กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

Autolytic activity of mantis shrimp (*Harpiosquilla raphidea*) muscle

จันทิรา วงศ์วิเชียร* และ ฐิติมา ลือแมะ**
Chantira Wongwichian* and Titima Lermah**

บทคัดย่อ

จากการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่ากล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดทั้ง 10 วันที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง ($p<0.05$) หลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษา กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองเพิ่มขึ้นอย่างเด่นชัดโดยจะเห็นได้จากการลดลงของแถบไมโอซินเส้นหนักบน SDS-PAGE และการเพิ่มขึ้นของปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก ($p<0.05$) นอกจากนี้จากการศึกษาคุณลักษณะรูปแบบการย่อยสลายตัวเองในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนโดยการบ่มกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่อุณหภูมิ (30–80 องศาเซลเซียส) และพีเอชต่างๆ (2.0–12.0) พบว่าการย่อยสลายตัวสูงสุดเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนเท่ากับ 4.0 และ 9.0

คำสำคัญ: กั้งตั๊กแตน, การย่อยสลายตัวเอง, การเก็บรักษา, เอนไซม์โปรตีเนส

* อาจารย์ประจำหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

** นักศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

Abstract

Autolysis 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, autolysis was markedly increased by the result of the decrease in MHC band intensity on SDS-PAGE and the increase in TCA-soluble peptides ($p<0.05$). Characterization of the autolytic profile of mantis shrimp muscle was also investigated. Mantis shrimp mince was incubated at different temperatures (30 – 80°C) and pH (2.0-12.0). The highest autolysis was observed at 60°C. Optimum pH for the autolysis of mantis shrimp mince was found at 4.0 and 9.0.

keywords: Mantis shrimp, Autolysis, Storage, Proteinase

1. บทนำ

กั้งตั๊กแตน (Mantis shrimp) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่ตลาดต้องการทั้งบริโภคในประเทศและส่งออกต่างประเทศ กั้งตั๊กแตนเป็นสัตว์น้ำที่มีโปรตีนสูงและเป็นที่นิยมของตลาดและจะต้องเป็นกั้งตั๊กแตนที่อยู่ในสภาพที่มีชีวิตเท่านั้นส่วนตั๊กแตนที่ตายแล้วจะไม่เป็นที่นิยมของตลาดเนื่องจากเนื้อจะมีการย่อยสลายอย่างรวดเร็วไม่เป็นที่นิยมบริโภค

กล้ามเนื้อสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดซึ่งมีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำภายหลังการตาย กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของสัตว์น้ำ วงจรชีวิต และอาหาร เอนไซม์โปรตีเนสสามารถพบได้ในของเหลวภายในเซลล์หรืออาจจับอยู่กับเซลล์ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549) ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร (2552) รายงานว่ากุ้งเคย (*Acestes* sp.) มีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส และพีเอช 5.0 และ 8.0 โดยการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนในเนื้อกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส จากรายงานของ Saborowski (2004) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสในปูทะเล (*Cancer pagurus*) พบกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 5.0-7.0 เอนไซม์ในกล้ามเนื้อกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus indicus*) มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พีเอช 8.0 (Doke & Ninjoor, 1987) ซึ่งใกล้เคียงกับกุ้งขาวแวนาไม (*Penaens vannamei*) โดยพบว่ามีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5-7.5 (Cao et al., 2008) สวามินี ธีระวุฒิ และคนอื่นๆ (2549) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในปูนิ่ม (Soft shell Crab) คือที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 เอนไซม์โปรตีเนสที่มีบทบาทสูงที่สุดคือ metallo-protease จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการย่อยสลายตัวเองในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง รวมทั้งสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยสลายตัวเองในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนซึ่งสามารถนำข้อมูลที่ได้ใช้เป็นแนวทางในการศึกษาเพื่ออธิบายคุณลักษณะรวมทั้งปัจจัยภายในที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนภายหลัง

การตาย ซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำไปต่อยอดในการศึกษาถึงวิธีการชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายได้จึงเป็นการเพิ่มศักยภาพกั้งตั๊กแตนหลังการเก็บเกี่ยวให้ดียิ่งขึ้น

2. สารเคมีและวัตถุดิบ

2.1 สารเคมี

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

2.2 วัตถุดิบ

กั้งตั๊กแตนสายพันธุ์ *Harpiosquilla raphidea* จับได้จากทะเลฝั่งอ่าวไทย อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช ในช่วงเดือนเมษายน 2556 ถึงเดือนมิถุนายน 2556 ตัวอย่างกั้งตั๊กแตนจะถูกบรรจุในกล่องสไตโรโฟม และขนส่งมายังห้องปฏิบัติการศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราชใช้เวลาประมาณ 30 นาที ขนาดของกั้งตั๊กแตนที่ใช้ในการศึกษามี 2 ขนาด ได้แก่ ขนาดใหญ่ (Large; L) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 190-210 กรัม มีความยาวของลำตัวมากกว่า 10 นิ้ว และขนาดกลาง (Medium; M) มีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 110-130 กรัม มีความยาวของลำตัวระหว่าง 8-10 นิ้ว

3. วิธีการวิจัย

3.1 การศึกษาการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

การเก็บรักษาตัวอย่างตลอดระยะเวลาการทดลองมีวิธีการดังนี้ บรรจุตัวอย่างกั้งตั๊กแตนทั้งขนาดใหญ่และขนาดกลางในถุงพลาสติกชนิดโพลีเอทิลีน และวางตัวอย่างลงในกล่องสไตโรโฟม โดยเรียงสลับระหว่างกั้งตั๊กแตนกับน้ำแข็งเป็นชั้นๆ ในอัตราส่วนกั้งตั๊กแตนกับน้ำแข็งเท่ากับ 1:3 เก็บในตู้แช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำแข็งให้อยู่ในอัตราส่วน 1:3 ทุกๆ 2 วัน เพื่อรักษาอัตราส่วนระหว่างกั้งตั๊กแตนและปริมาณน้ำแข็งให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา สุ่มตัวอย่างวันที่ 0 1 2 4 6 8 และ 10 ของการเก็บรักษา ตัวอย่างกั้งตั๊กแตนที่สุ่มได้ในแต่ละวันจะถูกนำมาแกะเปลือกแยกเอาเฉพาะเนื้อและบดด้วยเครื่องบดผ่านรูที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างทุกขั้นตอนตัวอย่างจะต้องแช่ในน้ำแข็งเพื่อควบคุมอุณหภูมิของตัวอย่าง ตัวอย่างที่เตรียมได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติก (Lowry et al., 1951) และติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (Laemmli, 1970) ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

3.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน (ขนาดกลาง) บดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 3.1 จากนั้นนำตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่เตรียมได้มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนส โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 3 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 27 มิลลิลิตร นำส่วนใสไปตรวจสอบปริมาณโอลิโกเปปไทด์ด้วยวิธี Lowry assay (Lowry et al., 1951) และติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ไม่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นชุดควบคุม

3.3 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกั้งตั๊กแตน

เตรียมตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน (ขนาดกลาง) บดเช่นเดียวกับการทดลองในข้อที่ 3.1 จากนั้นนำตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่เตรียมได้มาศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนส โดยชั่งตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบด 2 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์ พีเอช 2-12 ปริมาตร 12 มิลลิลิตร (พีเอช 2.0-7.0 ใช้ McIlvain's buffer ประกอบด้วย sodium phosphate เข้มข้น 0.2 M และ sodium citrate เข้มข้น 0.1 M และพีเอช 8.0-12 ใช้ 0.1 M glycine–NaOH buffer) บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแช่เย็นที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 18 มิลลิลิตร นำส่วนใสไปตรวจสอบปริมาณโอลิโกเปปไทด์ด้วยวิธี Lowry assay (Lowry et al., 1951) และติดตามการเปลี่ยนแปลงของรูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) สำหรับการเตรียมตัวอย่างชุดควบคุมให้เตรียมเช่นเดียวกับตัวอย่างชุดทดลอง

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ดำเนินการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของการทดลองโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) (Steel & Tottie, 1980)

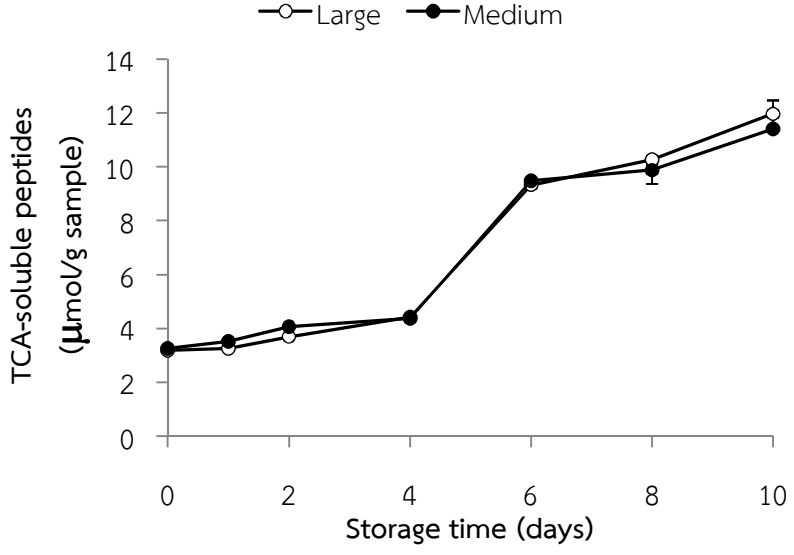
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การศึกษารูปแบบการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

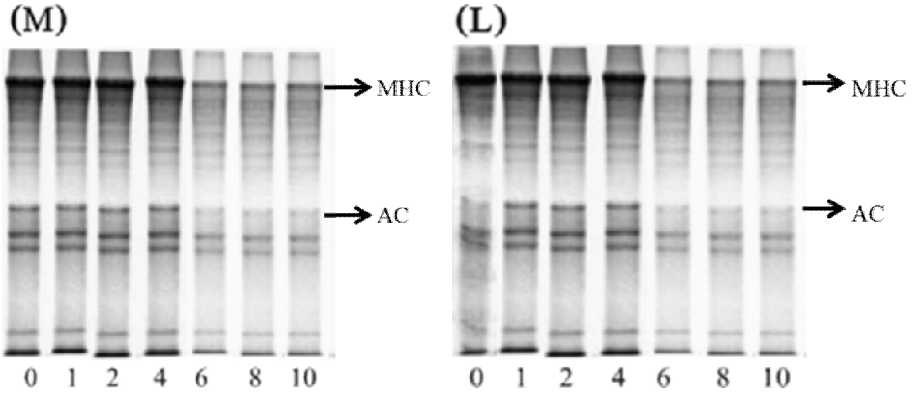
จากการศึกษาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนทั้งขนาดใหญ่และขนาดกลางระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ($p<0.05$) (ภาพที่ 1) และพบว่าหลังจากวันที่ 4 ของการเก็บรักษาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนของกั้งตั๊กแตนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 2) พบว่าในวันที่ 6-10 ของการเก็บรักษาแถบไมโอซินและแอกตินจะบางกว่าช่วงวันแรกๆ ของการเก็บรักษา เนื่องจากกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์กลุ่มไฮโดรเลส ซึ่งเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตายของสัตว์น้ำ เช่น เอนไซม์โปรตีเนส ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549)

Benjakul และคนอื่นๆ (1997) รายงานว่าโปรตีนชนิดไมโอซินเส้นหนักในปลาแปซิฟิกไวติ้ง (Pacific whiting) ถูกย่อยสลายประมาณร้อยละ 45 ภายใน 8 วัน ของการเก็บรักษาในน้ำแข็งโดยการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่และขนาดกลางมีความแตกต่างกัน ($p<0.05$) (ภาพที่ 1) โดยตัวอย่างกั้งตั๊กแตนขนาดกลางปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกมากกว่าตัวอย่างกั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่ ซึ่งบ่งชี้ให้ทราบว่าขนาดของสัตว์น้ำส่งผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายของเอนไซม์ จากผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่มีอยู่ในตัวอย่างกั้งตั๊กแตนขนาดกลาง มีกิจกรรมการย่อยสลายสูงกว่ากั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Klahan และคนอื่นๆ (2009) พบว่าเอนไซม์โปรตีเนสและไลเพสในปลานิล (*Oreochromis niloticus* L.) ขนาดกลางมีกิจกรรมการย่อยสูงกว่าปลานิลขนาดใหญ่



ภาพที่ 1 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกในกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

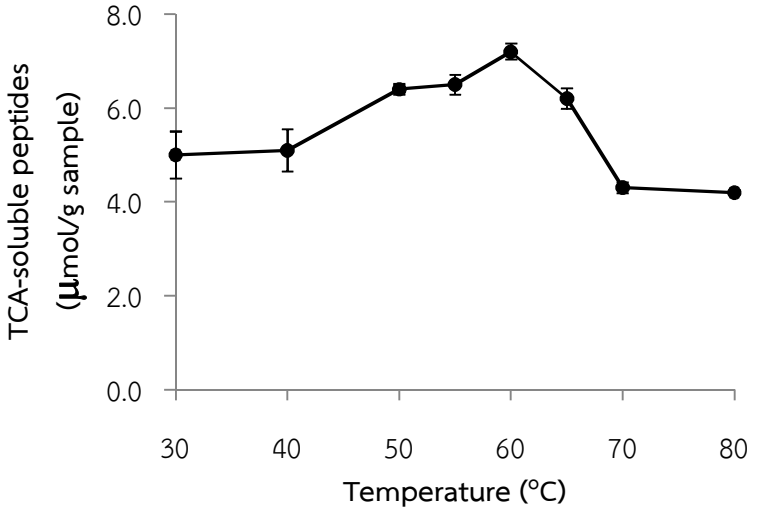


ภาพที่ 2 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน

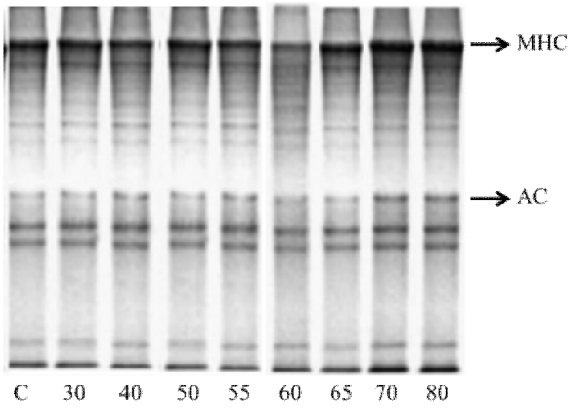
หมายเหตุ MHC: ไมโอซินเส้นหนัก AC: แอกติน
M: กั้งตั๊กแตนขนาดกลาง L: กั้งตั๊กแตนขนาดใหญ่

4.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน โดยการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเนสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่อุณหภูมิ 30-80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการบ่มสูงขึ้นปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (7.2±0.19 ไมโครโมล/กรัมตัวอย่าง) ($p<0.05$) (ภาพที่ 3) และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 65 องศาเซลเซียส ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้มีปริมาณลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 4) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินเส้นหนักและแอกตินมีความบางกว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นและตัวอย่างควบคุม (C) จากรายงานการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในสัตว์น้ำ พบว่าเอนไซม์โปรตีเนสในปูทะเล (*Scylla serrate*) มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานอยู่ในช่วง 50–60 องศาเซลเซียส (Pavasovic *et al*., 2004) Diaz-Tenorio และคนอื่นๆ (2006) ศึกษาเอนไซม์โปรตีเนสใน gastric juice และ mid gut ของปู 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Callinectes bellicosus* และ *Callinectes arcuatus* พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร (2552) รายงานว่ากุ้งเคยมีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส โดยการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนในเนื้อกุ้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 65 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้เอนไซม์ที่เป็นโปรตีนเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ (denature)



ภาพที่ 3 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที

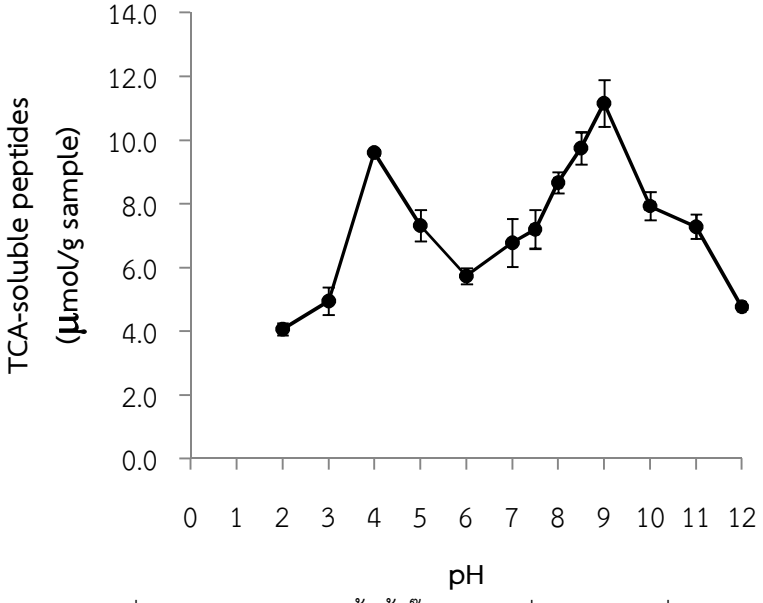


ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 60 นาที
หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ไม่ผ่านการบ่ม MHC: ไมโอซินเส้นหนัก AC: แอกติน

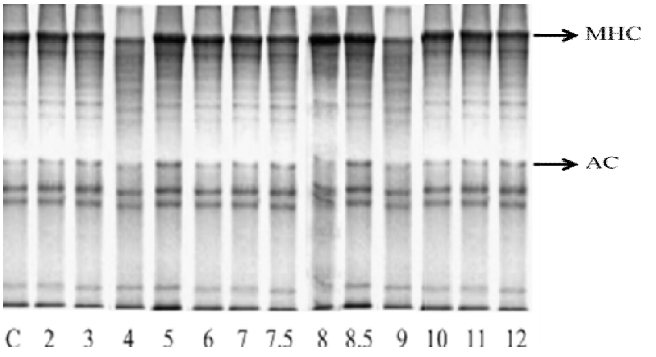
4.3 การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน

การศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตน โดยการย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเนสที่อยู่ในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่พีเอช 2–12 ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (ภาพที่ 5) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสมีกิจกรรมทั้งในช่วงกรดและด่าง โดยปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซิติกของตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ย่อยสลายโดยเอนไซม์ โปรตีเนสที่พีเอช 9.0 เท่ากับ 11.15±0.74 ไมโครโมล/กรัมตัวอย่างและตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ย่อยสลายโดยเอนไซม์โปรตีเนสที่พีเอช 4.0 เท่ากับ 9.64±0.09 ไมโครโมล/กรัมตัวอย่าง ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมี 2 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มแอซิดโปรตีเนส และอัลคาไลน์โปรตีเนส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษารูปแบบโปรตีนโดยเทคนิค SDS-PAGE (ภาพที่ 6) โดยพบว่าที่พีเอช 4.0 และ 9.0 แถบของไมโอซินเส้นหนักและแอกตินมีความบางกว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่บ่มที่พีเอชอื่นๆ และตัวอย่างควบคุม (C) Yarnpakdee และคนอื่นๆ (2009) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในปลาแพะ (*Mulloidichthys martinicus*) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้สูงสุดที่พีเอช 4.0 Klomklao และคนอื่นๆ (2008) รายงานว่าปลาซาร์ดีนมีกิจกรรมการย่อยสลาย ตัวเองสูงสุดที่ pH 3.5 และ 8.0 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับการทดลองของ Sirigan และคนอื่นๆ (2006) พบว่าเอนไซม์โปรตีเนสในปลากะตักมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 3.0 และ 8.5-9.5 Doke & Ninjoor (1987) รายงานว่าเอนไซม์ในกล้ามเนื้อกุ้งแชบ๊วย (*Penaeus indicus*) มีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 8.0 การที่พีเอชบางช่วงไม่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์อาจจะมีสาเหตุเนื่องจากพีเอชในช่วงดังกล่าวมีผลต่อการแตกไอออนของ prototropic group ที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์แล้วทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนโครงสร้างสามมิติไปอยู่ในรูปที่ไม่เหมาะสมต่อการจับกับสับสเตรท จึงส่งผลให้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลงหรืออาจเกิดจากที่พีเอชนั้นไปมีผลต่อการแตกไอออนของสับสเตรทหรือของโคแฟกเตอร์แล้วทำให้การจับของสับสเตรทกับเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) อย่างไรก็ตามการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนควรต้องศึกษาต่อไปในอนาคต เพื่อให้ทราบชนิดและเอนไซม์โปรตีเนสตัวหลักที่มีผลต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง



ภาพที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนบดที่ผ่านการบ่มที่พีเอช 2-12 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที



ภาพที่ 6 รูปแบบโปรตีนของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ผ่านการบ่มที่พีเอช 2-12 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ C: กล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนที่ไม่ผ่านการบ่ม MHC: ไมโอซินเส้นหนัก AC: แอกติน

5. สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนโดยเอนไซม์โปรตีเนสระหว่างการเก็บรักษาพบว่าตัวอย่างกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนมีการย่อยสลายตัวเองตลอดการเก็บรักษา สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนคือที่พีเอช 4.0 และ 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ดังนั้นวิธีการที่จะชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อกั้งตั๊กแตนได้คือการจัดสภาวะให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ จากผลการศึกษาสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลกั้งตั๊กแตนภายหลังการตายได้

6. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราชผู้ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำวิจัย

7. เอกสารอ้างอิง

ทัศนีย์ อนุกูลประเสริฐ และจิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร. (2552). กิจกรรมการย่อยสลายตังเองในกุ้งเคย (*Acetes* sp.). **ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47: สาขาประมง** (หน้า 170-177).กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. (2547). **เอนไซม์ทางอาหาร.**(พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สวามินี ธีระวุฒิ, นงนุช รักสกุลไทย และมยุรี จัยวัฒน์. (2549). การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว:เอนไซม์โปรตีเอสในปูนิ่ม. **วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร**,37 (5) (พิเศษ),317-320.

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

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

Cao, W., Zhang, C., Hong, P., &Ji, H. (2008). Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis, **Food Chem**, 109, 176–183.

Doke, S. N., &Ninjoor, V. (1984). Characteristics of an Alkaline proteinase and exopeptidase from shrimp (*Penaeusindicus*) muscle, **Food Scic**, 52, 1203-1206.

Dı´az-Tenorio, L. M., García-Carreno, F. L., & Navarretedel Toro, M. A. (2006). Characterization andcomparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab,*Callinectesbellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectesarcuatus*, **Invertebrate Biology**, 125(2),125–135.

Klahan, R., Areechon, N., Yoonpundh, R., &Engkagul, A. (2009). Characterization and Activity of Digestive Enzymes in Different Sizes of Nile Tilapia (*Oreochromisniloticus* L.). Kasetsart, **Nat. Sci**., 43, 143–153.

Klomklao, S., Kishimura H., &Benjakul, S. (2008). Endogenous proteinases in true sardine (*Sardinopsmelanostictus*), **Food Chem**, 107, 213–220.

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, **Biol. Chem**, 193, 256-275.

Pavasovic M., N.A. Richardson. A.J. Anderson, D. Mann., & P.B. Mather. (2004). Effect of pH, temperature and diet on digestive enzyme profiles in the mud crab, *Scylla serrate*, **Aquaculture**, 242, (1-4), 645-645.

Saborowski. R., Sahling, G., Navarettedel Toro, M. A., Walter, I., & Garcia-Carreno, F.L. (2004). Stability and effects of organic solvents on endopeptidases from the gastric fluid of the marine crab *Cancer pagurus*, **Molecular Catalysis: Enzymatic**, 30, 109-118.

Siringan, P., Raksakulthai, N., & Yongsawatdigul, J. (2006). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinase in Indian anchovy (*Stolephorusindicus*), **Food Chem**, 98, 678-684.

Steel, R. G. D., & Torrie, J. H. (1980). **Principle and procedure of statistics; a biometrical approach** (2nd ed.). New York: MacGraw-Hill.

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