Agricultural Sci. J. 37 : 5 (Suppl.) : 317-320 (2006) ว. วิทย. กษ. 37 : 5 (พิเศษ) : 317-320 (2549)

การดูแลรักษาปูนิ่มหลังการเก็บเกี่ยว: เอนไซม์โปรตีเอสในปูนิ่ม
Post-Harvest of Soft-shell Crab: Characterization of Proteases

สวามินี ธีระวุฒิ[1] นงนุช รักสกุลไทย[1] และมยุรี จัยวัฒน์[1]
Savaminee Teerawut[1], Nongnuch Raksakulthai[1] and Mayuree Chaiyawat[1]

Abstract

Soft-shell crab is a newly molted crab which has an entirely edible body. After harvesting, the crabs are packed and chilled or frozen. Soft-shell crabs have a high market potential; however, the industry has encountered post-harvest storage problems regarding appearance, taste and firmness. Proteases were reported to play an important role in texture degradation. It was found that the optimum temperature of soft-shell crab proteases was 65°C at pH 6. EDTA was the most effective inhibitor with % inhibition of 41.72 %. The % inhibition of soybean trypsin inhibitor, Pepstatin A and E64 were 29.04, 18.26 and 9.03 %, respectively. Substrate specificity for metallo-protease was the highest, followed by trysin, trypsin-like, cathepsin B, cathepsin L, chymotrypsin and cathepsin D. It could be concluded that metallo-protease played the most important role which the optimum temperature of 65°C at pH 6. Therefore, to retard the texture degradation in soft-shell crab, the optimum conditions for enzyme activity should be avoided by using low temperature, adjusting pH or adding appropriate enzyme inhibitors.

Key words: soft-shell crab, proteases, metallo-protease

บทคัดย่อ

ปูนิ่ม หมายถึง ปูที่ลอกคราบเสร็จสิ้นไม่นาน กระดองยังไม่มีความแข็ง ทำให้สามารถนำมาปรุงอาหารได้ทั้งตัว เมื่อเก็บเกี่ยวแล้วจะนำไปบรรจุหีบห่อ แช่เย็น หรือแช่แข็งเพื่อรอการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพภายหลังการลอกคราบยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งด้านลักษณะปรากฏ รสชาติ และโดยเฉพาะการสูญเสียความแน่นเนื้อ ซึ่งมีรายงานว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสูญเสียความแน่นเนื้อ คือ โปรติเอส ผลการศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6 ส่วนสารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม มากที่สุดได้แก่ EDTA โดยคิดเป็น 41.72 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ soybean trypsin inhibitor, Pepstatin A และ E64 ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสได้ 29.04, 18.26 และ 9.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การศึกษาความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์ต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ พบว่า สับสเตรทของ metallo-protease มีความจำเพาะเจาะจงสูงที่สุด รองลงมาได้แก่ trypsin, trypsin-like protease, cathepsin B, cathepsin L, chymotrypsin และ cathepsin D ตามลำดับผลการศึกษาสรุปได้ว่า เอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มที่มีบทบาทสูงสุด คือ metallo-protease ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH 6 ดังนั้น วิธีการที่จะชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านความแน่นเนื้อในปูนิ่มได้ทางหนึ่ง คือ การจัดสภาวะให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น การใช้ความเย็น การปรับ pH หรือ การเติมสารยับยั้งเอนไซม์ที่เหมาะสม

คำสำคัญ ปูนิ่ม โปรติเอส เอนไซม์

บทนำ

ปูนิ่ม หมายถึง ปูที่ลอกคราบเสร็จสิ้นไม่นาน กระดองยังไม่มีความแข็ง ทำให้สามารถนำมาปรุงอาหารได้ทั้งตัว เมื่อเก็บเกี่ยวแล้วจะนำไปบรรจุหีบห่อ แช่เย็น หรือแช่แข็งเพื่อรอการจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพภายหลังการลอกคราบยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งด้านลักษณะปรากฏ รสชาติ และโดยเฉพาะการสูญเสียความแน่นเนื้อ ซึ่งมีรายงานว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสูญเสียความแน่นเนื้อ คือ โปรติเอส ดังนั้นหากเราทราบถึงคุณลักษณะของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม ทำให้สามารถพัฒนาเทคนิคการจัดการดูแลรักษาปูนิ่ม เพื่อชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพภายหลังการลอกคราบ ซึ่งเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตเชิงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวปูนิ่มให้ดียิ่งขึ้น

[1] ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์10900
[1] Department of Fishery Products, Faculty of Fisheries, Katersart University 10900

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การสกัด crude enzyme

นำปูนิ่มมาปั่นด้วยเครื่องปั่นผสม (Waring model 32BL80, USA) ของเหลวที่ได้มาทำให้เป็นผง โดยใช้ไนโตรเจนเหลว และบรรจุภายใต้สภาวะสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ นำผงปูนิ่ม 1 กรัม ผสมกับบัฟเฟอร์(10 mM sodium citrate/0.1 M NaCl) pH 7 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องผสม (Polytron homogenizer model PT45-80, Switzerland) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำมาเข้าเครื่องเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Hettich zentrifugen model Universal 32 R, Germany) ที่ 10,000 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสใช้เป็น crude enzyme สำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์โปรติเอส ต่อไป (Pavasovic *et al.,* 2004)

2. ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย 10 mM sodium citrate/ 0.1 M NaCl pH 7 โดยเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มหลายระดับ (25-75 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาทีและนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยใช้ casein-TCA-Lowry assay (An *et al*., 1994) ซึ่งค่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสที่ได้จะแสดงเป็น ยูนิต/มิลลิลิตร

3. ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ด้วย 10 mM sodium citrate/ 0.1 M NaCl โดยใช้ เคซีนละลายในบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ ที่ pH ต่าง ๆ กันเป็นสับสเตรท กล่าวคือ ที่ pH 3 - 8 ใช้ MacIlvain's buffer ขณะที่ pH 8.5-10 ใช้ 0.1 M glycine – NaOH buffer และนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับข้อ 2

4. ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

เจือจาง crude enzyme ให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วย 10 mM sodium citrate/0.1 M NaCl ที่ pH 6 และเติมสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ 1 mM Pepstatin A, 2 mM EDTA, 0.01 mM soybean trypsin inhibitor, PMSF และ 10 μM E 64 (Sigma, USA) เขย่าให้เข้ากัน แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส เช่นเดียวกับข้อ 2

5. ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มต่อสับสเตรท

ผสม crude enzyme ที่เจือจาง ให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วย 0.1% Brij 35 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร กับ 1 หรือ10 mM ของสับสเตรทที่ละลายอยู่ใน DMSO ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร โดยสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC, Z-Arg-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC, Phe-Ala-Ala และ. Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC. (Sigma, USA) แล้วเติม 0.2 M Tris-HCl ที่ pH เท่ากับ 6 ปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติมสารหยุดปฏิกิริยา (methanol: n-butanol: distilled deionized water = 35;30:35 (v/v/v)) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที วัดค่าการเรืองแสงโดยใช้ spectrofluorophotometer ที่ excitation 380 นาโนเมตร และ emission 460 นาโนเมตร ซึ่งค่า specific activity ที่ได้จะแสดงเป็น ยูนิต/มิลลิกรัม (Barrett and Kirschke. 1981; Ishida *et al*., 1995)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม ที่ pH 7 พบว่าในช่วงแรกเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นตั้งแต่ 25 – 65 องศาเซลเซียส กิจกรรมของเอนไซม์จะเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ และพบว่าที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยเอนไซม์มีกิจกรรมสูงสุด คือ 49.88 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 70 และ 75 องศาเซลเซียส ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 40.46 และ 21.25 ยูนิต/มิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 1 การที่เอนไซม์มีกิจกรรมแตกต่างกันไปแต่ละช่วงอุณหภูมินั้นสามารถอธิบายได้ว่า ที่อุณหภูมิ 25 – 65 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นช่วยเพิ่มอัตราการชนกันระหว่างเอนไซม์กับสับเตรท ทำให้เกิดผลผลิตสูงขึ้นเช่นกัน แต่ถ้าอุณหภูมิสูงมากเกินไป คือ ตั้งแต่ 70 องศาเซลเซียส ก็จะมีผลต่อการเพิ่มอัตราการเสียสภาพธรรมชาติของเอนไซม์ได้ด้วย (ปราณี, 2547) และจากรายงานการศึกษาเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสใน gastric fluid ของ *Cancer pagurus* มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส 7 (Saborowski *et al.,* 2004)

2. pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

ผลของ pH ต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม พบว่าเมื่อ pH สูงขึ้นตั้งแต่ 3– 6 จะเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์และที่ pH 6 จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุด คือที่ 62.72 ยูนิต/มิลลิลิตร แต่เมื่อ pH เพิ่มขึ้นเป็น 6.5 – 10 กิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงจนเหลือค่ากิจกรรมของเอนไซม์เพียง 16.08 ยูนิต/มิลลิลิตร ที่ pH 10 ดังแสดงในภาพที่ 1 ซึ่งการที่ pH บางช่วงมีสภาพไม่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นั้น อาจจะมีสาเหตุมาจาก pH ในช่วงดังกล่าว มีผลต่อการแตกไอออนของ prototropic group ที่อยู่บริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ แล้วทำให้เอนไซม์เกิดการเปลี่ยนโครงรูปสามมิติไปอยู่ในรูปที่ไม่เหมาะสมต่อการจับกับสับสเตรท จึงส่งผลให้เอนไซม์มีกิจกรรมลดลง หรืออาจเกิดจาก pH นั้นไปมีผลต่อการแตกไอออนของสับสเตรท หรือของโคแฟกเตอร์ แล้วทำให้การจับของสับสเตรทกับเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป (ปราณี , 2547) และจากรายงานการศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมองเอนไซม์โปรติเอสในสัตว์น้ำ พบว่า เอนไซม์โปรติเอสจาก gastric fluid ของ *Cancer pagurus* มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานในช่วง 5 – 7 (Saborowski *et al.,* 2004)

3. สารยับยั้งที่มีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม

ผลของสารยับยั้งชนิดต่างๆ ได้แก่ Pepstatin A ยับยั้ง aspartic protease, EDTA ยับยั้ง metallo protease, soybean trypsin inhibitor, PMSF ยับยั้ง serine protease และ E 64 ยับยั้ง cysteine protease ที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่ม พบว่า EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้สูงที่สุด คือ 41.72 % รองลงมาได้แก่ soybean trypsin inhibitor, Pepstatin A และ E64 ซึ่งสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ 31.22, 29.04, 18.26 และ 9.03% ตามลำดับ การที่เอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มถูกยับยั้งการทำงานโดย EDTA สูงที่สุดนั้น ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มที่มีกิจกรรมสูงสุด คือ กลุ่มของ metallo-protease เนื่องจาก EDTA เป็นสารที่สามารถจับกับไอออนของโลหะ และ metallo-protease เป็นเอนไซม์ที่มีไอออนของโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์ที่อยู่ในลักษณะของโคแฟกเตอร์ และเมื่อไอออนของโลหะนี้ถูกจับโดย metal-chelating agentจะทำให้เอนไซม์ไม่สามารถนำไอออนนั้นมาใช้ได้ และกิจกรรมของเอนไซม์จะถูกยับยั้งไปด้วย (ปราณี, 2547)

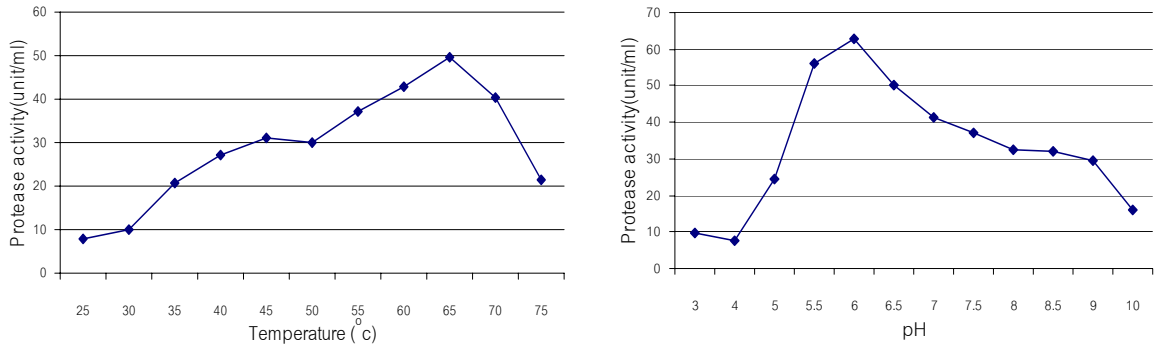

Fig 1 Effect of temperature 1(A) and pH 1(B) on protease activity of soft-shell crab.

4. ความจำเพาะเจาะจงของเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มต่อสับสเตรท

ผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อสับสเตรทชนิดต่างๆ ได้แก่ Boc-Asp(oBzl)-Pro-Arg-AMC ซึ่งเป็นสับสเตรทของ trypsin-like protease, Boc-Gln-Ala-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของ trypsin, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-AMC เป็นสับสเตรทของ chymotrypsin, Z-Arg-Arg-AMC เป็น สับสเตรทของ cathepsin B, Z-Phe-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของ cathepsin L, Phe-Ala-Ala เป็นสับสเตรทของ cathepsin D และ Arg-Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Arg-AMC เป็นสับสเตรทของ metallo-protease พบว่าสับสเตรทของ metallo-protease มีความจำเพาะเจาะจงสูงที่สุด คือมีค่า specific activity 72.88 ยูนิต/มิลลิกรัม รองลงมาได้แก่ สับสเตรทของ trypsin, trypsin-like protease, cathepsin B, cathepsin L, chymotrypsin และ cathepsin D ตามลำดับ ซึ่งมีค่า specific activity ที่ 49.5, 21.65, 12.13, 5.80, 2.11 และ 1.32 ยูนิต/มิลลิกรัม ตามลำดับ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในข้อ 3 ทำให้สรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มที่มีปริมาณสูงสุด คือ กลุ่มของ metallo-protease

สรุปผลการทดลอง

เอนไซม์โปรติเอสในปูนิ่มที่มีบทบาทสูงที่สุดคือ metallo-protease โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และ pH เท่ากับ 6 ดังนั้น วิธีการที่จะชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณภาพด้านความแน่นเนื้อในปูนิ่มได้ทางหนึ่ง คือ การจัดสภาวะให้ไม่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ เช่น การใช้ความเย็น การปรับ pH หรือ การเติมสารยับยั้งเอนไซม์ที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตเชิงคุณภาพหลังการเก็บเกี่ยวปูนิ่มให้ดียิ่งขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการส่งเสริมอุตสาหกรรมการเลี้ยงปูนิ่มต่อไป

เอกสารอ้างอิง

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

An, H., T.A. Seymour, J.W. Wu, and M.T. Morrissey. 1994. Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. J. Food Sci. 59: 277-281.

Barrett. A.J., H. Kirschke. 1981. Cathepsin B, cathepsin H and cathepsin L. Methods Enzymol. 80(41): 535-561.

Ishida. M., N. Sugiyama, M. Sato. And F. Nagayama. 1995. Two kinds of neutral serine proteinases in salted muscle of anchovy, *Engraulis japonica*. Biosci. Biotech. Biochem. 59: 1107-1112.

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

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