บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) จัดเป็นกุ้งทะเลในกลุ่ม Penaeid ชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจโดยประกอบด้วยกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกาย ได้แก่ อลานีน ไกลซีน ไฮดรอกซีโพรลีน เซอรีน และทรีโอนีน ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ให้รสชาติที่ดี นอกจากนี้ยังมีคุณค่าทางอาหารสูงและเป็นที่นิยมของผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ

สำหรับประเทศไทยกุ้งกุลาดำจัดเป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญทำรายได้ให้กับประเทศในอันดับต้นๆ โดยในแต่ละปีมีการส่งออกกุ้งปีละ 5 หมื่นล้านบาท กุ้งที่ใช้ในการแปรรูปส่วนใหญ่จะได้มาจากการเพาะเลี้ยง เนื่องจากปริมาณกุ้งที่จับได้จากแหล่งธรรมชาติมีปริมาณที่ลดลง และประเทศไทยก็เป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยเฉพาะกุ้งทะเล เนื่องจากมีสภาพภูมิอากาศและสภาพภูมิศาสตร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง และยังมีอาหารกุ้งที่มากพอ ราคาถูก แรงงานหาได้ง่าย และมีการใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยทำให้สามารถเพาะเลี้ยงกุ้งได้ในปริมาณมากและต้นทุนต่ำกว่าประเทศคู่แข่งอื่นๆ

อุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำ ส่วนใหญ่ร้อยละ 80-98 นิยมนำมาผลิตเป็นกุ้งกุลาดำสดแช่แข็ง ได้แก่ กุ้งเอาหัวออก (Headless) หรือกุ้งปอกเปลือกแช่แข็ง นอกจากกุ้งกุลาดำสดแช่แข็งแล้วยังมีผลิตภัณฑ์กุ้งชนิดอื่นๆอีก ได้แก่ กุ้งแห้ง กุ้งต้มสุก และกุ้งบรรจุกระป๋อง เป็นต้น สำหรับปี 2543 ประเทศไทยมีปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำ 300,000 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 107,000 ล้านบาท (สิริ ทุกข์วินาศ และชุติมา ชมวิลัย, 2546) ซึ่งจากกระบวนการผลิตดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดวัสดุเศษเหลือประมาณร้อยละ 37-40 โดยมีหัวกุ้งเป็นองค์ประกอบหลักของวัสดุเศษเหลือดังกล่าว (Bhuwapathapun, 1996) จากแนวโน้มการส่งออกกุ้งแช่แข็งที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณของวัสดุเศษเหลือเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ โดยวัสดุเศษเหลือดังกล่าวส่วนใหญ่จะนำมาใช้ประโยชน์หลายด้าน เช่น ใช้เป็นอาหารสัตว์โดยตรง หรือใช้ผลิตเป็นเปลือกกุ้งป่นสำหรับผสมในอาหารสัตว์ซึ่งมีมูลค่าต่ำ ซึ่งวิธีการนี้เป็นการช่วยลดต้นทุน

การผลิต การผลิตไคตินและไคโตแซน (Synowiecki and Al-Khateeb, 2000) โดยไคโตแซนสามารถใช้เป็นสารตกตะกอนสารประกอบอินทรีย์จากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปสัตว์น้ำ ใช้ยืดอายุการเก็บรักษาผลไม้โดยการเคลือบผิว หรือใช้ในการทำให้น้ำผลไม้ใส (ไพรัตน์ โสภโณดร และคณะ, 2540) นอกจากนี้ได้มีการนำหัวกุ้งไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตสารให้สีจากเปลือกกุ้ง (pigments) (Chen and Meyer, 1982) การผลิตสารให้กลิ่นรสอาหาร การผลิตเปปโตนสำหรับใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Adler–Nissen,1986) และการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสท และน้ำมันดิบจากหัวกุ้งกุลาดำ (ไตรตะวัน คงแก้ว, 2542) เป็นต้น

มีการนำเอาวัสดุเศษเหลือที่กล่าวมานี้มาทำการศึกษาเบื้องต้นถึงชนิดของเอนไซม์ เช่น Olsen และคณะ (1990) ศึกษาน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง พบเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (hyaluronidase), ไคติเนส (chitinase), อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) และเบต้า-เอน-อะซิติลกลูโคซามินิเดส (β–N acetyl glucosaminidase) Chen และคณะ 1991 สกัดแยกเอนไซม์ polyphenol oxidase จากกุ้ง Western Australian lobster (*Panulirus cygnus*) และกุ้ง Florida Spiny lobster (*Penulirus argus*) ส่วน Chen และ คณะ (1997) ทำการสกัดเอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดส (polyphenol oxidase) จากเซฟาโลทอแรกซ์ (cephalothorax) ของกุ้ง *Penaeus setiferus* และ *P. duorarum* Doke และ Ninjoor (1987) สกัดเอนไซม์จากเนื้อกุ้ง (*Penaeus indicus*) ด้วยโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5% ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 642 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน

สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้จึงศึกษาการสกัดและแยกเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไฮยาลูโรนิเดสจากส่วนตับและตับอ่อนหรือเฮปาโตแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้งกุลาดำ

ตรวจเอกสาร

1.กุ้งกุลาดำ

ชื่อสามัญ Black tiger shrimp หรือ Giant tiger shrimp หรือ Grass prawn

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Penaeus monodon*

1.1 **ลักษณะทั่วไปของกุ้งกุลาดำ (ภาพที่ 1)**

กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งทะเลในกลุ่ม Penaeid ชนิดหนึ่งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีสีสันสดใส ผิวเป็นมัน ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมของเม็ดสี (chromatophore) เปลือกคลุม (cuticle) มีลักษณะเปลือกเกลี้ยง ไม่มีขน หนวดมีสีเทาปนเขียวหรือน้ำตาล ลำตัวโค้งงอเล็กน้อยและเมื่อวัดจากโคนก้านตาถึงปลายหางยาวประมาณ 30 เซนติเมตร ส่วนระยางมักจะมีสีน้ำตาล และขนอ่อน (fringing setae) มีสีแดงอยู่โดยรอบ ลำตัวของกุ้งเป็นข้อปล้องรวม 19 ปล้อง แต่ละปล้องจะมีระยาง 1 คู่ ถ้าตัดตามขวางของลำตัวกุ้ง จะมองเห็นส่วนต่าง ๆ ของกุ้งได้ชัดเจน ด้านบนของตัวกุ้งเรียกว่า เทอไกด์ (tergite) เปลือกหุ้มตัวส่วนด้านล่างที่คลุมโคนขาว่ายน้ำเรียกว่า พลูรา (pleura) และส่วนด้านท้องของกุ้งเรียกว่า สเตอไนท์ (sternite) เปลือกคลุมหัว (carapace) จะคลุมส่วนของหัวและอกให้อยู่รวมกัน (cephalothorax) ซึ่งภายในจะมีอวัยวะต่าง ๆ เรียงตัวกันอยู่ ด้านข้างที่คลุมเหงือกทั้ง 2 ด้านเรียกว่า branchiostegite ส่วนหน้าของเปลือกคลุมหัวจะยื่นแหลมออกไปข้างหน้ายาวกว่าลูกตาเล็กน้อยเรียกว่า กรี (rostrum) และจะมีเยื่อบาง ๆ ยึดไว้ทำให้ปลายกรีสามารถโยกคลอนได้ ด้านบนของกรีมีหนามเป็นฟันหยักยื่นไปข้างหน้า 6-8 ซี่ และด้านล่างมี 2-4 ซี่ ตามลำดับ ด้านข้างกรีมีรอยสันนูน (abrostral carina) ยาวเข้ามาในเปลือกหัวจนเกือบถึงหนามซี่ในสุดของกรี (epigastric spine) (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535; ประจวบ หลำอุบล, 2527; บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530)

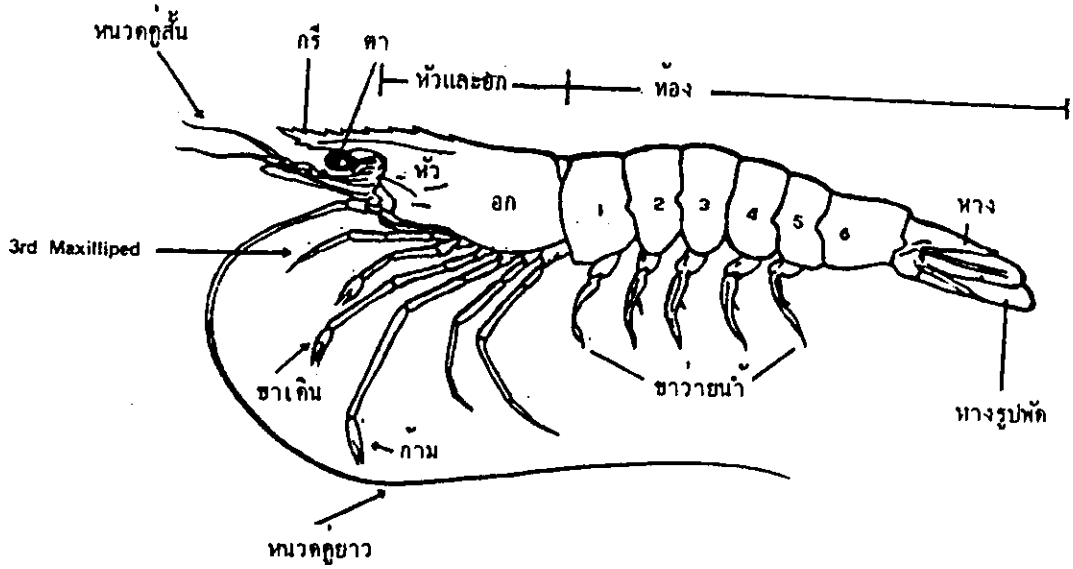

Figure 1. Black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)

Source : กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2535)

อวัยวะภายในของกุ้งส่วนใหญ่ อยู่ในบริเวณหัว ประกอบไปด้วยหัวใจ อวัยวะย่อยอาหาร ระบบประสาท และอวัยวะสืบพันธุ์ โดยกุ้งเพศผู้จะมีถุงอัณฑะ 1 คู่ เพศเมียมีรังไข่ 1 คู่ อวัยวะย่อยอาหารของกุ้งประกอบด้วย กระเพาะอาหารอยู่บริเวณอกมีลักษณะเป็นถุง ถ้ามีอาหารอยู่ในถุงจะเห็นเป็นสีดำ ถัดจากกระเพาะอาหารเป็นลำไส้ซึ่งจะทอดไปตามแนวสันหลังและไปเปิดตรงปลายสุดของระยางค์หางอันกลาง นอกจากกระเพาะอาหารยังมีอวัยวะอื่นที่ช่วยในการย่อยอาหารอีกได้แก่ ตับ และ ตับอ่อนหรือที่เรียกว่า มันกุ้ง ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงอ่อนนุ่มสีเหลืองแสด (กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535; นิรนาม, 2531) หรืออาจเรียกว่า เฮปาโตแพนเครียส (hepatopancreas)

เฮปาโตแพนเครียส เป็นต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) ที่พบในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังทำหน้าที่คล้ายกับตับและตับอ่อน (pancreas) ในสัตว์ชั้นสูง โดยเฮปาโตแพนเครียสในสัตว์พวกกุ้งทำหน้าที่เป็นทั้งตับและตับอ่อนรวมกัน นอกจากจะทำหน้าที่ในการย่อยอาหารแล้วยังทำหน้าที่ดูดซึมอาหารคล้ายกับตับอ่อนของคนและทำหน้าที่คุ้มกันรวมทั้งทำลายเชื้อโรคหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่จะเข้าไปสู่ระบบเลือด คล้ายกับตับอ่อนของคน (นิรนาม, 2544) เฮปาโต

แพนเครียสประกอบด้วยท่อตันหรือถุงตัน (diverticula) เปิดออกสู่ท่อ (duct) ที่ทำหน้าที่หลั่งน้ำย่อยโดยท่อเหล่านี้จะเปิดออกที่ท่ออันแรกหรือ collecting ducts ซึ่งน้ำย่อยที่หลั่งออกมาจะไหลสู่ลำไส้ส่วนกลางกับกระเพาะอาหาร (ประจวบ หลำอุบล, 2527)

1.2 **การแพร่กระจายของกุ้งกุลาดำ**

กุ้งกุลาดำมีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว สามารถอาศัยได้ในน้ำกร่อยและน้ำเค็ม ส่วนมากอาศัยอยู่ได้ที่ระดับความเค็มอยู่ในช่วง 5-35 ส่วนต่อพันส่วน แต่ระดับความเค็มเหมาะสมจะอยู่ในช่วง 25-30 ส่วนต่อพันส่วน อุณหภูมิของน้ำประมาณ 22-34 องศาเซลเซียส โดยมากชอบอาศัยบริเวณพื้นที่ทรายปนโคลน กินทั้งพืชและสัตว์ โดยจะเปลี่ยนแปลงไปตามวัย เช่น ในวัยอ่อนจะกินแพลงค์ตอนพืช แพลงค์ตอนสัตว์ เมื่อโตเต็มวัยจะอพยพจากบริเวณชายฝั่งไปผสมพันธุ์วางไข่ในทะเลที่มีน้ำลึก 20-30 เมตร มีการวางไข่มากที่สุดในช่วงปลายฤดูหนาวถึงฤดูร้อน แต่ในประเทศไทยสามารถวางไข่ได้ทุกฤดูกาลเพราะอุณหภูมิและสภาพแวดล้อมเหมาะสมตลอดปี ตัวเมียวางไข่คราวละ 100,000 – 1,000,000 ฟอง จำนวนไข่จะมากหรือน้อยขึ้นกับขนาดของแม่กุ้ง ตัวอ่อนจะเจริญในบริเวณน้ำลึกและอพยพเข้ามาหากินในบริเวณชายฝั่งเมื่อเติบโตเป็นกุ้งวัยรุ่นแล้ว กุ้งเจริญเติบโตด้วยการลอกคราบทุก 15-20 วันต่อครั้งขึ้นอยู่กับการได้รับอาหารอย่างสมบูรณ์และได้อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม (เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2540; กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2535; บรรจง เทียนส่งรัศมี, 2530)

1.3 **แหล่งที่อยู่อาศัยของกุ้งกุลาดำ**

บริเวณที่พบกุ้งกุลาดำมากและหนาแน่นได้แก่ มหาสมุทรอินเดียจนถึงเขตตะวันตกของมหาสมุทรแปซิฟิค (Indo – West Pacific region) ครอบคลุมอาณาเขตตั้งแต่ทางใต้ของทวีปแอฟริกา (ชายฝั่งประเทศ เคนยา, โซมาเลีย, แทนซาเนีย, มาดากัสการ์) ถึงเขตกลุ่มประเทศอาหรับ และคาบสมุทรอินเดีย เรื่อยมาจนถึงกลุ่มประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ คาบสมุทรเกาหลี และ ทวีปออสเตรเลีย โดยแหล่งที่พบกุ้งกุลาดำมาก มักเป็นเขตร้อน เช่น ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย และตอนใต้ของประเทศไทย (สุเมธ ชัยวัชรากูล, 2530; เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต, 2540)

1.4 **อุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำ**

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำที่มีมูลค่าสูงทางเศรษฐกิจ เป็นสินค้าส่งออกที่สามารถนำรายได้เข้าประเทศได้เป็นจำนวนมาก ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสูงมากจึงทำให้เกิดการตื่นตัวในการประกอบธุรกิจด้านนี้อย่างกว้างขวาง ผลิตภัณฑ์จากการแปรรูปกุ้งกุลาดำที่ไทยมีการส่งออกมากที่สุดได้แก่ กุ้งกุลาดำสดแช่แข็ง นอกนั้นจะเป็นผลิตภัณฑ์ประเภท กุ้งแห้ง กุ้งต้มแช่แข็ง และกุ้งต้มบรรจุกระป๋อง เป็นต้น ขั้นตอนการผลิตผลิตภัณฑ์กุ้งกุลาดำแช่แข็ง แสดงดังภาพที่ 2

อุตสาหกรรมการแปรรูปกุ้งกุลาดำเมื่อคิดปริมาณสัดส่วนของส่วนเนื้อที่นำไปบริโภคคิดเป็นร้อยละ 25 (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) ส่วนที่เหลือร้อยละ 75 เป็นวัสดุเศษเหลือ วัสดุเศษเหลือในส่วนที่เป็นของแข็ง เช่น เปลือกกุ้งหรือหัวกุ้ง มักจะนำไปสกัดไคตินหรือไคโตแซน ส่วนของเสียที่เป็นน้ำทิ้งที่ได้จากการทำละลายกุ้งแช่แข็ง ได้นำมาศึกษาถึงชนิดของเอนไซม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ไคติเนส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเบต้า-เอน-อะซิติลกลูโคซามินิเดส เป็นต้น (Olsen *et al*., 1990)

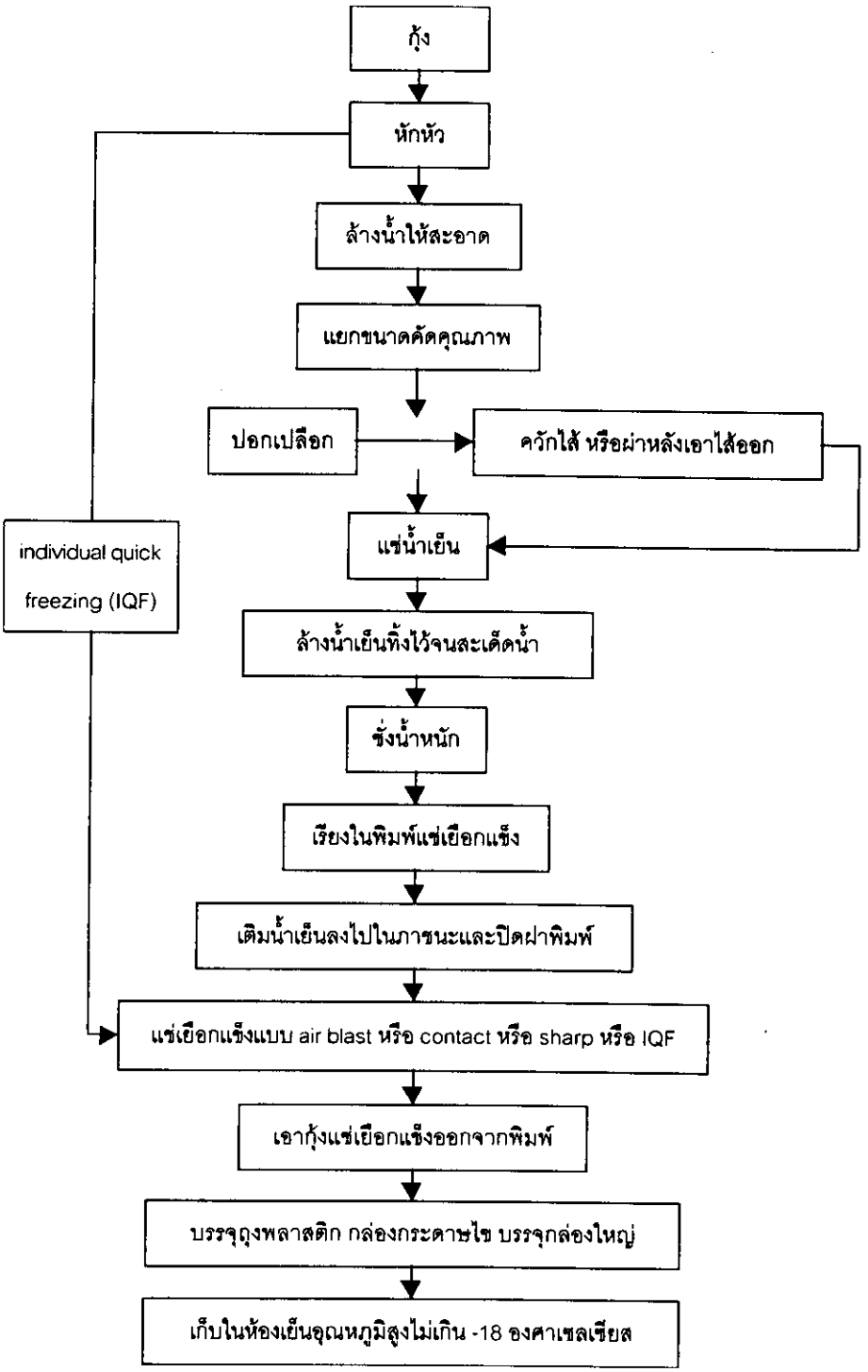

Figure 2. Process of frozen shrimp products

Source: พลูทรัพย์, 2531(อ้างโดย อภิชาติ หลีหมัด)

2. **เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส** (Alkaline phosphatase)

อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (EC 3.1.3.1) เป็นเอนไซม์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (Shaw and Chen, 1994) ในส่วนพลาสมาเมมเบรน (plasma membrane) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Chuang and Shih, 1990; Lee and Chuang, 1991) มีหน้าที่ในการขนส่งสารบางชนิดในร่างกายได้แก่ กรดไขมัน โคลีน แคดเมียม (Norman *et al.*, 1970; Pekarthy *et al.*, 1972 และ Koyama *et al.*, 1983 อ้างโดย Shaw and Chen, 1994) และการสร้างกระดูก (Matsuzawa and Anderson, 1982 อ้างโดย Shaw and Chen, 1994) นอกจากนี้ยังพบได้ในรก ลำไส้เล็ก ตับ และไตของมนุษย์ เป็นต้น (McComb *et al.*, 1980 อ้างโดย Chuang and Shin, 1990)

เอนไซม์ในกลุ่มฟอสฟาเตส แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase) และ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) ซึ่งเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่มีผู้สนใจศึกษาควบคู่กับแอซิดฟอสฟาเตส โดยเฉพาะในทางฮีสโตเคมีจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีผู้ศึกษามากที่สุดชนิดหนึ่ง บทบาทของเอนไซม์ชนิดนี้เกี่ยวข้องกับการรักษาระดับความเข้มข้นของฟอสเฟตภายในเซลล์ให้ปกติ มีบทบาทเกี่ยวกับกระบวนการดูดซึมและขนส่งสารอาหารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะกระบวนการดูดซึมและขนส่งแบบ active transport (Danielli, 1953 อ้างโดยจินตมาศ สุวรรณจรัส, 2537) นอกจากนี้ยังมีส่วนในกระบวนการเผาผลาญสารอาหาร (metabolic process) โดยช่วยให้ phosphohexoses แตกตัวได้น้ำตาล เนื้อเยื่อที่พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสสูง ได้แก่ เนื้อเยื่อบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารอาหาร เนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่เป็นอวัยวะคัดหลั่ง (scretory organ) และเนื้อเยื่อที่กำลังเจริญเติบโต (Fernley, 1971 อ้างโดยจินตมาศ สุวรรณจรัส, 2537) เป็นต้น

Shaw และ Chen (1994) กล่าวว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ทางการค้าที่มีความสำคัญมากชนิดหนึ่ง เนื่องจากมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในงานด้านพันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และด้านอิมมูโนเทคนิค (immunotechniques) มีรายงานว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีปริมาณสูงในสัตว์พวกครัสเตเซียน ได้แก่ crayfish (Denuce, 1967 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) spiny lobster (Travis, 1955 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) และ hermit (Chockalingam, 1971 อ้างโดย An and Visessanguan, 2000) นอกจากนี้พบว่าของเสียจากการแปรรูปอาหารทะเล เช่น ลำไส้ของปลา และส่วนของ

เซฟาโลทอแรกซ์ของกุ้งเป็นแหล่งที่มีเอนไซม์ชนิดนี้ในปริมาณสูงและมีประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า (Shaw and Chen, 1994)

Chuang และ Shih (1990) ศึกษาการสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้ง (*Penaeus japonicus*) โดยใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ที่ประกอบด้วยแมกนีเซียมคลอไรด์ และ Triton X-100 ร้อยละ 0.1 พบว่ามี กิจกรรมเอนไซม์เท่ากับ 4.0 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DE-52, Concanavalin A-Sepharose, AcA 34 และ Gel elution พบว่ามีค่า กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์หลังจากผ่านคอลัมน์สุดท้ายเท่ากับ 25,000 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40 กิโลดาลตัน

Olsen และคณะ (1990) ทดลองนำน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูป Northern shrimp (*Pandalus borealis*) เพื่อศึกษาชนิดของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส พบว่าน้ำทิ้งเริ่มต้นมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 1,600 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน หลังผ่านการกรองแบบอัลตราฟิวเตรชั่น พบว่าส่วนของน้ำทิ้งที่เหลืออยู่ (retentate) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 2,300 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

Shaw และ Chen (1994) ศึกษาการสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสโดยใช้สารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 จากส่วนของเซฟาโลทอแรกซ์ของ bighead shrimp (*Solenocera melantho*) black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) sword shrimp (*Parapenaeopsis hardwickii*) และ white whisker shrimp (*Trachypenaeus curvirostris*) เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่สกัดได้จากกุ้งแต่ละชนิด พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จาก bighead shrimp (*Solenocera melantho*) มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (98 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) เมื่อเปรียบเทียบกับกุ้งชนิดอื่นๆ ที่ทำการทดลอง เมื่อนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์โครมาโตกราฟีชนิด DEAE-Sepharose CL-6B Ultragel AcA 34 และ eletroendosmotic elution พบว่ามีเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 3 ชนิด คือ APase - I, APase - II และ APase - III มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 221 3,780 และ 532 ยูนิตต่อมิลลิกรัมตามลำดับ และมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 88.6 53 และ 20 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

3. **เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส** (Hyaluronidase)

ไฮยาลูโรนิเดสเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสามารถย่อยสารไฮยาลูโรเนท (hyaluronate) เป็นโอลิโกแซคาไรด์ (oligosaccharide) สายสั้นๆ ใช้ประโยชน์ในการทำความสะอาด isochaemic tissues หลังจาก myocardial infraction (Saltissi *et al.*, 1982; Sanders, 1988) นอกจากนี้ยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหารในการทำให้เนื้อนุ่ม (Wu *et al.*, 1981) เอนไซม์ชนิดนี้พบมากในอัณฑะของวัว (Borders and Raffery, 1968) และปลิง (Yuki and Fishmann, 1962) เป็นต้น

Olsen และคณะ (1990) ศึกษาชนิดเอนไซม์ที่มีในน้ำทิ้งจากกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมแปรรูปกุ้ง (*Pandalus borealis*) พบว่าน้ำทิ้งเริ่มต้นมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส เท่ากับ 4.1 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการกรองแบบอัลตราฟิวเตรชั่น พบว่าส่วนของน้ำทิ้งที่เหลืออยู่ มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 5.3 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน

Krishnapillai และคณะ (1999a) สกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) พบว่าสารละลายเอนไซม์สกัดมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เท่ากับ 0.074 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อผ่านการตกตะกอนด้วยอะซิโตน และผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนอิออน ชนิด Amberlite Tm IRA 420 พบว่าเอนไซม์ที่ได้มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 56.5 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งมีความความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 763 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น

Krishnapillai และคณะ (1999b) ศึกษาเปรียบเทียบกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่สกัดได้จากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) กับเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากอัณฑะวัว และแกะ พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้จากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) มีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงสุด (50 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) รองลงมาเป็นกิจกรรมของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากอัณฑะวัว และแกะ ซึ่งมีค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 33 และ 25 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

Poh และคณะ (1992) ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษของ stonefish (*Synanceia horrida*) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสภายหลังการทำให้บริสุทธิ์พบว่ามีกิจกรรมจำเพาะสูงมาก (1.6×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน และค่า pI เท่ากับ 9

Ramanaiah และคณะ(1990) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษแมงป่อง (*Heterometrus fulvipes*) มีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 4.0 และมีมวลโมเลกุล 82 กิโลดาลตันนอกจากนี้พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จะลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส

Yang และ Srivastava (1975) ศึกษาเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากสเปิร์มของวัวตัวผู้ พบว่าเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ DEAE-cellulose และ Sephadex มีกิจกรรมจำเพาะเท่ากับ 2,370 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 182 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายเอนไซม์สกัดเริ่มต้น และมีมวลโมเลกุลประมาณ 62 กิโลดาลตัน

4. ปัจจัยที่มีผลต่อคุณสมบัติและกิจกรรมของเอนไซม์จากสัตว์น้ำ

4.1 อุณหภูมิ (Temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อปฏิกิริยาเคมีทั่วไป คือ มีผลต่อการละลายของสับสเตรต การแตกตัวของบัฟเฟอร์ และการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต เอนไซม์กับโคแฟคเตอร์ และเอนไซม์กับตัวยับยั้ง นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อการแตกตัวของกรดอะมิโนบริเวณเร่ง (Ionization of active site) (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

การสกัดเอนไซม์ควรทำที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 0-4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการสกัด เช่น การสกัดเอนไซม์จากเครื่องในปลา cod ในเขตแอตแลนติก (*Gadus Morhua*) โดยใช้น้ำเย็นในอัตราส่วน 1:2 ของน้ำหนักเครื่องในต่อปริมาณน้ำ ปั่นด้วยเครื่องปั่นความเร็วสูง นาน 2 นาที นำส่วนที่ปั่นได้มาเหวี่ยงด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 13,000*g* เป็นเวลา 30 นาที (Shin and Zall,1986) แต่การสกัดที่อุณหภูมิสูง (35-40 องศาเซลเซียส) ในช่วงเวลาสั้นๆ (15–30 นาที) อาจช่วยในการสกัด ทั้งนี้เนื่องจากการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) มักเกิดขึ้นที่อุณหภูมิในช่วงนี้

สุนันทา ภิญญาวัชน์ (2535) รายงานว่าเอนไซม์ส่วนใหญ่จะเสียสภาพธรรมชาติ (denature) ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ยกเว้นจากแบคทีเรียประเภทเทอร์โมฟิลิก ที่สามารถทนร้อนได้ถึง 85 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ ประเสริฐ ศรีไพโรจน์ (2528) กล่าวว่าเอนไซม์แต่ละชนิดจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สมในการเร่งปฏิกิริยา เช่น การเร่งปฏิกิริยาในระบบทางเดินอาหารจะมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมประมาณ 40 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาเอนไซม์กับสับสเตรตที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสทำให้กิจกรรมของเอนไซม์สูญเสียน้อยที่สุด ถึงแม้ว่าคุณสมบัติการละลายของเอนไซม์จะลดลงก็ตาม (Palmer, 1985) ส่วนการแช่เยือกแข็งทำให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนไม่สามารถทำงานได้ และอาจทำให้เกิดการเสียสภาพ ดังนั้นไม่ควรเก็บเอนไซม์ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ไว้ในระยะเวลานานๆ (Scopes, 1978)

Reece (1988) สามารถแยกแอซิดโปรติเอส (acidic protease) และอัลคาไลน์โปรติเอส (alkaline protease) จากเครื่องในปลา salmon (*Salmon sarda*) และแอซิดโปรติเอสจากเครื่องในปลา cod (*Gadus morhua*) และปลา mackerel (*Scomba scombrus*) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์แอซิดโปรติเอสของปลาทั้ง 3 ชนิดมีค่าเท่ากันคือ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่เอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสจากเครื่องในปลา salmon มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 45 องศาเซลเซียส

เอนไซม์พอลิฟีนอลออกซิเดสที่สกัดได้จากกุ้งโดยทั่วไปจะมีความคงตัวดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30 และ 50 องศาเซลเซียส และเอนไซม์ที่สกัดได้จากปูทะเลน้ำลึกจะถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ได้ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (Chen *et al.*, 1991)

Chuang และ Shih (1990) สกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสจากตับอ่อนกุ้ง (*Penaeus japonicus*) พบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสที่ทำให้บริสุทธิ์มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

Shaw และ Chen (1994) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่สกัดได้จาก bighead shrimp (*Solenocera melantho*) พบว่ามีเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 ชนิด คือ APase-I และ APase-II มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่ 37 องศาเซลเซียส

4.2 **พีเอช** (pH)

โดยปกติแล้วเอนไซม์จะถูกยับยั้งที่พีเอชต่ำกว่า 5 หรือ พีเอชสูงกว่า 9 ยกเว้นเอนไซม์บางกลุ่ม เช่น เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมักจะทำงานได้ดีที่พีเอชช่วงเป็นกรดหรือที่พีเอชประมาณ 3.7- 4.0 (Menzel and Farr, 1998) ในการปรับพีเอชควรเติมโดยการหยดให้ของเหลวไหลลงไปตามขอบด้านในของภาชนะและควรคนโดยใช้เครื่องกวนและควรทำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Dixon and Wabb, 1979; Scopes, 1978)

Shaw และ Chen (1994) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ที่สกัดได้จาก bighead shrimp (*Solenocera melantho*) พบว่ามีเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส 2 ชนิด คือ APase - I และ APase - II มีพีเอชที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ที่พีเอชเท่ากับ 10 และ 8 ตามลำดับ

Krishnapillai และคณะ (1999a) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่ทำการสกัดและทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากตับอ่อนของ Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) มีค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์เท่ากับ พีเอช 5.4

สรุป เอนไซม์สำคัญที่แยกได้จากกุ้งชนิดต่างๆมีอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ดังแสดงในตารางที่ 1

4.3 **ความดัน** (Pressure)

การสกัดเอนไซม์บางวิธีจำเป็นต้องใช้ความดันสูง ซึ่งอาจจะมากกว่า 50,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว แต่การใช้ความดันสูงประมาณ 10,000 และ 100,000 ปอนด์ต่อตารางนิ้วอาจมีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ได้ อาจเนื่องมาจากความดันสูงทำให้โครงสร้างตติยภูมิและทุติยภูมิของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลง (Laidler and Bunting, 1973; Dixon and Webb, 1979) แต่ในสภาวะที่มีความดันต่ำชั้นของเมมเบรนและเจลจะมีความแข็งแรงน้อยลงส่งผลทำให้การไหลผ่านของสารละลายเกิดได้เร็วขึ้นและไม่มีผลต่อความคงตัวและกิจกรรมของเอนไซม์ (Chen and Zall, 1985)

4.4 **สับสเตรต** (Substrates)

ความสามารถในการละลายของเอนไซม์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรต เช่น การเติม glycero-phosphate เพื่อป้องกันการออกซิเดชั่นของกลุ่ม sulfhydryl แต่อาจส่งผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงได้ (Palmer, 1985)

4.5 **เกลือ** (Salts)

เกลือมีผลต่อการละลายและการตกตะกอนของโปรตีนหรือเอนไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกลือโซเดียมคลอไรด์ เกลือโซเดียมซัลเฟต และ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยความเข้มข้นของ

เกลือที่ใช้มีผลต่อการละลายของเอนไซม์ ความสามารถในการละลายของเกลือเป็นดังนี้ (Colowick and Kaplan, 1955)

Cation: $Li^+ > Na^+$ (ที่สภาวะเป็นกลางหรือด่าง)

Anion: $P_2O_7 > P_4O_7 > PO_4^{-3} > CNS^- > HCO_3^- > I^- > Cl^-$ (ในสภาวะเป็นด่าง)

การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงไปจะขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Frazier, 1978) นอกจากนี้ยังมีผลต่อการละลายของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ซึ่งสกัดได้จาก Norway lobster โดยพบว่า เกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.12 โมลาร์ มีผลทำให้เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสมีกิจกรรมสูงสุด (Krishnapillai *et al.*, 1999a)

Table 1 Optimum temperature and optimum pH of enzymes from some shrimps

Type of enzyme	Source	Optimum temparature (^{o}C)	Optimum pH	Reference
1. Protease				
Trypsin	White shrimp	49	7.0-9.5	Gate and Travis (1969)
Collagenase	Freshwater prawn	37	6.5-7.5	Nip *et al.* (1985)
2. Amylase	Pacific brown shrimp	30-40	7.5	Vega-Villasante *et al.* (1993)
3. Lipase	neon frying squid	25	7.0	Sukarno *et al.* (1996)
4. Alkaline phosphatase	bighead shrimp	37	7.0-8.0	Shaw and Chen (1994)
5. Polyphenol oxidase	Taiwanese black tiger - shrimp	45	6.0	Rolle *et al.* (1990)
	Western Australian lobster	-	6.0-8.0	Chen *et al.* (1991)
	Florida spiny lobster	-	6.5	Chen *et al.* (1991)
	Norway lobster			
	- PPO form I	40	-	Yan *et al.* (1990)
	- PPO form II	45	-	Yan *et al.* (1990)
6. Chitinase	Brine shrimp *Artemia*	55	5.8	Funke and Spindler (1989)
	Japanese common squid	50	-	Matsumiya and Mochizuki (1997)
7. Hyaluronidase	Norway lobster	-	5.4	Krishnapillai *et al.* (1999a)

4.6 **อิออนของโลหะและสารจับโลหะ** (Metal ions and chelating agent)

อิออนของโลหะหนัก เช่น เหล็ก สังกะสี ตะกั่ว ทองแดง และ ปรอท สามารถยับยั้งหรือส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้ เช่นเอนไซม์ทริปซินจากปลา cod ซึ่งมีความต้องการแคลเซียมอิออนในการทำให้เอนไซม์มีความคงตัวและเป็นการป้องกันการเกิดการย่อยสลายตัวเองของเอนไซม์ (Asgiersson *et al.*, 1989) ต่างจากเอนไซม์ทริปซินสกัดจาก white shrimp (*Penaeus setiferus*) ซึ่งแคลเซียมอิออนไม่มีผลต่อความคงตัว แต่มีผลต่อความทนทานต่อการย่อยสลายตัวเอง (Gates and Travis, 1969) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณแคลเซียมอิออนมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ไคโมทริปซินจากปลา cod ได้ (Asgiersson and Bjarnason, 1991)

Risk (1974) พบว่าความคงตัวของเอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซินลดลง เนื่องมาจากผลของปริมาณแคลเซียมอิออน นอกจากนี้แคลเซียมสามารถป้องกันการเกิด aggregation ของโมเลกุลของเอนไซม์ทริปซินอีกด้วย

ผลกระทบจากอิออนของโลหะเหล่านี้สามารถป้องกันได้โดยการเติมสารจับโลหะ (chelating agent) เช่น การเติม EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid) ที่ระดับความเข้มข้น 1-2 มิลลิโมลาร์ โดยสารจับโลหะเหล่านี้มีผลต่ออิออนที่มีประจุ 2 ตัว (divalent) (Deutscher, 1990)

Poh และคณะ (1992) ศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษของ stonefish (*Synanceia horrida*) พบว่าเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส ภายหลังการทำให้บริสุทธิ์มีกิจกรรมจำเพาะสูงมากคือ 1.6×10^6 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 60 กิโลดาลตัน มีค่า pI เท่ากับ 9.2 แต่พบว่าเอนไซม์ที่ได้ไม่ทนต่อความร้อน และสามารถถูกยับยั้งโดยอิออน Cu^{2+} และ Hg^{2+}

4.7 **ตัวยับยั้ง** (Inhibitors)

สารเคมีบางชนิดมีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ เช่น เอนไซม์ ทริปซินจากตับอ่อนของ crayfish (*Procambarus clarkii*) ถูกยับยั้งโดย TLCK (1-chloro-3-tosylamido-7-amidoheptanone), DFP และ PMSF (Kim *et al.*, 1992) เอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากพิษของ stonefish (*Synanceia horrida*) ถูกยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โดย heparin (Poh *et al.*, 1992)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาวิธีการแยกเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากส่วนตับอ่อนหรือเฮปาโตแพนเครียส (hepatopancreas) ของกุ้งกุลาดำ
2. เพื่อแยกเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสให้บริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการแยกและสกัดเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสจากส่วนตับอ่อนหรือเฮปาโตแพนเครียสของกุ้งกุลาดำ
2. ทราบคุณสมบัติของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดสที่แยกได้