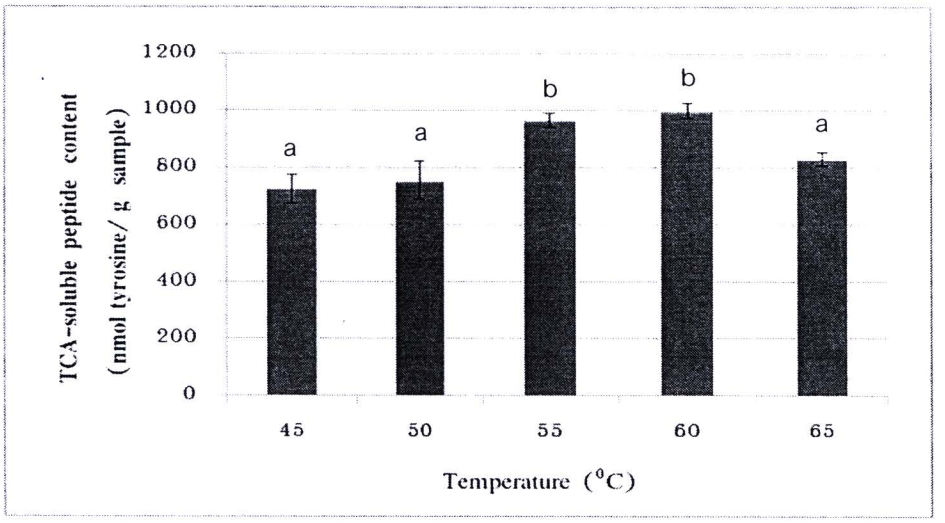
บทที่ 3
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด

1.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด

จากการศึกษาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมง ซึ่งเป็นค่าที่ใช้บ่งชี้ถึงกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นๆ พบว่า เมื่อนำเนื้อปลาโมงไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 50 55 60 และ 65 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที แล้วนำมาวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก โดยวิธี Lowry จาก **ภาพที่ 1** เมื่อเพิ่มอุณหภูมิในการบ่ม ทำให้ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเพิ่มขึ้น โดยปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกมีค่าสูงสุดที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส (ประมาณ 900 - 1000 นาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง) ($p \leq 0.05$) และเมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 65 องศาเซลเซียส ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโร-อะซิติกลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการที่เอนไซม์โปรตีเนสเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อน แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่พบในเนื้อปลาโมงอาจเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดทนความร้อน เอนไซม์คาเธปซิน แอล (cathepsin L, EC 3.4.22.15) เป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนที่พบในไลโซโซมอล ย่อยสลายองค์ประกอบในโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในระหว่างการย่อยสลายตัวเองของปลา เป็นเอนไซม์ที่ทนความร้อนที่พบในกล้ามเนื้อปลาซึ่งเกิดกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส Sirikan and others (2006) รายงานว่า ปลา Indian anchovy มีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (ประมาณ 2,500 นาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง) โดยการย่อยสลายตัวของโปรตีนในเนื้อปลา Indian anchovy เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส Hu and others (2007) รายงานการย่อยสลายของไมโอซินสายหนักในปลา walleye pollck เนื่องจากเอนไซม์คาเธปซิน แอล ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ปลา Indian anchovy (Sirikan and others 2006) ปลา Pacific whiting (ประมาณ 2.4 ไมโครโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง) (Mazorra-Manzano and others 2008) ปลา Japanese sandfish (Klomklao and others 2009) และปลาแพะ (goatfish) (ประมาณ2,600 นาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง) (Yarnpakdee and others 2009) มีการย่อยสลายตัวของโปรตีนอันเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยปลาทั้ง 4 ชนิด มีการย่อยสลายตัวของโปรตีนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงอุณหภูมิ 40 – 60 องศาเซลเซียส และลดลงเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE (**ภาพที่ 2**) โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain, MHC) มีความบางกว่าตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิอื่นๆ และตัวอย่างควบคุม (C) โดยพบแถบโมเลกุลโปรตีนด้านล่างของ แถบไมโอซินสายหนัก จำนวนมากที่เกิดจากไมโอซินสายหนักถูกย่อย ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนในตัวอย่างที่บ่มที่ 55 - 65 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังสังเกตพบการจางลงของแถบโปรตีนขนาดโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน ซึ่งคาดว่าคือโทรโปนิน ที (troponin T) ที่ช่วงอุณหภูมิเดียวกัน แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของแถบโปรตีนแอคติน



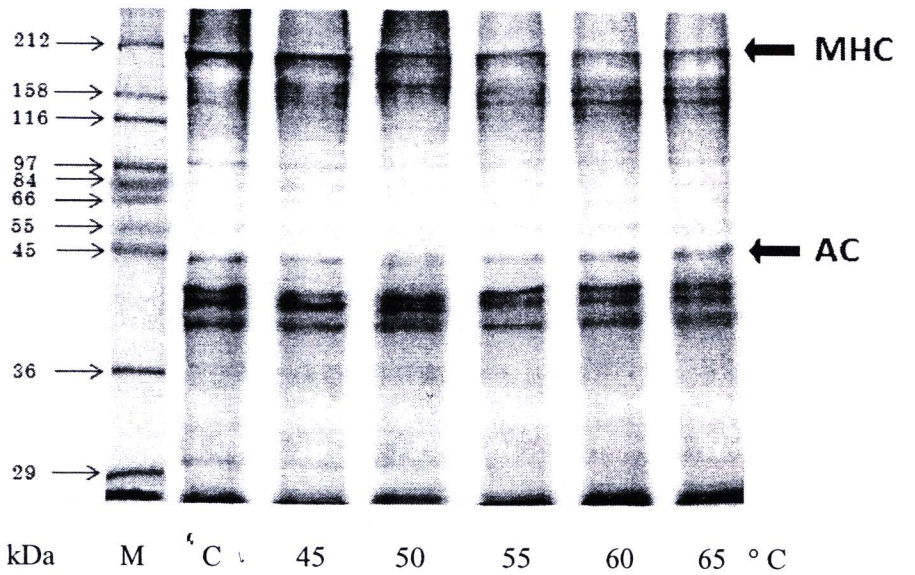
ภาพที่ 1 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที

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

Cao and others (1999) รายงานว่า เอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีนที่จับกับโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ จากกล้ามเนื้อปลาปากคม (lizardfish) สามารถย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนักที่อุณหภูมิ 55 – 60 องศาเซลเซียส ในขณะที่โปรตีนแอคตินและโปรตีนอัลฟ่า-แอคตินิน ไม่มีการย่อยสลาย Benjakul and others (2003b) รายงานการย่อยสลายไมโอซินสายหนักของเนื้อปลาปากคมบดที่ 65 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่างานวิจัยของ Cao and others (1999) เล็กน้อยอาจเนื่องมาจากแหล่งอาศัยของปลาที่ต่างกัน Rawdkuen and others (2007) กล่าวว่าพบการย่อยสลายของโปรตีนไมโอซินสายหนักและโทรโปนิน ที เกือบทั้งหมดเมื่อบ่มซูริมิปลา Pacific whiting ที่ 55 องศาเซลเซียส ภายใน 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ และแถบแอคตินมีขนาดลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 180 นาที ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าแอคตินมีความคงตัวต่อเอนไซม์โปรตีเนสมากกว่าโปรตีนไมโอฟิบริลลาร์ชนิดอื่น จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เกิดการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อปลาโมงสูงสุด จึงเลือกอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.2 **การศึกษาผลของ** pH **ต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด**

ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2.0 – 12.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แสดงตาม **ภาพที่ 3** เมื่อนำมาวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก พบว่าเนื้อปลาบดที่บ่มที่ pH 4.0 มีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกสูงที่สุด (3,915 นาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง) รองลงมาคือเนื้อปลาบดที่บ่มที่ pH 5.0 9.0 และ10.0 (2,938 2,955 และ2,748 นาโนโมลของไทโรซีนต่อกรัมของตัวอย่าง ตามลำดับ) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีนทำงานได้ดี มี 2 กลุ่ม คือ เอนไซม์กลุ่มแอซิดโปรตีเนส(acid proteinases) และอัลคาไลน์โปรตีเนส (alkaline proteinases)



ภาพที่ 2 รูปแบบโปรตีนของเนื้อปลาโมงที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 90 นาที

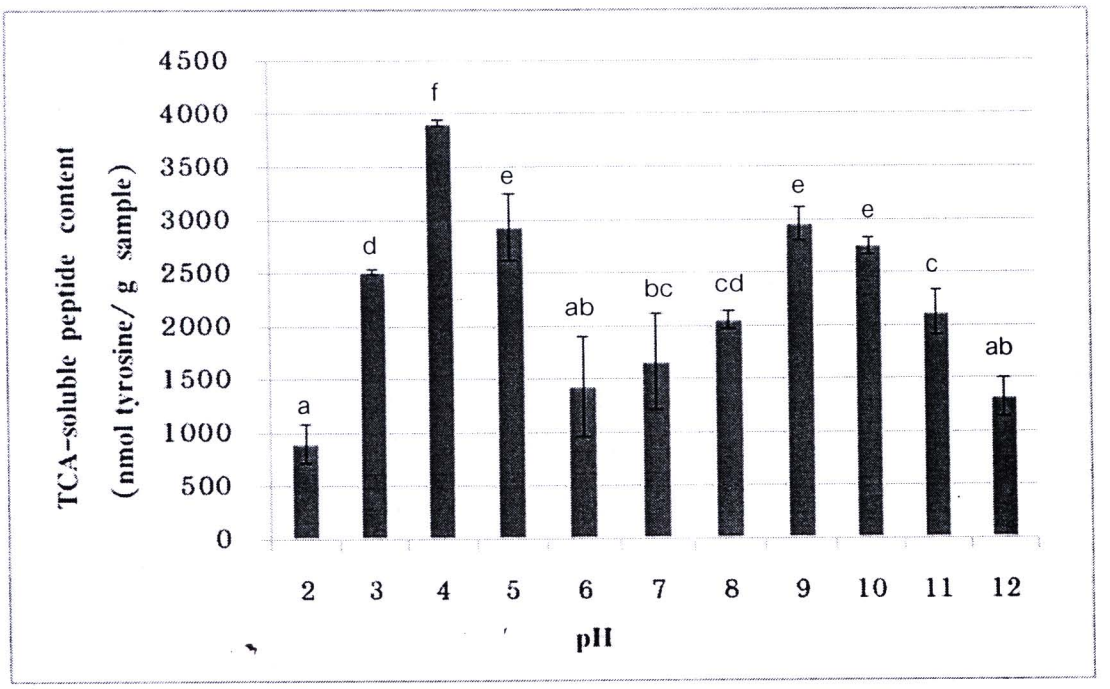
หมายเหตุ M: Protein standard marker C: เนื้อปลาบดที่ไม่ผ่านการบ่ม MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอคติน

การบ่มเนื้อปลาโมงบดที่ pH 4.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกสูงที่สุดนั้นอาจเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มแอสพาติก เช่น เอนไซม์คาเธปซิน ดี (Cathepsin D) และเอนไซม์เปปติน มีรายงานการพบเอนไซม์คาเธปซิน แอล 2 ชนิดในปลา silver carp คือ คาเธปซิน แอล 1 ซึ่งเป็นซีรีนโปรตีเนสที่ย่อยโปรตีนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส pH 5.0 (Luo and others 2006 อ้างถึงใน Schiavone and other 2008) และคาเธปซิน แอล 2 ซึ่งมีช่วง pH ที่เหมาะสมที่ pH 4.5-5.5 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และกิจกรรมถูกยับยั้งได้ที่ pH 7.0 (Li and others 2008 อ้างถึงใน Schiavone and other 2008) Jiang and others (1993) รายงานว่าเอนไซม์คาเธปซิน ดี จากปลาแมคคาเรลสามารถทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 3.0 และ อุณหภูมิประมาณ 45 และ 50 องศาเซลเซียส Klomklao and others (2007) รายงานว่าเอนไซม์เปปตินที่พบในกระเพาะของ Pectoral rattail (*Coryphaenoides pectoralis*) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ช่วง pH ประมาณ 3.0 – 3.5 ปลานิลมีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ pH เท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (Worratao and Yongsawatdigul 2002) ส่วนการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อปลาโมงบดที่สภาวะด่าง (pH 9-10) และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกสูงรองจาก pH 4.0 นั้นอาจเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์กลุ่มอัลคาไลน์โปรตีเนสที่ทนความร้อนซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเสื่อมสลายของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาหลายสายพันธุ์ เช่น เรนโบว์เทร้าต์ ชาร์ดีน ไวท์ครอกเกอร์ คาร์ป แมคคาเรล เป็นต้น

อัลคาไลน์โปรตีเนสที่สกัดจากปลาไวท์ครอกเกอร์และแอตแลนติกเมนฮาเดน (Atlantic Menhaden) แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 7.5-8.0 และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (An and others 1996) Stoknes and others (1993) รายงานว่าเอนไซม์ทนความร้อนกลุ่มอัลคาไลน์โปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อปลา

เฮอร์ริ่ง (*Clupea harengus*) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่ pH เท่ากับ 9.0 และอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส

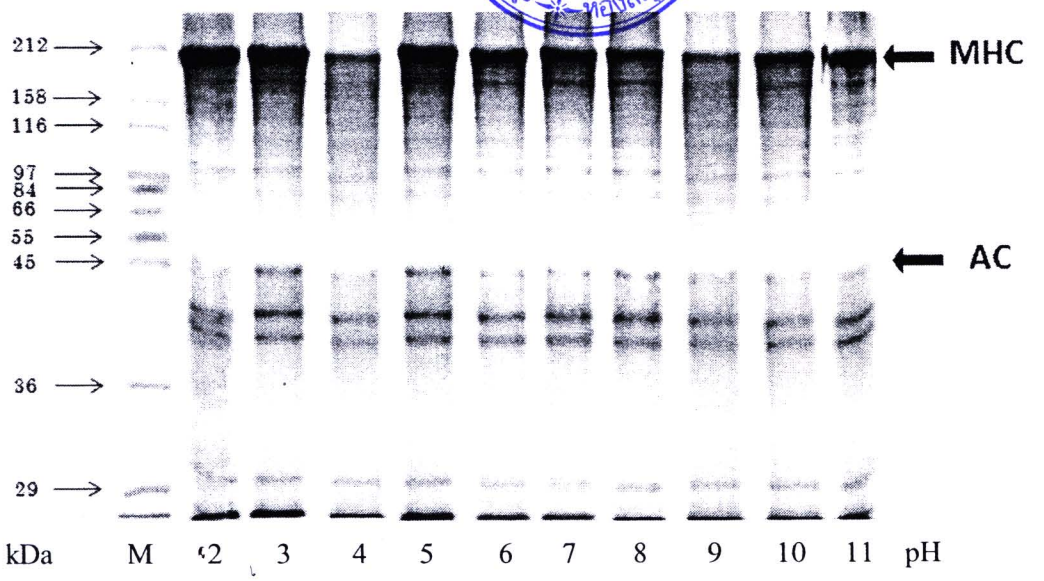
ผลการศึกษารูปแบบของโปรตีนพบว่าแถบของไมโอซินสายหนักและแอคตินในตัวอย่างที่บ่มที่ pH เท่ากับ 4.0 และ 9.0 บางกว่า pH ช่วงอื่นๆ (**ภาพที่ 4**) ซึ่งสอดคล้องกับค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแสดงถึงการเกิดกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาโมงได้ดีที่สภาวะกรดและด่างคล้ายคลึงกับงานวิจัยของ Visessanguan and others (2001) รายงาน การย่อยสลายโปรตีนของกล้ามเนื้อปลา Arrowtooth flounder อันเนื่องมาจากการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มทนความร้อนที่ทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรด (pH 5.5) และด่าง (pH 8.0) Klomklao and others (2009) ศึกษาพบว่าปลา Japanese sandfish มีการย่อยสลายตัวเองสูงสุดในช่วง pH ที่เป็นกรด และเป็นด่าง เช่นกัน คือ pH เท่ากับ 3.5 และ 9.5 อย่างไรก็ตามการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาโมงเกิดขึ้นมากกว่าที่สภาวะกรด (**ภาพที่ 3**) แสดงให้เห็นว่ากล้ามเนื้อปลาโมงอาจมีเอนไซม์โปรตีเนสกลุ่มแอซิดโปรตีเนสมากกว่ากลุ่มอัลคาไลน์โปรตีเนส ตรงกันข้ามกับปลา Japanese sandfish ซึ่งมีค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของตัวอย่างที่บ่มที่สภาวะด่างสูงกว่า และกล่าวว่าเอนไซม์โปรตีเนสหลักที่พบในปลา Japanese sandfish อาจเป็นกลุ่มอัลคาไลน์โปรตีเนสชนิดทนร้อน ได้แก่ Trypsin – like enzyme ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้ทำงานได้ดีที่ pH เท่ากับ 9.5 และอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส Klomklao and others (2009)



ภาพที่ 3 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2.0 – 12.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ $^{a-f}$ ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 4 รูปแบบโปรตีนของเนื้อปลาโมงบดที่ผ่านการบ่มที่ pH 2.0 – 11.0 อุณหภูมิ 60 องศา เซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ M: Protein standard marker MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอคติน

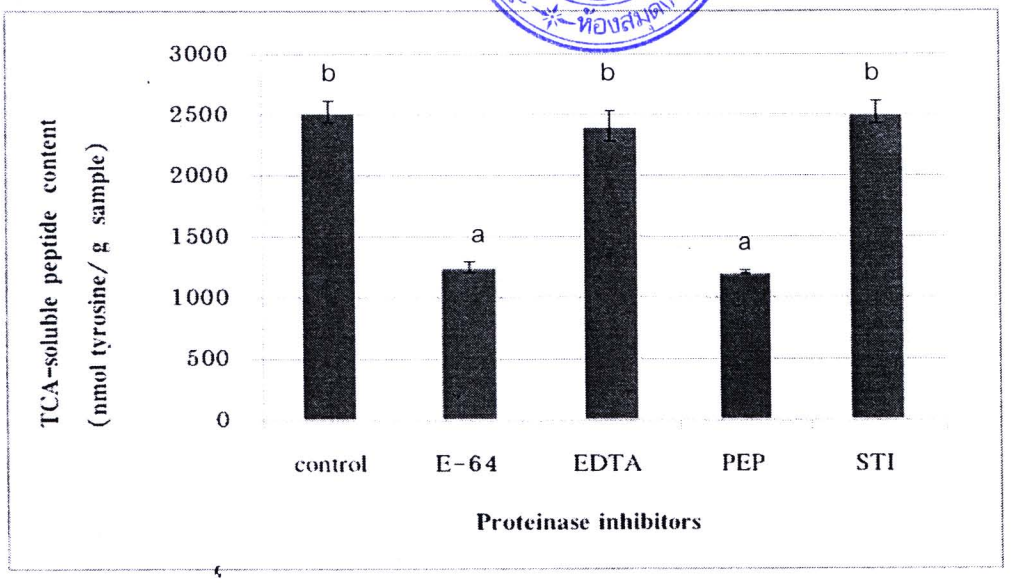
ในขณะที่ที่สภาวะเป็นกลาง (pH 6 และ 7) พบการบางลงของแถบโปรตีนแอคตินและแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30 กิโลดาลตัน (ซึ่งอาจเป็นโปรตีนโทรโปนิน ที (troponin T)) เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม Ladrat and others (2003) รายงานการย่อยสลายของแอกตินด้วยคาเธปซิน แอล และการย่อยสลายของโทรโปนิน ที ด้วยคาเธปซิน บี ดี และแอล ในปลาซีแบส (Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)) ที่ pH 5.5 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ที่ pH เท่ากับ 4.0 และ 9.0 เกิดการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อปลาโมงสูงสุด จึงเลือกสภาวะดังกล่าวเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

1.3 การศึกษาผลของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสต่อการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาโมงบด

สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้คือ E-64 soybean trypsin inhibitor (STI) Pepstatin A และ EDTA ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีน ซีรีน แอสพาติก และเอนไซม์โปรตีเนสชนิดเมทาโล ตามลำดับ **ภาพที่ 5 และ 6** แสดงปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 และ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ พบว่า เนื้อปลาโมงที่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 (0.01 mM) และ Pepstatin A (0.03 mM) มีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกต่ำกว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมและตัวอย่างเนื้อปลาบดที่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด EDTA และ Soybean trypsin inhibitor แสดงให้เห็นว่า เอนไซม์โปรตีเนสที่พบในเนื้อปลาโมงเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและชนิดแอสปาติก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 25 ก.ค. 2555
เลขทะเบียน 247513
เลขเรียกหนังสือ

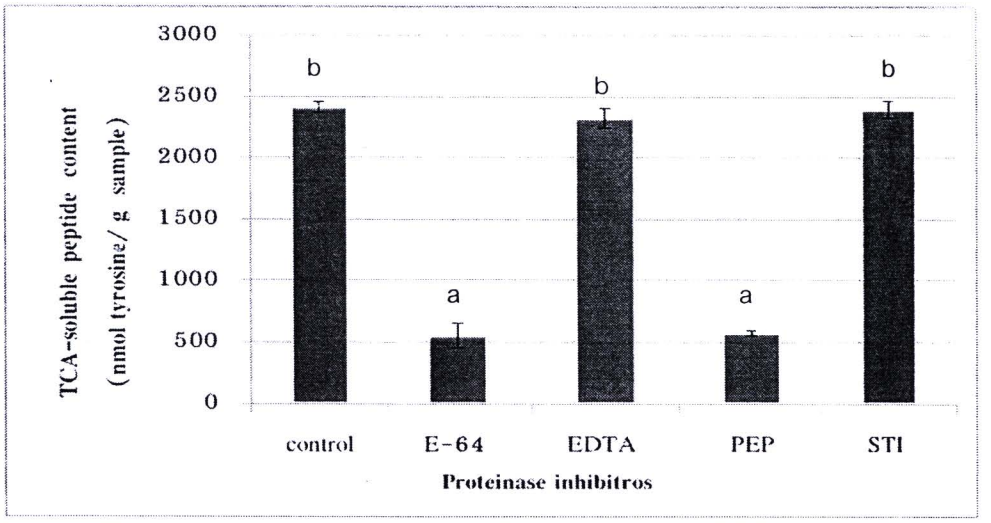
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



ภาพที่ 5 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ
- $^{a-b}$ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงบนแท่งกราฟความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
- Control: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส
- E-64 : 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane เข้มข้น 0.01 mM
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid เข้มข้น 2.00 mM
- PEP : Pepstatin A เข้มข้น 0.03 mM
- STI : soybean trypsin inhibitor เข้มข้น 0.5 g/L

จาก**ตารางที่ 1** แสดงความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ pH 4.0 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส E-64 และ Pepstatin A มีความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาโมงเท่ากับร้อยละ 50.5 และ 52.0 ตามลำดับ ส่วนที่ pH 9 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส E-64 และ Pepstatin A มีความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนได้ดีกว่าที่ pH 4.0 คือเท่ากับร้อยละ 77.1 และ 76.3 ตามลำดับ การศึกษารูปแบบโปรตีนของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 (**ภาพที่ 7**) และ pH 9.0 (**ภาพที่ 8**) อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่า การเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64และ Pepstatin A ในเนื้อปลาโมงบดทำให้แถบของไมโอซินสายหนัก หนากว่าการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสทั้งสองชนิดสามารถป้องกันการย่อยสลายของไมโอซินสายหนักในเนื้อปลาโมงบดได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่เติม E-64และ Pepstatin A สังเกตพบการย่อยสลายของ ไมโอซินสายหนักของตัวอย่างที่เติม E-64 มากกว่า Pepstatin A เนื่องจากแถบไมโอซินสายหนัก มีความเข้มน้อยกว่าและมีแถบโปรตีนขนาดเล็กใต้แถบไมโอซินสายหนัก ซึ่งเป็นผลจากการย่อยสลายของไมโอซินสายหนัก มากกว่า หรืออาจเกิดจากโปรตีนที่มีในเนื้อปลาโมง

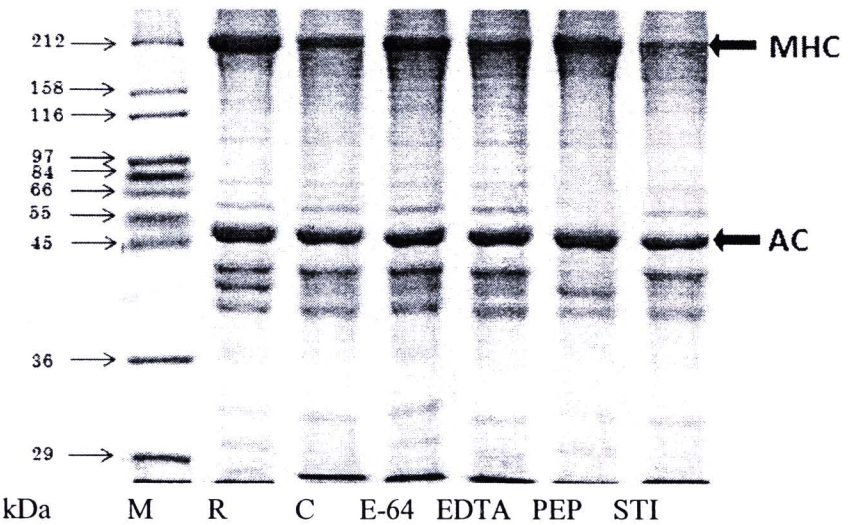


ภาพที่ 6 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ
- $^{a-b}$ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงบนแท่งกราฟความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
- Control: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส
- E-64 : 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane เข้มข้น 0.01 mM
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid เข้มข้น 2.00 mM
- PEP : Pepstatin A เข้มข้น 0.03 mM
- STI : soybean trypsin inhibitor เข้มข้น 0.5 g/L

บด นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่เติม Pepstatin A ที่ pH 4.0 แถบโปรตีนในช่วงน้ำหนักโมเลกุล 55-97 กิโลดาลตัน และแถบโปรตีนใต้แถบแอกตินจางกว่าการใช้สารยับยั้งชนิดอื่นๆ อย่างชัดเจน ซึ่งแตกต่างจากที่ pH 9.0 ทำให้ทราบว่า Pepstatin A ไม่สามารถยับยั้งเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลในช่วงดังกล่าวได้ในช่วง pH 4.0 ซึ่งอาจเป็นเหตุผลทำให้ค่าความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาโมงบดบ่มที่ pH 4.0 มีค่าต่ำกว่าตัวอย่างที่บ่มที่ pH 9.0 (**ตารางที่ 1**) อีกทั้งยังสอดคล้องกับค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกซึ่งมีค่าสูงกว่าที่ pH 4 (**ภาพที่ 3**)

Makindo and others (1982) รายงานว่า ในกล้ามเนื้อของปลาคาร์ปพบเอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสปาติกที่เป็นสาเหตุสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนัก และโปรตีนแอคติน โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ชนิดดังกล่าวได้โดยการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A Weng and others (2007) ศึกษาพบว่าในการทำฟิล์มจากซูริมิปลา Alaska pollack โดยมีการเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิด E-64 และ Pepstatin A ทำให้ฟิล์มที่ได้มีคุณภาพดี ทั้งนี้เนื่องจากในเนื้อปลาชนิดนี้มีเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและเอนไซม์คาเธปซิน ดี Benjakul and others (2003b) รายงานว่า E-64 สามารถยับยั้งการย่อยสลายตัวเองในเนื้อปลา lizardfish ได้ Klomklao and others (2008) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบมากในปลา true

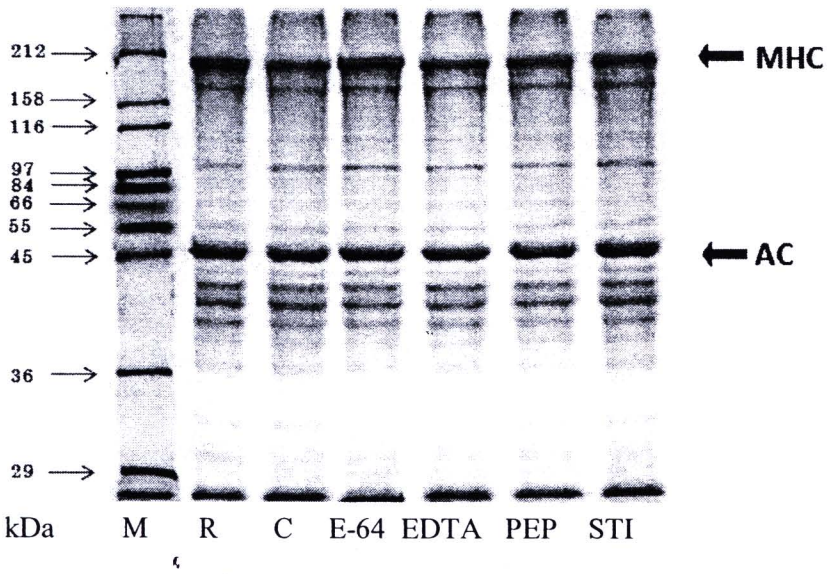


ภาพที่ 7 รูปแบบโปรตีนของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ
- M: Protein standard marker
- R: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม
- C: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม
- MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอคติน
- Control: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส
- E-64 : 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane เข้มข้น 0.01 mM
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid เข้มข้น 2.00 mM
- PEP : Pepstatin A เข้มข้น 0.03 mM
- STI : soybean trypsin inhibitor เข้มข้น 0.5 g/L

sardine ที่บ่มที่ pH 3.0 คือเอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสพาติก Klomklao and others รายงานว่าพบเอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสพาติกและซีรีนในกล้ามเนื้อปลา Japanese sandfish โดยเอนไซม์โปรตีเนสทั้งสองสามารถมีกิจกรรมได้ที่ pH 3.5 และ 9.5 ซึ่งสามารถยับยั้งได้โดยเอนไซม์โปรตีเนสชนิด Pepstatin A และ soybean trypsin inhibitor ตามลำดับ Yarnpakdee and others (2009) รายงานว่าเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในปลาแพะ (goatfish) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนได้ดีที่ pH 4.0 และ 7.0 โดยพบว่าที่ pH 4.0 มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนสูงสุด

Hu and others (2007) กล่าวว่าการใช้ E-64 ที่มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อกรัมช่วยเสริมคุณภาพของเจลจากซูริมิปลา walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) โดยช่วยยับยั้งการย่อยสลายไมโอซินสายหนักซึ่งถูกย่อยโดยเอนไซม์คาเธปซิน แอล ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนที่มีความสามารถในการทนความร้อนสูง แต่อย่างไรก็ตาม E-64 ไม่สามารถยับยั้งการย่อยสลายของไมโอซินสายหนักได้ทั้งหมดเนื่องจากในซูริมิปลา walleye pollock มีเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนหลายชนิด Wang and others (2011) รายงานว่าเนื้อปลา Atlantic cod มีเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนและเอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสพาติก



ภาพที่ 8 รูปแบบโปรตีนของเนื้อปลาโมงบดผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดต่างๆ ที่ผ่านการบ่มที่ pH 9.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที

หมายเหตุ
- M: Protein standard marker
- R: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสและไม่ผ่านการบ่ม
- C: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่ผสมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่ผ่านการบ่ม
- MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอคติน
- Control: เนื้อปลาโมงบดที่ไม่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส
- E-64 : 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane เข้มข้น 0.01 mM
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid เข้มข้น 2.00 mM
- PEP : Pepstatin A เข้มข้น 0.03 mM
- STI : soybean trypsin inhibitor เข้มข้น 0.5 g/L

ที่ย่อยสลายไมโอซินสายหนัก ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำงานได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกรดอ่อนๆ (pH 6.05) และได้ระบุว่าเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซิสเตอีนที่พบคือเอนไซม์คาเธปซิน บี และเอนไซม์คาเธปซิน แอล ส่วนเอนไซม์โปรตีเนสชนิดแอสพาติกที่พบอาจเป็น เอนไซม์คาเธปซิน ดี มีการศึกษาพบว่าเอนไซม์โปรตีเนสชนิดคาเธปซิน บี ดี และแอลสามารถย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริลล์ที่สกัดจากปลาได้ (Ladrat and others 2003)

ตารางที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาโมงบดบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส **นาน** 60 นาที

ชนิดของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส [1]	**ความเข้มข้น**	**ความสามารถในการยับยั้ง (%)** [2]	
		pH 4.0	**pH 9.0**
Control	-	0 [a]	0 [a]
E-64	0.01 mM	50.5±0.4 [b]	77.1±0.6 [b]
EDTA	2.0 mM	4.7±1.4 [a]	3.5±1.8 [a]
Pepstatin A	0.03 mM	52.0±1.3 [b]	76.3±0.4 [b]
STI	0.5 g/L	0.3±0.1 [a]	0.7±0.1 [a]

หมายเหตุ - [1] Control : เนื้อปลาโมงบดที่ไม่เติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส

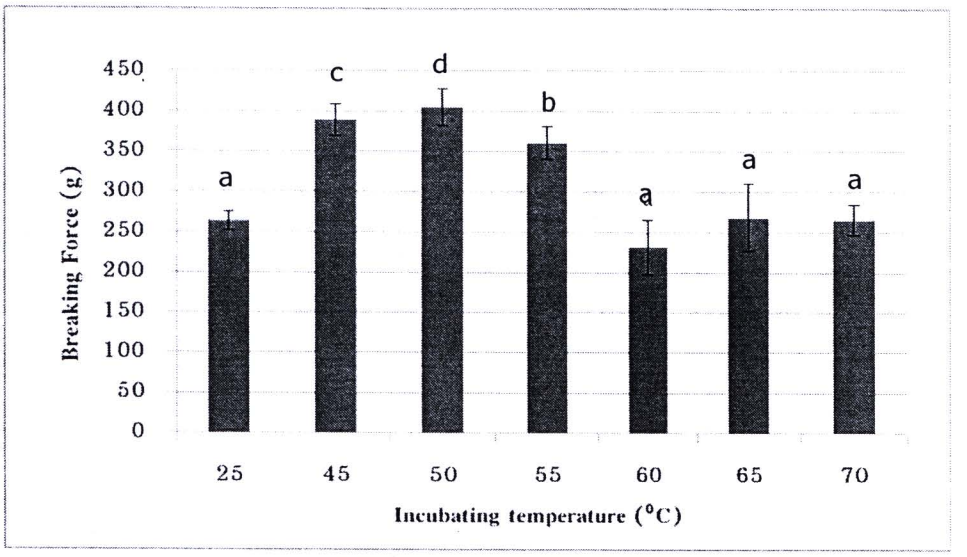
- E-64: 1-(L-trans-epoxysuccinyl-leucylamino)-4-guanid-inobutane 0.01 mM
- EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid 2.00 mM
- PEP : Pepstatin A 0.03 mM
- STI : soybean trypsin inhibitor 0.5 g/L
- [2] ค่าที่แสดงในตารางคือ ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ
- [a-b] ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

2. การศึกษาผลของการเซ็ตเจลต่อคุณภาพของเจลจากเนื้อปลาโมง

2.1 คุณสมบัติด้านเนื้อสัมผัส

ค่าแรงที่ทำให้เจลแตก (Breaking force) และระยะทางก่อนเจลแตก (Deformation) **ของเจลจาก** เนื้อปลาโมงที่เซ็ตที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที และเซ็ตที่อุณหภูมิ 45– 70 องศาเซลเซียส **นาน** 60 นาที แล้วทำให้สุกที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แสดงในภาพที่ 9 และ15 จากการ**ทดลอง** พบว่า การเซ็ตเจลจากเนื้อปลาโมงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ให้เจลที่มีคุณภาพต่ำโดยมีค่าแรง**ที่ทำให้เจล** แตกและระยะทางก่อนเจลแตกต่ำที่สุด เนื่องจากโปรตีนซึ่งทำหน้าที่หลักในการฟอร์มเจลถูกทำให้สูญ**เสียสภาพ** ไปอันเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่พบในกล้ามเนื้อปลาโมง ซึ่งถูกกระตุ้นให้แสดงกิจกรรม**ได้ดีที่ช่วง** อุณหภูมิดังกล่าว จึงทำให้ได้เจลที่ไม่มีความแข็งแรง และสูญเสียความยืดหยุ่นไป แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิ**ในการ** บ่มเจลมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสใน กล้ามเนื้อปลาโมงซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา**ผลของ** อุณหภูมิต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลาโมงบด

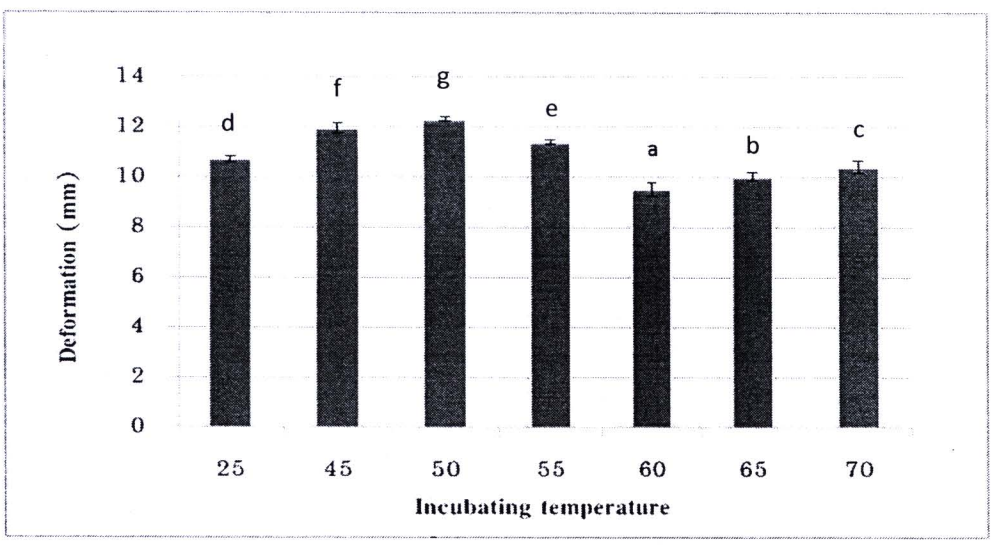
Suzuki (1981) และShimizu (1981) รายงานว่าเมื่อให้ความร้อนจนอุณหภูมิของเจล**สูงกว่า** 50 องศาเซลเซียส โครงร่างสามมิติของเจลที่จับกันอย่างหลวมๆ จะถูกทำลายบางส่วน เรียกเจลช่วงนี้ว่า **เจลโมโดริ** Lanier and others (1981) รายงานว่าการทำลายโครงสร้างโปรตีนที่จับกันในรูปแบบโครงร่าง**แหสามมิติ** บางส่วนนั้นเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเนส เนื่องจากเป็นเอนไซม์ที่พบอยู่ในเนื้อ**ปลาและมี** กิจกรรมที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส Yongsawatdikul and others (2006) ศึกษาความ**สามารถใน**



ภาพที่ 9 ความแข็งแรงของเจลจากเนื้อปลาโมงบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

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

- บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที



ภาพที่ 10 ความยืดหยุ่นของเจลจากเนื้อปลาโมงบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

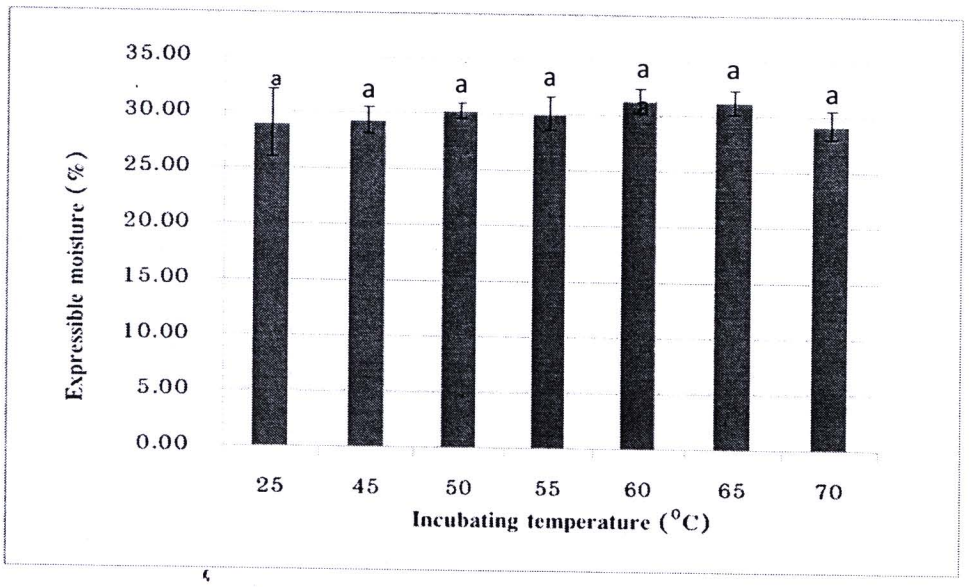
หมายเหตุ - $^{a-g}$ ตัวอักษรที่ต่างกันบนแท่งกราฟแสดงความแตกต่างกันระหว่างทรีตเม้นท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

- บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที

การเกิดเจลของปลานวลจันทร์ (Small scale mud carp; *Cirrhiana microlepis*) ที่ผ่านการบดและบดแล้วล้างพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อปลานวลจันทร์มีค่าสูงสุดที่สภาวะ pH 9.0 อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และที่สภาวะ pH 10 อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสตามลำดับโดยการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด หลังจากบ่มเนื้อปลาบดในสภาวะต่างๆ ซึ่งทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่พบในเนื้อปลานวลจันทร์เป็นอัลคาไลน์โปรตีเนสที่ถูกกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมได้ด้วยความร้อน เมื่อมีการล้างเนื้อปลานวลจันทร์บดด้วยน้ำ 2 ครั้งพบว่าการย่อยสลายโปรตีนลดลงทั้งนี้เนื่องจากการล้างเนื้อปลาบดเป็นการกำจัดเอนไซม์โปรตีเนสและเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดยการล้างเนื้อปลานวลจันทร์บดครั้งเดียวทำให้คุณภาพของเจลดีกว่าเนื้อปลาบดและเนื้อปลานวลจันทร์บดที่ผ่านการล้าง 2 ครั้ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) Rawdkuen and others (2007) พบการเกิดโมโดริเจลจากปลาแปซิฟิกไวท์ติ้งเมื่อบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ก่อนต้มสุกที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในขณะที่การเซ็ตเจลที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส คุณภาพด้านเนื้อสัมผัสของเจลปลาโมงดีที่สุด ($p \leq 0.05$) (**ภาพที่9 และ10**) Worratao and Yongsawatdigul 2003 รายงานว่าในกล้ามเนื้อของปลานิลเขตร้อน (Oreochromis niloticus) มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (TGase) ที่สูง และเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากปลานิลที่ยังไม่บริสุทธิ์ (crude tilapia TGase) นี้เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (cross-links) ของไมโอซินสายหนัก ซึ่งช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเจลเนื้อปลานิลบด ในปี 2005 Worratao and Yongsawatdigul ทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลานิลและศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลานิลคือ 37-50 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมคือ 7.5 ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่เหมาะสมคือ 1.25 มิลลิโมลาร์ และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพิ่มขึ้น Benjakul and others (2003b) รายงานว่าการเซ็ตเจลของเนื้อปลาเขตร้อนบางชนิดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถปรับปรุงคุณภาพของเจลได้โดยเพิ่มคุณภาพทางเนื้อสัมผัส (แรงที่ทำให้เจลแตก และระยะทางก่อนเจลแตก) ในทุกๆการทดลอง และเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเซ็ต ค่าแรงที่ทำให้เจลแตกและระยะทางก่อนเจลแตกจะเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการรวมตัวกันของไมโอซินสายหนักโดยการกระตุ้นของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสซึ่งมีในเนื้อปลา อย่างไรก็ตามในการบ่มเจลปลาโมงที่ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส แต่กลับพบปรากฏการณ์โมโดริ โดยเจลมีความแข็งแรงต่ำที่สุดไม่แตกต่างจากการบ่มที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส แต่มีความยืดหยุ่นสูงกว่า พบความสอดคล้องของค่าปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในกรดไตรคลอโรอะซีติก (**ภาพที่ 12**) และรูปแบบของโปรตีนที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE (**ภาพที่ 13**) ซึ่งแสดงถึงการที่โปรตีน ไมโอซินสายหนักถูกย่อยสลายอย่างชัดเจนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

2.2 การวิเคราะห์ความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล (water holding capacity)

ความสามารถในการอุ้มน้ำของเจลสามารถวัดได้จากร้อยละการสูญเสียน้ำของเจล ปลาโมง โดยจากการวิจัยเห็นได้ว่าจาก**ภาพที่ 11** การบ่มเจลที่อุณหภูมิต่างๆ ไม่มีความแตกต่างของร้อยละการสูญเสียน้ำของเจลปลาโมงอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาจากแนวโน้มของค่าดังกล่าว พบว่า การเซ็ตเจลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เจลมีค่าร้อยละการสูญเสียน้ำมากกว่าอุณหภูมิอื่นๆ ซึ่งการที่เจลมีความ



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 11 ร้อยละการสูญเสียน้ำของเจลเนื้อปลาโมงที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

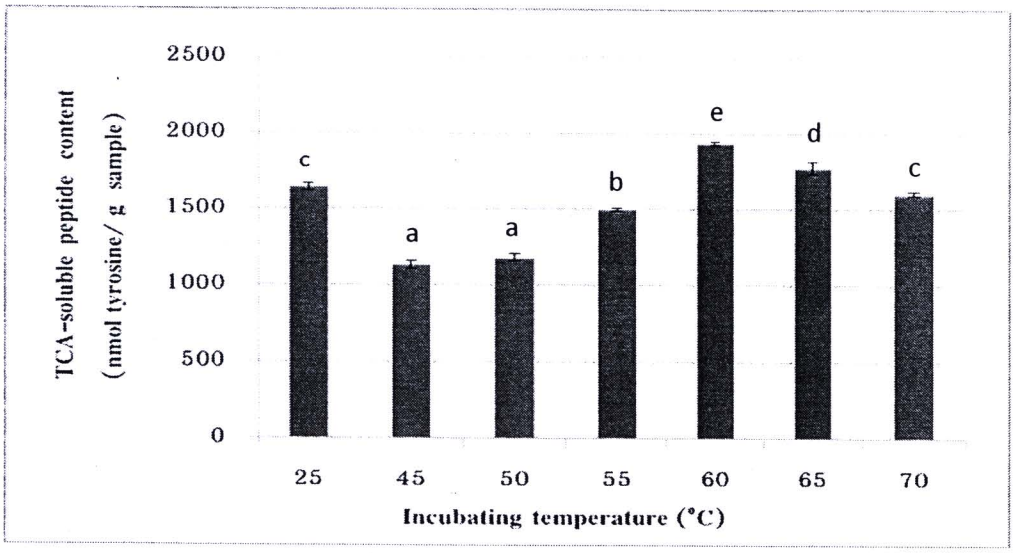
หมายเหตุ - บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที

- บ่มที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที

สามารถในการอุ้มน้ำไม่ดีนั้น อาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพของโครงสร้างภายในของโปรตีน ในขณะที่โปรตีนโครงสร้างเสียสภาพอันเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่มีในกล้ามเนื้อปลาโมงทำให้มีการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนไปด้วย โครงสร้างของโปรตีนจึงไม่สามารถเก็บกักน้ำไว้ได้

2.3 คุณสมบัติทางชีวเคมี

การศึกษาปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเจลปลาโมงพบว่าการเซ็ตเจลที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกสูงที่สุด ($p \leq 0.05$) (**ภาพที่ 12**) ทำให้ทราบว่าการเซ็ตเจลที่อุณหภูมิดังกล่าวทำให้ไมโอซินสายหนักถูกย่อยสลายไปเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้านเนื้อสัมผัส (ค่าแรงที่ทำให้เจลแตกและระยะทางก่อนเจลแตก) และความสามารถในการอุ้มน้ำของเจลปลาโมง ทั้งยังสอดคล้องกับผลการศึกษาโดยใช้ SDS-PAGE อีกด้วย (**ภาพที่ 13**) โดยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แถบของไมโอซินสายหนักมีความบางกว่าอุณหภูมิอื่นๆ อีกทั้งยังตรวจพบการหายไปของแถบแอคติน ปรากฏการณ์ดังกล่าวคือการเกิดโมโดริหรือการอ่อนตัวของเจลจากกล้ามเนื้อปลา ซึ่งส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ 50-70 องศาเซลเซียส เกิดจากโปรตีนไมโอซินถูกย่อยด้วยอัลคาไลน์โปรตีเนสที่ทนร้อน (heat stable alkaline proteinases) (Lin and Lanier 1980, Boye and Lanier 1988) An and others (1994b) ศึกษาพบว่าเอนไซม์คาเธปซิน แอล เป็นเอนไซม์ที่พบมากที่สุดในซูริมิปลา pacific whiting (Merluccius productus) และเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีนทำให้ซูริมิที่ได้มีคุณภาพทางเนื้อสัมผัสต่ำ อีกด้วยเนื่องจากเอนไซม์ชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยโปรตีนหลายชนิด ได้แก่ โปรตีนไมโอไฟบริลล์ ไมโอซิน คอลลาเจน และคอลลาเจนที่เสียสภาพทางธรรมชาติเนื่องจากความร้อน Yamashita and Konagaya (1991)

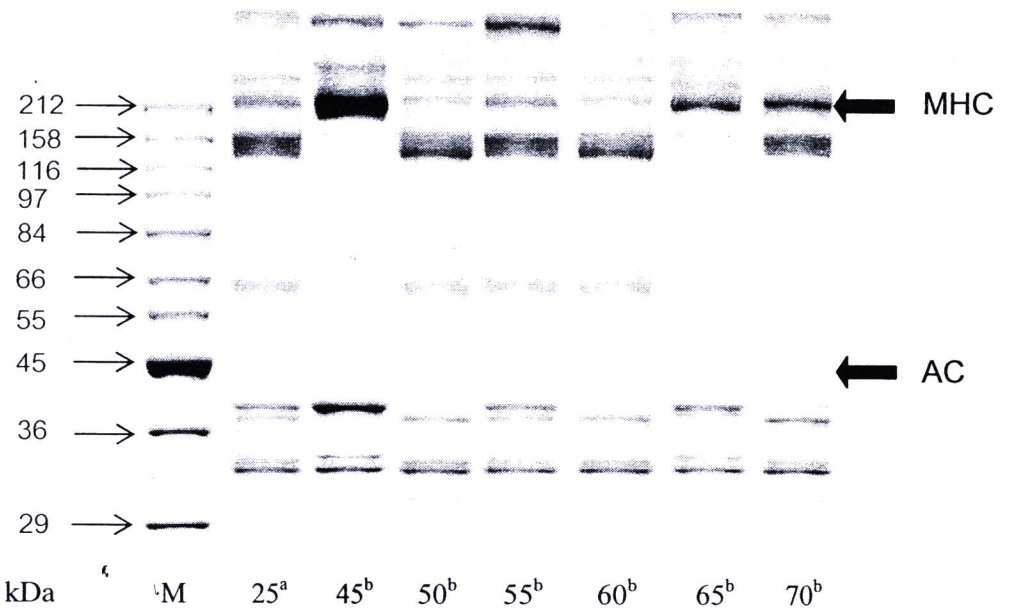


ภาพที่ 12 ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเจลจากเนื้อปลาโมงที่ผ่านการเซ็ตเจลที่อุณหภูมิต่างๆ นาน 60 นาที

หมายเหตุ - $^{a-e}$ ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างกันระหว่างทรีตเม้นท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)
- บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 120 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที
- บ่มที่อุณหภูมิ 45-70 องศาเซลเซียส 60 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส 15 นาที

รายงานว่าเอนไซม์คาเธปซิน แอล มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อ เช่น คอนเนคติน (connectin) เนบูลิน (nebulin) ไมโอซิน คอลลาเจน อัลฟ่า-แอคตินิน โทรโปนิน ที และโทรโปนิน ไอ Hastings and others (1990) Morrissey and others (1993) และ Wan and others (1995) รายงานอย่างสอดคล้องว่าปริมาณไมโอซินสายหนัก ลดลงเมื่อให้ความร้อนแก่เจล จากปลาแปซิฟิกไวท์ติ้ง(Pacific whiting: *Merluccius productus*) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที Cheng and others (1979) รายงานว่าในระหว่างการให้ความร้อนแก่เจลของปลาครอกเกอร์ (Crocker) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส มีการย่อยโปรตีนไมโอซินสายหนักเกิดขึ้น ในขณะที่การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะดังกล่าวเกิดขึ้นแต่อย่างใด ในขณะที่เจลของปลามิลค์ฟิช(Milkfish) เกิดปรากฏการณ์ของเจลโมโดริที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยการอ่อนตัวของโครงสร้างเจลจะเกิดขึ้นตามระยะเวลาของการให้ความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าว (Ko and Liou 1994)

การเซ็ตเจลที่อุณหภูมิ 45-55 องศาเซลเซียสทำให้ปริมาณเปปไทด์ที่ละลายได้ในสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกของเจลปลาโมงต่ำที่สุด ($p \leq 0.05$) และพบแถบของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 212 กิโลดาลตัน ในการศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE และพบตะกอนของแข็งบางส่วนที่ไม่ละลายในสารละลายโซเดียม โดเดซิล ซัลเฟต ความเข้มข้นร้อยละ 5 ในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง ซึ่งโปรตีนที่ไม่ละลายนี้บางส่วนอาจเกิดจากกิจกรรมการเชื่อมข้ามโปรตีนของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติการเกิดเจล ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเจลที่ดี โดยเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสทำหน้าที่เร่งการย้ายหมู่เอซิล เกิดเป็นพันธะเชื่อมโยงระหว่างแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxy amide) ของกรดอะมิโน



ภาพที่ 13 SDS-PAGE ของเจลจากเนื้อปลาโมงที่ผ่านการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

หมายเหตุ - M: Protein marker MHC: ไมโอซินสายหนัก AC: แอคติน

- [a] บ่มเป็นเวลา 120 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที
- [b] บ่มเป็นเวลา 60 นาที แล้วให้ความร้อน 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กลูตามีน (Glutamine) กับหมู่เอมีนของไลซีน (Lysine) เกิดเป็นไอโซเปปไทด์หรือพันธะแกมมา-กลูตามิลไลซีน (γ-glutamyl lysine crosslink) (Greenberg and others 1991) Sano and others (1994) ได้อธิบายไว้ว่าความร้อนมีผลให้โปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลาคาร์พ (Carp) เริ่มคลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และการคลายตัวของโปรตีนจะเกิดเพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อระบบมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส การคลายตัวดังกล่าวมีผลให้หมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และหมู่ซัลฟไฮดริลของโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำและพันธะไดซัลไฟด์ในช่วงอุณหภูมินี้ การรวมตัวของโปรตีนจะเกิดขึ้นสูงสุดระหว่างอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของระบบสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส โปรตีนไมโอซินจะแยกตัวออกจากโปรตีนแอคโตไมโอซิน ซึ่งสามารถจับตัวระหว่างกันและกันได้ โดยผลจากการจับตัวดังกล่าวจะก่อให้เกิดเจลโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่ำ และเมื่อนำเจลมาทำให้เย็น ความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากบทบาทของพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ความแข็งแรงของเจลยังเกี่ยวข้องกับพันธะ ε-(γ-glutamyl)-lysine ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจากการเชื่อมโยงระหว่างกลุ่มแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxy amide) ของกรดอะมิโนกลูตามีน (Glutamine) และกลุ่มแอพซีลอน-อะมิโน (ε-amino) ของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine)โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส ในขั้นตอนการบ่มซูริมิ (เซ็ตเจล) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนนำไปทำให้สุก อย่างไรก็ตามรูปแบบของโปรตีนยังแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิ 50 และ 55 องศาเซลเซียส มีการเกิดทั้งการเชื่อมข้ามโปรตีนไมโอซินสายหนัก (แถบโปรตีนสูงกว่าแถบไมโอซินสายหนัก) และการย่อยสลายโปรตีนไมโอซินสายหนัก (แถบโปรตีนต่ำกว่าแถบไมโอซินสายหนักน้ำหนักโมเลกุล

ประมาณ 160 กิโลดาลตัน) แสดงถึงการเกิดกิจกรรมของทั้งเอนไซม์โปรตีเนสและเอนไซม์ ทรานส์
ที่สภาวะเดียวกัน