 60 65 70 และ 80 องศาเซลเซียส

3. ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อโดยผันแปรที่ pH 2 3 4 5 6 7 7.5 8 8.5 9 10 11 และ 12

4. ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อการทำงานเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน ได้แก่ E-64, EDTA, Pepstatin A และ SBTI

1.5 คำสำคัญ (keywords) ของโครงการวิจัย

กั้งตั๊กแตน, การย่อยสลายตัวเอง, การเก็บรักษา, เอนไซม์โปรตีเนส

Mantis shrimp, Autolysis, Storage, Proteinase

1.6 สถานที่ทำวิจัย

อาคาร 13 ชั้น 3 ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของกั้งตั๊กแตน

กั้งตั๊กแตนมีชื่อสามัญว่า *Mantis shrimp* (สุภาวดี, 2525; นงนุช, 2551) กั้งตั๊กแตนอาศัยบริเวณชายฝั่งทะเลทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามันแต่พบชุกชุมแถวชายฝั่งอ่าวไทยบริเวณหน้าดินที่มีโคลนปนทรายที่ระดับความลึกไม่มากนัก กั้งตั๊กแตนจัดเป็นสัตว์ขาข้อ (arthropod) พวกครัสเตเชียน กั้งตั๊กแตนแตกต่างจากสัตว์พวกกุ้ง ปู คือ มีรยางค์ 5 คู่แรก เป็นรยางค์ที่มีชื่อเรียกว่า maxiliped เป็นรยางค์ของส่วนปากใช้ช่วยในการกินอาหารโดยเฉพาะ maxiliped คู่ที่ 2 ที่พัฒนาดีและมีขนาดใหญ่กว่าคู่อื่น เรียกว่า ก้ามฉก (raptorial claw) มีลักษณะที่แหลมคมใช้ในการดักจับเหยื่อซึ่งได้แก่ ปลา กุ้ง ปู หอย และสัตว์ขนาดเล็กในทะเล มีขาเดิน 3 คู่ ตั้งอยู่ปล้องอกที่ 6-8 มีขาว่ายน้ำ 5 คู่ อยู่ที่ปล้องส่วนท้องคู่ที่ 1-5 มีเปลือกคลุมหัวสั้นประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวทั้งตัว (Carpenter and Niem, 1998) ปล้องสุดท้ายเป็นส่วนของหางซึ่งมีปลายแยกออก หัว ลำตัว และหางสีเขียว ขาทุกขาสีเขียวแกมเหลือง (ภาพที่ 2.1) กั้งตั๊กแตนพบอาศัยเฉพาะในทะเลและบริเวณน้ำกร่อยโดยเฉพาะบริเวณเขตร้อน มักอาศัยอยู่ในรูที่มันขุดหรืออาศัยตามซอกหินหรือปะการัง พบตั้งแต่เขตน้ำขึ้นน้ำลงไปจนถึงระดับความลึก 1,500 เมตร ในประเทศไทยมีรายงานการกระจายทางภูมิศาสตร์ของกั้งตั๊กแตนในอ่าวไทยที่ได้จากประมงอวนลาก พบกั้งตั๊กแตนรวม 26 ชนิด 12 สกุล 6 วงศ์ (เบญจมาภรณ์, 2537)

ภาพที่ 2.1 กั้งตั๊กแตน (*Harpiosquilla raphidea*)

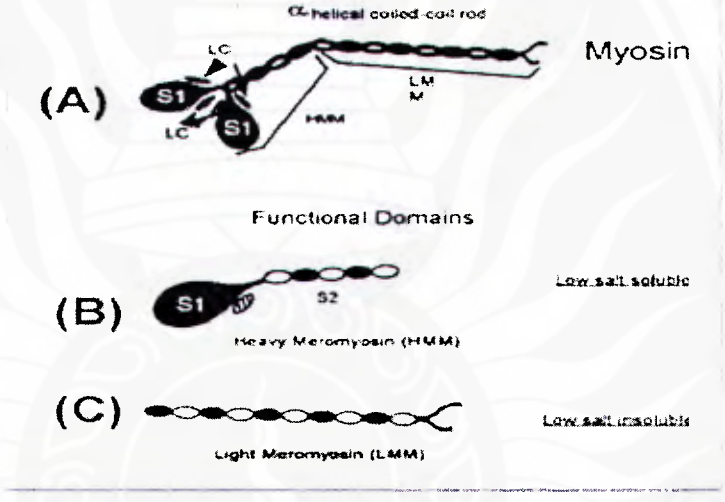
2.2 โปรตีน

โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิดดังนี้

2.2.1 โปรตีนโครงสร้างหรือโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (structural or myofibrillar proteins)

โปรตีนไมโอไฟริลลาร์เป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อ (structural muscle) ทำหน้าที่ในการยืดและหดตัวของกล้ามเนื้อ (contractile proteins) ขณะปลายังมีชีวิตอยู่ซึ่งโปรตีนนี้จะมีลักษณะเป็นเส้น (fibrous) มีคุณสมบัติละลายในสารละลายเกลือที่มีความเป็นกลางและมีความแรงอิออนอยู่ในช่วง 0.3-1.0 ดีไบน์ (Debye) (จักรี, 2544) ซึ่งความสามารถละลายในสารละลายเกลือของโปรตีนชนิดนี้พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนนอกจากนี้โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ยังมีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนสูง (high heat gelation properties) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะมีอยู่ประมาณร้อยละ 70-80 ของโปรตีนทั้งหมดและประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิดไมโอซิน (myosin) เป็นโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่พบในปริมาณมากที่สุดมีอยู่ประมาณร้อยละ 55-60 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์รองลงมา คือแอกติน(actin) มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-30 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ซึ่งเมื่อแอกตินและไมโอซินรวมตัวกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complex) เรียกว่าแอกโตไมโอซิน (actomyosin) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนพวกโทรโปนินเชิงซ้อน (troponin complex) โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) แอกตินิน (actinin) เอ็ม-โปรตีน (M-proteins) และซี-โปรตีน (C-proteins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนน้อยอยู่ด้วย (สุวรรณ,2544) ไมโอซินเป็นโมเลกุลสายยาวขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 500 กิโลดาลตัน (kilodalton,-kDa) ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย (subunit) คือไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain, MHC) 2 สายและไมโอซินสายเบา (myosin light chain, LC) 4 หน่วยย่อย (ภาพที่ 2.2) ไมโอซินสายหนักแต่ละสายประกอบด้วยส่วนหัวซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globularhead) และส่วนหางซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาว 2 สายพันรอบซึ่งกันและกันเกิดเป็นโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ (α-helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่ง (rod shape) ดังแสดงในภาพที่ 2.2 โดยแต่ละสายของไมโอซินสายหนักมีขนาด 200 กิโลดาลตันบริเวณ globular head สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลาย adenosine triphosphate (ATPase activity) ทำให้เกิดพลังงานเพื่อใช้ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อชื่อตามระบบ (systematic name) ของเอนไซม์ในไมโอซินคือ ATPphosphohydrolase (E.C. 3.6.1.3) นอกจากนี้บริเวณ globular head ของไมโอซินสามารถจับกับแอกติน (actin binding site) ซึ่งมีความสำคัญในระหว่างการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อสำหรับไมโอซินสายเบาจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์โดยแต่ละหน่วยมีขนาดอยู่ระหว่าง 16-27 กิโลดาลตัน เมื่อไมโอซินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จะทำให้โครงสร้างไมโอซินถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ heavy

meromyosin (HMM) ซึ่งประกอบด้วยส่วน globular head และส่วนต้นของ rod โปรตีน HMM สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจางดังแสดงในภาพที่ 2.2 ความสามารถในการละลายที่ต่างกันของ LMM และ HMM สามารถนำมาใช้ในการแยกสกัด LMM และ HMM ออกจากกันได้เมื่อนำส่วนของ HMM มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) ได้ส่วนย่อย S-1 และ S-2 ซึ่งคือส่วน globular head และส่วน myosin rod ตามลำดับ (ภาพที่ 2.2) (จิรวัฒน์, 2549)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างไมโอซิน
ที่มา: Wick (2008)

แอกตินมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 22 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์สายแอกตินประกอบด้วยหน่วยย่อยจี – แอคติน (G-actin) หรือ globular actin ซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular) และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (ภาพที่2.3) จี – แอคตินต่อเรียงตัวเป็นสายยาวประมาณ 500-600 หน่วยเกิดเป็นเส้นใยเรียกว่าเอฟ – แอคติน (F-actin) หรือ fibrousv actin ซึ่งจะพันเป็นเกลียวในลักษณะแอลฟาฮีลิกซ์ (ภาพที่ 2.4) การเชื่อมต่อกันของจี–แอคตินจนเป็นเอฟ–แอคตินนั้นจำเป็นจะต้องมีสภาวะที่เหมาะสมการศึกษาในหลอดทดลองพบว่าจี–แอคตินจะเชื่อมโยงเป็นสายยาว (polymerization) เป็นเอฟ – แอคตินเมื่ออยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เข้มข้น 20-100 มิลลิโมลาร์ และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยพบว่าประจุของเกลือแคลเซียม (Ca^{2+}) หรือแมกนีเซียม (Mg^{2+}) มีส่วนช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงดังกล่าว จากภาพที่ 2.3 จะเห็นว่าจี – แอคตินประกอบด้วย 4 โดเมน (domain) คือโดเมน 1, 2, 3 และ 4

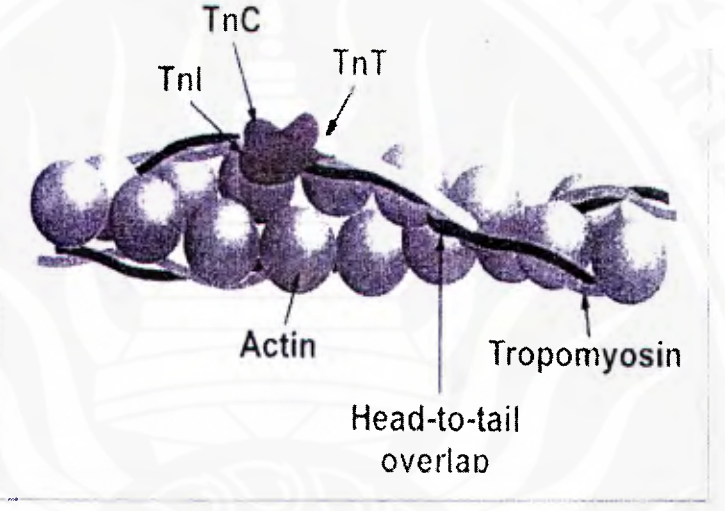
และมีบริเวณที่สามารถจับกับ ATP ซึ่งมีลักษณะเป็นแอ่ง (cleft) อยู่ระหว่างโดเมน 2 และ 4 (จิรวัฒน์, 2549)

ภาพที่ 2.3 โครงสร้างจี-แอกตินตัวเลขแสดงโดเมน
ที่มา: Anonymous (2008)

โทรโปไมโอซินประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย (ภาพที่2.4) ซึ่งพันกันเป็นเกลียวในลักษณะของแอลฟาฮีลิกซ์พอลิเปปไทด์แต่ละสายมีขนาดประมาณ 35,000-37,000 ดาลตัน โทรโปไมโอซินจะวางตัวอยู่บนแนวร่องของแอคตินในฟิลาเมนต์บาง (Thin filament) โดย 1 หน่วยของโทรโปไมโอซินจะวางตามแนวของจี-แอคติน 7 โมเลกุลและโทรโปไมโอซินเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ยึดกับโทรโปนินทีซึ่งองค์ประกอบที่เกิดขึ้นเป็นปัจจัยทำให้เกิดการคลายตัว (Relaxing factor) ของกล้ามเนื้อ (Alais and Linden, 1991; Sikorski and Kotakowska,1994)

โทรโปนินประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ส่วน (ภาพที่2.4) คือโทรโปนินหน่วยย่อยซี (troponin-C) ทำหน้าที่ในการจับ (bind) Ca^{2+} ขณะการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อมีขนาดโมเลกุลประมาณ 17,000-18,000 ดาลตัน โทรโปนินหน่วยย่อยไอ (troponin-I) มีบทบาทยับยั้งการจับตัวรวมกันระหว่างแอคตินกับไมโอซินซึ่งมีผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอสของแอคโตไมโอซินมีขนาดโมเลกุลประมาณ 20,000-24,000 ดาลตัน และโทรโปนินหน่วยย่อยที (troponin-T) เป็นส่วนที่

เชื่อมระหว่างโทรโปไมโอซินกับแอคตินมีขนาดโมเลกุลประมาณ 37,000-40,000 ดาลตัน (Alais and Linden, 1991; Sikorski and Kotakowska, 1994)



ภาพที่ 2.4 การจัดเรียงตัวของเอฟ-แอกตินโทรโปไมโอซินและโทรโปนิน
ที่มา: Young (2008)

โปรตีนไมโอซินจากสัตว์น้ำมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนของกล้ามเนื้อสัตว์อื่นๆ การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินจากปลาจึงพบว่าเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆแม้ว่าจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำนอกจากนี้ระดับความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนไมโอซินยังแตกต่างไปตามชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อโดยปลาที่จับได้จากเขตที่มีอุณหภูมิต่ำโปรตีนจะมีความ คงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในปลาที่จับได้จากเขตร้อนและโปรตีนที่ได้จากกล้ามเนื้อท้องจะมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อสัน Lin และ Wang (1998) และ Ogawa และคณะ (1994) แสดงให้เห็นว่าการที่โปรตีนไมโอซินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำนั้นเป็นผลมาจากการทนต่อความร้อนได้ต่ำของส่วน S-1 และ LMM Torigai and Konno (1996 อ้างถึงในสุทธวัฒน์, 2549) รายงานว่าทั้งนี้โปรตีนไมโอซินที่จับอยู่กับแอกตินในรูปของโปรตีนแอกโตไมโอซินนั้นมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปอิสระโดยเป็นผลจากการที่โปรตีนทั้งสองต่างช่วยเพิ่มความคงตัวให้แก่กันและกันโดยโปรตีนแอกตินซึ่งมีความคงตัวต่อ ความร้อนสูงกว่าโปรตีนไมโอซินจะช่วยเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนให้แก่โปรตีนไมโอซิน ในขณะที่โปรตีนไมโอซินซึ่งละลายได้ในสารละลายเกลือและทนต่อเกลือได้สูงกว่าโปรตีนแอกตินจะป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนแอกตินจากสารละลาย

เกลือซึ่งความเข้าใจต่อความคงตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์นี้สามารถนำไปใช้เตรียมเจลของโปรตีนได้เช่น Park และ Lanier (1989 อ้างถึงในสุทธวัฒน์, 2549) รายงานว่าการใช้เกลือเพื่อทำให้โปรตีนแอกโตไมโอซินแยกตัวเป็นโมเลกุลอิสระและเมื่อโปรตีนไมโอซินที่แยกออกจากแอกตินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำก็จะสามารถเตรียมเจลได้ที่อุณหภูมิต่ำลง

2.2.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins)

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (globular proteins) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความแรงของอิออนต่ำกว่า 0.15 ดีไบน์ มีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนต่ำซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 20-25 ของโปรตีนทั้งหมดส่วนใหญ่จะอยู่ในกล้ามเนื้อแดง (red or dark muscle) ประกอบไปด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) ไมโอโกลบิน (myoglobin) และเอนไซม์ (enzyme)

2.2.3 โปรตีนสโตรมาหรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stroma or connective tissue proteins)

โปรตีนสโตรมาเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำหรือสารละลายเกลือซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ร้อยละ 3-5 ของโปรตีนทั้งหมดไม่มีคุณสมบัติในการเกิดเจลมีคอลลาเจน (collagen) เป็นองค์ประกอบหลักเมื่อให้ความร้อนแก่คอลลาเจนจะทำให้คอลลาเจนละลายไปเป็นเจลาติน (gelatin) และอาจเข้าไปแทรกแซงการเกิดเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์แต่ในกล้ามเนื้อปลามีโปรตีนสโตรมาน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ดังนั้นจึงมีผลน้อยมากต่อความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์

2.3 เอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase)

กล้ามเนื้อของสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดโปรตีเนส (proteinase) คือกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีนเอนไซม์เหล่านี้มีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำหลังการตายกิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆเช่นชนิดของสัตว์น้ำวงจรชีวิตและอาหารเอนไซม์โปรตีเนสสามารถพบได้ในของเหลวภายในเซลล์หรือจับอยู่กับเซลล์ (สุทธวัฒน์, 2549) ในระหว่างการขนส่งหรือเก็บรักษาปลา อาจมีการย่อยสลายของโปรตีนโดยการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสโดย Benjakul และคณะ (1997) รายงานว่าโปรตีนชนิดไมโอซินสาย

หนักในปลาแปซิฟิกไวติ้งถูกย่อยสลายประมาณร้อยละ 45 ภายใน 8 วัน ของการเก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์

2.3.1 โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลา (Shahidi and Kamil 2002)

ปริมาณเอนไซม์โปรตีเนสจะแปรผันตามฤดูกาลโดยทั่วไปปริมาณเอนไซม์โปรตีเนสจะสูงในช่วงฤดูวางไข่โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาอาจสามารถจำแนกเป็นไลโซโซมอลโปรตีเนส (lysosomal proteinases) อัลคาไลน์โปรตีเนส (alkaline proteinases) นิวทรอลโปรตีเนส (neutralproteinases) และเมทาโลโปรตีเนส (metallo proteinases)

1) ไลโซโซมอลโปรตีเนสคือเอนไซม์ที่พบในไลโซโซมได้แก่คาเธปซิน เอ คาเธปซิน บี คาเธปซิน ดี เอช และแอล มีการพบและจำแนกคุณลักษณะในปลาและสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิดมีรายงานว่ากล้ามเนื้อปลามีเอนไซม์คาเธปซิน ดี สูงกว่าในกล้ามเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถึง 10 เท่า แต่เอนไซม์เหล่านี้เกิดกิจกรรมได้ต่ำที่อุณหภูมิต่ำของแหล่งน้ำที่อาศัย (habitat temperature) เชื่อกันว่าคาเธปซิน ดี เป็นเอนไซม์ไลโซโซมอลโปรตีเนสที่สำคัญในการย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อแต่คาเธปซิน บี เอช และแอล ก็เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนเช่นกัน (Shahidi and Kamil,2002)

2) อัลคาไลน์โปรตีเนสคือเอนไซม์ที่พบในซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) ไมโครพลาสซึม (microsomal fraction) หรือจับอยู่กับไมโอไฟบริลส์ในกล้ามเนื้อลักษณะพิเศษของเอนไซม์กลุ่มนี้คือไม่แสดงกิจกรรมหรือเกิดขึ้นน้อยมากยกเว้นการวิเคราะห์โดยใช้อุณหภูมิสูง 60-65 องศาเซลเซียส หรือการกระตุ้นกิจกรรมด้วยสารทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denaturingagent) เช่น ยูเรียกรดไขมันหรือดีเทอร์เจ้น (detergents) อัลคาไลน์โปรตีเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินสายหนักในเจลปลาหรือเจลจากซูริมิในกลุ่มของโปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อเอนโดโปรตีเนสชนิดซิสเตอีนมีผลต่อคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสมากที่สุดเนื่องจากทนความร้อนและสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลได้เช่น คาเธปซิน แอล มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของเจลจากซูริมิในระหว่างการให้ความร้อน (โมโดริ) เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉพาะซีรีนโปรตีเนสนอกจากนี้ยังพบนิวทรอลโปรตีเนสที่สามารถย่อยสลายไมโอซินสายหนักเรียกว่า “Modoriinducingproteinases” ในกลุ่มของนิวทรอลเมทาโลโปรตีเนส

3) นิวทรอลโปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลามักพบสภาวะที่เกิดการย่อยสลายตัวเองได้ดีที่หนึ่งหรือสองสภาวะคือภายใต้สภาวะกรดหรือด่างอย่างไรก็ตาม pH ที่เหมาะสมที่พบในเนื้อปลาและ

สัตว์น้ำมีเปลือก (shellfish) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง pH 6-7 (ตารางที่ 2.1) มีเอนไซม์หลายชนิดเช่น คาลเพน (calpains) และโปรตีเนสที่เร่งการเกิดโมโดริ (MIP) ที่เกิดกิจกรรมได้ดีที่ pH เป็นกลาง เอนไซม์เหล่านี้จึงจัดอยู่ในกลุ่มนิวทรอลโปรตีเนส เช่น คาลเพน เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}activated proteinases) เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลาย Z-disk จึงปลดปล่อยกล้ามเนื้อชนิดเส้นใยหนาและบาง (thick and thin filaments) ออกจากกัน ผลการศึกษาของ Godiksen และคณะ (2009) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มของแถบโปรตีนอัลฟ่า-แอคตินิน (α-actinin) และความแน่นเนื้อของปลาเทร้าแล่ (trout fillet) โปรตีนอัลฟ่า-แอคตินินเป็นโปรตีนที่สำคัญใน Z-disk ซึ่งเชื่อมระหว่างซาร์โคเมียในเส้นใยกล้ามเนื้อและถูกย่อยสลายได้ด้วยคาลเพนรวมทั้งคาเธปซิน บี แอล และดี

ตารางที่ 2.1 สภาวะที่เหมาะสมและการย่อยของโปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ

ประเภทเอนไซม์	เอนไซม์	pH ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ผลของเอนไซม์ต่อโปรตีนกล้ามเนื้อ
Cysteine proteinase	Calcium-activated Proteinase	6.9-7.5	30	ย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ให้เป็นTCA Soluble fragment
	Cathepsin L	5.0-5.6	40-50	ย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ส่วนใหญ่ย่อยสลาย telopeptin จากคอลลาเจนชนิดไอ
	Cathepsin B	5.7-6.0	55-65	ย่อยสลายไมโอซินแอกตินนีบูลินและโทรโปนินย่อยสลายไมโอซิน
	Cathepsin C	6.0-6.5		
	Heat-activated cysteine proteinase	6.0-8.5		
Serine proteinase	Heat-activated trypsin-like proteinase	6.2-8.0	50-60	ย่อยสลายไมโอซิน
	Other trypsin-like proteinase	8.0-9.0	37-40	ย่อยสลายไมโอซินและส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ประเภทเอนไซม์	เอนไซม์	pH ที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม	ผลของเอนไซม์ต่อโปรตีนกล้ามเนื้อ
Metallo proteinase	Neutral proteinase	7.2	40	ย่อยสลายคอลลาเจนชนิดไอเจลาตินและเนื้อเยื่อตามโครงสร้างย่อยสลายไมโอซิน
	Heat stable alkaline proteinase	7.0-8.0	50	
	Myosinase I and II	7.0	40	
Aspatic proteinase	Myosinnase I And II	7.0	60	ย่อยสลายไมโอซิน
	Cathepsin D	3.0-5.0	40	ย่อยสลายไมโอซิน

ที่มา : ดัดแปลงจาก Kolodziejska และ Sikorski (1996)

4) เมทาโลโปรตีเนสเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase or interstitial collagenase) อยู่ในกลุ่มของ matrix metallo proteinases ซึ่งแตกต่างจากคอลลาจีเนสที่พบในลำไส้ที่อยู่ในกลุ่มซีรีนโปรตีเนสเอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนบางส่วนและโปรตีนแมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญต่อการสูญเสียการรวมตัวของกล้ามเนื้อมีงานวิจัยพบว่าเมทาโลโปรตีเนสจากกล้ามเนื้อของ Squid mantle ประกอบด้วยคอลลาจีเนส 2 ชนิดคือ mayosinase I และ mayosinase II ซึ่งมีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่ pH 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส (Shahidi and Kamil, 2002)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนส

2.4.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลทั้งความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ในระบบจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเร่งดังนั้นจึงมีการใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงเพื่อเร่งปฏิกิริยาในปฏิกิริยาต่างๆอย่างไรก็ตามเอนไซม์เป็นโปรตีนจึงมีข้อจำกัดในการใช้ที่อุณหภูมิที่สูงเกินไปเพราะจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติอย่างถาวร (สุกัญญา และ วิเชียร, 2547)

2.4.2 pH

ที่ pH ต่างกันเอนไซม์ชนิดหนึ่งๆ จะทำงานได้ดีไม่เท่ากันแต่จะมีช่วง pH หนึ่งที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุดเรียกช่วง pH นี้ว่า pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) (สุกัญญา, 2547) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์แต่ละชนิดมี pH ที่เหมาะสมที่สุดแตกต่างกันคือที่บริเวณผิวของโมเลกุลของเอนไซม์จะประกอบด้วยหมู่ที่เป็นกรดและหมู่ที่เป็นเบสจำนวนมากประจุที่อยู่บนพื้นผิวของเอนไซม์มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงได้เมื่อระบบมีความเป็นกรดเปลี่ยนไปซึ่งมีผลต่อประจุรวมของเอนไซม์และความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของหมู่ที่เข้าทำปฏิกิริยาและเมื่อ pH ของระบบเปลี่ยนไปมีจะมีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างและความสามารถในการละลายของเอนไซม์โดยเอนไซม์แต่ละตัวมีค่าความเป็นกรด–ด่างเฉพาะตัวที่ทำให้ผลรวมของประจุมีค่าเป็นศูนย์ซึ่งเรียกค่า pH ค่านี้ว่า pI ซึ่งณจุดนี้เอนไซม์จะละลายได้น้อยที่สุด (นิธิยา, 2549)

2.4.3 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส

สารยับยั้งเอนไซม์เป็นสารบางชนิดที่เข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ปฏิกิริยาไม่เกิดขึ้นหยุดชะงักหรือมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง (ปราณี, 2547) การยับยั้งเอนไซม์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1) สารยับยั้งแบบไม่ทวนกลับ (irreversible inhibitor) สารประเภทนี้จะจับกับเอนไซม์อย่างถาวรด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bond) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้และเอนไซม์ก็ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ทำให้เอนไซม์ชนิดนั้นสูญเสียสมบัติในการเป็นเอนไซม์ไป

2) สารยับยั้งแบบทวนกลับ (reversible ingibitor) สารยับยั้งแบบทวนกลับแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด

2.1) การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) สารยับยั้งชนิดนี้มีรูปร่างคล้ายกับซับสเตรตทำให้สามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ดังนั้นถ้าหากมีสารยับยั้งชนิดนี้มากๆ จะมีผลให้ซับสเตรตจับกับเอนไซม์ได้น้อยลงทำให้ปฏิกิริยาช้าลงหรือหยุดชะงักได้ในทำนองเดียวกันถ้าหากมีซับสเตรตมากและมีสารยับยั้งน้อยก็จะมีผลต่อปฏิกิริยาน้อยมาก เนื่องจากซับสเตรตแย่งจับกับเอนไซม์ได้มากกว่าไม่มีเอนไซม์อิสระมาจับกับสารยับยั้ง

2.2) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) สารยับยั้งชนิดนี้จะจับกับเอนไซม์ได้เป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และสารยับยั้ง(enzyme-inhibitor, EIcomplex) หรือทั้งสารยับยั้งและซับสเตรตจับกับเอนไซม์โมเลกุลเดียวกันได้เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์ซับเตรตสารยับยั้ง (enzyme - substrate - inhibitor complex, ESI complex) ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้หรือทำให้ช้าลงมากวัตถุประสงค์ในการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่หนึ่งใช้เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในผลิตภัณฑ์เช่นผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาที่มีลักษณะเป็นเจลเมื่อให้ความร้อนในช่วง 50–60 องศาเซลเซียส จะเกิดปรากฏการณ์ของเจลโมโดริเนื่องจากเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาที่ใช้สำหรับผลิตซูริมิเข้าย่อยสลายโปรตีนซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพเจล (จิรวัฒน์, 2549) และในปลาบางชนิดที่มีเอนไซม์โปรตีเนสเป็นจำนวนมากขั้นตอนในการล้างเนื้อปลาไม่เพียงพอสำหรับกำจัดเอนไซม์โปรตีเนสออกไปดังนั้นในอุตสาหกรรมผลิตซึ่งใช้ปลาบางชนิดที่มีเอนไซม์สูงจึงจำเป็นต้องเติมสารที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อรักษาคุณภาพของเจล เช่น โปรตีนพลาสมาจากเลือดวัวโปรตีนไข่ขาวสารสกัดจากมันฝรั่งและโปรตีนเวย์เข้มข้นเป็นต้นเพื่อยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนอันมีผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ซูริมิหรือเจลที่มีคุณภาพสูงสุด (จิรวัฒน์, 2549)

- กลุ่มที่สองใช้เพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเนสโดยสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ในงานวิจัยเพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์ที่มีในเนื้อปลาแต่ละชนิดทำให้ทราบแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์จากปลาชนิดนั้นๆสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้เพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเนสต้องมีความจำเพาะในการเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ชนิดนั้นๆ (สุทธวัฒน์, 2549) ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีเนส

ชนิดของเอนไซม์โปรตีเนส	ตัวอย่างสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส
เอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีน	E-64
เอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีน	Soybean trypsin inhibitor
เอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสปาติก	pepstatin A
เอนไซม์โปรตีเนสชนิดเมทาโล	EDTA

ที่มา: Hu และคณะ (2007)

2.5 การศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

เทคนิคการวิเคราะห์การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสมีหลายวิธีดังจะกล่าวต่อไปนี้

2.5.1 การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีโซเดียมโดดิซิลซัลเฟตเป็นส่วนประกอบ (Sodium dodecylsulfate – polyacrylamide gel eletrophoresis :SDS-PAGE) (Laemmli 1970 ดัดแปลงจาก จิรวัฒน์, 2549)

เทคนิค SDS-PAGE เป็นการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนชนิดต่างๆที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบโปรตีนขนาดต่างๆ ก่อนและหลังการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างทำให้สามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้การแยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE อาศัยการแยกโดยขนาดเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้องและเนื่องจากระยะทางที่เคลื่อนที่ไปของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์เท่านั้นการแยกโปรตีนที่สนใจบนเจลนี้ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนเทียบเคียงในกรณีที่มั่นใจว่าน้ำหนักของโปรตีนที่ต้องการแตกต่างจากโปรตีนอื่นๆอย่างชัดเจนสามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้ (โดยที่ไม่ต้องเทียบกับโปรตีนเทียบเคียงที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว) การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้นของผสมโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพการละลายโปรตีนด้วยโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate, SDS) จะทำให้โปรตีนมีประจุลบเนื่องจากมีกลุ่มซัลเฟต SDS จับกับโปรตีนในอัตราส่วนค่อนข้างคงที่คือ 1.4 กรัมต่อกรัมโปรตีนเนื่องจาก SDS เป็น detergent ที่ทำให้โปรตีน

สูญเสียสภาพธรรมชาติหากโปรตีนมีหน่วยย่อยจะเกิดการแยกออกจากกันและหากโปรตีนนั้นเป็นเพียงพอลีเปปไทด์สายเดี่ยวก็จะเกิดการคลายตัวและสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากโปรตีนถูกล้อมรอบด้วย SDS ทำให้มีประจุเป็นลบเหมือนกันหมดการแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จึงขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนเป็นสำคัญโดยโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปตามน้ำหนักโมเลกุลของตัวเองภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสีเช่นสีคูแมสซีบลู (coomassie blue) หรือสีของสารประกอบเงิน (silver stain) ในการศึกษาการสลายตัวของโปรตีนสามารถศึกษาได้โดยการย้อมสีโปรตีนหลังจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถใช้ตรวจสอบติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนได้ (Wang และคณะ, 2009)

2.5.2 การวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด (TCA-soluble peptide) โดยวิธี Lowry (Lowry, 1951)

ในกล้ามเนื้อปลามีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนไปเป็นหน่วยย่อยขนาดเล็กที่แตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์การตรวจวิเคราะห์เพื่อติดตามและศึกษากิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีนสามารถทำได้โดยการวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด ด้วยวิธี Lowry ความสามารถในการดูดกลืนแสงเป็นคุณสมบัติหนึ่งของกรดอะมิโนที่ผู้ศึกษาโปรตีนสามารถนำมาใช้ในการตรวจติดตามและประมาณความเข้มข้นของโปรตีนได้สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยาคือ Folin – ciocalteu' phenol reagent ซึ่งเป็นสารประกอบของโซเดียมโมลิบเดทและโซเดียมทังสเตทโดยวิธีการนี้เป็นการวัดไทโรซิน (tyrosine) ที่ละลายอยู่ในสารละลายกรดเพราะ Folin – ciocalteu' phenol reagent สามารถตรวจจับหมู่ฟีนอล (Phenol group) ของไทโรซีนได้โดย Folin – Ciocalteu' phenol reagent ถูกรีดิวซ์โดยไทโรซินไปเป็น สารประกอบเชิงซ้อนโมลิบดินัม-ทังสเตนบลู (molybdenum-tungsten blue) ซึ่งมีสีน้ำเงินสามารถตรวจวัดความเข้นข้นได้ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (สุกัญญา และ วิเชียร, 2547; Lowry et al., 1951)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- ตู้แช่แข็ง ยี่ห้อ SANYO รุ่น SF-C995 ประเทศไทย
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ HAAKE รุ่น DC 30 ประเทศเยอรมัน
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (digital pH meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น S-20 ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องโฮโมจีไนซ์ ยี่ห้อ Nissei รุ่น AM-8 ประเทศญี่ปุ่น
- อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน Mini-PROTEAN Tetra Cell ยี่ห้อ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lamda 25 UV/VIS Spectrophotom ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น ED3202S ประเทศ เยอรมัน
- เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210S ประเทศเยอรมัน
- เครื่อง Vortex mixer ยี่ห้อ : Scientific Industries รุ่น : G650E ประเทศไต้หวัน
- อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี

3.2 สารเคมี

- สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (TCA soluble peptide) ได้แก่

กรดไตรคลอโรอะซิติก (CCl_3COOH; TCA) ยี่ห้อ BDH, กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ยี่ห้อ Merck, คอปเปอร์ซัลเฟต (Cu_2SO_4. $5H_2O$) ยี่ห้อ Univar, โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ยี่ห้อ Univar, โซเดียมซิเตรท ($Na_3C_6H_5O_7$. $2H_2O$) ยี่ห้อ Univar, โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ Merck, ทริสไฮโดรคลอริก (Tris HCl) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, ไทโรซีน ($CH_2C_6H_4OH$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, โฟลินฟีนอล ($3H_2O.P_2O_5.13WO_3.5MoO_3.10H_2O$) ยี่ห้อ Fluka, กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

- สารเคมีสำหรับศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ได้แก่

โบรโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, ไกลซีน ($C_2H_5NO_2$) ยี่ห้อ Merck, คูแมสซีบริลเลียนท์บลู R-250 ($C_45H_44N_3NaO_7S_2$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, เมธานอล (CH_3OH) ยี่ห้อ Merck, กรดอะซิติก (CH_3COOH) ยี่ห้อ Merck, บิส อะคลิลาไมด์ ($C_6H_{16}N_2$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, อะคลิลาไมด์ (C_6H_5NO) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, เบต้า เมอร์แคปโตเอธานอล ($SH\text{-}CH_2CH_2OH$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, TEMED ($C_6H_6N_2$) Sigma – Aldrich

- สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้ในการศึกษาได้แก่

E-64: 1-(trans-epoxy-succinyl-leucelamino)-4-guanid-inobutane ยี่ห้อ Sigma–Aldrich, EDTA: Ethylenediamine tatraacitic acid ยี่ห้อ BDH, Pepstatin A ($C_{34}H_{63}N_5O_9$) ยี่ห้อ Sigma – Aldrich, SBTI ยี่ห้อ Sigma – Aldrich

3.3 ขั้นตอนการดำเนินการทดลอง

วิธีการสุ่มตัวอย่าง

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกั้งตั๊กแตนภายหลังการตาย โดยกั้งตั๊กแตนที่นำมาใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นกั้งตั๊กแตนสายพันธุ์ *Harpiosquilla raphidea* ขนาดใหญ่ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 190-210 กรัม มีความยาวของลำตัวมากกว่า 10 นิ้ว และขนาดกลางมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 110-130 กรัม มีความยาวของลำตัวระหว่าง 8-10 นิ้ว ที่จับได้จากทะเลฝั่งอ่าวไทย อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช

3.3.1 ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน (ดัดแปลงจากวิธีของ Morrissey *et al.*, 1993)

- การเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้เป็นกั้งตักแตนมีชีวิตและถูกทำให้ตายทันทีโดยนำกั้งตั๊กแตนมีชีวิตลงไปแช่ในน้ำที่ผสมกับน้ำแข็ง (อัตราส่วนระหว่างน้ำ:น้ำแข็งเท่ากับ 3:1) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบรรจุกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วลงในกล่องสไตโรโฟมและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราชใช้เวลาประมาณ 30 นาที การเก็บรักษาตัวอย่างตลอดระยะเวลาการทดลองโดยนำกั้งตั๊กแตนบรรจุลงในถุงพลาสติกชนิด polyethylene บรรจุลงในกล่องโฟมโดยเรียงสลับระหว่างกั้งตั๊กแตนกับน้ำแข็งเป็นชั้นๆในอัตราส่วน 1:3 เก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งให้อยู่ในอัตราส่วน1:3 ทุกๆ 2 วัน เพื่อรักษาอัตราส่วน

ระหว่างกั้งตั๊กแตนและปริมาณน้ำแข็งให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาสุ่มตัวอย่างวันที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 ของการเก็บรักษาเพื่อวิเคราะห์คุณภาพดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (TCA soluble peptide) (Balange and Benjakul, 2009)

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

- ติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อนความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

- การเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้เป็นกั้งตักแตนมีชีวิตและถูกทำให้ตายทันที โดยนำกั้งตั๊กแตนมีชีวิตลงไปแช่ในน้ำที่ผสมกับน้ำแข็ง (อัตราส่วนระหว่างน้ำ:น้ำแข็งเท่ากับ 3:1) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบรรจุกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วลงในกล่องสไตโรโฟมและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราชใช้เวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการแกะเปลือกเอาเฉพาะกล้ามเนื้อเพื่อนำมาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนโดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ บ่มที่ 30 40 50 55 60 65 70 และ 80 องศาเซลเซียส ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วย

ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGEโดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์บ่มที่ 30 40 50 55 60 65 70 และ 80 องศาเซลเซียส บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมินาน 60 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อนความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาทีนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.3.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเนสในกั้งตั๊กแตน

- การเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้เป็นกั้งตักแตนมีชีวิตและถูกทำให้ตายทันที โดยนำกั้งตั๊กแตนมีชีวิตลงไปแช่ในน้ำที่ผสมกับน้ำแข็ง (อัตราส่วนระหว่างน้ำ:น้ำแข็งเท่ากับ 3:1) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบรรจุกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วลงในกล่องสไตโรโฟมและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏชนครศรีธรรมราชใช้เวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการแกะเปลือกเอาเฉพาะกล้ามเนื้อเพื่อนำมาศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 2 กรัมผสมกับบัฟเฟอร์ 12 มิลลิลิตร (McIlvain's buffer) ที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 2 3 4 5 6 7 7.5 8 8.5 9 10 11 และ 12 จากนั้นนำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

สำหรับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยชั่งกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัมผสมกับบัฟเฟอร์ 12 มิลลิลิตรที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 2 3 4 5 6 7 7.5 8 8.5 9 10 11 และ 12 จากนั้นนำไปโฮโมจิไนซ์ที่ความเร็ว

11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อนความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.3.4 ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

- การเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างที่ใช้เป็นกั้งตักแตนมีชีวิตและถูกทำให้ตายทันทีโดยนำกั้งตั๊กแตนมีชีวิตลงไปแช่ในน้ำที่ผสมกับน้ำแข็ง (อัตราส่วนระหว่างน้ำ:น้ำแข็งเท่ากับ 3:1) เป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นบรรจุกั้งตั๊กแตนที่ตายแล้วลงในกล่องสไตโรโฟมและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏชนครศรีธรรมราชใช้เวลาประมาณ 30 นาที จากนั้นทำการแกะเปลือกเอาเฉพาะกล้ามเนื้อเพื่อนำมาวิเคราะห์วิเคราะห์คุณภาพโดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน 0.5 กรัม เติมบัพเฟอร์ pH 4 หรือ pH 9 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจิไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ E-64 ความเข้มข้น 0.1 mM, SBTI 0.1 กรัม/ลิตร pepstatin A ความเข้มข้น 0.01 mM, EDTA ความเข้มข้น 2 mM จากนั้นนำไปโฮโมจิไนซ์ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจิไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน 0.5 กรัม เติมบัพเฟอร์ pH 4 หรือ pH 9 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจิไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ E-64 ความเข้มข้น 0.1 mM, SBTI 0.1 กรัม/ลิตร pepstatin A ความเข้มข้น 0.01 mM, EDTA ความเข้มข้น 2 mM จากนั้นนำไป โฮโมจิไนซ์

ที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที และบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปโฮโมจีไนซ์ด้วยความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที บ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปเซนตริฟิวจ์ที่ความเร็ว 8,000xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

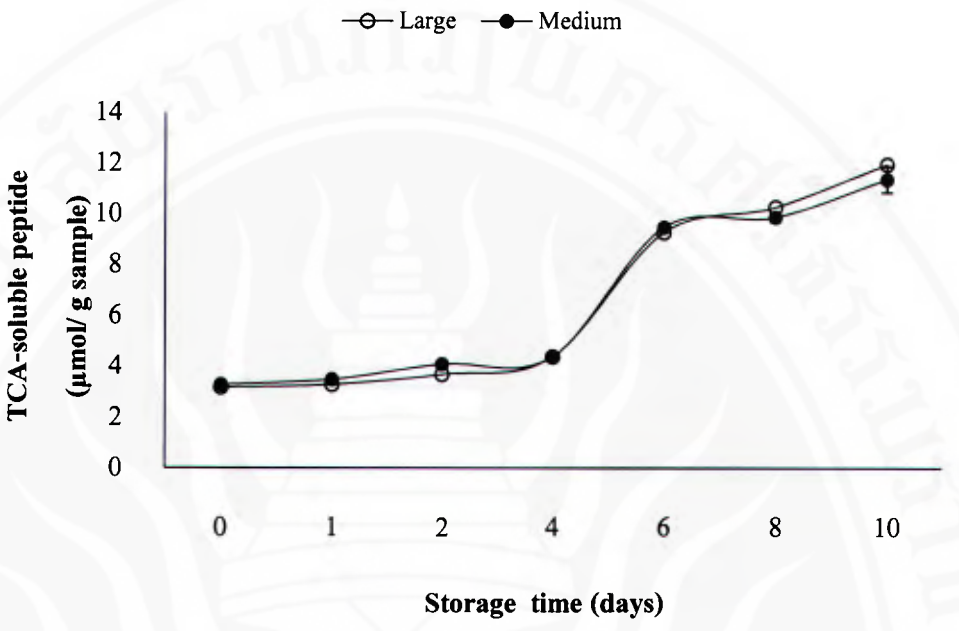
ดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (anova) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี Duncan's MultipleRange Test (DMRT) (Steel and Tottie, 1980)

บทที่ 4

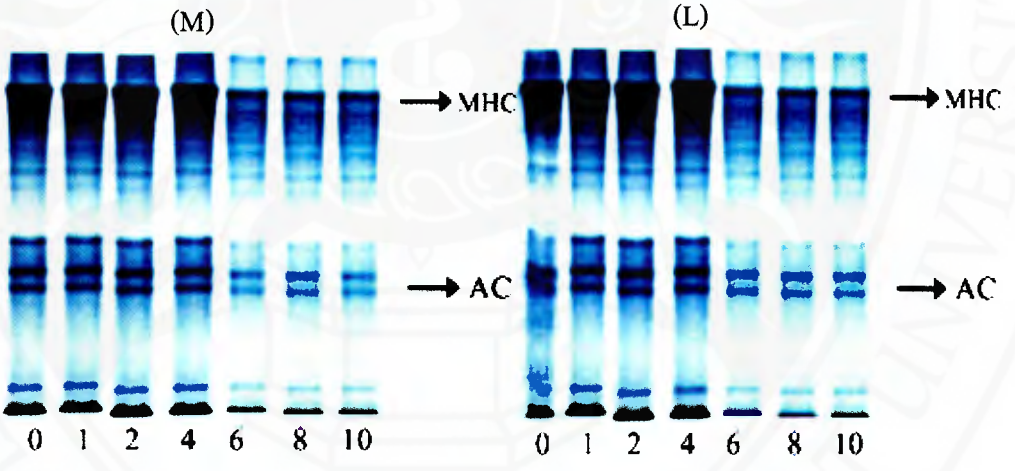
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา10 วัน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่และขนาดกลาง พบว่าเมื่อนำเนื้อกั้งตั๊กแตนเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน โดยสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 4.1 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้นส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เพิ่มขึ้น โดยวันที่ 0-4 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้อยู่ในช่วง 3.2±0.00-4.4±0.06 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ($p<0.05$) และพบว่าหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้อยู่ในช่วง 10.3±0.15-12.0±0.51 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง ($p<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทั้งสองขนาด พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนของกั้งตั๊กแตนโดยใช้ SDS PAGE (ภาพที่ 4.2) ซึ่งพบว่าในวันที่ 6-10 ของการเก็บรักษาแถบไมโอซินและแอกตินจะบางกว่าช่วง 4 วันแรกของการเก็บรักษา



ภาพที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

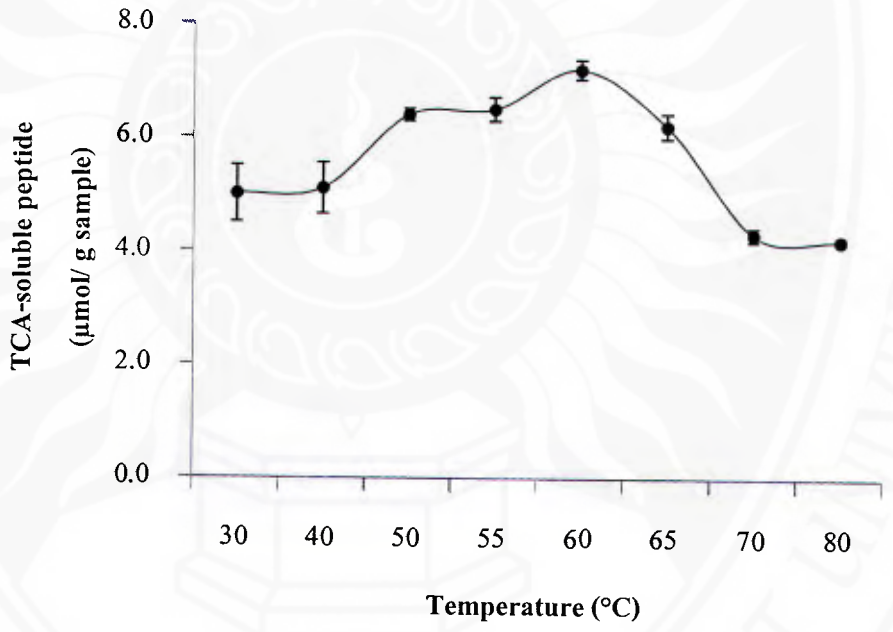


ภาพที่ 4.2 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

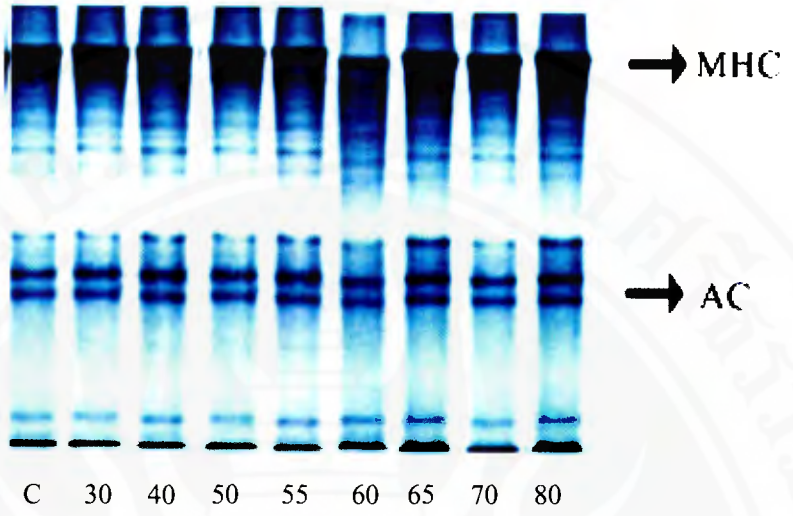
หมายเหตุ MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน
M: กั้งตั๊กแตนขนาดกลาง L: กั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน พบว่าเมื่อนำกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบ่มสูงขึ้นปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จะเพิ่มขึ้น โดยปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ มีปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (7.2±0.19 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) (p<0.05) (ภาพที่ 4.3) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีปริมาณลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS PAGE (ภาพที่ 4.4) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินสายหนักและแอกตินมีความบางกว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ และตัวอย่างควบคุม (C)



ภาพที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที



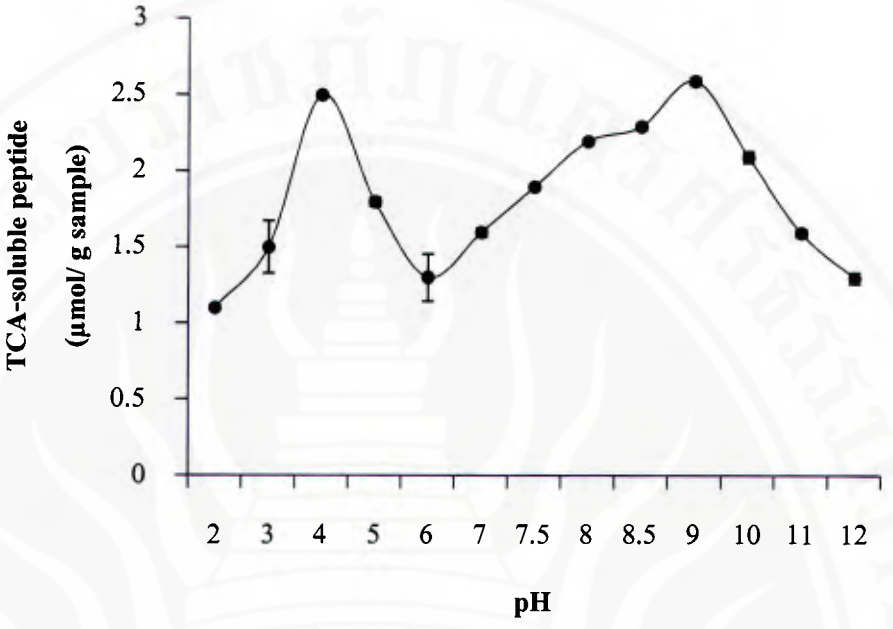
ภาพที่ 4.4 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผ่านการบ่ม
MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน

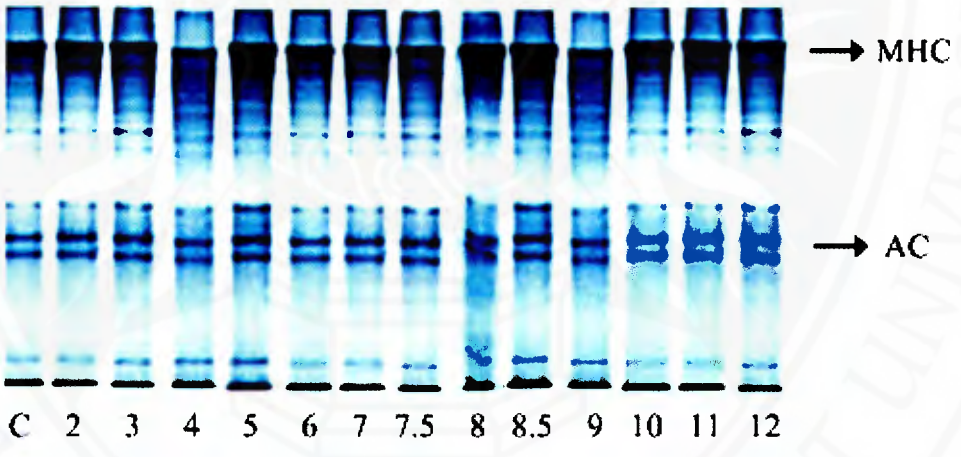
จากผลการทดลองพบว่าที่อุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เกิดการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้สูงสุด ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2–12 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่ 4.5) พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่บ่มที่ pH 9 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงสุด (2.6±0.29 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่บ่มที่ pH 4 (2.3±0.16ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) ซึ่งมีปริมาณไกล้เคียงกัน (p>0.05) จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมี 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอซิดโปรตีเนสและอัลคาไลน์โปรตีเนส



ภาพที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2 - 12 อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส เป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 4.6 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2-12 อุณหภูมิ 60 องศเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผ่านการบ่ม

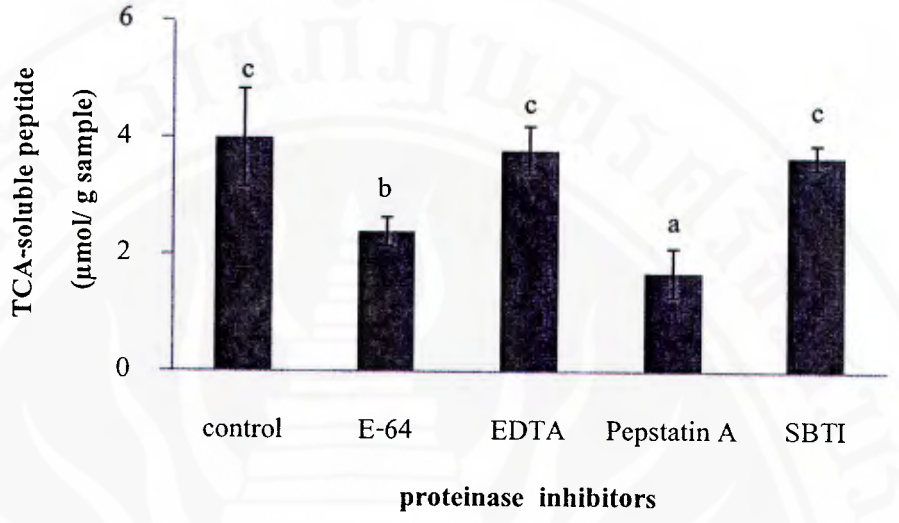
MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน

จากผลการทดลองพบว่า pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน มี 2 ช่วง คือที่ pH 4 และ pH 9

4.4 การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

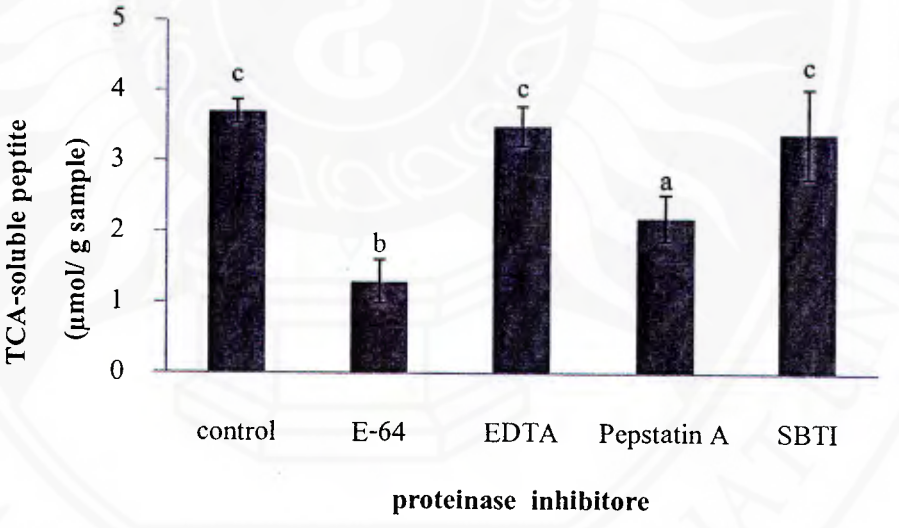
สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือ E-64 SBTI Pepstatin A และ EDTA ภาพที่ 4.7 และ 4.8 แสดงปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4 และ pH 9 ตามลำดับ ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่ากล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 และ Pepstatin A มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ต่ำกว่าตัวอย่างเนื้อกั้งตั๊งแตนควบคุม (C) และตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด EDTA และ SBTI จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า เอนไซม์โปรตีเนสที่พบในเนื้อกั้งตั๊กแตนเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีสเตอีนและแอสปาติก

การศึกษารูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4 (ภาพที่ 4.9) และ pH 9 (ภาพที่ 4.10) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์ปรตีเนสชนิด E-64 และ Pepstatin A ในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้แถบของไมโอซินสายหนักหนากว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ ซึ่งแสดงให้ทราบว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสทั้งสองชนิดสามารถป้องกันการย่อยสลายของไมโอซินสายหนักและแอกตินในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้



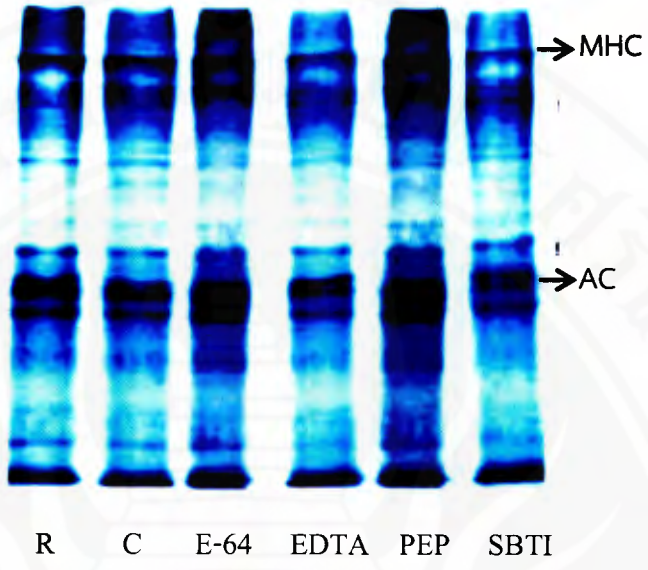
ภาพที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ $^{a-c}$ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

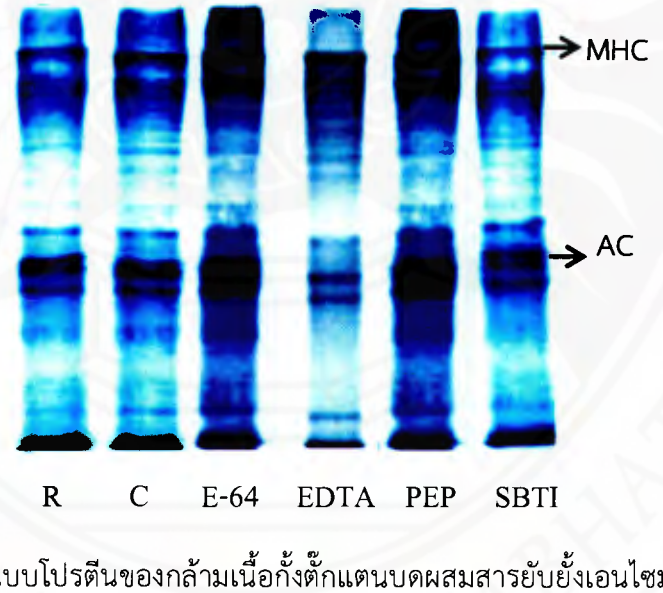
หมายเหตุ $^{a-c}$ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.9 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ R: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม

C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม



ภาพที่ 4.10 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ R: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม

C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม

ตารางที่ 4.1 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

ชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส	**ความเข้มข้นของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส**	**ความสามารถในการยับยั้ง (%)**	
		pH 4	**pH 9**
control	-	0	0
E-64	0.1 mM	44.2	68.6
EDTA	2.0 mM	8.8	8.6
Pepstatin A	0.01 mM	68.3	40.0
SBTI	0.1 g/L	15.0	18.1

บทที่ 5

สรุป วิจารณ์ผลและข้อเสนอแนะ

5.1 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่และขนาดกลางพบว่าเมื่อนำเนื้อกั้งตั๊กแตนเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน โดยสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 10 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลาย ซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 4.1 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้นส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เพิ่มขึ้น โดยวันที่ 0-4 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้อยู่ในช่วง (3.2±0.00-4.4±0.06 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) ($p<0.05$) และพบว่าหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งเกิดจากกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเนส ได้แก่กลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลสซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน เอนไซม์เหล่านี้มีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำหลังการตาย กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของสัตว์น้ำ วงจรชีวิตและอาหาร เอนไซม์โปรตีเนสสามารถพบได้ในของเหลวภายในเซลล์หรือจับอยู่กับเซลล์ (สุทธวัฒน์, 2549) ในระหว่างการขนส่งหรือเก็บรักษาสัตว์น้ำอาจมีการย่อยสลายของโปรตีนโดยการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนส โดย Benjakul และคณะ (1997) รายงานว่า โปรตีนชนิดไมโอซินสายหนักในปลาแปซิฟิกไวติ้งถูกย่อยสลายประมาณร้อยละ 45 ภายใน 8 วัน ของการเก็บรักษาในน้ำแข็งโดยการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ นอกจากนี้ ตรี วาทกิจ (2552) รายงานว่าภายหลังการตายของสัตว์น้ำจะเกิดการย่อยสลายตัวเองโดยเอนไซม์ภายในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำและจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว สัตว์น้ำที่เก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็นพบการย่อยสลายตัวเองเกิดขึ้นสมบูรณ์ภายใน 6 วันภายหลังการตาย จากรายงานของ potter และ Hotchkis (1995) พบว่าการเก็บรักษาปลาภายหลังการตายปลาเกิดการเน่าเสียซึ่งเกิดจากเอนไซม์โปรตีเนสในตัวปลา

5.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกั้งตั๊กแตนพบว่าเมื่อนำเนื้อกั้งตั๊กแตนบดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 40 50 55 60 65 70 75 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (ภาพที่ 4.3) พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบ่มสูงขึ้นปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จะเพิ่มขึ้นโดยปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ มีปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส

(7.2±0.19 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) ($p<0.05$) ที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีปริมาณลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์โปรติเนสเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อนแสดงให้เห็นว่า เอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนอาจเป็นเอนไซม์โปรติเนสชนิดทนความร้อน จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในสัตว์น้ำ พบว่าเอนไซม์โปรติเนสในปูทะเลมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 50–60 องศาเซลเซียส (Pavasovic *et al.*, 2004) Diaz-Tenorio และคณะ (2006) ศึกษาเอนไซม์โปรติเนสใน gastric juice และ mid gut ของปู 2 ชนิด ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *C. arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ทัศนีย์ และ จิราพร (2009) รายงานว่ากุ้งเคอยมีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนในเนื้อกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 30 - 60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Saborowski (2004) พบว่าเอนไซม์ในกล้ามเนื้อกุ้งแชบ๊วยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งไกล้เคียงกับกุ้งขาวแวนาไมโดยพบว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (Doke and Ninjoor, 2012) Cao และคณะ (1999) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีนที่จับกับโปรตีนไมโอฟิบลิลลาร์ จากกล้ามเนื้อปลาปากคมสามารถย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนักที่อุณหภูมิ 50–60 องศาเซลเซียส ในขณะที่โปรตีนแอกตินและโปรตีนแอลฟ่า-แอดตินิน ไม่มีการย่อยสลายซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าแอกตินมีความคงตัวต่อเอนไซม์โปรติเนสมากกว่าไมโอฟิบริลลาร์ชนิดอื่น จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ที่อุณภูมิ 60 องศาเซลเซียส เกิดการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนสูงสุดซึ่งแสดงคุณสมบัติของ Heat- activated

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนในครั้งนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมากที่สุด แต่กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้เทคนิค SDS PAGE (ภาพที่ 4.4) โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินสายหนักและแอกตินมีความบางกว่าตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ และตัวอย่างควบคุม (C) เกิดจากไมโอซินสายหนักและแอกตินถูกย่อย

5.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากกการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ผ่านการบ่มที่ pH 2–12 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ภาพที่ 4.5 พบว่าเมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่ pH 9.0 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงสุด (2.6±0.29 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่ pH 4.0 (2.3±0.16 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกัน (p>0.05) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมี 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอซิดโปรตีเนสและอัลคาไลน์โปรตีเนส

การบ่มตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ pH 4.0 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงนั้นเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มแอสปาติก เช่น เอนไซม์ คาเธปซิน ดี และเอนไซม์เปปตัน มีรายงานการพบเอนไซม์คาเธปซิน แอล 2 ชนิดในปลาลิ่น คือ คาเธปซิลแอล 1 ซึ่งเป็นซีรีนโปรตีเนสที่ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดที่ pH 5.0 (Luo และคณะ 2006 อ้างถึงใน Schiavone และคณะ 2008) คาเธปซินแอล 2 ซึ่งมีช่วง pH ที่เหมาะสมที่ pH 4.0–5.5 Yarnpakdee และคณะ (2009) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในปลาแพะมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่ pH 4.0 และ 7.0 และพบว่าที่ pH 4.0 มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุด Klomklao และคณะ (2007) รายงายว่าปลานิลมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ pH 5.0 ส่วนการย่อยสลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่สภาวะด่าง (pH 8.5–9.0) ซึ่งมีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงสุดนั้นเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มอัลคาไลน์โปรติเนสที่ทนความร้อนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมสลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาหลายสายพันธุ์ เช่น ซาร์ดีน คาร์ปแมคคาเรล เป็นต้น อัลคาไลน์โปรติเนสที่สกัดจากปลาไวน์ครอกเกอร์และแอตแลนติกเมนฮาเดนแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.5 – 8.0 (An *et al.*,1996) Diaz-Tenorio และคณะ (2006) ศึกษาเอนไซม์โปรติเนสในปู 2 ชนิด ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *C. arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ pH 6.0–8.0 Stoknase และคณะ (1993) รายงานว่าเอนไซม์ทนความร้อนกลุ่มอัลคาไลน์โปรติเนสที่พบในกล้ามเนื้อปลาเฮอร์ริ่งมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ pH 9.0

ผลการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าแถบของไมโอซินสายหนักและแอกตินในตัวอย่างที่บ่มที่ pH 4.0 และ pH 9.0 บางกว่า pH ช่วงอื่นๆ (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ที่มีปริมาณสูงกว่าที่ pH อื่นๆ (ภาพที่ 4.5) ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าที่ pH 4.0 และ 9.0 เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมากที่สุด

5.4 การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อการทำงานเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากผลการศึกษาสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน (ตารางที่ 4.1) พบว่าที่ pH 4.0 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุด โดยมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 68.3 ส่วนที่ pH 9.0 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุด โดยมีความสมารถในการยับยั้งกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 68.6 จากการทดลองบ่งชี้ว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและแอสปาติก

การศึกษารูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 (ภาพที่ 4.9) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที พบว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A ในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดทำให้แถบไมโอซินสายหนักหนากว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ ส่วนที่ pH 9.0 (ภาพที่ 4.10) พบว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 ในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้แถบไมโอซินสายหนักหนากว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสชนิด Pepstatin A สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดส่วนสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง Asghar และ Bhatti (1987) กล่าวว่าวิธีการศึกษาความจำเพาะเจาะจงของสารยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสชนิดต่าง ๆ สามารถใช้จำแนกกลุ่มของเอนไซม์โปรติเนสได้ โดยอาศัยความแตกต่างของหมู่อนุมูลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ Makindo และคณะ (1982) รายงานว่า ในกล้ามเนื้อของปลาคาร์ปพบเอนไซม์ชนิดแอสปาติก ที่เป็นสาเหตุสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนัก และโปรตีนแอกตินโดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดดังกล่าวได้โดยการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A Banjakul และคณะ (2003) รายงานว่า E-64 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาซาร์ดีนได้ Kloamkloa และคณะ (2008) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบมากในปากคมที่บ่มที่ pH 3.0 คือเอนไซม์โปนตีเนสชนิดแอสปาติกและซีรีนในกล้ามเนื้อปลาปากคมโดยเอนไซม์โปรตีเนสทั้งสองสามารถมีกิจกรรมได้ที่ pH 3.5 และ 9.5 ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดยเติมสารยับยั้งเอนไซม์ชนิด Pepstatin A และ SBTI ตามลำดับ

5.5 สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนโดยเอนไซม์โปรตีเนสระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดการเก็บรักษา สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนคือ ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส pH 4.0 และ 9.0 สำหรับผลการศึกษาชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนพบว่า E-64 และ Pepstatin A สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเป็นชนิดซิสเตอีนและแอสปาติก

บรรณานุกรม

จักรี ทองเรือง. 2544. **ซูริมิ**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล. (2549). **โครงสร้างของโปรตีน**. เอกสารประกอบคำสอนรายวิชา 305623

ตรี วาทกิจ. (2552). **ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ.** ภาควิชา อุตสาหกรรมเกษตร วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพน.

ทวีศักดิ์ ชัยเรืองยศ. (2556). **ความเป็นไปได้ในการเพาะพันธุ์กั้งตั๊กแตน เพื่อเลี้ยงในเชิงพาณิช**.

ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร. (2009). **ศึกษาการย่อยสลายตัวเองในกุ้งเคย.** ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทีเอ็มบีเพื่อการส่งออก. (2550). ฐานข้อมูล: **ธุรกิจสินค้า**. ค้นเมื่อ มิถุนายน 6, 2556, จาก http://www.newswit.com/news/2007-09-04.

นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. (2551). **สัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง**. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

นิธิยา รัตนาปนนท์. (2549). **เคมีอาหาร**. กรุงเทพฯ: โอเอสพริ้นติ้งเฮ้าส์. 487 หน้า.

นิสากร ศรีธัญรัตน์ และศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ. (2011). **ศึกษาสมบัติของเอนไซม์โปรติเนส ในเนื้อปลาโมงบด**. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

บังอร ศรีมุกดาและสรณัญช์ จำปาศร. (2537). **การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับการเพาะและอนุบาลกั้งตั๊กแตน (*Harpioquilla raphidea*) Fabricius**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2537. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งจันทบุรี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง.

เบญจมาภรณ์ วัฒนธงชัย. 2537. **การกระจายทางภูมิศาสตร์ของกั้งตั๊กแตนในอ่าวไทย.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิตใ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). **เอนไซม์ทางอาหาร**. พิมพ์ครั้งที่ 4 (ฉบับปรับปรุงเพิ่มเติม) โปรตีนอาหาร. 58-62.

พงศ์ศักดิ์ สังขภิณโย, วิเชียร มันแหล่, งามเพ็ญ ยาวงษ์ และพัชรินทร์ แซ่เจียง. (2551).

พวงชมพู ชูเกียรติวัฒนา. (2545). **การเพิ่มความบริสุทธ์และคุณสมบัติของเอนไซม์โปรตีเอส** มหาวิทยาลัยบูรพา.

มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

ศูนย์วิจัยกสิกรไทย. (2550). ฐานข้อมูล: **ปลานิลไทย**: ตลาดขยายตัวทั้งในประเทศและส่งออก. สืบค้นได้จาก: http://www.positioningmag.com/prnews/prnews.aspx?id=62988. ค้นคว้าเมื่อ 30 มิถุนายน 2552.

สวามินี ธีระวุฒิ และคณะ. (2549). **ศึกษาการดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว: เอนไซม์โปรตเนสในปูนิ่ม**. ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารนิเทศเพื่อการศึกษาค้นคว้า. ภาควิชาบรรณรักษศาสตร์และสารนิเทศคณะมนุษยศาสตร์และสังคมศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

สารานุกรมอาหารออนไลน์. (2555). **โครงสร้างของแอกตินและไมโอซิน**. ค้นเมื่อ ธันวาคม 20, 2555, จาก http://www.foodnetworksolution.com.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. (2554). **การผลิต การตลาด ผลิตผลการเกษตร: ประมง**. ค้นเมื่อ กุมภาพันธ์ 19, 2556, จาก http://www.ryt9.com/s/oae/1191038

สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2547). **ชีวโมเลกุล**. กรุงเทพฯ: พิมพลักษณ์.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. (2549). **ซูริมิ: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อปลาบด**. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. (2555). **การศึกษาเปรียบเทียบคุณลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายและการรักษาคุณภาพของกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย**. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

สุภาวดี จุลละศร. (2525). **สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สุรินทร์ มิจฉาชีพ. (2547). **สัตว์ชายฝั่งทะเลไทย**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สุวรรณ วิรัชกุล. (2540). **การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาภายหลังการจับ**. ภาควิชาเทคโนโลยีอาหารคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

หน่วยงานกรมประมงโดยศูนย์สารสนเทศ. (2555). **การเพาะและอนุบาลกั้งตั๊กแตนหางจุด**. ค้นเมื่อ ธันวาคม 15, 2555, จาก http://www.fisheries.go.th.

Alais, C., & Linden, G. (1991). **Meat and blood products**. In: Food Biochemistry . England: Ellishorwood limited. pp. 174-192

An, H., Peters, M. Y., & Seymours, T. A. (1996). **Roles of endogenous enzymes on surimi gelation**. Trends in Food Science and Technology, 7, 321 – 327.

Anonymous. (2008). **An Overview of Actin**. Carnegie Mellon University. Available from: http://www.andrew.cmu.edu/user/asurie/03240/page1_files/image005.jpg. Accessed June 25, 2009.

Asghar, A., & Bhatti, A. R. (1987). **Endogenous proteolytic cayma in skeletal muscle: Thcir significance in muscle physiology and during postmortem aging events in carcasses**. Adv. Food Res. 31: 343.

Benjakul, S., Chantarasuwan, C., & Visessanguan, W. (2003). Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from tropical fish. Food Chem. 82: 567-574

Benjakul, S., Morrissey, M. T., Seymour, T. A., & An, H. (1997). **Recovery of proteinase from Pacific whiting surimi wash water**. J. Food Biochem. 21: 431-436.

Benjakul, S., Morrissey, M. T., Seymour, T. A., & An, H. (1997). Recovery of proteinase from Pacific whiting surimi wash water. J. Food Biochem. 21: 431-436.

Benjakul, S., Visessanguan, W., & Tueksuban, J. (2003). **Heat-activated proteolysis in lizardfish (*Saurida tumbil*) muscle**. Food Res. Int. 36: 1021-1028.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Tueksuban, J., & Tanaka, M. (2004). **Effect of some protein additives on proteolysis and gel-forming Ability of lizardfish (*Saurida tumbil*)**. Food Hydrocolloid. 18: 395-401.

Bigelow, W., & Lee, C. M. (2007). **Evaluation of various infused cryoprotective ingredients for their freeze-thaw stabilizing and texture improuving properties in frozen Red Hake muscle**. J. Food Sci. 72: 56-64.

Boye, S. W., & Lanie,r T. C. (1988). **Effects of heat-stable alkaline protease activity of Atlantic menhaden (*Brevoorti tyrannus*) on surimi gels**. J. Food Sci. 53: 1340-1342.

Cao, M. J., Osatomi, K., Tachibana, K., Izumi, T., & Ishihara, T. (1999). **Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar protein**. J. Food Sci. 64: 644-647.

Cheng, C. S., Hamann, D. D., & Webb, N. B. (1979). **Effect of thermal processing on minced fish gel texture**. J. Food Sci. 44: 1080-1086.

Doke, S. N., Ninjoor, V., & Nadkarni, G. B. (2012). **Characterization of cathepsin D from the skeletal muscle of fresh water fish Tilapia mossambic II.** Agric. Biol. Chem. 44: 1521-1528.

Diaz-Tenorio, L. M., Garcia-Carreno, F. L., & Pacheco-Aguilar, R. (2006). Comparison of freezing and thawing treatments on muscle properties of whiteleg shrimp (*Litopeneus vannamei*). J. Food Biochem. 31: 563-576.

Hashimoto, A., Kobayashi, A., & Arai, K. (1982). **Thermostability of fish myofibrillar Ca^{2+}-ATPase and adaptation to environmental temperature.** Nippon Suisan Gakkaishi. 57: 747.

Hermansson, A. M. (1978). **Physico-chemical aspects of soy protein structure formation.** J. Text Studies. 9: 33.

Heu, M. S., Kim, H. R., Cho, D. M., Godber, J. S., & Pyeun, J. H. (1990). **Purification and characterization of alkaline proteinases from the viscera of anchovy (*Engraulisjaponica*).** J. Food Sci. 15: 51-66.

http://www.mona.uwi.edu/fpas/courses/physiology/muscles/index.htm. Accessed June 25, 2013.

Hu, Y., Morioka, K., & Itoh, Y. (2007) .**Hydrolysis of surimi paste from walleye Pollock (*Theragra chalcogramma*) by cystaine proteinase cathepsin L and effect of the proteinase inhihitor (E-64) on gelation.** Food Chem. 104: 702-708.

Huang, C., Lai, H., Weng, Y. (1998). **Suitability of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) muscle for gel formation.** Int. J. Food Sci. Technol. 33: 339.

Jiang, S. T., Her, Y. H., Lee, J. J., & Wang, J. H. (1993). **Comparision of the cathepsin D from mackerel (*Scomber australasicus*) and milkfish (*Chanos chanos*) muscle.** Bioscience Biotechnology and Biochemistry 57: 571-577.

Jimenez-Colmenero, F., Careche, J., Carballo, L., Cofrades, S. (1994). **Influence of thermal treatment on gelation of actomyosin from different myosystems.** J Food Sci. 53(1): 211-215, 220.

Kjrsgård, I. V. H, & Jessen, F. (2003). **Proteome analysis elucidating post-mortern changes in cod (*Gadus morhua*) muscle proteins.** J. Agric. Food Chem. 51(14): 3985–3991.

Klomklao, S., Kishimura, H., & Benjakul, S. (2008). **Endogenous proteinase in true sardine (*Sardinops melanostictus*).** Food Chem. 107: 213-220.

Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., & Simpson, B.K. (2009). **Autolysis and biochemical properties of endogenous proteinase in Japanese sandfish (*Arctoscopus japonicus*).** Int. J. Food Sci. Technol. 44: 1344-1350.

Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., & Benjakul, S. (2007). **Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*)**. Comp. Biochem. Phys. Part B. 147: 682-689.

Ko, W. C., & Liou, S. C. (1994). **Thermal gelation properties of milkfish (*Chanos chanos*) cultured in Taiwan**. Niippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 41: 574-577.

Kolodziejska, I., & Sikorski, Z. E. (1996). **Neutral and alkaline muscle proteases of marine fish and invertebrates—a review**. J. Food Biochem. 20: 349–363.

Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of stuctural of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4**. Nature. 277: 680-685.

Lanier, T. C., Lin, T. S., Hamann, D. D., & Thomas, F. B. (1981). **Effect of alkaline protease in minced fish on texture of heat-processed gels**. J. Food Sci. 46: 1643-1645.

Lin, C. Y., & Wang, J. C. (1998). **Comparison of the characteristics of surimi-products of dorsal and belly muscle from milkfish**. Food Sci. Taiwan. 25(5): 591-600.

Lin, T. S., & Lanier, T. C. (1980). **Properties of an alkaline protease from the skeletal muscle of Atlantic croaker**. J. Food Biochem. 4: 17.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). **Protein measurement with Folin phenol reagent**. J. Biol. Chem. 193: 256-275.

Makindo, Y., Akasaka, T., Toyohara, H., & Ikeda, S. (1982). **Purification and properties of carp muscle cathepsin D**. J Food Sci. 47: 647-652.

Mikkelsen, S. R., & Corton, E. (2004). **Bioanalytical chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 361p.

Morrissey, M. T., Wu, J. W., Lin, D. D., & An, H. (1993). **Effect of food grade proteinase inhibitor on autolysis and gel strength of surimi**. J. Food Sci. 58: 1051-1054.

Ogawa, M., Tamiya, T., & Tsuchiya, T. (1994). **Structural changes of carp myosin during heating**. Fisheries Sci. 60: 723-7.

Park, J. W., & Lanier, T. C. (1989). **Scanning calorimetric behavior of tilapia myosin and actin due to processing of muscle and protein purification.** J. Food Sci. 54: 49-51.

Pavasovic, M., Richardson, N. A., Anderson, A. J., Mann, D., & Mather, .P. B. (2004). **Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrate*.** Aquaculture. 242: 641–654.

Potter, N. N., & Hotchkis, J.H. (1995). **Food Science.** New York: Chapman & Hall.

Rawdkuen, S., & Benjakul, S. (2008). Whey proyein concentrate: **Autolysis inhibition and effects on the gel properties of surimi prepared from tropical fish.** Food Chem. 106: 1077-1084.

Rawdkuen, S., Benjakul, S., Visessagnuan, W., & Lanier, T, C. (2007). **Effect of cysteine proteinase inhibitor containing fraction from chicken plasma on autolysis and gelation 0f Pacific whiting surimi.** Food Hydrocolloid 21:1209-1216.

Saborowski, R. (2004). **Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab Cancer pagurus.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 30: 109-118.

Schiavone, R., Zilli, L., Storelli, C., & Vilella, S. (2008). **Identification by proteome analysis of muscle proteins in sea bream (Sparus aurata).** European Food Research and Technology. 227(5): 1403–1410.

Shahidi, F., Kamil, Y. V. (2002). **Enzyme from fish and aquatic invertebrates and their application in the food industry.** Trends Food Sci Technol. 12: 435-464.

Shimizu, Y., Machida, R., & Tajenanami, S. (1981). **Species variation in tha gel-forming characteristics of fish meat.** Nippon Suisan Gakkaishi 47:95-104.

Sikorski, Z. E. & Kotakowska, A. (1994). **Change in frozen stored fish.** In: Sikorski, Z. E, Pan, B.S, & Shahidi, F. Seafood Protein. 1st ed. New York: Chapman Hall. p. 99-112.

Sikorski, Z. E. (1994). **The myofibrilar protein in seafood.** In: Sikorski ZE, Pan BS, Shahidi F. Seafood Protein. 1st ed. New York: Chapman & Hall One Penn Plaza. p. 40-50.

Sirikan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdikul, J. (2006). **Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*)**. Food Chem. 98: 678-684.

Suzuki, T. (1981). **Fish and Kill Protein Processing Technology**. Applied Science Publisher. London. p. 243-260.

Wang, P. A., Icair, M., Ragnar, L. O. (2009). **Myosin heavy chain degradation during post mortem storage of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)**. Food chem. 155: 1228-1233.

Wang, P. A., Vang, B., Pedersen, A. M., Martinez, I., & Olsen, R. L. (2011). **Post-mortem degradation of myosin heavy chain in intact fish muscle: Effect of pH and enzyme inhibitors**. Food chem. 124: 1090-1095.

Weng, W. Y., Hamaguchi, P.Y., Osaka, K., & Tanaka, M. (2007). **Effect of endogenous acid proteinases on the properties of edible films prepared from Alaska pollack surimi**. Food Chem. 105: 996-1002.

Wick, M. (2008). **Filament Assembly Properties of the Sarcomeric Myosin Heavy Chain**. The Ohio State University.Available from http://ohioline.osu.edu/sc172/images/sc172_4. jpg.Accessed June 25, 2013.

Wu, M. C., Lanier, T. C., & Hamann, D. D. (1985). **Rigidity and viscosity changes of croaker actomyosin during thermal gelation**. J Food Sci 50: 14.

Yamashita, M., & Konagaya, S. (1991). **Hydrolytic action of salmon cathepsin B and L muscle softening**. Nippon Suisan. Gakkaishi 57: 1917-1922.

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijroongrjana, K. (2009). **Autolysis of goatfish (*Mulloidichthys martinicus*) mince: Characterisation and effect of washing and skin inclusion**. J. Food Sci. 114: 1339-1344.

Young, R. E. (2008). **Myofilament fine structure**. Available from: กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ค้นเมื่อ มกราคม 2, 2556, จาก http://www.nicaonline.com.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

1.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

-หลอดทดลอง

-ปิเปตอัตโนมัติขนาด 1 มิลลิลิตรและ 5 มิลลิลิตร

-ทิปขนาด 1 มิลลิลิตรและ 5 มิลลิลิตร

- เครื่อง Vortex mixer

- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

1.2 สารเคมี

-คอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$)

-โซเดียมซิเตรท ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$)

-โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3)

-โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

-โฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu phenol reagent)

-ไทโรซีน (Tyrosine;Tyr)

1.3 วิธีการ

สารเคมี

(1) สารละลาย A

นำโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) จำนวน 1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.1 N เป็น 50 มิลลิลิตร

(2) สารละลาย B

นำคอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$) จำนวน 0.05 กรัมผสมกับโซเดียมซิเตรท ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$) จำนวน 0.1 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(3) สารละลาย C

นำสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย A ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

(4) สารละลาย D

1.3.1 นำโฟลินฟีนอล (Folin-Ciocalteu phenol reagent) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร

1.3.2 ดูดสารละลายตัวอย่าง 200 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย C 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที

1.3.3 เติมสารละลาย D ปริมาตร 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.3.4 นำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเรื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.3.5 หาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณไทโรซีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กับค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine; Tyr)

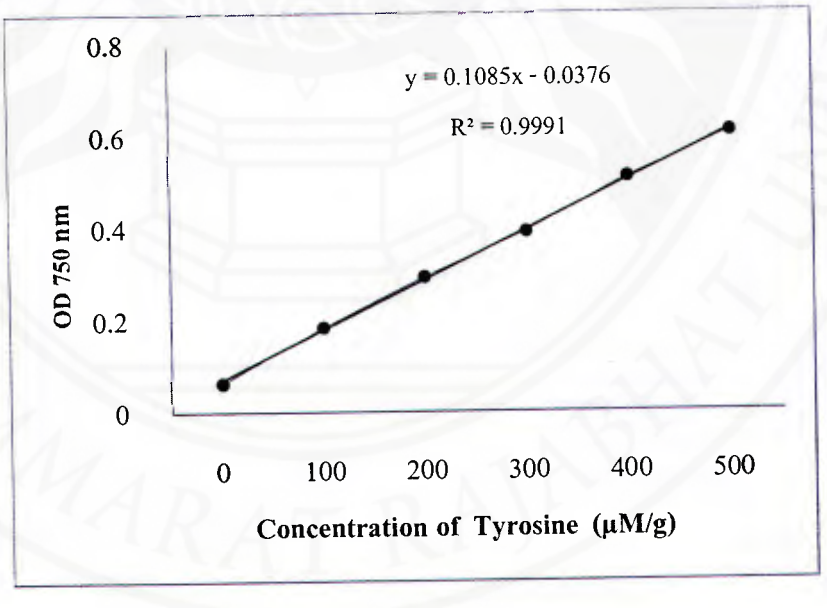
1.4.1 ดูดสารละลายโปรตีนมาตรฐานไทโรซีน (Tyrosine; Tyr) เข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจำนวน 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 มิลลิลิตรปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 มิลลิลิตร

1.4.2 เติมสารละลาย C 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 - 10 นาที

1.4.3 เติมสารละลาย D ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

1.4.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

1.4.5 เขียนกราฟมาตรฐานและหาสมการการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายไทโรซีนกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร (ภาพภาคผนวกที่ 1) ปริมาณโปรตีนคำนวณได้โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรแทนค่าในสมการของกราฟมาตรฐานไทโรซีน



ภาพภาคผนวกที่ 1 กราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีน

2. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret (1987)

2.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- หลอดทดลอง
- ปิเปตอัตโนมัติขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร
- ทิปขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร
- เครื่อง Vortex mixer
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer)

2.2 สารเคมี

- คอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$)
- โซเดียมโพเทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)
- สารละลาย Biuret

ผสม 0.5 กรัม ของคอปเปอร์ซัลเฟต ($Cu_2SO_4.5H_2O$) 600 กรัม ของโซเดียมโพเทสเซียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$) และ 500 มิลลิลิตรของน้ำกลั่น เติมสารละลาย 10 % โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารลลายเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

2.3 วิธีการ

2.3.1 ดูดสารละลายตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองเติมสารละลาย Biuret 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย Vortex mixer วางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

2.3.2 นำสารละลายผสมไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเรื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

3. การศึกษารูปแบบของโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE ดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970)

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- เครื่องโฮโมจีไนซ์ยี่ห้อ Ystral รุ่น X10/25
- อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์รูปแบบโปรตีน Mini-PROTEANTetra Cell ยี่ห้อ BIO-RAD ประเทศสหรัฐอเมริกา
- เครื่องชั่งไฟฟ้าละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่งยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210S ประเทศเยอรมัน
- อ่างควบคุมอุณหภูมิ
- อุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับวิเคราะห์ทางเคมี

3.2 สารเคมี

- สารละลายโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 5% (w/v)
- สารละลายโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 10% (w/v)
- สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 6 N
- สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 1.5 โมลาร์ค่าความเป็นกรดด่าง 8.8
- สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 0.5 โมลาร์ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8
- สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต ($N_2H_8S_2O_8$) เข้มข้น10%(w/v)
- สารละลายโบโมฟีนอลบลู ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) 0.5% (w/v)
- สารละลายอะคริลาไมด์/บิสอะคริลาไมด์

ชั่งอะคริลาไมด์ (C_3H_5NO) 29.2 กรัมบิสอะคริลาไมด์ ($C_7H_{10}N_2O_2$) 0.8 กรัมจากนั้นปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นกำจัดไอออนจากนั้นนำไปกรองเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ก่อนใช้ต้องเอาออกไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที)

- Electrode buffer

ชั่ง Tris-HCL 6.0 กรัมไกลซีน ($C_2H_5NO_2$) 28.8 กรัมและโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) 2 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 2000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น (แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนใช้)

- Sample buffer

สารละลาย Tris-HCL เข้มข้น 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 ปริมาตร 6.25 มิลลิลิตร กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) 5 มิลลิลิตร สารละลายโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ($C_{12}H_{25}NaO_4S$) เข้มข้น 10% (w/v) 10 มิลลิลิตร สารละลายโบโมฟีนอลบลู($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) 0.0750 มิลลิลิตร เบต้าเมอร์แคปโตเอธานอล ($HS\text{-}CH_2CH_2OH$) 2.5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 25 มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรอง แยกเก็บใน microtube และแช่เยือกแข็ง

- สีย้อมแถบโปรตีน

ชั่งคูแมสซีบริลเลียนท์บลู R-250 ($C_45H_44N_3NaO7S_2$) 0.08 กรัม ละลายในเมธานอล (CH_3OH) 200 มิลลิลิตรน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร และกรดอะซิติก (CH_3COOH) 30 มิลลิลิตร

-สารชะล้างสีย้อมแถบโปรตีน

เมธานอล (CH_3OH) 200 มิลลิลิตรกรดอะซิติก (CH_3COOH) 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 170 มิลลิลิตร

3.3 วิธีการ

3.3.1 นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต ($C_{12}H_25NaO_4S$) เข้มข้น 5% (w/v) เพื่อปรับความเข้มข้นของโปรตีนให้เท่ากันในทุกๆตัวอย่าง

3.3.2 ผสมสารละลายตัวอย่างกับ Sample buffer ในอัตราส่วน 1:1 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของโปรตีนในสารละลายตัวอย่างเท่ากับ 5 ไมโครกรัม ต้ม 3 นาที

3.3.3 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยโหลดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตรควาเข้มข้นของเจลอะคริลาไมด์สำหรับการแยก (running gel) ที่ 10% และความเข้มข้นของเจลสำหรับการทำให้โปรตีนในตัวอย่างเข้มข้นขึ้น (stacking gel) ที่ 4% ใช้ไฟฟ้าที่มีความต้านทานคงที่ 120 โวลท์โดยสามารถเตรียมเจลได้ตาม (ตารางที่ภาคผนวกที่ 1)

3.3.4 นำไปหยุดการเคลื่อนที่ของแถบโปรตีน (fixed และย้อมสีสีย้อมแถบโปรตีน)

3.3.5 ล้างสีย้อมด้วยสารชะล้างสีย้อมแถบโปรตีน

ตารางภาคผนวกที่ 1 ปริมาณสารผสมที่ใช้สำหรับเตรียมเจล

Reagent	10% running gel	4% stacking gel
Monomer solution (30% T,2.7%C)	3,333 µl	665 µl
Saparating gel buffer (1.5 M Tris_HCl, pH 8.8)	2,500 µl	-
Stacking gel buffer (0.5 M Tris_HCl, pH 6.8)	-	1,250 µl
Distilled water	4,012 µl	3,000 µl
10% SDS	100 µl	50 µl
10% Ammonium persulfate	50 µl	25 µl
TEMED	5 µl	5 µl
Total	10 ml	4.993 ml

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	256.580	6	42.763	965.624	.000*
Within Groups	.620	14	.044		
Total	257.200	20			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนขนาดกลางระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	221.090	6	36.848	841.101	.000*
Within Groups	.613	14	.044		
Total	221.703	20			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 4 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63.185	8	7.898	27.235	.000*
Within Groups	13.050	45	.290		
Total	76.235	53			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2 – 12 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.742	13	1.211	9.974	.000*
Within Groups	8.013	66	.121		
Total	23.756	79			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	21.938	4	5.484	54.067	.000*
Within Groups	2.232	22	.101		
Total	24.170	26			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางภาคผนวกที่ 7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	20.583	4	5.146	32.314	.000*
Within Groups	3.503	22	.159		
Total	24.087	26			

*แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ประวัตินักวิจัย

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ-สกุล นางสาวจันทิรา วงศ์วิเชียร
Ms. Chantira Wongwichian

2. หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3 8501 00288 402

3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

4. สถานที่ทำงาน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช
ตำบลท่างิ้ว อำเภอเมือง จังหวัด
นครศรีธรรมราช 80280
โทรศัพท์ และโทรสาร (075) 377443

5. สาขาชำนาญการ เคมีอาหาร (Food Chemistry)

6. ประวัติการศึกษา

ปีที่ศึกษา	ระดับการศึกษา	ชื่อปริญญา	สาขาวิชา	ชื่อสถาบัน
พ.ศ. 2541-2544	ปริญญาตรี	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	เคมี	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พ.ศ. 2546-2548	ปริญญาโท	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	เทคโนโลยีการอาหาร	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
พ.ศ. 2551-ปัจจุบัน	ปริญญาเอก	ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต	อุตสาหกรรมเกษตร	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์

7. ประสบการณ์ในการทำวิจัย

ชื่อเรื่อง	ปี	สถานภาพในการวิจัย
1. ความคงตัวของสารสีที่สกัดจากกระเจี๊ยบ	2550	หัวหน้าโครงการวิจัย
2. ความปลอดภัยทางอาหารของทรัพยากรชีวภาพในชุมชนประมงอ่าวนครศรีธรรมราช	2552	ผู้ร่วมวิจัย
3. Production and Improvement of Surimi Gel from Oxeye Scad (*Selar boops*) and Shrimp Scad (*Alepes djedaba*)	2553	วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก
3. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพความสดของกั้งตั๊กแตน (*Harpiosquilla*) ภายหลังการจับ (โครงการวิจัยต่อเนื่อง 2 ปี)	2554 - 2555	หัวหน้าโครงการวิจัย
4. การพัฒนาตำรับอาหารจากชะคราม	2554	ผู้ร่วมวิจัย

การจำแนกคุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

Characterization of Endogenous Proteinases in Mantis Shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) Muscle

จันทิรา วงศ์วิเชียร* ฐิติมา ลือแมะ**

Chantira Wongwichian* Titima Lermah**

บทคัดย่อ

การศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดการเก็บรักษา ($p<0.05$) และหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ($p<0.05$) ผลการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน โดยการบ่มกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่อุณหภูมิ (30–80 องศาเซลเซียส) และ pH ต่างๆ (2.0–12.0) พบว่าการย่อยสลายตัวสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และ pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเท่ากับ 4.0 และ 9.0 และพบว่าสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 และ Pepstatin A สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุดทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและด่าง ดังนั้นเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในเนื้อกั้งตั๊กแตนบดเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและชนิดแอสปาติก

คำสำคัญ: กั้งตั๊กแตน, การย่อยสลายตัวเอง, การเก็บรักษา, เอนไซม์โปรตีเนส

---

*อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

**นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

Abstract

Autolytic activity of mantis shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) muscle during 10-day iced storage was characterized. Autolytic degradation of mantis shrimp muscle increased throughout 10 days of iced storage ($p<0.05$). After day 4, mantis shrimp muscle showed sharply increases in TCA-soluble peptide content ($p<0.05$). Proteases of mantis shrimp mince was characterized. Mantis shrimp mince were incubated at different temperatures (30 – 80oC) and pH (2.0-12.0). The highest autolysis activity was exhibited at 60 oC. The optimum pH for the autolysis of mantis shrimp mince was found at 4.0 and 9.0. The proteinase inhibitors, E-64 and Pepstatin A showed the greatest inhibition of autolysis at both acid and alkali pHs revealing that proteinases found in mantis shrimp mince are cysteine proteinases and aspartic proteinases

keywords: Mantis shrimp, Autolysis, Storage, Proteinase

บทนำ

กั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ตลาดต้องการทั้งบริโภคในประเทศและส่งออกต่างประเทศ ประเทศ กั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์น้ำที่มีโปรตีนสูงและเป็นที่นิยมของตลาดและจะต้องเป็นกั้งตั๊กแตนที่อยู่ในสภาพที่มีชีวิตเท่านั้นส่วนตั๊กแตนที่ตายแล้วจะไม่เป็นที่นิยมของตลาดเนื่องจากเนื้อจะมีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วไม่เป็นที่นิยมบริโภค

กล้ามเนื้อสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งมีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำภายหลังการตาย กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของสัตว์น้ำ วงจรชีวิต และอาหาร เอนไซม์โปรตีเนสสามารถพบได้ในของเหลวภายในเซลล์หรืออาจจับอยู่กับเซลล์ (สุทธวัฒน์, 2549) ทัศนีย์ และ จิราพร (2009) รายงานว่ากุ้งเคยมีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนในเนื้อกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Saborowski (2004) พบว่าเอนไซม์ในกล้ามเนื้อกุ้งแชบ๊วยมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้เคียงกับกุ้งขาวแวนาไมโดยพบว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส (Doke, & Ninjoor, 2012) Cao และคณะ (1999) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีนที่จับกับโปรตีนไมโอฟิบลิลลาร์ จากกล้ามเนื้อปลาปากคมสามารถย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนักที่อุณหภูมิ 50–60 องศาเซลเซียส จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายตัวเองและการจำแนกคุณลักษณะของเอนไซม์ในกั้งตั๊กแตน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเอง รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อ กั้งตั๊กแตนและผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่มีผลต่อกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเพื่ออธิบายคุณลักษณะรวมทั้งปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนภายหลังการตาย ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาถึงวิธีการชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายได้จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพกั้งตั๊กแตนหลังการเก็บเกี่ยวให้ดียิ่งขึ้น

สารเคมีและวิธีสุ่มตัวอย่าง

สารเคมี

Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pepstatin A, soybean trypsin inhibitor, iodoacetic acid, 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanidinobutane (E-64), N-ethylmaleimide, β-mercaptoethanol (βME) and bovine serum albumin, Sodium chloride, tris (hydroxymethyl) aminomethane and Folin–Ciocalteu's phenol reagent Sodium dodecyl sulfate (SDS), Coomassie Blue R-250 และ *N,N,N',N'*-tetramethyl ethylene diamine (TEMED)

วิธีสุ่มตัวอย่าง

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายโดยกั้งตั๊กแตนที่นำมาใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นกั้งตั๊กแตนสายพันธุ์ *Harpiosquilla raphidea* ที่จับได้จากทะเลฝั่งอ่าวไทย อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนเมษายน 2556-มิถุนายน 2556

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

1.1 วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (TCA soluble peptide) (Balange, & Benjakul, 2009)

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 2 กรัม ใส่ในบีกเกอร์เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

1.2 ติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อน ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

2. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (1951)

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ บ่มที่ 30-80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อน ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำส่วนที่เป็นของเหลวใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบของโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

3. ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเนสในกั้งตั๊กแตน

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 2 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ pH 2-12 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร (McIlvain's buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยชั่งกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัมผสมกับบัฟเฟอร์ pH 2-12 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตร้อนความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

4. ศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

ชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน 0.5 กรัม เติมบัฟเฟอร์ pH 4 หรือ pH 9 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ E-64 ความเข้มข้น 0.1 mM, SBTI 0.1 กรัม/ลิตร pepstatin A ความเข้มข้น 0.01 mM, EDTA ความเข้มข้น 2 mM บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเย็น ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 15 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้โดยวิธี Lowry (1951)

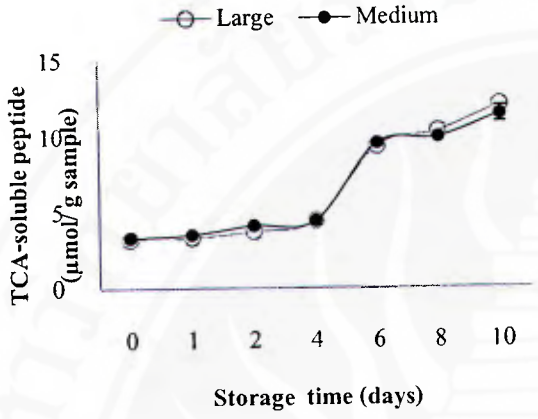
สำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970) โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน 0.5 กรัม เติมบัฟเฟอร์ pH 4 หรือ pH 9 ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายดังนี้ E-64 ความเข้มข้น 0.1 mM, SBTI 0.1 กรัม/ลิตร pepstatin A ความเข้มข้น 0.01 mM, EDTA ความเข้มข้น 2 mM จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 15 บ่มต่อที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที นำส่วนใสไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Biuret (1987) และรูปแบบโปรตีน ด้วยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

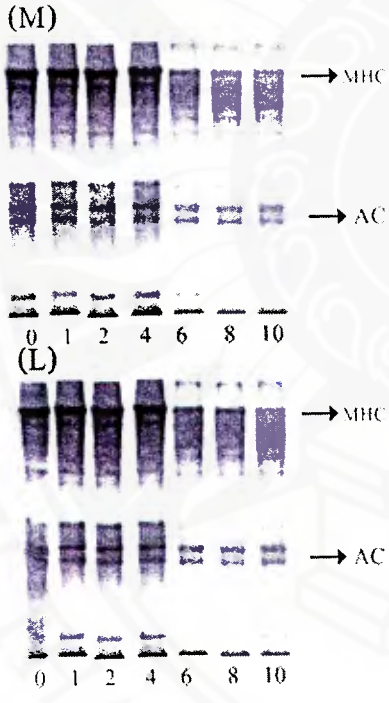
1. การศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่และขนาดกลางพบว่าเมื่อนำกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน โดยสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0 1 2 4 6 8 และ 10 แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายซึ่งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 4.1 พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้นส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้เพิ่มขึ้นโดยวันที่ 0-4 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้อยู่ในช่วง 3.2±0.00-4.4±0.06 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง (p<0.05) และพบว่าหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนของกั้งตั๊กแตนโดยใช้เทคนิค SDS- PAGE (ภาพที่ 4.2) พบว่า ในวันที่ 6-10 ของการเก็บรักษาแถบไมโอซินและแอกตินจะบางกว่าช่วงอื่นๆซึ่งเกิดจากกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเนสได้แก่กลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะ เปปไทด์ของสายโปรตีน เอนไซม์เหล่านี้มีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำหลังการตาย Benjakul และคณะ (1997) รายงานว่า โปรตีนชนิดไมโอซินสายหนักในปลาแปซิฟิกไวติ้งถูกย่อยสลายประมาณร้อยละ 45 ภายใน 8 วัน ของการเก็บ

รักษาในน้ำแข็งโดยการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์



ภาพที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

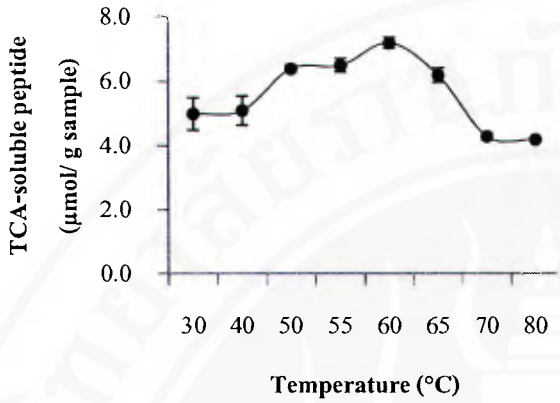


ภาพที่ 4.2 รูปแบบโปรตีนของเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการ เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

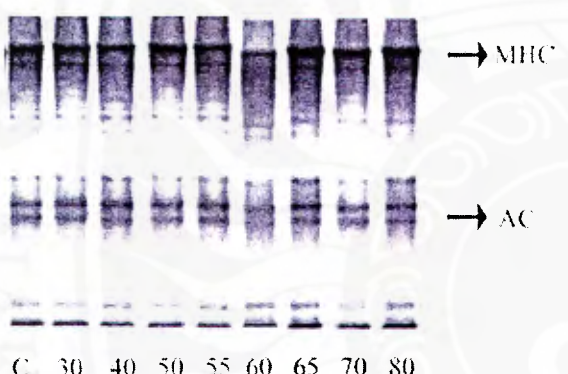
หมายเหตุ MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน
M: กั้งตั๊กแตนขนาดกลาง
L: กั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่

2. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกั้งตั๊กแตน พบว่าเมื่อนำกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบ่มสูงขึ้นปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จะเพิ่มขึ้นโดยปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ มีปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (7.2±0.19 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) (p<0.05) (ภาพที่ 4.3) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีปริมาณลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4.4) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินสายหนักและแอกตินมีความบางกว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆและตัวอย่างควบคุม (C) จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสในสัตว์น้ำ พบว่าเอนไซม์โปรติเนสในปูทะเลมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 50–60 องศาเซลเซียส (Pavasovic *et al.*, 2004) Diaz-Tenorio และคณะ (2006) ศึกษาเอนไซม์โปรติเนสใน gastric juice และ mid gut ของปู 2 ชนิด ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *C. arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ทัศนีย์ และ จิราพร (2009) รายงานว่ากุ้งเคอยมีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนในเนื้อกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ เป็นเวลา 60 นาที

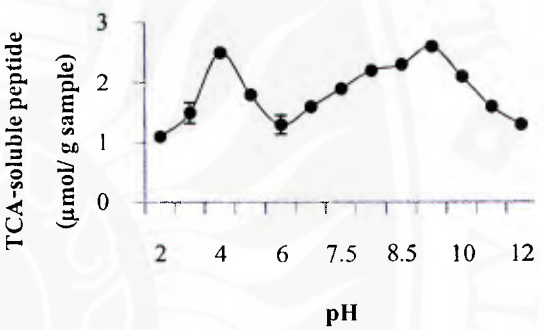


ภาพที่ 4.4 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

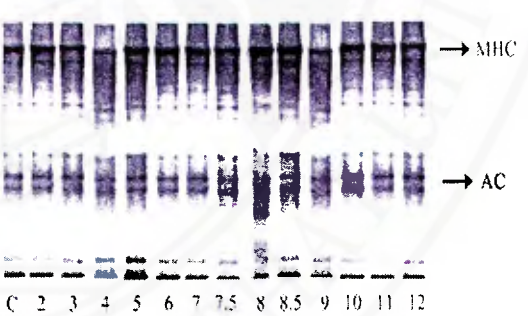
หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ไม่ผ่านการบ่ม MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน

3. การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ผ่านการบ่มที่ pH 2–12 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่ 4.5) พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่ pH 9 มีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้สูงสุด (2.6±0.29ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) รองลงมาคือกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่ pH 4 (2.3±0.16 ไมโครโมลต่อกรัมตัวอย่าง) ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกัน (p>0.05) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมี 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มแอซิดโปรตีเนสและอัลคาไลน์โปรตีเนส Yarnpakdee และคณะ (2009) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในปลาแพะ มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่ pH 4.0 และ 7.0 และพบว่าที่ pH 4.0 มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุด Klomklao และคณะ (2007) รายงายว่าปลานิลมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ pH 5 ส่วนการย่อยสลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่สภาวะด่าง (pH 8.5 – 9.0)



ภาพที่ 4.5 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2 - 12 อุณหภูมิ 60 องศาเซียสเซียส เป็นเวลา 60 นาที



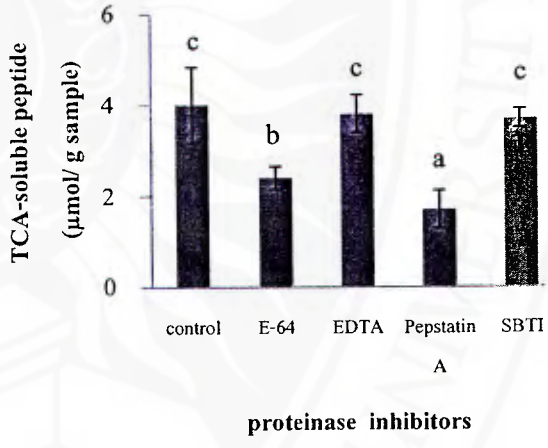
ภาพที่ 4.6 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2-12 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผ่านการบ่ม MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอกติน

4. การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อการ ทำงานเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

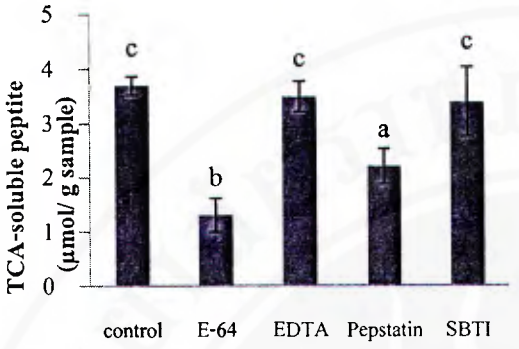
จากผลการศึกษาสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนตารางที่ 4.1 แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์ โปรตีเนสชนิดต่างๆที่ pH 4 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A มีความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุดโดยมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 68.3 ส่วนที่ pH 9 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุด โดยมีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมเท่ากับร้อยละ 68.6 จากการทดลองบ่งชี้ว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและแอสปาติก

การศึกษารูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4 (ภาพที่ 4.9) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที พบว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A ในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้แถบไมโอซินสายหนักหนากว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ ส่วนที่ pH 9 (ภาพที่ 4.10) พบว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 ในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้แถบไมโอซินสายหนักหนากว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งเอนไซม์โปรติเนสชนิด Pepstatin A สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดส่วนสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง Banjakul และคณะ (2003) รายงานว่า E-64 สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาซาร์ดีนได้ Kloamkloa และคณะ (2008) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสพี่พบในกล้ามเนื้อปากคมคือ เอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสปาติกและซีรีน โดยเอนไซม์โปรตีเนสทั้งสองสามารถมีกิจกรรมได้ที่ pH 3.5 และ 9.5 ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองได้โดยเติมสารยับยั้งเอนไซม์ชนิด Pepstatin A และ SBTI ตามลำดับ



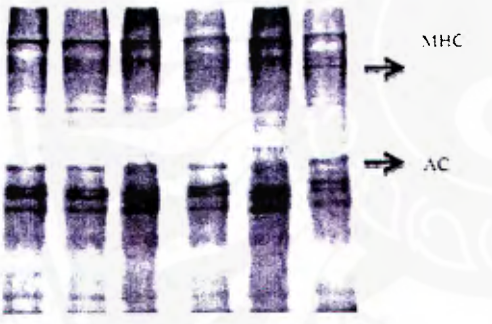
ภาพที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ $^{a-c}$ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.8 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

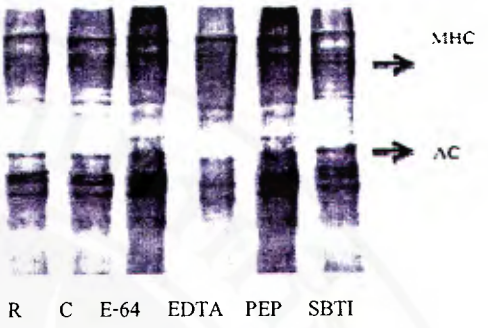
หมายเหตุ $^{a-b}$ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)



ภาพที่ 4.9 รูปแบบโปรตีนของเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ -R: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม

-C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม



ภาพที่ 4.10 รูปแบบโปรตีนของเนื้อกั้งตั๊กแตนบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ -R: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม

-C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนโดยเอนไซม์โปรตีเนส ระหว่างการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดการเก็บรักษา สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนคือที่ pH 4.0 และ 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซียลเซียส สำหรับผลการศึกษาชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนพบว่า E-64 และ Pepstatin A สามารถยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้ดีที่สุด ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเป็นชนิดซิสเตอีนและแอสปาติก

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร. (2009). **ศึกษาการย่อยสลายตังเองในกุ้งเคย.** ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล. (2549). **ชูริมิ: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเนื้อปลาบด.** กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

Benjakul, S., Chantarasuwan, C., & Visessanguan, W. (2003). **Effect of medium temperature setting on gelling characteristics of surimi from tropical fish.** Food Chem. 82: 567-574

Benjakul, S., Morrissey, M. T., Seymour, T. A., & An, H. (1997). **Recovery of proteinase from Pacific whiting surimi wash water.** J. Food Biochem. 21: 431-436.

Cao, M. J., Osatomi, K., Tachibana, K., Izumi, T., & Ishihara, T. (1999). **Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar protein.** J. Food Sci. 64: 644-647.

Klomklao, S., Kishimura, H., Yabe, M., & Benjakul, S. (2007). **Purification and characterization of two pepsins from the stomach of pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*).** Comparative Biochemistry and Physioligy Part B. 147: 682-689.

Laemmli, U. K. (1970). **Cleavage of stuctural of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature. 277: 680-685.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). **Protein measurement with Folin phenol reagent.** J. Biol. Chem. 193: 256-275.

Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Kijroongrjana, K. (2009). **Autolysis of goatfish(*Mulloidichthys martinicus*) mince: Characterisation and effect of washing and skin inclusion.** J. Food Sci. 114: 1339-1344.