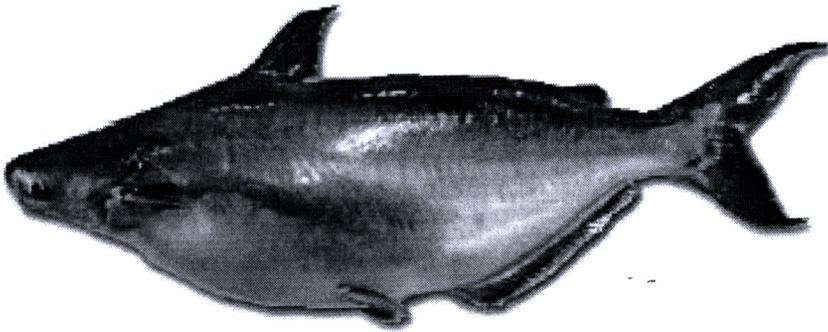


## บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 1. ปลาโพง

ปลาโพง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pangasius bocourti* (ภาพที่ 1) เป็นปลาตระกูลเดียวกับปลาสาวย มีขนาดโตเต็มที่ถึง 50 เซนติเมตร มีส่วนหัวกลมมน ส่วนท้อง ไม่มีสัน มีเมือกมาก ชอบอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหลที่มีออกซิเจนละลายน้ำสูงโดยเฉพาะในแม่น้ำโขง จัดเป็นปลากินเนื้อ ในธรรมชาติปลาชนิดนี้มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1.5 ไข่ปลาโพงเป็นไข่ติดจมน้ำ มีลักษณะกลม สีขาวอมเหลืองใส เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.28 มิลลิเมตร ความตลกของไข่เฉลี่ย 157,040 ฟอง จากแม่ปลาน้ำหนักเฉลี่ย 8,680 กรัม ลักษณะเด่นของปลาโพงที่แสดงถึงความแตกต่างจากปลาชนิดอื่นในตระกูลเดียวกัน นอกจากส่วนหัวที่กลมมนกว่าและกระเพาะลม ซึ่งแบ่งเป็นสองตอน เมื่อลองสัมผัสดูจะพบว่าปลาโพงมีเมือกที่เหนียวจำนวนมาก เนื่องจากปลาโพงมีต่อมสร้างเมือก (mucous gland) ซึ่งจะขับเมือกออกมาบริเวณรูโคนครีบหู จำนวน 3 รู (ศูนย์สารสนเทศ สถาบันอาหาร 2552b)



ภาพที่ 1 ปลาโพง

ที่มา : ศูนย์สารสนเทศ สถาบันอาหาร (2552b)

ส่วนใหญ่พบปลาโพงในแม่น้ำโขงแถบจังหวัดนครพนม จังหวัดมุกดาหาร และจังหวัด เชียงราย ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมักเรียกปลาตัวนี้ว่า ปลาเผา ส่วนในภาคกลางและภาคเหนือ เรียกว่า ปลาโพง ในแม่น้ำโขงพ่อ-แม่ปลาจะอพยพขึ้นไปเหนือน้ำเพื่อวางไข่ แหล่งวางไข่อยู่

ระหว่างประเทศไทย-ลาวและวางไข่ทันทีที่น้ำแดงในต้นฤดูฝน ถูกปลาพบได้ครั้งแรกในเดือน มิถุนายน และมีขนาดประมาณ 5 เซนติเมตรในราวกลางเดือนมิถุนายน ในต่างประเทศทราบว่ามีการเลี้ยงในประเทศเวียดนามแถบสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขง และสามารถเลี้ยงเป็นการค้าส่งออกไปยังสหรัฐอเมริกา และประเทศแถบยุโรป ซึ่งเป็นที่นิยมของผู้บริโภคในต่างประเทศ เพราะเนื้อมีลักษณะขาว ปัจจุบันการเลี้ยงปลาโพงเริ่มเป็นที่แพร่หลายในบริเวณแม่น้ำโขง โดยเฉพาะที่อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนมซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการเลี้ยงปลาโพงมากที่สุดของประเทศ (ศูนย์สารสนเทศ สถาบันอาหาร 2552c) คุณค่าทางโภชนาการของปลาโพงแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 คุณค่าทางโภชนาการของปลาโพง ต่อน้ำหนัก 100 กรัม

รายการ	หน่วย	ผลการทดสอบ
พลังงานทั้งหมด	กิโลแคลอรี	274.75
พลังงานจากไขมัน	กิโลแคลอรี	189.63
ไขมันทั้งหมด	กรัม	21.07
ไขมันอิ่มตัว	กรัม	7.92
ไขมันชนิดทรานส์	กรัม	ไม่พบ
คอเลสเตอรอล	มิลลิกรัม	10.09
โปรตีน	กรัม	14.15
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด	กรัม	7.13
ใยอาหาร	-	-
โซเดียม	มิลลิกรัม	58.11
วิตามิน A	-	-
วิตามิน B1	มิลลิกรัม	0.10
วิตามิน B2	มิลลิกรัม	0.26
วิตามิน C	มิลลิกรัม	0.72
แคลเซียม	มิลลิกรัม	28.35
เหล็ก	มิลลิกรัม	0.32

ที่มา : ศูนย์สารสนเทศ สถาบันอาหาร (2552a)

## 2. โปรตีนปลา

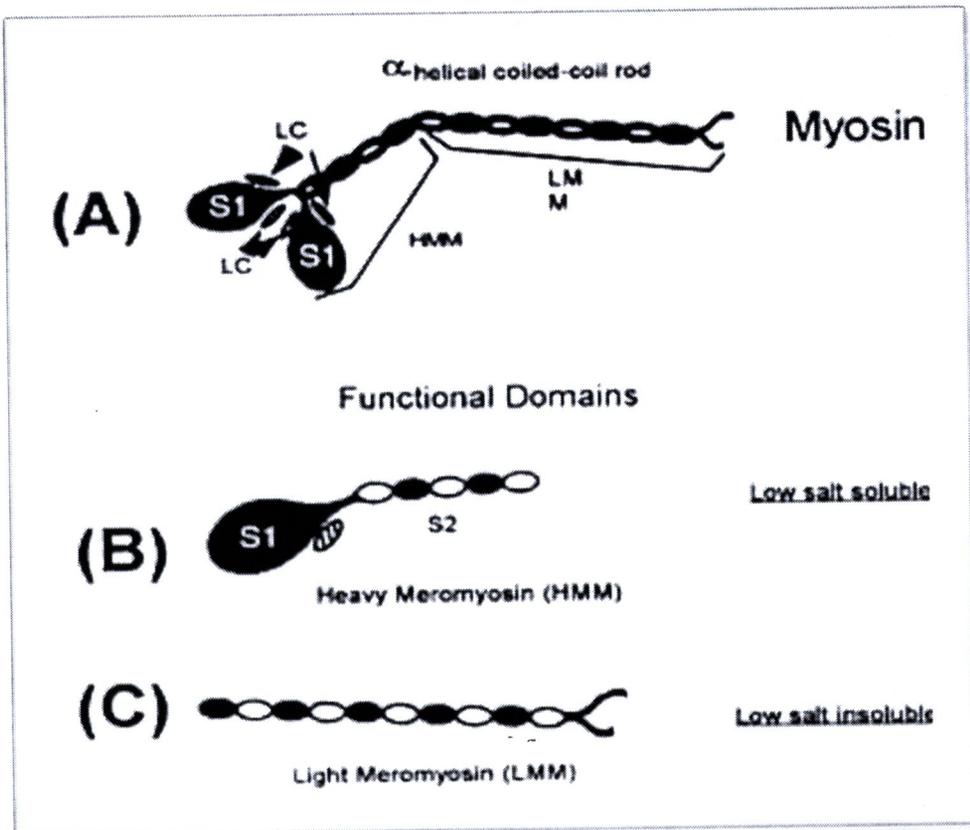
โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

### 2.1 โปรตีนโครงสร้าง หรือโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (structural or myofibrillar proteins)

โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์เป็นโปรตีนที่เป็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อ (structural muscle) ทำหน้าที่ในการยึดและหดตัวของกล้ามเนื้อ (contractile proteins) ขณะปลายังมีชีวิตอยู่ ซึ่งโปรตีนนี้จะมีลักษณะเป็นเส้น (fibrous) มีคุณสมบัติละลายในสารละลายเกลือที่มีความเป็นกลางและมีความแรงไอออนอยู่ในช่วง 0.3-1.0 ดีบายน์ (Debye) (จักรี ทองเรือง 2544) ซึ่งความสามารถละลายในสารละลายเกลือของโปรตีนชนิดนี้พบว่า มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน นอกจากนี้โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ยังมีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนสูง (high heat gelation properties) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะมีอยู่ประมาณร้อยละ 70-80 ของโปรตีนทั้งหมดและประกอบไปด้วยโปรตีนหลายชนิดไมโอซิน (myosin) เป็นโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่พบในปริมาณมากที่สุดมีอยู่ประมาณร้อยละ 55-60 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ รองลงมาคือแอกติน (actin) มีอยู่ประมาณร้อยละ 15-30 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ซึ่งเมื่อแอกตินและไมโอซินรวมตัวกันเป็นคอมเพล็กซ์ (complex) เรียกว่า แอกโตไมโอซิน (actomyosin) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนพวกโทรโปนินเชิงซ้อน (troponin complex) โทรโปไมโอซิน (tropomyosin) แอกตินิน (actinin) เอ็ม-โปรตีน (M-proteins) และซี-โปรตีน (C-proteins) ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนน้อยอยู่ด้วย (สุวรรณ วิรัชกุล 2544)

ไมโอซินเป็นโมเลกุลสายยาวขนาดใหญ่ซึ่งมีมวลโมเลกุลประมาณ 500 กิโลดาลตัน (kilodalton, kDa) ประกอบด้วยโปรตีนสองหน่วยย่อย (subunit) คือ ไมโอซินสายหนัก (myosin heavy chain, MHC) 2 สาย และไมโอซินสายเบา (myosin light chain, LC) 4 หน่วยย่อย (ภาพที่ 2) ไมโอซินสายหนัก แต่ละสายประกอบด้วยส่วนหัวซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular head) และส่วนหางซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์สายยาว 2 สายพันรอบซึ่งกันและกันเกิดเป็นโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ ( $\alpha$ -helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่ง (rod shape) ดังแสดงในภาพที่ 2 โดยแต่ละสายของไมโอซินสายหนัก มีขนาด 200 กิโลดาลตัน บริเวณ globular head สามารถแสดงกิจกรรมการย่อยสลาย adenosine triphosphate (ATPase activity) ทำให้เกิดพลังงานเพื่อใช้ในการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ ชื่อตามระบบ (systematic name) ของเอนไซม์ในไมโอซิน คือ ATP phosphohydrolase (EC 3.6.1.3) นอกจากนี้บริเวณ globular head ของไมโอซิน สามารถจับกับแอกติน (actin binding site) ซึ่งมีความสำคัญในระหว่างการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ สำหรับไมโอซินสายเบาจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยแต่ละหน่วยมีขนาดอยู่ระหว่าง 16-27 กิโลดาลตัน

เมื่อไมโอซินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) จะทำให้โครงสร้างไมโอซินถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ heavy meromyosin (HMM) ซึ่งประกอบด้วยส่วน globular head และส่วนต้นของ rod โปรตีน HMM สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือเจือจางดังแสดงในภาพที่ 2 ความสามารถในการละลายที่ต่างกันของ LMM และ HMM สามารถนำมาใช้ในการแยกสกัด LMM และ HMM ออกจากกันได้ เมื่อนำส่วนของ HMM มาย่อยต่อด้วยเอนไซม์ปาเปน (papain) ได้ส่วนย่อย S-1 และ S-2 ซึ่งคือส่วน globular head และส่วน myosin rod ตามลำดับ (จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล 2549) (ภาพที่ 2)

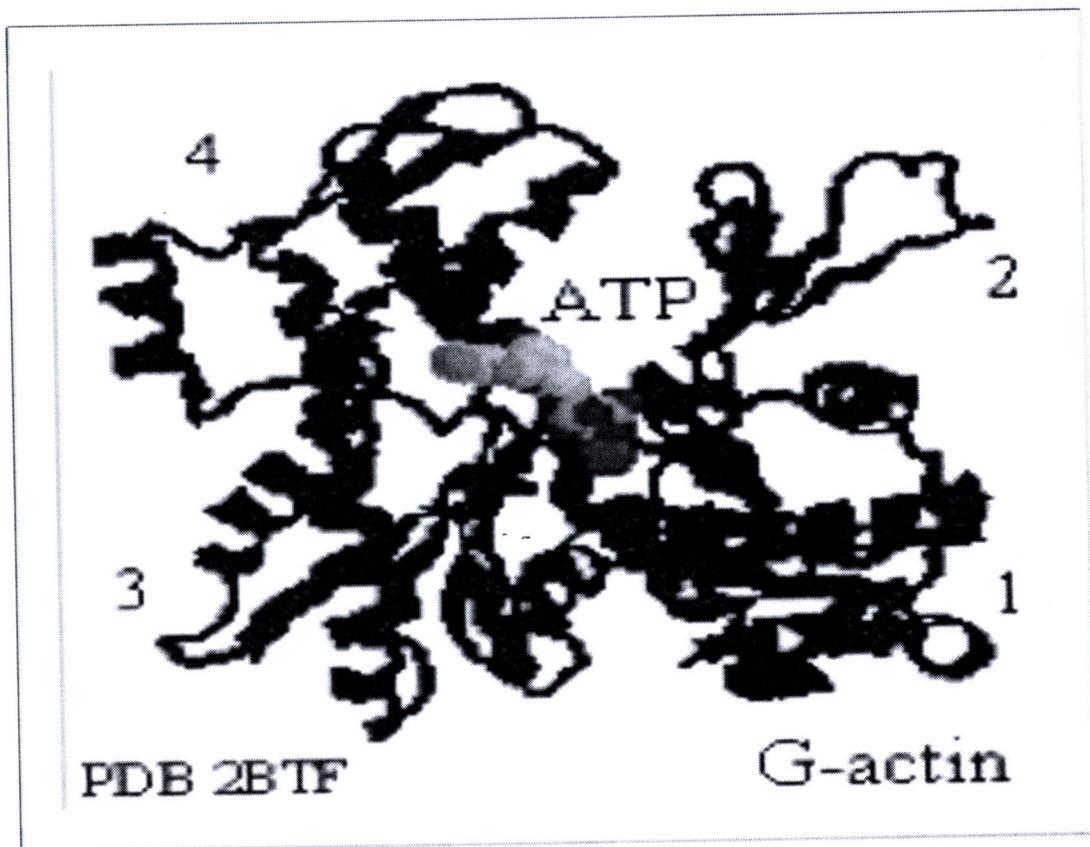


## ภาพที่ 2 ภาพวาดไมโอซิน

หมายเหตุ (A) และหน่วยย่อย heavy meromyosin (B) และหน่วยย่อย light meromyosin (C) S1=subfragment S1, S2= subfragment S2

ที่มา: Wick (2008)

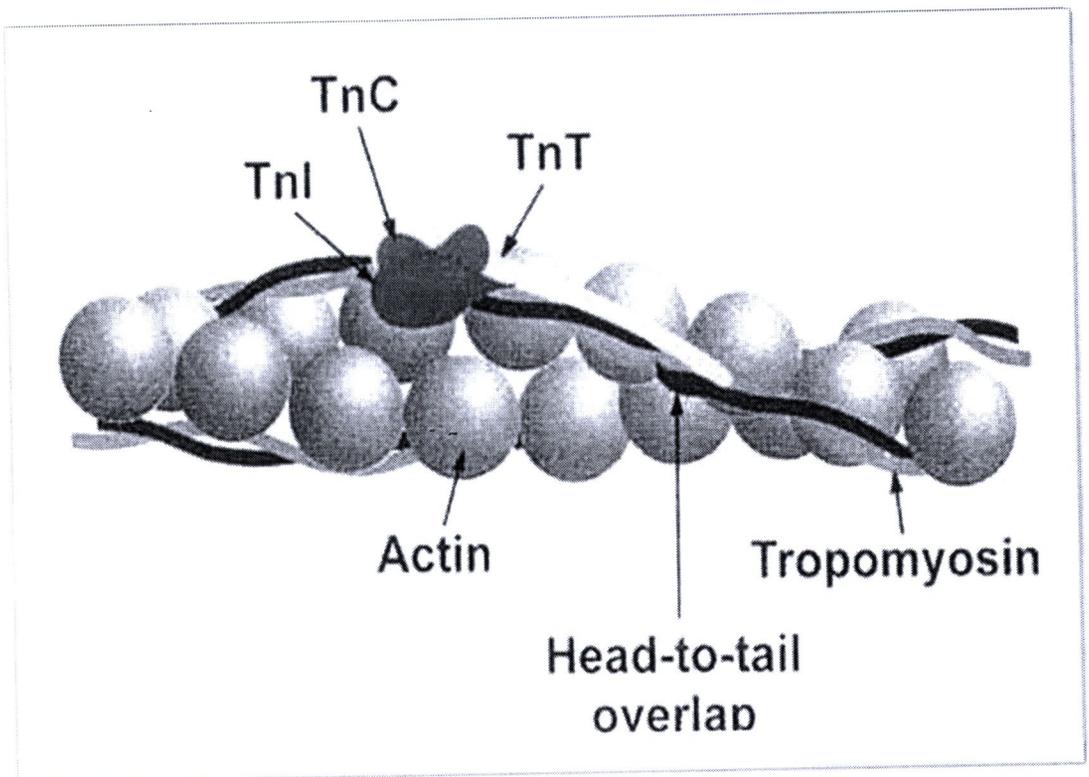
แอกตินมีปริมาณคิดเป็นร้อยละ 22 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ สายแอกตินประกอบด้วยหน่วยย่อย จี - แอกติน (G-actin) หรือ globular actin ซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม (globular) และมีขนาด 43 กิโลดาลตัน (ภาพที่ 3) จี - แอกติน ต่อเรียงตัวเป็นสายยาวประมาณ 500-600 หน่วย เกิดเป็นเส้นใย เรียกว่า เอฟ - แอกติน (F-actin) หรือ fibrous actin ซึ่งจะพันเป็นเกลียวในลักษณะแอลฟาฮีลิกซ์ (ภาพที่ 4) การเชื่อมต่อกันของ จี - แอกตินจนเป็น เอฟ - แอกติน นั้นจำเป็นจะต้องมีสภาวะที่เหมาะสม การศึกษาในหลอดทดลองพบว่า จี - แอกติน จะเชื่อมโยงเป็นสายยาว (polymerization) เป็น เอฟ - แอกติน เมื่ออยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (KCl) และแมกนีเซียมคลอไรด์ ( $MgCl_2$ ) เข้มข้น 20-100 มิลลิโมลาร์ และ 0.5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ โดยพบว่าประจุของเกลือแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) หรือแมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) มีส่วนช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยงดังกล่าว จากภาพที่ 3 จะเห็นว่า จี - แอกตินประกอบด้วย 4 โดเมน (domain) คือโดเมน 1, 2, 3 และ 4 และมีบริเวณที่สามารถจับกับ ATP ซึ่งมีลักษณะเป็นแฉ่ง (cleft) อยู่ระหว่างโดเมน 2 และ 4 (จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล 2549)



ภาพที่ 3 ภาพวาดโครงสร้างจี-แอกติน ตัวเลขแสดงโดเมน  
ที่มา: Anonymous (2008)

โทรโปไมโอซิน ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย (ภาพที่ 4) ซึ่งพันกันเป็นเกลียวในลักษณะของแอลฟาฮีลิกซ์พอลิเปปไทด์แต่ละสายมีขนาดประมาณ 35,000-37,000 ดาลตัน โทรโปไมโอซินจะวางตัวอยู่บนแนวร่องของแอกตินในฟิลาเมนต์บาง (Thin filament) โดย 1 หน่วยของโทรโปไมโอซินจะวางตามแนวของจี-แอกติน 7 โมเลกุล และโทรโปไมโอซินเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ยึดกับโทรโปนิน ที่ ซึ่งองค์ประกอบที่เกิดขึ้นเป็นปัจจัยทำให้เกิดการคลายตัว (Relaxing factor) ของกล้ามเนื้อ (Alais and Linden, 1991; Sikorski, and Kotakowska, 1994)

โทรโปนิน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ส่วน (ภาพที่ 4) คือ โทรโปนิน หน่วยย่อย ซี (troponin-C) ทำหน้าที่ในการจับ(bind)  $Ca^{2+}$  ขณะการยึดหดตัวของกล้ามเนื้อ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17,000-18,000 ดาลตัน โทรโปนิน หน่วยย่อย ไอ (troponin-I) มีบทบาทยับยั้งการจับตัวรวมกันระหว่างแอกตินกับไมโอซิน ซึ่งมีผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอสของแอกโตไมโอซิน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 20,000-24,000 ดาลตัน และโทรโปนิน หน่วยย่อย ที (troponin-T) เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างโทรโปไมโอซินกับแอกติน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 37,000-40,000 ดาลตัน (Alais and Linden 1991; Sikorski and Kotakowska 1994)



ภาพที่ 4 ภาพวาดแสดงการจัดเรียงตัวของแอฟ-แอกติน โทรโปไมโอซินและโทรโปนิน  
ที่มา: Young (2008)

โปรตีนไมโอซินจากสัตว์น้ำมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนของกล้ามเนื้อสัตว์อื่น ๆ การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินจากปลาจึงพบว่าจะเกิดขึ้นได้อย่างช้า ๆ แม้ว่า จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ระดับความคงตัวต่อความร้อนของโปรตีนไมโอซินยังแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาและชนิดของกล้ามเนื้อ โดยปลาที่จับได้จากเขตที่มีอุณหภูมิต่ำโปรตีนจะมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในปลาที่จับได้จากเขตร้อน (Hashimoto and others 1982; Rodgers and others 1987; Jimenez-Colmenero and others 1994) และโปรตีนที่ได้จากกล้ามเนื้อท้องจะมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำกว่าโปรตีนในกล้ามเนื้อสัน Lin and Wang (1998) และ Ogawa and others (1994) แสดงให้เห็นว่าการที่โปรตีนไมโอซินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำนั้นเป็นผลมาจากการทนต่อความร้อนได้ต่ำของส่วน S-1 และ LMM Torigai and Konno (1996 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) รายงานว่าทั้งนี้โปรตีนไมโอซินที่จับอยู่กับแอกตินในรูปของโปรตีนแอกโตไมโอซินนั้นมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปอิสระ โดยเป็นผลจากการที่โปรตีนทั้งสองต่างช่วยเพิ่มความคงตัวให้แก่กันและกัน โดยโปรตีนแอกตินซึ่งมีความคงตัวต่อความร้อนสูงกว่าโปรตีนไมโอซินจะช่วยเพิ่มความคงตัวต่อความร้อนให้แก่โปรตีนไมโอซินในขณะที่โปรตีนไมโอซินซึ่งละลายได้ในสารละลายเกลือและทนต่อเกลือได้สูงกว่าโปรตีนแอกตินจะป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนแอกตินจากสารละลายเกลือ ซึ่งความเข้าใจต่อความคงตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์นี้สามารถนำไปใช้เตรียมเจลของโปรตีนได้ เช่น Park and Lanier (1989 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) รายงานว่าการใช้เกลือเพื่อทำให้โปรตีนแอกโตไมโอซินแยกตัวเป็นโมเลกุลอิสระ และเมื่อโปรตีนไมโอซินที่แยกออกจากแอกตินมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำก็จะสามารถเตรียมเจลได้ที่อุณหภูมิ ต่ำลง

## 2.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic proteins)

โปรตีนซาร์โคพลาสมิกเป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นทรงกลม (globular proteins) มีคุณสมบัติละลายได้ในน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความแรงของออสโมต่ำกว่า 0.15 ดีไบน์ มีคุณสมบัติในการเกิดเจลด้วยความร้อนต่ำ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ประมาณร้อยละ 20-25 ของโปรตีนทั้งหมด ส่วนใหญ่จะอยู่ในกล้ามเนื้อแดง (red or dark muscle) ประกอบไปด้วยโปรตีนอัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) ไมโอโกลบิน (myoglobin) และเอนไซม์ (enzyme)

## 2.3 โปรตีนสโตรมา หรือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (stroma or connective tissue proteins)

โปรตีนสโตรมาเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายในน้ำหรือสารละลายเกลือ ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีอยู่ ร้อยละ 3-5 ของโปรตีนทั้งหมด ไม่มีคุณสมบัติในการเกิดเจล มีคอลลาเจน (collagen) เป็น

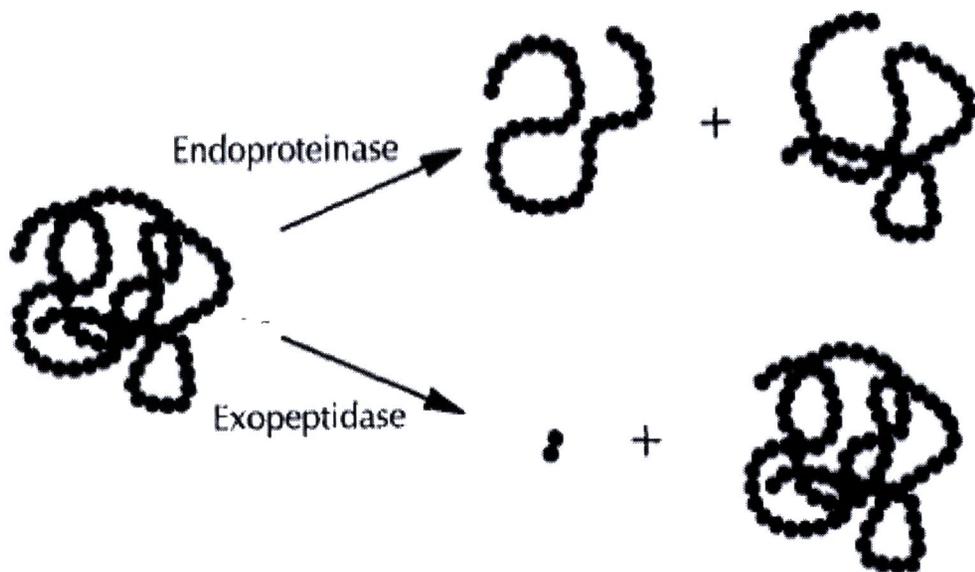
องค์ประกอบหลัก เมื่อให้ความร้อนแก่คอลลาเจนจะทำให้คอลลาเจนละลายไปเป็นเจลาติน (gelatin) และอาจเข้าไปแทรกแซงการเกิดเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ แต่ในกล้ามเนื้อปลามีโปรตีนสโตรมาน้อยมากเมื่อเทียบกับปริมาณโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ดังนั้นจึงมีผลน้อยมากต่อความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์

### 3. เอนไซม์โปรตีเนส (Proteinase)

กล้ามเนื้อของสัตว์น้ำประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดโปรตีเนส (proteinase) หรือโปรตีเอส (protease) คือกลุ่มเอนไซม์ไฮโดรเลส (hydrolase) ซึ่งสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของสายโปรตีน เอนไซม์เหล่านี้มีผลโดยตรงต่อคุณภาพสัตว์น้ำหลังการตาย กิจกรรมของเอนไซม์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ชนิดของสัตว์น้ำ วงจรชีวิตและอาหาร เอนไซม์โปรตีเนสสามารถพบได้ในของเหลวภายในเซลล์หรือจับอยู่กับเซลล์ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

#### 3.1 การแบ่งประเภทของเอนไซม์โปรตีเนส (จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล 2549)

3.1.1 การแบ่งประเภทของเอนไซม์โปรตีเนสตามตำแหน่งการเกิดไฮโดรไลซิสของพันธะเปปไทด์ แบ่งได้ 2 ประเภท (ภาพที่ 5) คือ



ภาพที่ 5 ภาพแสดงผลของเอนโดเปปติเดสและเอกโซเปปติเดสต่อโครงสร้างของโปรตีน  
ที่มา : An and others (1996)

3.1.1.1 เอนโดเปปติเดส (Endopeptidases, EC 3.4.21-99) คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์ซึ่งอยู่ภายในสายโมเลกุลของโปรตีน

3.1.1.2 เอกโซเปปติเดส (Exopeptidases, EC 3.4.11-19) คือ เอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์โดยอาจไฮโดรไลซ์พันธะเปปไทด์ที่อยู่ปลายสายด้านอะมิโน (N-terminal) หรือปลายสายด้านคาร์บอกซิล (C-terminal) ของสายโปรตีน ซึ่งแบ่งออกเป็น อะมิโนเปปติเดส (Aminopeptidase, EC 3.4.11) คือ เอนไซม์ซึ่งสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายด้านอะมิโน (N-terminus) และคาร์บอกซิเปปติเดส (Carboxypeptidase, EC 3.4.16-18) คือ เอนไซม์ซึ่งสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายด้านคาร์บอกซิลของโปรตีน (C-terminus) โดยกลุ่มคาร์บอกซิล ของโปรตีนนั้นมีความสำคัญต่อการเข้าจับของเอนไซม์

3.1.2 การแบ่งประเภทของเอนไซม์โปรตีนเอนตามชนิดของโซ่ข้างที่บริเวณเร่ง แบ่งได้ 4 ประเภท คือ

### 3.1.2.1 ซีรีนโปรตีนเนส (Serine proteinase)

คือเอนไซม์กลุ่มซึ่งมีกรดอะมิโนซีรีน (Serine; Ser) ที่บริเวณเร่ง ตัวอย่างเอนไซม์กลุ่มนี้คือ ไคโมทริปซินชนิดต่างๆ เช่น อัลฟา-( $\alpha$ ) เดลตา-( $\delta$ ) และพาย-( $\pi$ ) ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) เอนไซม์ทรอมบิน (thrombin) สับทิลิซิน (subtilisin) ทริปซิน (trypsin) และอีลาสเทส (elastase) โดยโปรตีนชนิดนี้ที่ถูกกระตุ้นโดยความร้อนเป็นสาเหตุสำคัญในการก่อให้เกิดโมดิริในปลาบางประเภท บางครั้งจึงมีการเรียกเอนไซม์กลุ่มนี้ว่า โปรตีนเนสที่เร่งการเกิดโมดิริ (modori - inducing proteinase ; MIP<sub>s</sub>) โดยสามารถแบ่งได้เป็น 4 ประเภทตามวิธีสกัดและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานดังนี้

- MIP ชนิดซาร์โคพลาสมิก ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (sarcolemmic 50 °C MIP; Sp-50-MIP)
- MIP ชนิดซาร์โคพลาสมิก ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (sarcolemmic 60 °C MIP; Sp-60-MIP)
- MIP ชนิดที่จับกับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (myofibrillar - associated 50 °C MIP ; Mf-50-MIP)
- MIP ชนิดที่จับกับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ซึ่งทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (myofibrillar - associated 60 °C MIP ; Mf-60-MIP)

ซีรีนโปรตีนเนสที่สำคัญได้แก่

1) ทริปซิน (Trypsin) เป็นเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารสามารถสกัดได้จากตับอ่อน (pancreas) ของสุกรและวัว มีขนาดโมเลกุลประมาณ 24 กิโลดาลตัน



และ pI ประมาณ 10.1 ช่วง pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (optimum pH) ของเอนไซม์ทริปซิน อยู่ในช่วง 7-9 ปัญหาของทริปซินคือ เอนไซม์ย่อยตัวเองได้ง่าย โดยเฉพาะเมื่อไม่มีสารตั้งต้น ซึ่งเป็นปัญหาต่อเสถียรภาพของเอนไซม์ จากการศึกษาพบว่า  $Ca^{2+}$  มีผลในการเพิ่มความคงตัวของเอนไซม์และช่วยลดการย่อยสลายตัวเอง มีการใช้ทริปซินในการผลิตไฮโดรไลเซทจากโปรตีนเวย์ ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ดีขึ้น

2) สับทิลิน (subtilisin) คือกลุ่มเอนไซม์ซีรีนโปรตีนเอสที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. เอนไซม์ที่รู้จักและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลายคือ อัลคาเลส (Alcalase) ซึ่งผลิตจาก *Bacillus licheniformis* เป็นเอนไซม์ที่มีขนาด 27 กิโลดาลตัน และ pI ประมาณ 9.4 สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วง pH 8-9 และอุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส เอนไซม์สามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ที่โซ่ข้างเป็นกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก การยับยั้งเอนไซม์สามารถทำได้โดยปรับ pH เป็น 4 ในสภาพที่เป็นกรดเอนไซม์เปิดตัวออก (unfold) และเกิดการย่อยสลายตัวเองขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งด้วยความร้อน

### 3.1.2.2 ซิสเตอีนโปรตีนเอส (Thiol หรือ Cysteine proteinases)

คือเอนไซม์กลุ่มที่มีซิสเตอีนที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ที่รู้จักในกลุ่มนี้คือ พาเพน (papain, EC 3.4.22.3) ฟิซิน (ficin, EC 3.4.22.3) และโบรมีเลน (bromelain, EC 3.4.22.4) ซึ่งเป็นเอนไซม์จากมะละกอ ผลมะเดื่อ (fig) และสับปะรด ตามลำดับ พาเพน เป็นเอนไซม์ที่ได้รับการศึกษากันอย่างแพร่หลาย มีขนาดโมเลกุล 21 กิโลดาลตัน และ pI ประมาณ 8.8 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 212 ตัว ส่วนโบรมีเลนมีขนาดโมเลกุล 33 กิโลดาลตันและฟิซินมีขนาดโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน นอกจากนี้เอนไซม์ซึ่งผลิตจาก *Streptococcus* spp. ก็จัดเป็นโปรตีนเอสชนิดซิสเตอีน เอนไซม์กลุ่มนี้สามารถทำงานได้ที่ pH ในช่วง 6-7.5 และในสภาวะที่เป็นกลางสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 60-80 องศาเซลเซียส สารที่มีผลทำให้เกิดการออกซิไดซ์ของกลุ่ม SH เป็น S-S มีผลยับยั้งเอนไซม์นี้

### 3.1.2.3 แอสพาร์ติกโปรตีนเอส (Aspartic proteinases, acid proteinases)

คือกลุ่มเอนไซม์ที่มีกรดแอสพาร์ติก (Asp) 2 โมเลกุลที่บริเวณเร่ง เอนไซม์กลุ่มนี้ทำงานได้ดีที่ pH ประมาณ 2-4 ดังนั้นจึงเป็นที่รู้จักในอีกชื่อหนึ่งว่า “acid proteinase” สำหรับโปรตีนเอสชนิดแอสพาร์ติกนั้นส่วนใหญ่พบในอวัยวะภายในและสามารถทำงานได้ดีในช่วง pH เป็นกรด เช่น เปปซิน อย่างไรก็ตาม คาเธปซิน ดี ซึ่งเป็นเอนไซม์โปรตีนเอสชนิดแอสพาร์ติกสามารถพบในกล้ามเนื้อ ตัวอย่างของเอนไซม์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารคือ ไคโมซิน (chymosin) เปปซิน (pepsin) และเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Endothal parasitica*, *Mucor pusillus* และ *Mucor miehei*

1) เปปซิน (Pepsin) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตันและ pI อยู่ในช่วง 2-3 เป็นเอนไซม์ที่ได้จากกระเพาะสัตว์ โดยเอนไซม์ในรูปแบบที่ไม่แสดงกิจกรรม คือ เปปซิโนเจน (pepsinogen) เอนไซม์เปปซินสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ pH 2 และสามารถทน

ห้องสมุดบีไอที  
วันที่..... 26 S.H. 2555 .....

เลขทะเบียน.....	203390.....
เลขเรียกหนังสือ.....	

ความร้อนได้สูงถึง 60 องศาเซลเซียส เมื่อ pH สูงขึ้น ความคงตัวของเอนไซม์จะลดลงและเกิดการย่อยสลายตัวเอง ในทางการค้ามักผสมเปปซินกับโคโมซินเพื่อใช้ในการเตรียมเรนเนท ซึ่งเป็นเอนไซม์ในการผลิตเนยแข็ง

2) โคโมซิน คือเอนไซม์ในกระเพาะอาหารของลูกวัวซึ่งเกิดการไฮโดรไลซิสของโปรโคโมซิน (prochymosin) โคโมซินมีขนาดโมเลกุลประมาณ 35 กิโลดาลตัน แสดงกิจกรรมสูงสุดที่ pH 3.5 และสูญเสียสภาพธรรมชาติที่ pH สูงกว่า 6 โคโมซินเป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อรา *Mucor pusillus* และ *Mucor miehei* ซึ่งมีขนาดโมเลกุล 38 กิโลดาลตันและ 30 กิโลดาลตัน ตามลำดับโดยเอนไซม์จากเชื้อราทั้งสองมีกิจกรรมสูงสุดที่ pH 4

#### 3.1.2.4 เมทาโลโปรตีนเอส (Metallo proteinases)

เอนไซม์กลุ่มนี้จำเป็นต้องใช้ออนในการเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์คาร์บอกซีเปปติเดส-เอ และ บี (carboxypeptidase A and B) มี  $Zn^{2+}$  ที่บริเวณเร่งและจัดเป็นเอกโซเปปติเดส ในขณะที่โปรลิเดส (prolidase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของไดเปปไทด์ที่มีโพรลีน (Pro) หรือไฮ-ดรอกซีโพรลีน (hydroxyPro) อยู่ปลายสายคาร์บอกซิล เอนไซม์อิมิโนเปปติเดส (iminopeptidase) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ของไดเปปไทด์ซึ่งมี Pro หรือ hydroxyPro อยู่ปลายสายด้านกลุ่มอะมิโน (N-terminal) ทั้งเอนไซม์โปรลิเดสและอิมิโนเปปติเดส มี  $Mn^{2+}$  อยู่ที่บริเวณเร่ง นอกจากนี้เทอร์โมไลซิน (thermolysin) ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียและคอลลาจีเนส (collagenase) ซึ่งเป็นโปรตีนเอสที่ย่อยสลายคอลลาเจน ก็จัดอยู่ในกลุ่มเมทาโลโปรตีนเอส

1) โพรคาร์บอกซีเปปติเดส-เอและบี (procarboxypeptidase A and B) จัดเป็นเอกโซเปปติเดสที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากปลายสายคาร์บอกซิล pH ที่เหมาะสมสำหรับเอนไซม์ทั้ง 2 คือ 7.8 แต่ต่างกันตรงที่กรดอะมิโนที่ปลายสายคาร์บอกซิลของสารตั้งต้นสำหรับคาร์บอกซีเปปติเดส-บี จะต้องเป็น Arg หรือ Lys ในขณะที่คาร์บอกซีเปปติเดส-เอ จะต้องไม่ใช่ Arg Lys หรือ Pro

2) เทอร์โมไลซิน (thermolysin) เป็นเมทาโลโปรตีนเอส ซึ่งผลิตได้จาก *Bacillus stearothermophilus* มีขนาดประมาณ 34 กิโลดาลตัน มี pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาในช่วง 7-9 เอนไซม์ถูกยับยั้งโดย chelating agent เช่น อีดีทีเอ (EDTA) ซิเตรต และ ฟอสเฟต เมทาโลโปรตีนเอสในทางการค้าอีกชนิดหนึ่งคือ นิวเทรส (neutrase) มีขนาดประมาณ 37 กิโลดาลตัน ซึ่งผลิตจาก *Bacillus amyloliquefaciens* โดยเอนไซม์ชนิดนี้มี pH ที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมในช่วง pH 6-8 สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ในอุณหภูมิไม่สูงเกินกว่า 50 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงถูกยับยั้งได้ด้วยความร้อน

#### 3.2 โปรตีนเอสในกล้ามเนื้อปลา (Shahidi and Kamil 2002)

ปริมาณเอนไซม์โปรตีนเอสจะแปรผันตามฤดูกาล โดยทั่วไปปริมาณเอนไซม์โปรตีนเอสจะสูงในช่วงฤดูวางไข่ โปรตีนเอสในกล้ามเนื้อปลาอาจสามารถจำแนกเป็น ไลโซโซมอลโปรตีนเอส

(lysosomal proteinases) อัลคาไลน์โปรตีนเนส (alkaline proteinases) นิวทรอลโปรตีนเนส (neutral proteinases) และ เมทาโลโปรตีนเนส (metallo proteinases)

3.2.1 โลโซโซมอลโปรตีนเนส คือเอนไซม์ที่พบในโลโซโซม ได้แก่ คาเธปซิน เอ (cathepsin A หรือ carboxypeptidase A) คาเธปซิน บี (cathepsin B หรือ carboxypeptidase B) คาเธปซิน ดี เอช และ แอล (cathepsin D, H and L) มีการพบและจำแนกคุณลักษณะในปลาและสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง หลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2 เอนไซม์กลุ่มนี้ยกเว้น คาเธปซิน ดี เป็นเอนไซม์โปรตีนเนสชนิดซีรีน หรือ ซิสเตอีน ซึ่งทำงานได้ดีในช่วง pH ช่วงต่าง ส่วน คาเธปซิน ดี เป็นแอสพาร์ติกโปรตีนเนสเกิดกิจกรรมได้ดีที่ pH ช่วงกรด มีรายงานว่ากล้ามเนื้อปลามีเอนไซม์คาเธปซิน ดี สูงกว่าในกล้ามเนื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถึง 10 เท่า แต่เอนไซม์เหล่านี้เกิดกิจกรรมได้ดีที่อุณหภูมิต่ำของแหล่งน้ำที่อาศัย (habitat temperature) เชื่อกันว่า คาเธปซิน ดี เป็นเอนไซม์โลโซโซมอลโปรตีนเนสที่สำคัญในการย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อ แต่คาเธปซิน บี เอช และ แอล ก็เกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนเช่นกัน

3.2.2 อัลคาไลน์โปรตีนเนส คือเอนไซม์ที่พบในซาร์โคพลาสซึม (sarcooplasm) ไมโครพลาสซึม (microsomal fraction) หรือจับอยู่กับไมโอไฟบริลล์ในกล้ามเนื้อ ลักษณะพิเศษของเอนไซม์กลุ่มนี้คือ ไม่แสดงกิจกรรมหรือเกิดขึ้นน้อยมาก ยกเว้นการวิเคราะห์โดยใช้อุณหภูมิสูง 60-65 องศาเซลเซียส หรือการกระตุ้นกิจกรรมด้วยสารทำให้โปรตีนเสียสภาพ (denaturing agent) เช่น ยูเรีย กรดไขมัน หรือ ดีเทอร์เจนต์ (detergents)

อัลคาไลน์โปรตีนเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายไมโอซินสายหนักในเจลปลาหรือเจลจากซูริมิ ในกลุ่มของโปรตีนเนสที่พบในกล้ามเนื้อ เอนโดโปรตีนเนสชนิดซิสเตอีนมีผลต่อคุณภาพด้านเนื้อสัมผัสมากที่สุด เนื่องจากทนความร้อนและสามารถย่อยสลายพันธะเปปไทด์ภายในโมเลกุลได้ เช่น คาเธปซิน แอล มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของเจลจากซูริมิในระหว่างการให้ความร้อน (โมโดริ (modori)) เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนโดยเฉพาะซีรีนโปรตีนเนส นอกจากนี้ยังพบนิวทรอลโปรตีนเนสที่สามารถย่อยสลายไมโอซินสายหนัก เรียกว่า “Modori-inducing proteinases” ในกลุ่มของนิวทรอล เมทาโลโปรตีนเนส

3.2.3 นิวทรอลโปรตีนเนส ในกล้ามเนื้อปลา มักพบสถานะที่เกิดการย่อยสลายตัวเองได้ดีที่หนึ่งหรือสองสถานะ คือ ภายใตสภาวะกรด และ/หรือต่าง อย่างไรก็ตาม pH ที่เหมาะสมที่พบในเนื้อปลา และสัตว์น้ำมีเปลือก (shellfish) ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง pH 6-7 มีเอนไซม์หลายชนิด เช่น คาลเพน (calpains) และ โปรตีนเนสที่เร่งการเกิดโมโดริ (MIP) ที่เกิดกิจกรรมได้ดีที่ pH เป็นกลาง เอนไซม์เหล่านี้จึงจัดอยู่ในกลุ่มนิวทรอลโปรตีนเนส เช่น คาลเพน เป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ -activated proteinases) เอนไซม์กลุ่มนี้ย่อยสลาย Z-disk จึงปลดปล่อยกล้ามเนื้อชนิดเส้นใยหนาและบาง (thick and thin filaments) ออกจากกัน

ผลการศึกษาของ Godiksen and others (2009) พบว่า ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของแถบโปรตีนอัลฟา-แอคตินิน ( $\alpha$ -actinin) และความแน่นเนื้อของปลาเทร้าแล้ว

(trout fillet) โปรตีนอัลฟา-แอคตินิน เป็นโปรตีนที่สำคัญใน Z-disk ซึ่งเชื่อมระหว่างซาร์โคเมียร์ในเส้นใยกล้ามเนื้อและถูกย่อยสลายได้ด้วยคาลเพน รวมทั้งคาเธปซิน บี แอล และ ดี

ตารางที่ 2 เอนไซม์โปรตีนในกล้ามเนื้อปลาและสัตว์น้ำไม่มีกระดูกสันหลัง

กลุ่มของเอนไซม์	ประเภทเอนไซม์	เอนไซม์	แหล่งที่พบ	อ้างอิง
ไลโซโซมอลโปรตีน	ซิสเตอีนโปรตีน	คาเธปซิน เอ	Carp	Toyohara and others (1982)
	ซิสเตอีนโปรตีน	คาเธปซิน บี	Tilapia	Sherekar and others (1988)
	ซิสเตอีนโปรตีน	คาเธปซิน เอช	Chum salmon	Yamashita and Konagaya (1990)
	ซิสเตอีนโปรตีน	คาเธปซิน แอล	Surimi wash water	Benjakul and others (1996, 1997)
	ซิสเตอีนโปรตีน	คาเธปซิน ซี	Squid	Hameed and Haard (1985)
	แอสพาร์ติกโปรตีน	คาเธปซิน ดี	Atlantic icefish	Capasso and others (1999)
อัลคาไลน์โปรตีน	ซีรีนโปรตีน	Multicatalytic proteinases	White croaker	Toyohara and others (1987)
			Chum salmon	Toyohara and others (1987)
นิวทรอลโปรตีน	ซิสเตอีนโปรตีน	Calcium-dependent proteinases (calpains)	Tilapia	Jiang and others (1991)
	เมทาโลโปรตีน	Neutral Metalloproteinases (Modori-inducing proteinases)	Crucian carp	Kinoshita and others (1990)
อัลคาไลน์เมทาโลโปรตีน	เมทาโลโปรตีน	Muscle collagenases	Squid mantle muscle	Okamoto and others (1993)
			Pacific rockfish	Bracho and Haard (1995)

ที่มา: Shahidi and Kamil (2002)

3.2.4 เมทาโลโปรตีนเนส เอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase or interstitial collagenase) อยู่ในกลุ่มของ matrix metallo proteinases ซึ่งแตกต่างจากคอลลาจีเนสที่พบในลำไส้ที่อยู่ในกลุ่มซีรีนโปรตีนเนส เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายคอลลาเจนบางส่วนและโปรตีนแมทริกซ์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ ดังนั้นจึงมีบทบาทสำคัญต่อการสูญเสียการรวมตัวของกล้ามเนื้อ มีงานวิจัยพบว่า เมทาโลโปรตีนเนสจากกล้ามเนื้อของ Squid mantle ประกอบด้วย คอลลาจีเนส 2 ชนิด คือ mayosinase I และ mayosinase II ซึ่งมีสภาวะการทำงานที่เหมาะสมที่ pH 7.0 และ 40 องศาเซลเซียส

### 3.3 ผลของโปรตีนเนสต่อคุณภาพเจลซูริมิ

ความแข็งแรงเจลของซูริมิขึ้นกับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ดังนั้นปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อโครงสร้างของไมโอซินจึงมีบทบาทโดยตรงต่อคุณภาพของเจล สมบัติของเจลของไมโอซินจะสัมพันธ์โดยตรงกับความยาวส่วนหางของไมโอซินส่งผลให้การจัดเรียงตัวของโปรตีนในการเกิดเจลลดลง รูปแบบธรรมชาติของไมโอซินจึงมีความจำเป็นและสำคัญต่อการเกิดเจล

ดังนั้นเอนไซม์โปรตีนเนสในกล้ามเนื้อของปลาจึงมีผลเสียต่อการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อ การย่อยสลายหรือทำลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ ดังภาพที่ 5 โดยเอนไซม์โปรตีนเนสจะมีผลยับยั้งการเกิดโครงข่ายสามมิติของเจลในระหว่างการให้ความร้อน Nishimoto and others (1987 อ้างถึงใน สุทธิวัฒน์ เบญจกุล 2549) รายงานว่าเมื่อความสามารถในการเชื่อมประสานของ MHC เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเกิดเจลของกล้ามเนื้อปลาสดที่ผ่านการเติมเกลือจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ชนิดของกล้ามเนื้อ โดยพบว่ากล้ามเนื้อสีดามีปริมาณเอนไซม์สูงกว่ากล้ามเนื้อสีขาว และยังพบว่าปลาเทศเมียมมีเอนไซม์โปรตีนเนสในปริมาณสูง (สุทธิวัฒน์ เบญจกุล 2549)

ในระหว่างการขนส่งหรือเก็บรักษาปลา อาจมีการย่อยสลายของโปรตีนโดยการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเนส โดย Benjakul and others (1997) รายงานว่า โปรตีนชนิดไมโอซินสายหนักในปลาแปซิฟิกไวต์ถูกย่อยสลายประมาณร้อยละ 45 ภายใน 8 วัน ของการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ดังนั้นการย่อยสลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ โดยเอนไซม์คาเทปซินและอัลคาไลน์โปรตีนเนสสามารถเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าอัตราการย่อยสลายจะต่ำ

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องผลิตซูริมิโดยเร็วที่สุด เพื่อป้องกันการย่อยสลายโปรตีนโดยเอนไซม์ใน เนื้อปลา นอกจากนี้มีการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเนสเพื่อลดปัญหาการย่อยสลายตัวเองในระหว่าง การให้ความร้อนในกระบวนการเกิดเจล

ตารางที่ 3 สภาวะที่เหมาะสมและการย่อยของโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ

ประเภท เอนไซม์	เอนไซม์	pH ที่ เหมาะสม	อุณหภูมิที่ เหมาะสม	ผลของเอนไซม์ต่อ โปรตีนกล้ามเนื้อ
Cysteine proteinase	Calcium-activated proteinase	6.9-7.5	30	ย่อยสลายโปรตีน โมโอไฟบริลลาร์ให้เป็น TCA Soluble fragment
	Cathepsin L	5.0-5.6	40-50	ย่อยสลายโปรตีน โมโอไฟบริลลาร์ ส่วนใหญ่ ย่อยสลาย telopeptin จาก คอลลาเจน ชนิด ไอ ย่อยสลายไมโอซิน แอกติน นีบูลิน และ โทรโปนิน
	Cathepsin B	5.7-6.0		
	Cathepsin C	6.0-6.5		
Heat-activated cysteine proteinase	6.0-8.5	55-65	ย่อยสลายไมโอซิน	
Serine proteinase	Heat-activated trypsin-like proteinase	6.2-8.0	50-60	ย่อยสลายไมโอซิน
	Multicatalytic proteinase	6.0-10.0	60-65	ย่อยสลายไมโอซิน
	Other trypsin-like proteinase	8.0-9.0	37-40	ย่อยสลายไมโอซิน และ ส่วนเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งมี ผลต่อโมโอไฟบริลลาร์
Metallo proteinase	Neutral proteinase	7.2	40	ย่อยสลายคอลลาเจน ชนิด ไอ เจลาติน และเนื้อเยื่อ ตามโครงสร้าง
	Heat stable alkaline proteinase	7.0-8.0	50	
	Myosinase I and II	7.0	40	ย่อยสลายไมโอซิน

ที่มา: ดัดแปลงจาก Kolodziejaska and Sikorski (1996 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

### 3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โปรตีนเอส

#### 3.4.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลทั้งต่อความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาและความเสถียรของเอนไซม์ อัตราการเกิดปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์ในระบบ จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาจเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติของเอนไซม์ ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่บริเวณเร่ง ดังนั้นจึงมีการใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้อุณหภูมิสูงเพื่อเร่งปฏิกิริยา



ในปฏิกิริยาต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม เอนไซม์เป็นโปรตีนจึงมีข้อจำกัดในการใช้ที่อุณหภูมิที่สูงเกินไป เพราะจะทำให้เอนไซม์เสียสภาพธรรมชาติอย่างถาวร (สุกัญญา สุนทรสและ วิเชียร ริมพณิชยกิจ 2547, นิธิยา รัตนานนท์ 2549)

### 3.4.2 ความเป็นกรด - ต่าง (pH)

ที่ pH ที่ต่างกัน เอนไซม์ชนิดหนึ่ง ๆ จะทำงานได้ดีไม่เท่ากัน แต่จะมีช่วง pH หนึ่งที่เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่สุด เรียกช่วง pH นี้ว่า pH ที่เหมาะสมที่สุด (optimum pH) (สุกัญญา สุนทรสและ วิเชียร ริมพณิชยกิจ 2547) สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เอนไซม์แต่ละชนิดมี pH ที่เหมาะสมที่สุดแตกต่างกัน คือ ที่บริเวณผิวของโมเลกุลของเอนไซม์จะประกอบด้วยหมู่ที่เป็นกรดและหมู่ที่เป็นเบสจำนวนมาก ประจุที่อยู่บนพื้นผิวของเอนไซม์มีความหลากหลายและเปลี่ยนแปลงได้เมื่อระบบมีความเป็นกรดเปลี่ยนไป ซึ่งมีผลต่อประจุรวมของเอนไซม์และความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาของหมู่ที่เข้าทำปฏิกิริยา และเมื่อ pH ของระบบเปลี่ยนไป จะมีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างและความสามารถในการละลายของเอนไซม์ โดยเอนไซม์แต่ละตัวมีค่าความเป็นกรด - ต่างเฉพาะตัวที่ทำให้ผลรวมของประจุมูลค่าเป็นศูนย์ซึ่งเรียกค่า pH ค่านี้ว่า pI ซึ่ง ณ จุดนี้ เอนไซม์จะละลายได้น้อยที่สุด (นิธิยา รัตนานนท์ 2549)

### 3.4.3 สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส

สารยับยั้งเอนไซม์เป็นสารบางชนิดที่เข้าไปขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ปฏิกิริยาไม่เกิดขึ้น หยุดชะงักหรือ มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาลดลง (ปราณี อ่านเปรื่อง 2547) การยับยั้งเอนไซม์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

3.4.3.1. สารยับยั้งแบบไม่ทวนกลับ (irreversible inhibitor) สารประเภทนี้จะจับกับเอนไซม์อย่างถาวรด้วยพันธะโคเวเลนต์ (Covalent bond) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ และเอนไซม์ก็ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ ทำให้เอนไซม์ชนิดนั้นสูญเสียสมบัติในการเป็นเอนไซม์ไป

3.4.3.2. สารยับยั้งแบบทวนกลับ (reversible inhibitor) สารยับยั้งแบบทวนกลับแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด

(1) การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) สารยับยั้งชนิดนี้มีรูปร่างคล้ายกับซับสเตรตทำให้สามารถแย่งจับกับเอนไซม์ได้ ดังนั้นถ้าหากมีสารยับยั้งชนิดนี้มาก ๆ จะมีผลให้ซับสเตรตจับกับเอนไซม์ได้น้อยลง ทำให้ปฏิกิริยาช้าลงหรือหยุดชะงักได้ในทำนองเดียวกัน ถ้าหากมีซับสเตรตมากและมีสารยับยั้งน้อยก็จะมีผลต่อปฏิกิริยาน้อยมาก เนื่องจากซับสเตรตแย่งจับกับเอนไซม์ได้มากกว่าไม่มีเอนไซม์อิสระมาจับกับสารยับยั้ง

(2) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) สารยับยั้งชนิดนี้จะจับกับเอนไซม์ได้เป็นสารเชิงซ้อนของเอนไซม์และสารยับยั้ง (enzyme-inhibitor, EI complex) หรือทั้งสารยับยั้งและซับสเตรตจับกับเอนไซม์โมเลกุลเดียวกันได้เกิดเป็น สารเชิงซ้อน

ของเอนไซม์- ซับสเตรต- สารยับยั้ง (enzyme - substrate - inhibitor complex, ESI complex) ทำให้ไม่สามารถทำปฏิกิริยาต่อไปได้หรือทำให้ช้าลงมาก

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีน

ชนิดของเอนไซม์โปรตีน	ลักษณะการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีน	ตัวอย่างสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีน
เอนไซม์โปรตีนชนิดซิสเตอีน	ถูกยับยั้งด้วย sulfhydryl reagents ซึ่งจะทำให้หมู่อนุมูล sulfhydryl ที่บริเวณเร่งได้รับการรบกวนจนสูญเสียแอกติวิตี้ไปในที่สุด <sup>4</sup>	E-64 <sup>1,3</sup> , iodoacetic acid <sup>2</sup>
เอนไซม์โปรตีนชนิดซีรีน	ถูกยับยั้งด้วยสารที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH <sup>-</sup> ) ของอนุมูลหมู่ซีรีลที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ <sup>4</sup>	Soybean trypsin inhibitor <sup>2,3</sup> , leupeptin <sup>2</sup>
เอนไซม์โปรตีนชนิดแอสปาติก	เอนไซม์โปรตีนชนิดแอสปาติก ทุกชนิดถูกยับยั้งโดยสาร pepstatin โดยหมู่ไฮดรอกซิล (OH <sup>-</sup> ) ของ pepstatine เข้าไปจับกับส่วนเร่งของอนุมูลกรดแอสปาติกทั้งสองส่วน <sup>5</sup>	pepstatin A <sup>2,3,5</sup>
เอนไซม์โปรตีนชนิดเมทาโล	ถูกยับยั้งด้วยสารที่มีความสามารถในการจับกับไอออนของโลหะ (metal chelating agents) <sup>4</sup>	EDTA <sup>2,3</sup>

ที่มา: Hu and others (2007)<sup>1</sup>; Klomklao and others (2008<sup>2</sup>, 2009<sup>3</sup>); ปราณี อานเป็รื่อง (2547)<sup>4</sup>; (Marciniszyn and others 1976a, b อ้างถึงใน Chitpinyol and Crabbe 1998)<sup>5</sup>

วัตถุประสงค์ในการใช้สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งใช้เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีนเอสในผลิตภัณฑ์ เช่น ผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาที่มีลักษณะเป็นเจล เมื่อให้ความร้อนในช่วง 50 – 60 องศาเซลเซียส จะเกิดปรากฏการณ์ของเจลโมดิฟิเคชันเนื่องจากเอนไซม์โปรตีนเอสในกล้ามเนื้อปลาที่ใช้สำหรับผลิตซูริมิเข้าย่อยสลายโปรตีน ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพเจล (จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล 2549) และในปลาบางชนิดที่มีเอนไซม์โปรตีนเอสเป็นจำนวนมาก ขั้นตอนในการล้างเนื้อปลาไม่เพียงพอสำหรับกำจัดเอนไซม์โปรตีนเอสออกไป ดังนั้นในอุตสาหกรรมผลิตซึ่งใช้ปลาบางชนิดที่มีเอนไซม์สูงจึงจำเป็นต้องเติมสารที่มีความสามารถในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้เพื่อรักษาคุณภาพของเจล เช่น โปรตีนพลาสมาจากเลือดวัว (Beef plasma protein) โปรตีนไข่ขาว สารสกัดจากมันฝรั่ง และโปรตีนเวย์เข้มข้น เป็นต้น เพื่อยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนอันมีผลให้ได้ผลิตภัณฑ์ซูริมิหรือเจลที่มีคุณภาพสูงสุด กลุ่มที่สองใช้เพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีนเอส โดยสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอส กลุ่มนี้ส่วนใหญ่ใช้ในงานวิจัยเพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์ที่มีในเนื้อปลาแต่ละชนิด ทำให้ทราบแนวทางในการผลิตผลิตภัณฑ์จากปลาชนิดนั้น ๆ สารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสที่ใช้เพื่อจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีนเอสต้องมีความจำเพาะในการเข้าทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) ตัวอย่างดังแสดงในตารางที่ 4

#### 4. กระบวนการเกิดเจลของกล้ามเนื้อปลา

เจลจัดเป็นวัสดุที่มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างของเจลโปรตีนเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนจับกันด้วยพันธะชนิดต่าง ๆ เป็นโครงตาข่าย 3 มิติที่สามารถจับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ (Damodaran 1996)

คุณสมบัติในการเกิดเจล (gelation properties) เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาซึ่งบ่งบอกถึงคุณภาพของเนื้อปลา เจลที่แข็งแรงต้องอาศัยโปรตีนที่มีคุณภาพสูงตลอดจนปฏิบัติการ และการให้ความร้อนที่เหมาะสม การเกิดเจลเป็นกลไกทางเคมีที่เกิดจากการเชื่อมของโปรตีนไมโอไฟบริลด้วยพันธะต่าง ๆ และอาจมีเอนไซม์บางชนิดเร่งการเชื่อมประสานของโปรตีนและให้โครงข่ายของโปรตีนที่แข็งแรง โดยกระบวนการเกิดเจลจะเริ่มจากขั้นตอนการแตกตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลก่อนจากนั้นจะเป็นขั้นตอนในการเกิดเจลซึ่งมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

##### 4.1 การแตกตัวของโปรตีนไมโอไฟบริล

โปรตีนไมโอไฟบริลเป็นโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีส่วนสำคัญในการเกิดเจล ซึ่งการเกิดเจลสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีเกลือร้อยละ 2-3 ภายใต้สภาวะนี้โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนและไอออน (โซเดียมและคลอไรด์ไอออน) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบไปด้วย (Xiong 1997)

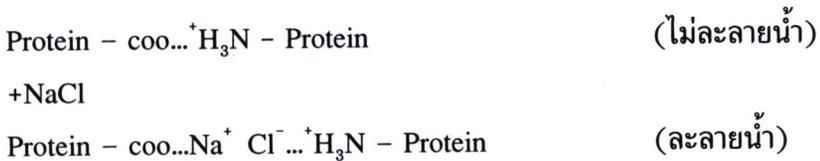
4.1.1 การบวม (Swelling) ของไมโอไฟบริล เนื่องจากแรงผลักของประจุระหว่างเส้นใยโปรตีน (myofilament)

4.1.2 การแยก (depolymerization) ของเส้นใยโปรตีน

4.1.3 การแยกของแอกตินจากไมโอซิน หรือการแยกของแอกโตไมโอซินจากโครงสร้างไมโอไฟบริล

โปรตีนไมโอไฟบริลสามารถละลายได้โดยการเติมเกลือ ซึ่งไมโอซินที่ละลายสามารถรวมตัวกับแอกตินเกิดเป็นแอกโตไมโอซิน ซึ่งไมโอซินและแอกโตไมโอซินมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเจล แอกตินอาจมีผลเปลี่ยนแปลงคุณลักษณะการเกิดเจลของไมโอซินในปลาบางชนิด แต่โทรโปไมโอซินจะมีผลต่อการเกิดเจล อย่างไรก็ตามไมโอซินเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญที่สุดในการเกิดเจล

กรดอะมิโนมากกว่าร้อยละ 50 จัดเป็นกรดอะมิโนชนิดไฮโดรฟิลิก ซึ่งร้อยละ 80 ของกรดอะมิโนนี้เป็นชนิดเบสิกและเอซิด กรดอะมิโนเหล่านี้จะอยู่บริเวณพื้นผิวของโปรตีนซึ่งสามารถจับกับน้ำได้ หมายความว่าความแตกต่างภายหลังจากการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อปลา หมู่คาร์บอกซิลของกลูตามิกและแอสพาร์ติกจะมีประจุลบ ในขณะที่หมู่มะมิโนของไลซีนและอาร์จินีนมีประจุบวก ดังนั้นแรงยึดระหว่างประจุของหมู่มดั่งกล่าว (salt linkage) สามารถเกิดขึ้นและโปรตีนไมโอไฟบริลสามารถจับเรียงตัวกันเป็นโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น (aggregate) ส่งผลให้ไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่เมื่อเติมเกลือ ไอออนของเกลือสามารถจับกับประจุตรงกันข้ามบนพื้นผิวของโปรตีน



เพราะฉะนั้นแรงยึดระหว่างประจุของกรดอะมิโนที่อยู่ระหว่างโมเลกุลของโปรตีนไมโอไฟบริลสารถูกทำลายและโปรตีนสามารถละลายน้ำได้เพิ่มขึ้น โมเลกุลของไมโอซินและแอกโตไมโอซินจะมีสภาพเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับค่า ionic strength เมื่อค่า ionic strength ต่ำ (< 0.3 M) ในช่วงความเป็นกรดต่างเป็นกลางพบว่า โมเลกุลของไมโอซินมีลักษณะเป็นฟิลาเมนต์ (filament) แต่เมื่อค่า ionic strength สูงขึ้น (>0.3 M) โมเลกุลของไมโอซินจะกระจายตัวแยกออกจากกัน และอยู่ในลักษณะโมโนเมอร์ (monomer)

นอกจากเกลือสามารถเพิ่มการละลายของโปรตีนแล้ว ยังมีผลลดความคงตัวของโครงสร้างโมเลกุลต่อการสูญเสียสภาพโดยความร้อน (thermal denaturation) Wu and others

(1985) รายงานว่า อุณหภูมิทรานสิชัน (transition temperature) ของซูริมิลลดลงเมื่อเติมเกลือ และปริมาณเอนทาลปีที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสภาพของโปรตีนจะลดลง ดังนั้นโปรตีนจึงเกิดการสูญเสียสภาพได้ง่ายขึ้นภายหลังการเติมเกลือ

ปริมาณเกลือที่เติมลงในซูริมิลมีผลต่อสมบัติของเจลซูริมิ Huang and others (1998) พบว่าปริมาณเกลือมีผลต่อความแข็งแรง (strength) และความยืดหยุ่น (deformation) ของเจลซูริมิจากปลาชนิดโดยการเติมเกลือในช่วงร้อยละ 2-3 ให้สมบัติของเจลไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการเติมเกลือต่ำกว่าร้อยละ 2 ให้เจลที่มีความแข็งแรงต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากเกลือที่ระดับความเข้มข้นที่เพียงพอสามารถละลายโปรตีนไมโอไฟบริล ซึ่งเป็นความจำเป็นพื้นฐานต่อการเกิดเจล

## 4.2 การเกิดเจล (gelation)

การเกิดเจลของโปรตีนสามารถแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ (Connell 1960)

### 4.2.1 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (denaturation)

การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนซึ่งมักจะเป็นผลจากการได้รับความร้อน หรือเกิดจากโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติไปบางส่วนด้วยปัจจัยอื่น เมื่อเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเกิดขึ้นจะพบว่าความหนืดของระบบโปรตีนเพิ่ม เนื่องจากขนาดโมเลกุลโปรตีนใหญ่ขึ้นซึ่งเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุลรวมกับการเริ่มจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนบางส่วนที่คลายตัวออกมา

### 4.2.2 การจับเรียงตัวของโปรตีน (aggregation)

เมื่อโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือโมเลกุลเกิดการคลายตัวอย่างสมบูรณ์แล้วจะรวมตัวกันหรือเกิดการจับเรียงตัวกันอย่างช้า ๆ เพื่อเกิดเป็นโครงร่างตาข่าย ความหนืดของระบบโปรตีนจะเพิ่มอย่างรวดเร็ว และในระยะสุดท้ายระบบของเจลก็จะมีคุณสมบัติบางประการของของแข็งที่มีความยืดหยุ่น (Hermansson 1978)

การจับเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีนที่เหมาะสมจะทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติ มีความสำคัญต่อการเกิดเจล ซึ่งแตกต่างจากการจับตัวตกตะกอน (coagulation) โดยการเกิดเจลเป็นกระบวนการจัดเรียงตัวของโครงข่ายโมเลกุลอย่างมีระเบียบ ส่วนการจับตัวตกตะกอนเป็นการจับเรียงตัวของโมเลกุลแบบสุ่มและไม่เป็นระเบียบ ปัจจัยที่มีผลต่อระดับการจัดเรียงตัว ได้แก่ อัตราการให้ความร้อน (Mulvihill and Kinsella 1987) ชนิดของโปรตีน ความเข้มข้น และความเป็นกรด-ด่าง (Stone and Stanley 1992)

Wong (1989 อ้างถึงในจักรี ทองเรือง 2544) อัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในทั้งสองขั้นตอนจะเกิดขึ้นในระดับที่เหมาะสม ถ้าการทำโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นเร็วกว่าการจับเรียงตัวของโปรตีนโครงสร้าง 3 มิติที่ได้จะไม่มีประสิทธิภาพ เจลที่ได้จึงมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่นต่ำแต่ถ้าการทำโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นในอัตราที่

ไม่สูงมากนัก เจลที่ได้ก็จะมีความยืดหยุ่นและแข็งแรง ขณะที่การจับเรียงตัวในชั้นที่สองเกิดเร็วก็จะมีผลทำให้โปรตีนจับเรียงตัวกันแบบสุ่มซึ่งทำให้โครงสร้างที่ได้สามารถอุ้มน้ำไว้ได้น้อย

### 4.3 พันธะที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเจล

เมื่อพิจารณาถึงการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลโปรตีนในระยะเวลาการจับเรียงตัวนั้น จำนวนพันธะที่เกิดขึ้นจะต้องไม่น้อยกว่า 3 พันธะ พันธะที่สามารถเชื่อมต่อกับโมเลกุลของโปรตีนเข้าด้วยกันซึ่งเป็นพันธะที่มีความสำคัญต่อความคงตัวของโมเลกุลโปรตีน มี 4 ชนิด (Park 1995)

#### 4.3.1 พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bonds)

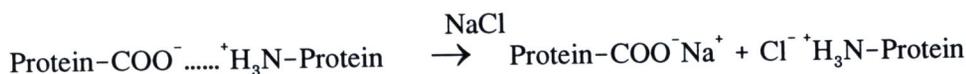
เป็นพันธะที่เกิดจากการใช้อะตอมไฮโดรเจนร่วมกันระหว่างอะตอมที่มีขั้วไฟฟ้าลบ 2 อะตอม เช่น ระหว่างอะตอมของไนโตรเจน ออกซิเจน หรือ ซัลเฟอร์ กับอะตอมของออกซิเจนในหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) ดังนั้น โมเลกุลของโปรตีนซึ่งมีหมู่ต่างๆ เหล่านี้อยู่ จึงสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่ต่างๆ ในโมเลกุลของโปรตีนได้หลายหมู่ เนื่องจากพันธะไฮโดรเจนอ่อนแอกว่าพันธะอื่นจึงไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดเจลของโปรตีน แต่ก็ยังมีความสำคัญที่ช่วยให้เกิดความคงตัวของน้ำอิสระ (free water) ที่อยู่ภายในเจลที่มีปริมาณน้ำสูง (hydrogel) เช่น เจลของซูริมิ ซึ่งจำนวนของน้ำที่จับอยู่กับโครงสร้างของสารอื่น หรือ bound water จะมีความสัมพันธ์ค่อนข้างสูงกับความยืดหยุ่นของเจล และเนื่องจากที่ระดับอุณหภูมิต่ำจะเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของโปรตีนขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิสูง เป็นผลให้เจลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำมีความคงตัวสูงกว่าเจลที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า (Park 1995)

#### 4.3.2 การดึงดูดกันด้วยแรงอ็อน หรือปฏิกิริยาต่อกันระหว่างขั้วไฟฟ้า

(Electrostatic interaction)

เป็นการดึงดูดกันระหว่างหมู่โซ่ด้านข้างที่มีประจุบวกกับหมู่โซ่ข้างที่มีประจุลบ บนผิวหน้าของโปรตีน เนื่องจากภายในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยหมู่โซ่ด้านข้างที่สามารถแตกตัวและมีประจุบวกหรือลบ นั่นคือในโมเลกุลของโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน (amino acids) ชนิดต่างๆ โปรตีนที่มีค่าความเป็นกรดต่าง เข้าใกล้ความเป็นกลาง หรือ ค่าความเป็นกรดต่าง ประมาณ 6.8 นั้น หมู่คาร์บอกซิล ( $\text{COO}^-$ ) ของกรดกลูตามิก (glutamic acid) และแอสพาร์ติก (aspartic acid) ซึ่งในกรดอะมิโนบนสายโซ่โปรตีนจะมีประจุสุทธิเป็นลบ ขณะที่หมู่อะมิโน ( $\text{NH}_2^+$ ) ของกรดอะมิโนอีกสองตัวบนสายโซ่โปรตีนคือ ไลซีน (lysine) และอาร์จินีน (arginine) จะมีประจุสุทธิเป็นบวก ทำให้เกิดสะพานเชื่อมต่อกัน (ionic linkages) เกิดการดึงดูดกันขึ้นได้ เมื่อโมเลกุลของโปรตีนเข้าใกล้กันมากพอ ซึ่งเป็นผลให้โมเลกุลของไมโอไฟบริลลาร์โปรตีนแต่ละโมเลกุลเชื่อมติดกันอย่างแน่นเป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำ ดังนั้น การที่จะทำให้เกิดโครงสร้างของเจลได้ต้องมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ( $\text{NaCl}$ ) เพื่อให้อ็อนของเกลือ ได้แก่  $\text{Na}^+$  และ  $\text{Cl}^-$  ไปจับกับอ็อนของหมู่ที่มีประจุตรงกันข้ามเพื่อให้ ionic linkages ระหว่างโมเลกุลของ

โมโนไฟบริลลาร์โปรตีนขาดออกจากกัน ส่งผลให้โมโนไฟบริลลาร์โปรตีนละลายออกมาและทำให้เกิดโครงสร้างของเจล โดยทำให้เกิดการฟอร์มเจลด้วยความร้อน (heat-set gel) ขึ้นดังสมการ

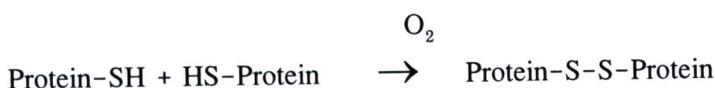


#### 4.3.3 พันธะ หรือปฏิกริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interactions)

ภายในสายโซ่โปรตีนที่ยังไม่คลายตัวหรือม้วนพับอยู่กรดอะมิโนที่มีคุณสมบัติเหมือนไขมันคือ ไม่รวมตัวกับน้ำ เรียกว่า หมู่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ส่วนกรดอะมิโนที่อยู่บริเวณผิวหน้าของสายโซ่โปรตีนที่ยังไม่คลายตัวจะมีคุณสมบัติดูดน้ำและละลายน้ำได้ เรียกว่า หมู่ชอบน้ำ (hydrophilic) เมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือสายโซ่โปรตีนคลายตัวแกนของหมู่ที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่ภายในโครงสร้างโมเลกุลจะเปิดเผยตัวออกมาสัมผัสกับน้ำ ทำให้ส่วนของหมู่ไม่ชอบน้ำของโปรตีนพยายามจะเชื่อมต่อกับโมเลกุลอื่นๆ เรียกว่า hydrophobic binding ความแข็งแรงของพันธะจะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น (ประมาณ 60 องศาเซลเซียส) ซึ่งตรงข้ามกับการเกิดพันธะไฮโดรเจนซึ่งจะเกิดที่อุณหภูมิต่ำกว่า

#### 4.3.4 พันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bounds)

เป็นพันธะโควาเลนต์ที่มีความสำคัญต่อการเกิดเจลและความคงตัวของโปรตีน พันธะโควาเลนต์ที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลของโปรตีนเป็นพันธะที่มีความแข็งแรงไม่แตกหักง่าย ในระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง (สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส) พันธะโควาเลนต์ที่มีบทบาทเด่นที่ทำให้เกิดการฟอร์มเจลในโปรตีนคือพันธะไดซัลไฟด์ พันธะไดซัลไฟด์ ที่เกิดขึ้นภายในโมเลกุลของโปรตีน เกิดจากการเกิดออกซิเดชันของโมเลกุลของกรดอะมิโนซิสเตอีน (cysteine) สองโมเลกุลที่อยู่บนสายโซ่โปรตีนที่อยู่เคียงข้างกันที่มีหมู่ซัลไฟไฮดริล (-SH) ที่มีกิจกรรมอยู่ (Park 1995) ดังสมการ



ดังนั้นเมื่อเติมสารเร่งการเกิดออกซิเดชัน เช่น โพรแตสเซียมโบรมเอท (potassium bromate) จะทำให้เจลมีความแข็งแรงมากขึ้น (Park 1995)

#### 4.4 การเซ็ทตัว

การเกิดปฏิกิริยาการเซ็ทเจล (setting reaction) เป็นการเกิดเจลที่อุณหภูมิต่ำ เกิดเนื่องจากการเกิดพันธะระหว่างโมเลกุลของกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) และไลซีน (lysine) ที่อยู่บนสายโซ่โปรตีนที่เคียงข้างกัน และผลของปฏิกิริยาของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลา เอนไซม์นี้มีคุณสมบัติละลายในน้ำและถ้าทำการล้างเนื้อปลาสดนานเกินไปเอนไซม์ดังกล่าวจะถูกล้างออกไป การที่เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจะช่วยให้เกิดการเซ็ทเจลของโปรตีนได้จะต้องมีแคลเซียมไอออน ( $Ca^{2+}$ ) อยู่ด้วย ดังนั้นถ้าจะป้องกันการเกิดเจลของโปรตีนที่อุณหภูมิต่ำจะต้องเติมสารจับอนุมูลโลหะ (chelating agents) เช่นโซเดียมซิเตรท ซึ่งจะจับกับแคลเซียมไอออนป้องกันไม่ให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสร้างสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนขึ้น อย่างไรก็ตามเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากเชื้อราไม่ต้องการแคลเซียมไอออนเป็นตัวช่วยในการเซ็ทเจลของโปรตีนด้วย ซึ่งจะช่วยปรับปรุงคุณภาพของเจลที่มีคุณภาพต่ำให้สูงขึ้น (Park 1995)

เจลที่เตรียมโดยการให้โปรตีนเซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำ หรือให้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสสร้างสะพานเชื่อมระหว่างโมเลกุลของโปรตีนก่อน แล้วตามด้วยการต้มให้สุกที่อุณหภูมิสูงจะได้เจลที่มีความแข็งแรงกว่าเจลที่ไม่ได้ปล่อยให้เซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำเสียก่อน

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเซ็ทเจลของโปรตีนจะแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เนื่องจากโปรตีนไมโอซินในปลาแต่ละชนิดจะมีความคงตัวต่อความร้อนแตกต่างกัน ความคงตัวของโปรตีนต่อความร้อนจะแปรผันไปตามชนิดของปลาเป็นสำคัญ โดยทั่วไปแล้วโปรตีนของปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่า ขณะที่โปรตีนของปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิสูงกว่าจะมีความคงตัวต่อความร้อนใกล้เคียงกับโปรตีนจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหรือสัตว์ปีก (Park 1995)

#### 4.5 การอ่อนตัวของเจล (Gel-weakening: Modori)

เมื่อมีการให้ความร้อนแก่เจลซูริมิที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 - 50 องศาเซลเซียส โครงสร้างบางส่วนของซูริมิถูกทำลาย ส่งผลให้เจลมีความอ่อนตัว เรียกว่า โมโดริ (modori) ปฏิกิริยาดังกล่าวขึ้นกับชนิดของปลา และได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นผลโดยตรงจากเอนไซม์โปรตีนเอสซึ่งมีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาหรือโปรตีนเอสที่พบในส่วนซาร์โค พลาสติก ซึ่งสามารถชะล้างออกไปบางส่วนระหว่างการล้างกล้ามเนื้อปลาสด โปรตีนเอสซึ่งทำงานได้ดี ณ pH เป็นด่าง (alkaline proteinase) มีผลต่อการอ่อนตัวของเจล นอกจากนี้เอนไซม์คาเทปซิน ซึ่งพบมากในปลาบางชนิด เช่น แปะซิฟิกไวตัง ซึ่งมีผลต่อการเกิดโมโดริ (สุทรวัดน์ เบนญกุล 2549)

##### 4.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดโมโดริ

จากการศึกษาพบว่า การเกิดโมโดริของเจลเกิดจากหลายปัจจัย โดยขอ ยกตัวอย่างปลาบางชนิด ดังนี้

- การเกิดโมโตริของปลาครุเซียนคาร์ป เกิดขึ้นเมื่อเก็บปลาไว้นานก่อนการนำมาผลิตเป็นเจล (Toyohara and others 1990 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)
- การเกิดโมโตริของปลาปากคม เกิดขึ้นมากในช่วงหลังที่ปลามีการวางไข่ (ทำการเปรียบเทียบกับช่วงก่อนวางไข่ (Shimizu and Wendakoon 1990 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)
- การเกิดโมโตริของปลาเรนโบว์เทราท์ เกิดขึ้นมากเมื่อมีการนำเลือดออก (Bleeding) ทั้งนี้อาจเนื่องจากในเลือดของปลาเรนโบว์เทราท์ประกอบด้วยสารบางชนิดที่มีความสามารถยับยั้งการเกิดโมโตริ (Toyohara and others 1990 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)
- การเกิดโมโตริของปลาแอนโชวีที่หมักเกลือ พบว่าโปรตีนชนิดซีรีนสามารถย่อยสลายกล้ามเนื้อได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส และกล้ามเนื้อปลาถูกย่อยสลายโดยสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (Ishida and others 1994 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549)

Taguchi and others (1989 อ้างถึงใน Sikorski 1994b) รายงานว่าอัตราการลดลงของความแข็งของเจลยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของปลาและเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาปลาหลังการจับ แต่ก็สามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลได้จากการใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ต Lanier (1994) รายงานว่า ในปลาเกือบทุกชนิดมีเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อนซึ่งพบในเครื่องใน (โดยเฉพาะอย่างยิ่งในไตและกระเพาะอาหาร) ดังนั้นผลของการควักเครื่องในออกจากตัวปลาอย่างรวดเร็วแล้วล้างทำความสะอาดทันทีสามารถลดการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาและลดโอกาสที่เอนไซม์ในเครื่องในจะแพร่ออกมาสู่เนื้อปลา ซึ่งจะสร้างความเสียหายแก่ผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนส่วนใหญ่สามารถละลายน้ำได้ ดังนั้นในการผลิตซูริมิจึงต้องมีขั้นตอนการล้างเนื้อปลาเพื่อเป็นการกำจัดเอนไซม์

#### 4.5.2 กลไกการเกิดเจลโมโตริ

เนื่องจากการให้ความร้อนแก่เนื้อปลามีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดทั้งอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลของโปรตีนและการกระตุ้นให้เอนไซม์ย่อยโปรตีนเกิดกิจกรรมขึ้น กระบวนการทั้งสองจึงอาจมีส่วนต่อการสูญเสียความแข็งแรงของโครงสร้างเจลที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส Deng (1981 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) รายงานว่าการให้ความร้อนแก่เนื้อปลามุลเลต (Mullet) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิในระดับที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อาจพบในกล้ามเนื้อปลาได้อย่างสมบูรณ์นั้นมีผลให้ค่าแรงเฉือนของเนื้อปลาซึ่งบ่งชี้ความเหนียวของเนื้อปลามีค่าเพิ่มมากขึ้น และมีแนวโน้มคงที่เมื่อให้ความร้อนนานประมาณ 15 นาที จึงแสดงให้เห็นว่าการตกตะกอนโปรตีนโดยความร้อนไม่ควรจะเป็นสาเหตุหลักของการสูญเสียความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของเจล ในช่วงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และเมื่อพิจารณาว่าการให้ความร้อนแก่ชิ้นปลาโดยวิธีปกติจะต้องใช้เวลา

ประมาณ 3 - 4 นาที จนภายในชั้นปลามีอุณหภูมิเท่ากับตัวกลางที่ให้ความร้อน ดังนั้นการให้ความร้อนแก่เนื้อปลาในระดับ 75 หรือ 85 องศาเซลเซียส เนื้อปลาที่ผ่านช่วงที่มีอุณหภูมิภายในเท่ากับ 60 - 70 องศาเซลเซียส นานประมาณ 1 นาที ซึ่งเป็นเวลาที่เพียงพอสำหรับการแสดงกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีผลให้เนื้อปลานุ่มขึ้นและสามารถลดความเหนียวของเนื้อปลาที่เกิดจากการจับกันของโปรตีนที่เป็นผลจากการตกตะกอนโปรตีนด้วยความร้อน

#### 4.5.3 กลไกอื่นของการเกิดโมโตริ

นอกจากกลไกการเกิดโมโตริที่มีสาเหตุจากเอนไซม์โปรตีเนสซึ่งสามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ส่งผลต่อการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อแล้ว ยังมีการสันนิษฐานได้ว่าการเกิดโมโตรินั้นมีสาเหตุมาจากการตกตะกอนของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในระหว่างการให้ความร้อน โดยการเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ระหว่างโปรตีนมีผลให้โปรตีนเกิดการหดตัวและปล่อยน้ำออกมา โมโตริจะเกิดขึ้นน้อยลงเมื่อเติมน้ำตาลซึ่งมีผลต่อการลดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Niwa 1992 อ้างถึงใน Sikorski 1994a)

กลไกการเกิดโมโตริอาจเกิดจากปฏิกิริยาที่ไม่ใช่เอนไซม์ Iwata and others (1974, 1977 อ้างถึงในสุทธวัฒน์ เบญจกุล 2549) พบว่าในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ และ pH เท่ากับ 6.6 ซึ่งเป็นสภาวะที่คล้ายคลึงกับสภาวะที่ใช้ในการผลิตซูริมิ เอนไซม์อัลคาไลน์โปรตีเนสที่พบในซูริมิปลาคาร์ป มีความสามารถในการย่อยสลายแอกโตไมโอซินได้น้อยมาก โดยสามารถแยกโปรตีนที่เป็นสาเหตุของการเกิดโมโตริ ออกเป็น 2 ชนิด ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 44,000 และ 50,000 ดาลตัน โดยโปรตีนทั้งสองนี้ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนส เมื่อให้ความร้อนที่ 65 องศาเซลเซียส โปรตีนขนาดเล็กกว่าสามารถลดสมบัติการอุ้มน้ำของซูริมิปลาคาร์ป ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่า

## 5. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสในกล้ามเนื้อปลา

เทคนิคการวิเคราะห์การเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสมีหลายวิธี ดังจะกล่าวต่อไปนี้

### 5.1 การแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนเจลพอลิอะคริลาไมด์ที่มีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตเป็นส่วนประกอบ (Sodium dodecylsulfate - polyacrylamide gel eletrophoresis :SDS-PAGE)

(Laemmli 1970 ดัดแปลงเล็กน้อยโดย จีรวัดน์ ยงสวัสดิกุล 2549)

เทคนิค SDS-PAGE เป็นการวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนชนิดต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในสารละลายตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของแถบโปรตีนขนาดต่างๆ ก่อนและหลังการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ โปรตีเนสในตัวอย่างทำให้สามารถตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนได้ การแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE อาศัยการแยกโดยขนาดเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีจำนวนประจุมาเกี่ยวข้อง และเนื่องจากกระแสวิกฤติที่เคลื่อนที่ไปของสายพอลิเพปไทด์บนเจลมีความสัมพันธ์โดยตรงกับขนาดของพอลิเพปไทด์เท่านั้น การแยกโปรตีนที่สนใจบนเจลนี้

ทำได้โดยเทียบน้ำหนักโมเลกุลระหว่างโปรตีนตัวอย่างกับโปรตีนเทียบเคียง ในกรณีที่มั่นใจว่าน้ำหนักของโปรตีนที่ต้องการแตกต่างจากโปรตีนอื่น ๆ อย่างชัดเจน สามารถแยกโปรตีนบนเจลเพื่อนำไปศึกษาองค์ประกอบได้ (โดยที่ไม่ต้องเทียบกับโปรตีนเทียบเคียงที่ทราบน้ำหนักโมเลกุลแล้ว)

การวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE นั้น ของผสมโปรตีนจะถูกทำให้เสียสภาพ การละลายโปรตีนด้วยโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate, SDS) จะทำให้โปรตีนมีประจุลบเนื่องจากมีกลุ่มซัลเฟต SDS จับกับโปรตีนในอัตราส่วนค่อนข้างคงที่คือ 1.4 กรัมต่อกรัมโปรตีน เนื่องจาก SDS เป็น detergent ที่ทำให้โปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติ หากโปรตีนมีหน่วยย่อยจะเกิดการแยกออกจากกัน และหากโปรตีนนั้นเป็นเพียงพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว ก็จะทำให้เกิดการคลายตัวและสูญเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากโปรตีนถูกล้อมรอบด้วย SDS ทำให้มีประจุเป็นลบเหมือนกันหมด การแยกโปรตีนด้วย SDS-PAGE จึงขึ้นอยู่กับขนาดของโปรตีนเป็นสำคัญ โดยโปรตีนจะเคลื่อนที่ไปตามน้ำหนักโมเลกุลของตัวเอง ภายหลังจากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า ตำแหน่งของแถบโปรตีนที่แยกออกจากกันจะปรากฏขึ้นเมื่อย้อมด้วยสี เช่น สีคูแมสซีบลู (Coomassie blue) หรือ สีของสารประกอบเงิน (silver stain)

ในการศึกษาการสลายตัวของโปรตีน สามารถศึกษาได้โดยการย้อมสีโปรตีนหลังจากการวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถใช้ตรวจสอบ ติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนได้ (Wang and other 2009) Kj? rsgård and Jessen (2003) และ Schiavone and others (2008) ใช้เพียงเทคนิค SDS-PAGE ในการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลา cod (*Gadus morhua*) และปลา sea bream (*Sparus aurata*) ตามลำดับ

## 5.2 การวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด (TCA-soluble peptide) โดย Lowry method (Lowry and others 1951)

ในกล้ามเนื้อปลามีเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนไปเป็นหน่วยย่อยขนาดเล็กที่แตกต่างกันตามชนิดของเอนไซม์ การตรวจวิเคราะห์เพื่อติดตามและศึกษากิจกรรมการย่อยสลายของโปรตีน สามารถทำได้โดยการวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด ด้วยวิธี Lowry method

ความสามารถในการดูดกลืนแสงเป็นคุณสมบัติหนึ่งของกรดอะมิโนที่ผู้ศึกษาโปรตีนสามารถนำมาใช้ในการตรวจติดตามและประมาณความเข้มข้นของโปรตีนได้ สารที่ใช้เป็นตัวทำปฏิกิริยา คือ Folin - ciocalteu' phenol reagent ซึ่งเป็นสารประกอบของโซเดียมโมลิบเดตและโซเดียมทังสเตต โดยวิธีการนี้เป็นการวัดไทโรซีน (tyrosine) ที่ละลายอยู่ในสารละลายกรด เพราะ Folin - ciocalteu' phenol reagent สามารถตรวจจับหมู่ฟีนอล (Phenol group) ของไทโรซีนได้ โดย Folin - Ciocalteu' phenol reagent ถูกรีดิวซ์โดยไทโรซีนไปเป็นสารประกอบเชิงซ้อน

โมลิบดีนัม-ทังสเตนบลู (molybdenum-tungsten blue) ซึ่งมีสีน้ำเงิน สามารถตรวจวัดความเข้มข้นได้ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (สุกัญญา สุนทรส และ วิเชียร ริมพิณชยกิจ 2547; Lowry and others 1951; Mikkelsen and Corton 2004)

### 5.3 การวิเคราะห์ทางเนื้อสัมผัส

เมื่อกล้ามเนื้อปลาถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรตีนเอส เจลที่ได้จะมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นลดลง การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลจากโปรตีนกลุ้มเนื้อปลาสามารถบอกได้ว่าโปรตีนอาจถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ การตรวจสอบสมบัติเจลซูริมิโดยใช้ Punch test (สุทรวัดน์ เบญจกุล 2549; Kim and Park 2000) เป็นวิธีที่นิยมมากในประเทศญี่ปุ่น โดยอาศัยหลักการการเจาะทะลุผ่านตัวอย่าง หัวเข็ม (plunger) ประกอบด้วยทรงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร ซึ่งอยู่บริเวณปลายแท่งที่มีขนาดยาว 10 เซนติเมตร การวัดเริ่มจากให้หัวเข็มแทงทะลุผ่านผิวหน้าของตัวอย่างเจล การรายงานจะรายงานค่าของแรงที่ทำให้เจลแตก (breaking force) ในหน่วยกรัม และระยะทางก่อนเจลแตก (deformation) ในหน่วยมิลลิเมตร หรือ เซนติเมตร

### 5.4 ความสามารถในการอุ้มน้ำของเจล (Water holding capacity)

ความสามารถในการอุ้มน้ำของเจลสามารถใช้ในการบอกคุณภาพของเจลได้ โดยความสามารถในการอุ้มน้ำของเจลนั้นมีความสัมพันธ์กับความแข็งแรงของโครงข่ายสามมิติของเจล เจลที่มีโครงสร้างแน่นและแข็งแรงสูงจะสามารถอุ้มน้ำไว้ได้สูง โดยปกติแล้วน้ำภายในเจลจะพบใน 2 สถานะ คือ น้ำอิสระ (free water) และน้ำผูกพัน (bound water) น้ำชนิดแรกสามารถระเหยไปในขณะให้ความร้อน ส่วนน้ำชนิดที่สองสามารถจับกับโครงข่ายของเจลโดยพันธะไฮโดรเจน หรืออาจถูกกักไว้ในโครงข่ายของเจล โดยน้ำที่ถูกกักในโครงข่ายของเจลนี้สามารถเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิได้ ส่วนใหญ่การตรวจสอบสถานะของน้ำกระทำโดยการวัดปริมาณของเหลวบีบอัด (expressible water) ซึ่งเจลที่มีลักษณะเปราะจะมีปริมาณของเหลวบีบอัดสูงกว่าเจลที่มีความยืดหยุ่น (จักรี ทองเรือง 2544; สุทรวัดน์ เบญจกุล 2549)

## 6. งานวิจัยที่ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีนเอสในปลาชนิดต่าง ๆ

Yongsawatdikul and others (2000) ศึกษาการย่อยสลายของโปรตีน (autolysis) และจำแนกชนิดของเอนไซม์โปรตีนเอสในซูริมิปลานิลโดยการวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด (TCA-soluble peptide content) เพื่อศึกษาผลของเวลา และอุณหภูมิต่อการย่อยสลายของโปรตีนพบว่าการย่อยสลายของโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มขึ้นและอุณหภูมิสูงขึ้น และเกิดการย่อยสลายของโปรตีนในซูริมิสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษารูปแบบโปรตีน (protein patterns) โดยการใช้เทคนิค SDS - PAGE พบโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็กที่เป็น



ผลจากการสลายตัวของไมโอซินสายหนัก และเมื่อบ่มซุริมิปลานิลไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง ทำให้ไมโอซินสายหนัก ถูกย่อยสลายจนหมด โดยการย่อยสลายของโปรตีนในซุริมิ ถูกยับยั้งโดย soybean trypsin inhibitor และ leupeptin ซึ่งบ่งชี้ว่าเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายของโปรตีนในซุริมิปลานิลคือเอนไซม์โปรตีนเอสกลุ่มซีรีน (serine proteinases)

สุวรรณ วิรัชกุล และคณะ (2543) ศึกษาสภาวะการให้ความร้อนที่เหมาะสมกับการเกิดเจลของซุริมิจากปลานิลเขตร้อน (*Oreochromis niloticus*) โดยให้ความร้อน 3 สภาวะ ดังนี้ (1) เซ็ทที่ 40 องศาเซลเซียส 60 นาที (2) เซ็ทที่ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที (3) เซ็ทที่ 90 องศาเซลเซียส 40 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 องศาเซลเซียส 40 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณภาพของเจลจากการศึกษาพบว่า การเซ็ทเจลที่อุณหภูมิต่ำคือที่ 40 องศาเซลเซียส 60 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 องศาเซลเซียส 40 นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเกิดเจลของซุริมิจากปลานิล ซึ่งให้เจลที่มีคุณภาพสูงกว่าสภาวะอื่น ๆ โดยให้เจลที่มีค่าแรงกดและค่าระยะทางก่อนเจลแตกสูงกว่าที่สภาวะอื่น ๆ ( $p < 0.05$ ) การที่คุณภาพของเจลที่สภาวะการให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส 60 นาที ตามด้วยการต้มที่ 90 องศาเซลเซียส 40 นาที สูงกว่าอีกสองสภาวะนั้นผู้วิจัยเสนอว่าเป็นผลมาจากช่วงอุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เอนไซม์โปรตีนเอส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลาตามธรรมชาติมีกิจกรรมสูงสุด เอนไซม์นี้จะย่อยสลายโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเจลทำให้คุณภาพของเจล ลดลง การเตรียมเจลโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำในครั้งแรกก่อนแล้วตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงอีกครั้งหนึ่งเป็นการสร้างความคงตัวให้แก่เจล การให้ความร้อนครั้งแรกเป็นการให้ความร้อนในระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเกิดเจลของโปรตีนของปลาแต่ละชนิดเพื่อให้การเกิดเจลหรือการสร้างร่างแหโปรตีนอย่างเป็นระเบียบ ก่อนนำไปให้ความร้อนครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เพื่อให้โปรตีนที่เกิดเจลอย่างสมบูรณ์แล้วตกตะกอน เป็นผลให้เจลมีความคงตัวและเจลมีคุณภาพสูงทั้งทางด้านความแข็งและความยืดหยุ่น

Benjakul and others (2003b) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาปากคม (lizard fish) ที่ผ่านการบดและเนื้อปลาปากคมที่ผ่านการบดแล้วล้างในช่วงการให้ความร้อนอย่างรวดเร็ว พบว่าเนื้อปลาปากคมบดเกิดการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดของเนื้อปลาปากคมบดแล้วล้างเกิดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การย่อยสลายโปรตีนจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งทราบได้จากการใช้ SDS-PAGE ในการวิเคราะห์การลดลงของความเข้มข้นของแถบโปรตีนไมโอซินสายหนักและการเพิ่มขึ้นของปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด การย่อยสลายโปรตีนของเนื้อปลาปากคมบดแล้วล้าง สามารถถูกยับยั้งได้โดย E-64 และ soybean trypsin inhibitor ทำให้ทราบว่าโปรตีนเอสที่จับอยู่กับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์และเป็นสาเหตุทำให้เกิดการย่อยสลายของโปรตีนที่พบในปลาปากคมคือโปรตีนเอสชนิดซิสเตอีนและซีรีน ซึ่งเป็นอัลคาไลน์โปรตีนเอสที่ถูกกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมได้ด้วยความร้อน (heat-activated alkaline proteinase) ทำงานได้ดีที่ pH เท่ากับ 8 และอุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส

Benjakul and others (2004) ศึกษาผลของการเติมสารเติมแต่งอาหารจากโปรตีน (protein additives) ต่อการย่อยสลายโปรตีนและความสามารถในการเกิดเจลของปลาปากคม โดยสารเติมแต่งอาหารจากโปรตีนที่ใช้ในการศึกษาคือโปรตีนพลาสมาจากวัว และไข่ขาวผง เมื่อวัดการเหลืออยู่ของโปรตีนไมโอซินสายหนักด้วยการใช้เทคนิค SDS-PAGE วัดกิจกรรมของเอนไซม์ (sarcoplasmic proteinases) และวัดปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด พบว่าโปรตีนพลาสมาจากวัว มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนเนื่องจากเอนไซม์โปรตีเนสได้ดีกว่าไข่ขาวผง และการใช้เกลือ 2.5% ร่วมกับโปรตีนพลาสมาจากวัว และไข่ขาวผง สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนได้ การเติมโปรตีนพลาสมาจากวัวและไข่ขาวผงบ่งชี้ว่าช่วยให้เจลที่ได้มีความแข็งแรงเพิ่มขึ้นอีกด้วย

Yongsawatdikul and Piyadhamviboon (2004) ศึกษาการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลาปากคมที่เกิดจากเอนไซม์โปรตีเนส พบว่า การย่อยสลายโปรตีนของเนื้อปลาปากคมสดและซูริมิจากปลาปากคมเกิดได้ดีที่ pH 6 และ 7 ตามลำดับ และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนส คือ 65 องศาเซลเซียส สารที่สามารถยับยั้งการย่อยสลายซูริมิจากปลาปากคม คือ ฟีนิลมีเทนซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ (phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)) และพารา-โทซิล-แอล-ฟีนิลอลานิล-คลอโรเมทิลคีโตน (p-tosyl-L-phenylalanyl chloromethylketone (TLCK)) ซึ่งเป็นสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสที่สามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสชนิดซีรีนที่จับอยู่กับโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ จากนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการยับยั้งการย่อยสลายโปรตีนของสารเติมแต่งอาหารจากโปรตีนซึ่งได้แก่ไข่ขาวผงและโปรตีนเวย์เข้มข้น (whey protein concentrate) พบว่าร้อยละการยับยั้งของสารทั้ง 2 มีค่าเท่ากับ 77 และ 96 ตามลำดับ

Sirigan and others (2006) ศึกษากิจกรรมการย่อยตัวเองและคุณลักษณะทางชีวเคมีเอนไซม์โปรตีเนสในปลา Indian anchovy โดยศึกษาทั้งผลของอุณหภูมิและโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลา Indian anchovy พบว่า เมื่อพิจารณาจากปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด ปลา Indian anchovy เกิดย่อยสลายตัวเองสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส การเกิดการย่อยสลายตัวเองที่อุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าเกิดจากเอนไซม์โปรตีเนสที่ทนความร้อน และยังพบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์สามารถลดการย่อยสลายโปรตีนได้

Yongsawatdikul and others (2006) ศึกษาความสามารถในการเกิดเจลของปลานวลจันทร์ (Small scale mud carp; *Cirrhiana microlepis*) ที่ผ่านการบดและบดแล้วล้างพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ที่สกัดจากเนื้อปลานวลจันทร์มีค่าสูงสุดที่สภาวะ pH 9 และอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และเกิดการย่อยสลายโปรตีนสูงสุดซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณเปปไทด์ที่ละลายในสารละลายกรด หลังจากบ่มเนื้อปลาบดในสภาวะต่างๆ มีค่าสูงสุดที่สภาวะ pH 10 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ซึ่งทำให้ทราบว่าเอนไซม์ที่พบในเนื้อปลานวลจันทร์เป็นอัลคาไลน์โปรตีเนสที่ถูกระตุ้นให้เกิด

กิจกรรมได้ด้วยความร้อน เมื่อมีการล้างเนื้อปลานวลจันทร์สดด้วยน้ำ 2 ครั้งพบว่าการย่อยสลายโปรตีนลดลงทั้งนี้เนื่องจากการล้างเนื้อปลาสดเป็นการกำจัดเอนไซม์โปรตีเนสและเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส โดยการล้างเนื้อปลานวลจันทร์สดครั้งเดียวทำให้คุณภาพของเจลดีกว่าเนื้อปลาสดและเนื้อปลาสดที่ผ่านการล้าง 2 ครั้ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ( $p \leq 0.05$ )

Mazorra-Manzano and others (2008) ศึกษาการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลาแปซิฟิกไวติง (Pacific whiting) ที่จับจากอ่าวแคลิฟอร์เนีย เมื่อศึกษากิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนทั้งหมดโดยศึกษาช่วง pH ต่างกัน พบว่า เนื้อปลาแปซิฟิกไวติงที่ผสมกับบัฟเฟอร์ที่มี pH ในช่วง 3.5-4.0 (acidic enzyme) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนทั้งหมดสูงสุดที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสโดยมีกิจกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 56 มิลลิโมลของไทโรซินต่อกรัมของโปรตีน ต่อ 60 นาที และเมื่อปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 6.75-7.0 (neutral proteinase) มีกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนทั้งหมดสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส โดยมีกิจกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 45 มิลลิโมลของไทโรซินต่อกรัมของโปรตีน ต่อ 60 นาที โดยเมื่อแบ่งเป็น pH ต่าง ๆ พบว่า ที่ pH เท่ากับ 3 กิจกรรมการย่อยสลายจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในขณะที่เมื่อ pH เท่ากับ 3.5 และ 4.0 กิจกรรมการย่อยสลายจะถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

Klomklao and others (2008) ศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์โปรตีเนสในเนื้อปลาชาร์ดิน (*Sardinops melanostictus*) พบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์สามารถลดการย่อยสลายโปรตีนได้เมื่อศึกษาผลของ pH พบว่า pH เท่ากับ 3.5 และ 9.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่สกัดจากเนื้อปลาชาร์ดินมากกว่า pH ช่วงอื่น ๆ และเมื่อศึกษาอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิเท่ากับ 55 และ 60 องศาเซลเซียส ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนสที่สกัดจากเนื้อปลาชาร์ดินมีค่าสูงกว่าช่วงอุณหภูมิอื่น ๆ เอนไซม์ที่พบในเนื้อปลาเป็นเอนไซม์กลุ่มโปรตีเนสชนิดซีรีนและแอสพาร์ติกเนื่องจากเปปสแตติน เอ (pepstatin A) ซึ่งสามารถยับยั้งโปรตีเนสชนิดแอสพาร์ติก และ soybean trypsin inhibitor PMSF และ TLCK สามารถยับยั้งโปรตีเนสชนิดซีรีน

สุญณีพร ตัญพงษ์ศรีรักษ์ (2551) รายงานว่าเนื้อปลาสวายโม่ที่ไม่ผ่านการล้างน้ำให้ความร้อน 1 ระดับที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จะให้ค่าความแข็งแรงของเจลสูงสุดเท่ากับ 721.55 กรัม.เซนติเมตร และค่าความยืดหยุ่นสูงสุดเท่ากับ 0.9 การล้างน้ำจะทำให้เจลมีค่าความขาวสูงกว่าการไม่ล้างน้ำ แต่ความแข็งแรงและความยืดหยุ่นของเจลลดลง และเมื่อผลของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำพบว่า ค่าความแข็งแรงของเจลลดลง ( $p \leq 0.05$ )