บทที่ 1
บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

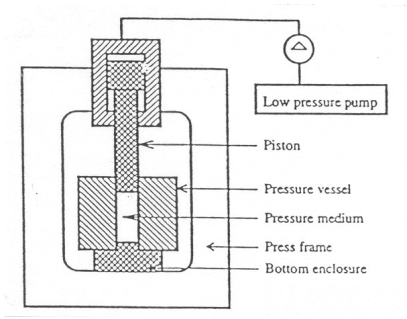
ปัจจุบันมีการนำเทคโนโลยีความดันสูงมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหารหลายประเภทโดยเฉพาะอุตสาหกรรมการแปรรูปสัตว์น้ำ ดังเช่น การใช้เทคโนโลยีความดันสูงในการผลิตผลิตภัณฑ์จากซูริมิในประเทศญี่ปุ่น และสามารถทำให้เนื้อปลาที่ผ่านการแช่แข็งเกิดเจลได้ โดยใช้ความดันระดับ 200 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส (Shoji *et al*., 1990) โดยการเกิดเจลในเนื้อสัตว์ชนิดต่างๆ มีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งจากการศึกษาของ Ko และคณะ (2003) พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างไมโอซินของปลานิล (tilapia) เมื่อให้ความดัน 50-200 เมกกะปาสคาล ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส นาน 0-60 นาที โดยที่ความดัน 150 เมกกะปาสคาล ไมโอซินเกิดการคลายเกลียวโปรตีนแล้วเกิดพันธะไดซัลไฟด์และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างโมเลกุลขึ้นใหม่ซึ่งทำให้เกิดเป็นเจลได้ Cheftel และ Culioli (1997) รายงานว่า ลักษณะเจลที่ได้จากความดันมีลักษณะแตกต่างจากเจลที่ได้จากความร้อนโดยมีลักษณะเงามัน โปร่งใส มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำได้ดี มีความแน่นเนื้อ นุ่มแต่เหนียวและยืดหยุ่นมากกว่าเจลที่ได้จากความร้อน ดังนั้นการสร้างพันธะในการเกิดเจลที่เกิดจากการแปรรูปทั้งสองแบบอาจจะมีความแตกต่างกัน (Mozhaev *et al*., 1994) นอกจากนี้มีแนวทางการนำความดันไปใช้ในโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีความสามารถในการเกิดเจลต่ำด้วยความร้อน ได้แก่ โปรตีนกล้ามเนื้อปลาหมึก (Nagashima *et al.,* 1993) และกุ้งกุลาดำ (ธิติมา จันทโกศล, 2547) ซึ่งสามารถเกิดเจลได้ด้วยความดันสูงกว่า 600 เมกกะปาสคาล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที และมากกว่า 400 เมกกะปาสคาล ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเจลกุ้งกุลาดำที่ได้มีความแข็งแรงของเจลต่ำเมื่อเทียบกับเจลจากเนื้อปลาที่มีคุณภาพที่เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องมีการปรับปรุงคุณภาพของเจล ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การเติมสารพอลิเมอร์เพื่อเพิ่มความแข็งแรงของเจล การเติมสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนส เช่น โปรตีนพลาสมาเลือดวัว พบว่า สามารถเพิ่มความแข็งแรงของเจลซูริมิที่ผลิตจากปลาแปซิฟิคไวทิ่ง (Pacific Whiting) (Chung *et al*., 1994) หรือการใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์ก็สามารถทำให้เจลซูริมิจากปลาอลาสก้าพอลล็อค (Alaska Pollock) และเนื้อไก่งวงบดมีความแข็งแรงของเจลเพิ่มขึ้นได้ (Ashie and Lanier, 1999) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงมีการศึกษาการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำบดโดยกระบวนการใช้ความดัน และเปรียบเทียบกับการใช้ความร้อน และศึกษาการปรับปรุงคุณภาพของเจลเนื้อกุ้งกุลาดำบดด้วยโปรตีนพลาสมาเลือดวัวและเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์

ตรวจเอกสาร

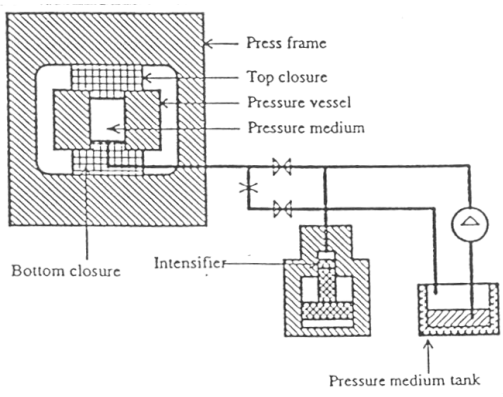
กระบวนการใช้ความดันสูง

ระบบกำเนิดความดันแบ่งเป็น 2 แบบ คือ แบบทางตรง และแบบทางอ้อม (Palou *et al*., 1999) โดยระบบการให้ความดันแบบทางตรง เกิดจากตัวกลางส่งผ่านความดันได้รับความดันจากปลายด้านเล็กของลูกสูบ และส่วนปลายด้านใหญ่ของลูกสูบจะถูกขับดันด้วยปั๊มความดันต่ำ ดังภาพที่ 1.1A ซึ่งการสร้างความดันด้วยวิธีนี้จะทำให้เกิดความดันขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่มีข้อจำกัดในระบบผนึก (high pressure dynamic seal) ระหว่างลูกสูบกับพื้นผิวภายในของช่องใส่ตัวอย่าง จึงทำให้วิธีนี้สามารถใช้ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ หรือในโรงงานต้นแบบเท่านั้น ซึ่งแตกต่างจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้ระบบการให้ความดันแบบทางอ้อม โดยการสูบตัวกลางส่งผ่านความดันจากภาชนะที่เก็บตัวกลางไปยังช่องใส่ตัวอย่างจนกระทั่งได้ความดันตามต้องการดังภาพที่ 1.1B (Barbosa-Canovas *et al*., 1997)

A.



B.



ภาพที่ 1.1 ระบบกำเนิดความดันสูง A. แบบทางตรง B. แบบทางอ้อม

High pressure systems; A: direct system; B: indirect system

Source: Barbosa-Canovas *et al.* (1997)

นอกจากนี้เรายังสามารถให้ความดันร่วมกับการควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระบบ คือ cold isostatic, warm isostatic และ hot isostatic system โดยในการเลือกใช้แต่ละระบบขึ้นอยู่กับการใช้งาน ซึ่งในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ใช้ระบบ cold isostatic และ warm isostatic (Leadley and Williams, 1997)

การใช้ความดันสูงในกระบวนการแปรรูปอาหาร

มีการเริ่มต้นใช้ความดันสูงครั้งแรกกับอาหารในปี 1899 โดยนักเคมีชาวอเมริกันได้ทดลองให้ความดันกับเนื้อที่ระดับ 40 ตัน อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 3 เดือน ไม่พบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และยังได้ทดลองกับนม โดยใช้ความดันระดับ 90 ตัน นาน 1 ชั่วโมง ก็ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดการเก็บรักษา 4 วัน นอกจากนี้เขายังใช้ความดันสูงกับผัก ผลไม้ ซึ่งให้ผลในการเก็บรักษาเป็นที่น่าพอใจ (Hite *et al*., 1899 อ้างโดย Gomes, 1997) เมื่อเทคโนโลยีการใช้ความดันสูงเป็นเทคโนโลยีที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ที่อุณหภูมิปานกลาง จึงเป็นเทคโนโลยีที่น่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากการใช้อุณหภูมิปานกลาง-ต่ำ มีผลต่อการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี และคุณลักษณะทางด้านประสาทสัมผัสน้อยกว่าการใช้ความร้อนในกระบวนการแปรรูป (Fellows, 1990) และการใช้ความดันสูง ยังใช้เวลาในการผลิตสั้นมาก คือ อยู่ในช่วง 2-30 นาที (พันธ์จิต พัฒโนภาษ, 2541) นอกจากนี้การใช้ความดันสูงจะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอทั่วทุกจุดของอาหาร ไม่ขึ้นกับรูปร่าง ขนาด และองค์ประกอบของอาหาร ดังนั้นขนาดภาชนะบรรจุ รูปร่าง และองค์ประกอบก็จะไม่มีผลในระหว่างการแปรรูปด้วยความดัน (Farkas and Hoover, 2000)

ต่อมามีการนำเทคโนโลยีความดันสูงมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตขนาดเล็กเพิ่มมากขึ้น ทั้งในกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์จากผลไม้ และอาหารทะเล เช่น การนำมาใช้กับเนื้อปลาดิบ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์และปรสิตลดลงได้ แต่จะต้องเก็บในสภาวะเย็น ซึ่งสามารถเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคปลาดิบได้มากขึ้น (Cheftel and Culioli, 1997) แต่ความดันก็ไม่สามารถทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ และสปอร์ได้ทั้งหมด เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถทนความดันได้ในระดับต่างกัน และสปอร์ของจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งได้ก็ต่อเมื่อสปอร์งอกแล้วเท่านั้น ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยในการบริโภคสูงสุดจึงจำเป็นต้องใช้ความดันร่วมกับอุณหภูมิ หรือการใช้ร่วมกับสภาวะอื่นๆ เช่น การใช้กระแสไฟฟ้าเป็นช่วงๆ การใช้คลื่นอัลตราโซนิค การใช้สารเคมี เช่น กรดซอร์บิค กรดเบนโซอิค ไคโตแซน เป็นต้น (Mozhaev *et al*., 1994) และในปัจจุบันมีการพัฒนาปรับปรุงเครื่องจักรการผลิตให้มีอัตราการผลิตสูงขึ้นจนสามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ (พันธ์จิต พัฒโนภาษ, 2541) อีกทั้งมีต้นทุนการใช้พลังงานต่ำโดยพบว่าการผลิตด้วยความดันที่ระดับ

400 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที มีต้นทุนในการใช้พลังงานต่ำกว่าการผลิตด้วยการให้ความร้อน (Cheftel and Culioli, 1997)

นอกจากเทคโนโลยีความดันสูงจะมีผลต่ออาหารดังที่กล่าวมาแล้วเทคโนโลยีความดันสูงยังมีข้อได้เปรียบ และข้อจำกัดในกระบวนการแปรรูปอาหาร แสดงดังตารางที่ 1

ผลของการให้ความดันสูงจะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิของอาหาร โดยทำให้เกิดความร้อนโดยไม่มีการสูญเสีย (adiabatic heating) ได้ 3 องศาเซลเซียส เมื่อมีการให้ความดันทุกๆ 100 เมกกะปาสคาล ทั้งนี้ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหาร เช่น อาหารที่มีปริมาณไขมันอัตราการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิก็จะมากขึ้นและเมื่อมีการลดความดันลง อาหารจะเย็นลงจนถึงอุณหภูมิเริ่มต้นที่ให้ความดัน ถ้าไม่มีการสูญเสียความร้อนไปในช่วงที่มีการคงความดัน และพบว่าอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบน้อยกว่าร้อยละ 25 และมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันจะมีอัตราเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอย่างสม่ำเสมอ เนื่องจากการให้ความดันจะทำให้อุณหภูมิกระจายทั่วชิ้นของอาหาร การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิเกิดจากการถ่ายโอนความร้อนของอาหารไปยังผนังช่องอัดความดัน ดังนั้นช่องอัดความดันที่ดีจะต้องมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ (isothermal) (Farkas and Hoover, 2000)

นอกจากนี้การให้ความดันสูงทำให้เกิดการลดลงของปริมาตรอาหาร และมีการขยายตัวกลับมาเหมือนเดิมเมื่อมีการลดความดัน ด้วยเหตุนี้ภาชนะบรรจุที่มีการใช้กับอาหารที่ต้องการนำมาให้ความดัน จะต้องสามารถทนการลดลงของปริมาตรได้ถึงร้อยละ 15 และคงสภาพเหมือนเดิมได้โดยปราศจากการฉีกขาดของรอยปิดผนึก (Farkas and Hoover, 2000)

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius)

กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabrioius) มีชื่อเรียกเป็นภาษาอังกฤษว่า black tiger shrimp หรือ Jumbo tiger shrimp กุ้งชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Penaeidae ในขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ลำตัวจะมีสีม่วงแดงมีแถบสีน้ำตาลหรือดำพาดขวาง ลำตัวเป็นปล้องๆ โคนขาว่ายน้ำมีแถบสีเหลืองเป็นปล้องๆ เปลือกหัวเกลี้ยงไม่มีขน หนวดมีสีดำ ไม่มีลาย พันกรีด้านบนมี 7-8 ซี่ ด้านล่างมี 3 ซี่ ร่องข้างกรีทั้งสองข้าง มีลักษณะแคบและยาวไม่ถึงพันกรีอันสุดท้าย ที่ขาเดินคู่ที่ 5 ไม่มีรยางค์อันนอก กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในวงศ์ Penaeidea ถิ่นอาศัยของกุ้งกุลาดำ ได้แก่ น่านน้ำแถบไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และที่พบมากได้แก่ ออสเตรเลียและอินเดีย กุ้งชนิดนี้ อยู่ในเขตร้อนชอบอาศัยอยู่บริเวณน้ำลึก ห่างออกจากชายฝั่งและชอบพื้นทะเลที่เป็นดินทราย สามารถทนอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ เช่น บริเวณป่าชายเลน เป็นต้น จัดเป็นกุ้งที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว (นุจรินทร์ เกตุนิล, 2545)

ตารางที่ 1.1 ข้อได้เปรียบและข้อจำกัดของการใช้ความดันสูงในกระบวนการแปรรูปอาหาร
Advantages and limitation of high hydrostatic pressure treatment for food processing operations

Treatment	Advantages
Instant response	Immediate distribution throughout product (in the absence of gases)
Even distribution	Independence of sample size and geometry
Low/ambient temperature	Reducing thermally generated quality reduction/losses
Application affects (directly) mainly non – covalent bonds	Quality retention (i.e., flavor, color, nutrients)
Increased reaction rates	Increased bioconversion rates; increased metabolite production; improved separation processes
Affects phase transition	Process and product development (i.e., gelling, melting, crystallization)
Degassing	Improved heat transfer, reduced oxidation
Membrane permeabilization	Aids separation processes
Waste-free technology	Environmentally friendly process
Volume compression	Compacting, forming, coating
Affects enzyme activity	Food preservation
Affects microbial activity	Food preservation
Differs from thermal effects	Selective process/ product development (i.e., pressure induced gelling)
Adiabatic heating	Additional temperature effect
pH reduction	Additional pH effect
Treatment	**Limitations**
Membrane permeabilization	Stress reaction (plants, microorganisms), texture effect
Residual enzyme activity	Quality effects
Incomplete microbial inactivation	Safety and quality effects
Reaction enhancement	Quality effects (i.e., enzymatic browning)
Temperature effects	Adiabatic heating, heat of fusion
Volume effects	Compression of water

Source: Knorr (1999)

1. องค์ประกอบทางเคมีของกุ้งกุลาดำ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1.2 องค์ประกอบทางเคมีของกล้ามเนื้อกุ้งกุลาดำ

Chemical composition of black tiger shrimp muscle

Chemical composition	**percentage**[1]	**Percentage**[2]
Protein	20.70-21.56	18.00-18.12
Carbohydrate	0.92-1.54	-
Lipid	0.14-0.15	0.30-0.32
mositure	76.07-76.25	77.94-78.68
Ash	1.13-1.54	0.78-0.84

- no determination

Source: [1] Pitukkosornpong (1992)

[2] Juntagosorn (2004)

2. โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบ

กล้ามเนื้อสัตว์น้ำประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิด แต่ละชนิดมีหน้าที่แตกต่างกัน โดยสามารถจำแนกโปรตีนกล้ามเนื้อเป็นกลุ่มต่างๆ (Sikorski and Pan, 1994) ดังนี้

2.1 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก มีอยู่ร้อยละ 30 ของโปรตีนทั้งหมด สามารถละลายน้ำหรือสารละลายเกลือที่มีความแรงของไอออนต่ำ (น้อยกว่า 0.15) โปรตีนชนิดนี้ ได้แก่

2.1.1 เอนไซม์ กล้ามเนื้อสัตว์น้ำมีเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) จำนวนมาก

2.1.2 โปรตีนเม็ดสี โปรตีนฮีมเป็นแหล่งของเม็ดสีที่สำคัญโดยมีผลต่อลักษณะสีแดงของเนื้อ เม็ดสีที่สำคัญ ได้แก่ ออกซีไมโอโกลบิน(oxymyoglobin) และออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) แต่ในสัตว์จำพวกกุ้งและปู ประกอบด้วยโปรตีนที่มีทองแดง เรียกว่า ฮีโมไซยานิน (hemocyanin) ปกติไม่มีสี แต่เมื่อทิ้งเลือดให้ถูกอากาศภายนอกจะกลายเป็นสีฟ้า (Haard *et al*., 1994)

2.1.3 โปรตีนไม่แข็งตัวเป็นโปรตีนเลือด ที่เป็นไกลโคโปรตีน(glycoprotein) ซึ่งประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต และไกลโคเจน พบมากในเมือกและตับ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2548)

2.2 สโตรมาร์ เป็นส่วนที่เหลือจากการสกัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิก และโปรตีนไมโอไฟบริล ประกอบด้วย เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue protein) เช่น คอลลาเจน

และอิลาสติน ซึ่งในกุ้งพบประมาณร้อยละ 2.4-2.6 ของโปรตีนทั้งหมด (Sikorski and Borderias, 1994) และคอลลาเจนจากกุ้ง ประกอบด้วยทริปโตเฟนในระดับสูง และมีคอลลาเจนกลุ่มหลัก คือ type AR-I

2.3 โปรตีนไมโอไฟบริล เป็นโปรตีนหลักในกล้ามเนื้อสามารถสกัดได้ด้วยสารละลายเกลือที่มีความแรงไอออนมากกว่า 0.15 (อยู่ในช่วง 0.1-0.3) โดยทั่วไปเนื้อสัตว์จะประกอบด้วยโปรตีนไมโอไฟบริลร้อยละ 40-60 โดยมีบทบาทสำคัญต่อการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อการเคลื่อนที่ ซึ่งมีความสำคัญต่อการอุ้มน้ำของเนื้อและความสามารถในการเกิดเจล

3. เอนไซม์ย่อยโปรตีนในสัตว์น้ำ

เอนไซม์ย่อยโปรตีนในสัตว์น้ำมีมากมายหลายชนิดและสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามแหล่งที่พบเอนไซม์ คือ (Klimova *et al.,* 1990)

3.1. เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อ

เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำมีหลายชนิด โดยสามารถพบได้ในส่วนของของเหลวภายนอกเซลล์ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบบริเวณกล้ามเนื้อ ซึ่งล้วนแต่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ (Koloddziejska and Sikorski, 1996)

3.1.1 คาเธปซิน (cathepsin) คาเธปซินจัดอยู่ในกลุ่มของซีสเตอีนโปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ สามารถพบได้มากในไลโซโซม (lysosomal protease) โดยในไลโซโซมมีคาเธปซินประมาณ 13 ชนิด เอนไซม์ที่พบมากในกลุ่มนี้ ได้แก่ คาเธปซิน L B และ D (Aranishi *et al.,*1997) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อปลา คาเธปซิน L เป็นเอนไซม์โปรตีนเอสที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนหลายชนิด เช่น ไมโอซิน (myosin) แอกติน (actin) นีบูลิน (nebulin) ไซโตโซลิกโปรตีน (cytosolic protein) คอลลาเจน (collagen) และอีลาสติก (elastic) (Kirschke and Barrett, 1987) คาเธปซินสามารถพบได้ในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลาชุม แซลมอน *(Oncorhynchus keta)* (Yamashita and Konagaya, 1990) ปลาแมคเคอเรล *(Scomber japonicus)* (Lee *et al.,*1993) ปลาแปซิฟิกไวทิ่ง *(Merluccius productus)* (An *et al.,* 1994) และปลานิล (*Tilapia nilotica*, *Tilapia aurea*) (Jiang *et al*., 1990) นอกจากนี้ยังพบในกุ้ง *(Penaeus japonicus)* และกุ้งกุลาดำ *(Penaeus monodon)* (Jiang *et al*., 1991)

3.1.2 คาลเพน (calpain) คาลเพนจัดอยู่ในกลุ่มของซีสเตอีนโปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่พบภายในเซลล์ โดยทั่วไปคาลเพนสามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างที่เป็นกลาง และกิจกรรมของคาลเพนถูกกระตุ้นโดยแคลเซียม (neutral calcium-dependent proteinases) และถูกยับยั้งโดย Calpastatin (Toyohara and Makinodan, 1989; Jiang *et al.,* 1991; Geesink *et al*.,

2000) คาลเพนเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย เนื่องจากภายหลังการตายไมโทคอนเดรีย และซาร์โคพลาสมิกเรกติคูรัมสูญเสียหน้าที่ในการทำงาน ก่อให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมไอออนในกล้ามเนื้อ และทำให้ระดับความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้นจากปกติซึ่งมีผลไปกระตุ้นการทำงานของคาลเพน คาลเพนสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามความต้องการปริมาณแคลเซียมในการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ คือ ไมโคร-คาลเพน ([μ]-calpain) และมิลลิ-คาลเพน ([m]-calpain) (Toyohara and Makinodan, 1989; Jiang *et al.,* 1991; Geesink *et al*., 2000) คาลเพนสามารถพบในกล้ามเนื้อสัตว์น้ำ เช่น ปลากะพง (*Dicentrarchus labrax L*.) (Delbarre-Ladrat *et al.,* 2004) ปลานิล (*Tilapia nilotica* and *Tilapia aurea*) (Jiang *et al.,* 1991) ปลาคาร์ฟ (Toyohara and Makinodan, 1989) รวมไปถึงสัตว์จำพวกครัสเตเชีย (Mykles and Skinner, 1986)

3.1.3 อัลคาไลน์โปรตีเอส (alkaline protease) เป็นเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์นี้มีช่วงความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการทำงานเป็นด่าง (ความเป็นกรดด่าง 9.5-10) (Natalia *et al.,* 2004) และมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูง (มากกว่า 50 องศาเซลเซียส) สามารถย่อยสลายโปรตีนไมโอไฟบริล โดยเฉพาะไมโอซิน (Wasson *et al.,* 1992)

3.2 เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเครื่องใน

การย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อที่มีผลต่อการสูญเสียคุณภาพของสัตว์น้ำ สามารถเกิดจากเอนไซม์ที่พบในเครื่องในเช่นเดียวกับที่เกิดจากเอนไซม์ที่พบในกล้ามเนื้อ โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบในเครื่องในส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มซีรีนโปรตีเอส เช่น ทริปซิน หรือไคโมทริปซิน เป็นต้น ยกเว้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่สกัดได้จากกระเพาะอาหารเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มแอสปาร์ติกเอส เช่น เปปซิน เป็นต้น (Gimenez *et al.,* 2001)

3.2.1 คอลลาจีเนส (collagenase) คอลลาจีเนสจัดอยู่ในกลุ่มของซีรีนโปรตีเอสเป็นเอนไซม์ที่พบในตับอ่อนและระบบทางเดินอาหารของสัตว์น้ำ คอลลาจีเนสสามารถย่อยสลายคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งให้ความแข็งแรงต่อโครงสร้างกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำที่ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น กุ้งหรือกุ้งก้ามกราม เป็นต้น โดยทั่วไปคอลลาเจนในสัตว์น้ำสามารถย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้สูงกว่าคอลลาเจนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Mizuta *et al.,* 1991) และมีบทบาทสำคัญต่อการอ่อนตัวของกล้ามเนื้อสัตว์น้ำในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ รวมทั้งก่อให้เกิดช่องว่าง (gaping) ในปลาเนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีนในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Hernandez-Herrero *et al.,* 2003) Kristjansson และคณะ (1995) ศึกษาคุณลักษณะของคอลลาจีเนสที่สกัดได้จากเครื่องในของปลาแอตแลนติกคอด (*Gadus morhua*) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ คือ ความเป็นกรดด่างระหว่าง 8.0-9.5 แต่จะสูญเสียกิจกรรมที่ความเป็นกรดด่างต่ำกว่า 7.0 และมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดที่อุณหภูมิระหว่าง

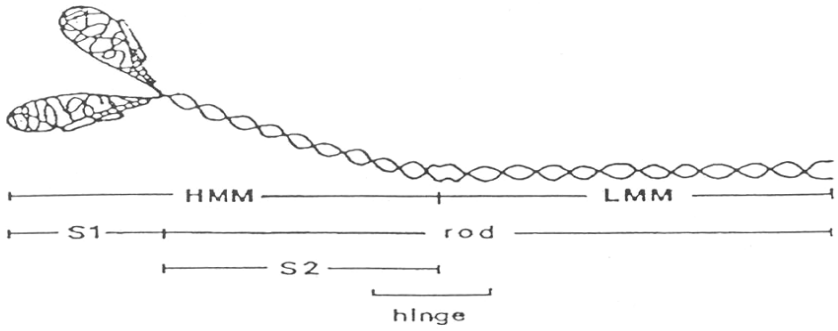
45-50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับคอลลาจีเนสที่ได้จากปลาคาร์ฟ ปลาดุก และกุ้ง (Grant *et al*., 1986; Yoshinaka *et al*., 1986; Tsai *et al*., 1991) กิจกรรมของเอนไซม์สามารถถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งเอนไซม์โปรตีนเอสจากถั่วเหลือง คอลลาจีเนสมีความสามารถย่อยสลายคอลลาเจลชนิดที่ 1 และ 3 ซึ่งมีคุณลักษณะใกล้เคียงกับไคโมทริปซินในสัตว์กลุ่มครัสเตเชีย (Roy *et al*., 1996)

3.2.2 ทริปซิน (trypsin) ทริปซินจัดอยู่ในกลุ่มของซีรีนโปรตีเอส เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์จากตับอ่อนสามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรดด่างเป็นกลางถึงด่าง และจัดเป็นเอนไซม์กลุ่มเอนโดเปปติเดส (endopeptidase) ทริปซินและไคโมทริปซินในกุ้ง (*Litopenaeus schmitti*) มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 14.6-21.7 กิโลดาลตัน และ 28.9 32.0 และ 37.7 กิโลดาลตัน ตามลำดับ (Lemos *et al*., 2000) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่คล้ายคลึงกับทริปซินของกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) (Jiang *et al*., 1991) และไคโมทริปซินของกุ้งขาว (*L. vannamei*) (Hernandez-Cortes *et al*., 1997)

4. โปรตีนไมโอไฟบริล ประกอบด้วย

4.1 ไมโอซิน เป็นโปรตีนสำคัญของฟิลาเมนท์หนา (thick filament) มีประมาณร้อยละ 45 ของโปรตีนไมโอไฟบริล ไมโอซินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480,000 ดาลตัน (Foegeding *et al*., 1996) และมีรูปร่างโมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 1.2 ประกอบด้วยส่วนหัวของโมเลกุล เป็นส่วนของโปรตีนทรงกลม (globular protein) เรียกโมเลกุลส่วนไมโอซินนี้ว่า ซับแฟรกเมนท์ที่ 1 (subfragment-1: S1) ซึ่งในส่วนนี้มีเอนไซม์ ATPase ที่สามารถมีอันตรกิริยากับแอกตินได้ และส่วนหางของโมเลกุล เรียกว่า ส่วนท่อน (rod) และในส่วนหางนี้มีโซ่พอลิเปปไทด์เหมือนกัน 2 โซ่ รวมตัวกันเป็นโครงสร้างเกลียวแอลฟา (α-helical structure) เมื่อใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น แอลฟาไคโมทริปซิน และทริปซิน ย่อยส่วนหางนี้ จะได้องค์ประกอบ 2 ส่วนที่สำคัญ คือ ส่วนของเมอร์โรไมโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (light meromyosin: LMM) และซับแฟรกเมนท์ที่ 2 (subfragment-2: S2) (Suzuki, 1981) สัตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีปริมาณไมโอซินแตกต่างกันโดยมีปริมาณสูงสุดขณะจับได้ใหม่ๆ แต่จะมีปริมาณลดลงเป็นลำดับตามระยะเวลาการเก็บรักษา ความยืดหยุ่นของเนื้อสัตว์น้ำขึ้นอยู่กับปริมาณไมโอซิน (Sikorski *et al*., 1990)

4.2 แอกติน เป็นองค์ประกอบของฟิลาเมนท์บาง (thin filament) มีประมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนไมโอไฟบริล มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วที่มีขนาดเท่ากันเรียงต่อกัน ดังภาพที่ 1.3 โมโนเมอร์ของแอกตินเรียกว่า globular actin หรือ จี-แอกติน (G-actin) และจะเรียงตัวกันเป็นโครงสร้างแบบ double-helical structure เรียกว่า fibrous actin หรือ เอฟ-แอกติน (F-actin) แอกตินมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42,000-48,000 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 374-375 ตัว ฟิลาเมนท์ของเอฟ-แอกติน สามารถมีอันตรกิริยากับส่วนหัวของไมโอซิน (Foegeding *et al*., 1996)



ภาพที่ 1.2 รูปร่างโมเลกุลของไมโอซิน

Structure of myosin (HMM : Heavy meromyosin; LMM : Light meromyosin; S1: Subfragment-1; S2: Subfragment-2)

Source: Xiong (1997)

4.3 แอกโตไมโอซิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของแอกตินและไมโอซิน ไมโอซินและแอกตินจับรวมตัวกันด้วยพันธะที่ไม่ใช่พันธะโควาเลนต์ ซึ่งสามารถแยกออกได้ง่ายโดยองค์ประกอบที่มีพลังงานสูงหรือมีความแรงของอิออนสูง แอกโตไมโอซินที่สกัดได้ประกอบด้วยไมโอซิน และแอกตินเป็นส่วนใหญ่ และอาจประกอบด้วยองค์ประกอบอื่นๆ เช่น ซี-โปรตีน โทรโปไมโอซิน โทรโปนิน (Xiong, 1997)

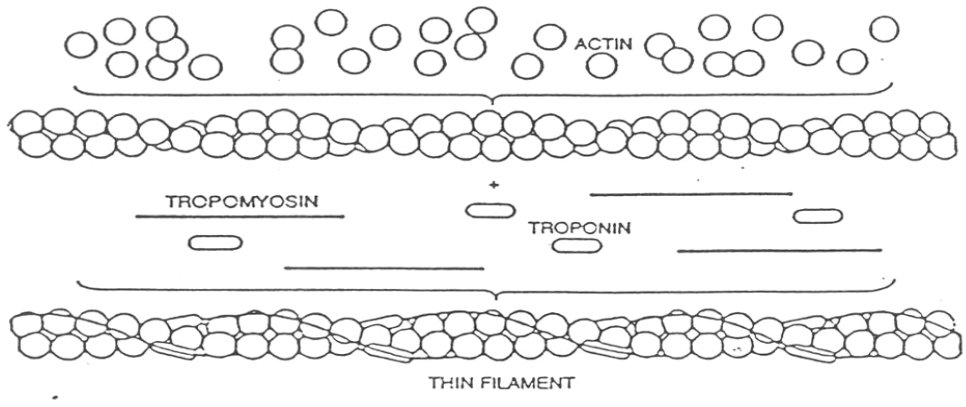
4.4 โทรโปไมโอซิน มีประมาณร้อยละ 5 ของโปรตีนไมโอไฟบริล มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 68,000 ดาลตัน มีลักษณะคล้ายส่วนหางของไมโอซิน ในโทรโปไมโอซินแต่ละเส้นประกอบด้วยจี-แอกติน 7 โมเลกุล (Foegeding *et al*., 1996)

4.5 โทรโปนิน เป็นโปรตีนชนิดโกลบูลาร์มีประมาณร้อยละ 8-10 ของโปรตีนไมโอไฟบริล ส่วนใหญ่มักอยู่รวมกับโทรโปไมโอซิน ประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย

4.5.1 โทรโปนิน-ซี ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดที่เป็นกรด และมีบทบาทในการจับกับแคลเซียมอิออน และมีผลต่อ calcium sensivity มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 17,000-18,000 ดาลตัน

4.5.2 โทรโปนิน-ไอ สามารถยับยั้งกิจกรรมของ ATPase มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 20,000-24,000 ดาลตัน

4.5.3 โทนโปนิน-ที ทำหน้าที่ในการจับกับโทรโปไมโอซิน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 37,000-40,000 ดาลตัน (McCormick, 1994; Foegeding *et al.,* 1996)



ภาพที่ 1.3 องค์ประกอบของฟิลาเมนท์เส้นบาง

Proteins of thin filament

Source: Foegeding *et al.* (1996)

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนกล้ามเนื้อ

สมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนคือ สมบัติทางกายภาพและเคมีของโปรตีนที่มีผลต่อพฤติกรรมของโปรตีนในอาหารระหว่างการผลิต การเก็บรักษา การเตรียมก่อนบริโภค และการบริโภค สมบัติเชิงหน้าที่จึงเป็นสมบัติที่มีผลต่อคุณภาพ และระดับการยอมรับทางประสาทสัมผัสของอาหาร (Kinsella, 1976)

การเกิดเจลของโปรตีนก็เป็นสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนเช่นกัน โดยเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนจับกันด้วยพันธะต่างๆ เกิดเป็นโครงร่างตาข่ายสามมิติที่สามารถจับน้ำหรือสารอื่นๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายใน ซึ่งในอาหารประเภทเนื้อสัตว์และสัตว์น้ำ โปรตีนที่สามารถเกิดเป็นโครงข่ายได้นั้นเป็นกลุ่มโปรตีนไมโอไฟบริล (Myofibril protein) (Sikorski, 2001) และเจลที่เกิดขึ้นจะมีลักษณะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 1.3 ได้แก่ ปัจจัยจากคุณสมบัติภายในของโปรตีนเอง โดยเฉพาะโครงสร้างโมเลกุลทั้งที่เป็นโครงสร้างตามธรรมชาติ หรือโครงสร้างภายหลังการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ปัจจัยสิ่งแวดล้อม รวมทั้งสภาวะของกระบวนการแปรรูป (Kinsella, 1976)

ตารางที่ 1.3 ปัจจัยบางประการที่มีผลต่อสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน

Effect of some factors on functional property of protein

Intrinsic factors	**Environmental factors**	**Processing treatments**
Compsition of proteins	pH	Heating
Conformation of proteins	Redox status	pH
Mono or Multicomponent	Salt, Ions	Ionic strength
Homogeneity-Heterogeneity	Water	Reducing agents
	Carbohydrate	Storage conditions
	Lipids	Drying
	Surfactants	Physical, Chemical,
	Flavors	Enzymatic modification

Source: Kinsella (1976)

ผลของสภาวะการแปรรูปต่อโปรตีน

โครงสร้างโมเลกุลของโปรตีน แบ่งได้เป็น โครงสร้างแบบปฐมภูมิ ทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ ซึ่งโครงสร้างของโมเลกุลต่างๆ เหล่านี้เกิดจากการจับกันด้วยพันธะหลายรูปแบบ และแต่ละพันธะนั้นมีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ ได้แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1.4

1. ผลของการใช้ความร้อนต่อโปรตีน

1.1 ผลของความร้อนต่อโครงสร้างและพันธะภายในของโปรตีน

กลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนด้วยความร้อนมีความซับซ้อนมาก โดยมีผลต่อความคงตัวของพันธะที่มิใช่พันธะโควาเลนต์ ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาแรงกระทำระหว่างประจุ และแรงแวนเดอวาล์ว ซึ่งเป็นอันตรกิริยาที่คายความร้อนในธรรมชาติ ดังนั้นจึงไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงและคงตัวที่อุณหภูมิต่ำ อย่างไรก็ตามพันธะเปปไทด์ไฮโดรเจนในโปรตีนเป็นพันธะที่แฝงอยู่ในส่วนกลางของโครงสร้างจึงสามารถคงตัวอยู่ได้ในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง ในอีกทางหนึ่งอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกเป็นอันตรกิริยาที่ดูดความร้อน ดังนั้นจึงสามารถคงตัวที่อุณหภูมิสูง และไม่คงตัวที่อุณหภูมิต่ำ แต่ความคงตัวของอันตรกิริยาของไฮโดรโฟบิกก็มีอย่างจำกัด โดยมีความแข็งแรงมากที่สุดที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียส (Damodaran, 1996)

เมื่อมีการให้ความร้อนกับโปรตีน โปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงดังภาพที่ 1.4 ดังนี้ สายโซ่ด้านข้างของโปรตีนที่อยู่ภายในโครงสร้างโปรตีนมีการคลายตัวมากขึ้น ทำให้เกิดการ

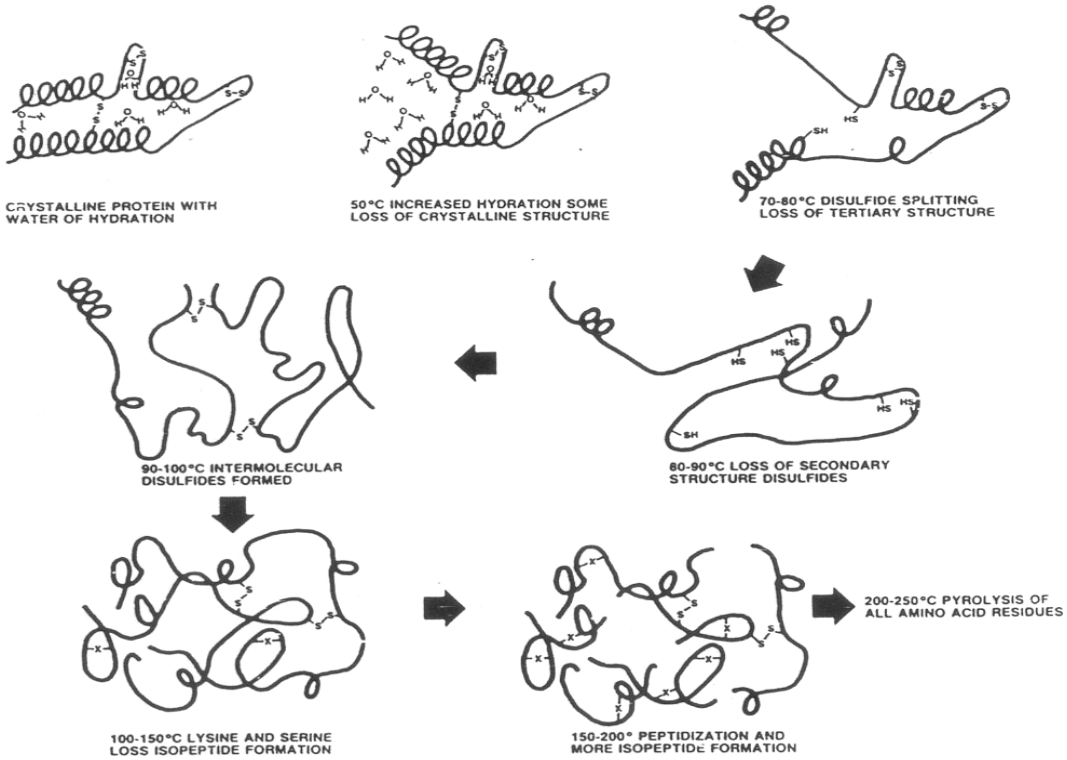
เปลี่ยนแปลงระดับของโครงสร้างโปรตีน ดังเช่น จากจตุรภูมิเป็นตติยภูมิ จากตติยภูมิเป็นทุติยภูมิ เมื่อมีการคลายตัวของโครงสร้างเฮลิกซ์แล้วพันธะโควาเลนต์จะถูกทำลาย และในที่สุดพันธะเปปไทด์ของกรดอะมิโนก็ถูกทำลายไปด้วยความร้อน (Finley, 1989)

ตารางที่ 1.4 คุณสมบัติของอันตรกิริยาที่ทำให้เกิดความคงตัวของโครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิ

Properties of the interactions stabilizing the secondary, tertiary and quaternary structures of proteins

Type of interaction	Energy ($kj.mol^{-1}$)	Functional Groups involved	Destabilizing conditions	Stabilizing conditions
Covalent and Semi-covalent	330-400 (peptide bond) 200 (S-S bond)	-NH-CO-(peptide bond) Cystine S-S	Reducing agents: β-mercaptoethanol, dithiothreitol (S-S bonds)	Increased reactivity of SH groups above pH7
Electrostatic	42-48	Amino acid residues with carboxyl COO^- (e.g.Asp,Glu) and amino NH_4^+ (e.g.His,Arg,Lys)groups	Salt solutions, high or low pH values, pressure	
Hydrogen bonds	8-40	H atom of OH or NH (proton donor) group shared with CO (proton acceptor) group,e.g. -N-H- - - - O=C -O-H- - - - O=C	Solutions with guanidine HCl, urea or detergents, heating	Cooling
Hydrophobic	4-12	Amino acid residues with aliphatic (e.g. Leu, Ite, Val) or aromatic (e.g. Phe,Tyr) side chains	Detergents, pressure (aliphatic side chains), heating at high temperatures	Moderate heating, pressure (stacking of aromatic side chains)
Vander Waals	1-9	Permanent, induced and instantaneous dipoles		

Source: Messen *et al*. (1997)



ภาพที่ 1.4 การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนระหว่างการให้ความร้อน

Changes a protein undergoes during heat treatment

Source: Finley (1989)

1.2 ผลของความร้อนต่อการเกิดเจลโปรตีนกล้ามเนื้อ

โดยทั่วไปโครงข่ายเจลของโปรตีน ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก อันตรกิริยาแรงกระทำระหว่างประจุ และพันธะไดซัลไฟด์ ทั้งนี้การกระจายตัวของแรงเหล่านี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน สภาวะในการให้ความร้อน การสูญเสียสภาพธรรมชาติอย่างต่อเนื่อง และสภาวะแวดล้อมของโปรตีน (Damodaran, 1996)

โครงข่ายเจลที่ไม่สามารถผันกลับได้ของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกและมีความแข็งแรงที่อุณหภูมิสูง สามารถแบ่งขั้นตอนในการเกิดเจลเป็น 2 ขั้นตอน (Ziegler and Aton, 1984) คือ ขั้นตอนการแตกตัวของโปรตีนไมโอไฟบริล โดยเกิดการบวมของไมโอไฟบริลที่เกิดจากแรงผลักระหว่างประจุภายในเส้นใยโปรตีน การแยกออกจากกันของเส้นใยโปรตีน และการแยกออกของแอกตินจากไมโอซิน หรือการแยกของแอกโตไมโอซินจากโครงสร้างไมโอไฟบริล ดังตารางที่ 5 ซึ่งแสดงถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติ เนื่องจากความร้อน

ตารางที่ 1.5 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบของโปรตีนแอกโตไมโอซินธรรมชาติระหว่างการให้ความร้อน

Conformational changes which may occur during the thermal denaturation of nature actomyosin

Temperature (°C)	Protein (s) or segment involved	Description of events
30-35	Native tropomyosin	Thermally dissociate from the F-actin backbone
38	F-actin	Super helix dissociates into singel chains
40-45	Myosin	Dissociates into light and heavy chains
	Head	Possibly some conformational change
	Hinge	Helix to random coil transformation
45-50	Actin,myosin	Actin-myosin complex dissociates
50-55	Light meromyosin	Helix to coil transformation and rapid aggregation
>70	Actin	Major conformational changes in the G-actin monomer

Source: Ziegler and Aton (1984)

ของโปรตีนแอกโตไมโอซินธรรมชาติ และขั้นตอนที่สอง คือ ขั้นตอนการเกิดเจล โปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติเริ่มเกิดพันธะที่มิใช่พันธะโควาเลนต์ในการสร้างโครงข่ายโมเลกุลอย่างมีระเบียบในระหว่างการให้ความร้อน

ในองค์ประกอบทั้งหมดของโปรตีนไมโอไฟบริล ไมโอซินเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญที่มีผลต่อการเกิดเจล (Asghar *et al*., 1985) การแผ่ตัวออกจากโครงสร้างไมโอซินแตกต่างกันขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่อยู่อาศัยของสัตว์นั้นๆ โดยไมโอซินจากปลามีความคงตัวต่ออุณหภูมิ (thermal stability) น้อยกว่าจากสัตว์เลือดอุ่น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอันเนื่องมาจากอุณหภูมิสูง (thermal denaturation) และอุณหภูมิต่ำ (freeze denaturation) จึงเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าสัตว์เลือดอุ่น การสูญเสียโครงสร้างตามธรรมชาติของไมโอซินสกัดจากกระต่ายเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส ในขณะที่ไมโอซินจากปลาคาร์ฟสูญเสียโครงสร้างที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส (Akahane *et al*., 1985) สำหรับการสูญเสียโครงสร้างตามธรรมชาติของแอกตินเป็นไปในลักษณะเดียวกัน คือ แอกตินของกระต่ายและปลาคาร์ฟเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 82 องศาเซลเซียส และ 75 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และได้มีรายงานว่าปลาที่อาศัยอยู่ในเขตน้ำเย็นมากขึ้น ไมโอซินจะมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยลง โดยติดตามได้จากการสูญเสีย ATPase activity ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างส่วนหัวของไมโอซินและจากการสูญเสียโครงสร้างแอลฟา-เฮลิกซ์ในส่วนหาง (Ogawa *et al*., 1993)

องค์ประกอบที่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเจลของโมเลกุลไมโอซิน คือ ไมโอซินเส้นหนัก (MHC) โดย Samejima และคณะ (1984) Chan และคณะ(1992a, b) และ Yongsawatdigul และคณะ (1997) ศึกษาความยืดหยุ่นของเจล พบว่าความยืดหยุ่นของซูริมิเจลจาก Pacific whiting มีค่าแปรผันตามปริมาณไมโอซินเส้นหนัก ซูริมิที่ผลิตจากปลาที่มีเอนไซม์โปรตีเนสอยู่ในกล้ามเนื้อเป็นจำนวนมาก มักจะเกิดปัญหาทำให้เจลมีลักษณะยุ่ยเละ เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายของไมโอซินโดยใช้ไมโอซินเส้นหนักเป็นสารตั้งต้นได้เป็นอย่างดี

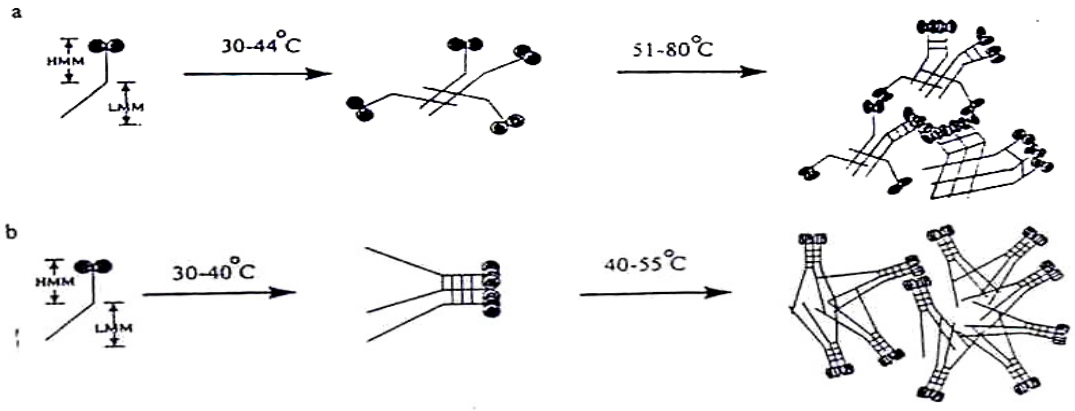
แอกตินนั้นไม่มีคุณสมบัติในการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างสามมิติ แต่อย่างไรก็ตาม Yasui และคณะ (1980) พบว่าตัวอย่างเจลที่มีส่วนผสมระหว่างไมโอซินและแอกตินมีค่าความแข็งแรงมากกว่าตัวอย่างที่มีไมโอซินแต่เพียงอย่างเดียว จึงถือว่าแอกตินมีส่วนส่งเสริม (synergistic effect) ความแข็งของเจล ซึ่งเกิดจากการรวมตัวระหว่างเอฟ-แอกติน และไมโอซินบางส่วนเกิดเป็นแอกโตไมโอซิน ซึ่งเป็นตัวเชื่อมกับไมโอซินที่เหลืออยู่ในรูปอิสระ และทำให้เกิดโครงสร้างเจลที่แข็งแรง (Yasui *et al*., 1982) สำหรับโทรโปนิน และโทรโปไมโอซินนั้นไม่มีผลต่อการเกิดเจลของแอกโตไมโอซิน (Samejima *et al*., 1982) ทั้งนี้เนื่องจากโทรโปไมโอซินเป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนได้สูง จึงไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านโครงสร้าง และไม่เกิดการจัดเรียงตัวเป็นโครงข่ายร่างแห

ส่วนหางของไมโอซินที่เป็นเกลียวแอลฟา-เฮลิกซ์ มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดโครงข่ายร่างแห (Samejima *et al*., 1981) ค่าความแข็งแรงของเจลที่เตรียมจากส่วนของเกลียวแอลฟา-เฮลิกซ์ มีค่าสูงกว่าเจลที่ได้จากส่วนเอส-1 (S1) โครงสร้างตัวอย่างที่เตรียมจากเอส-1 มีลักษณะการต่อเรียงกันเป็นแถว (bead-like structure) และไม่เกิดเป็นร่างแห ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเป็นตะกอนของโปรตีน (curd) มากกว่าเป็นเจล ซึ่งแสดงว่า ส่วนเอส-1 ไม่มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเจล ส่วนเจลที่เกิดจากส่วนที่เป็นแอลฟา-เฮลิกซ์ มีลักษณะเนื้อสัมผัสและโครงสร้างใกล้เคียงกับเจลที่เตรียมจากไมโอซิน ดังนั้นส่วนหางของโมเลกุลไมโอซินจึงเป็นบริเวณที่เกิดการเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลเกิดเป็นโครงสร้างสามมิติของเจล Ishioroshi และคณะ (1981) ศึกษาการเกิดเจลในส่วน HMM เปรียบเทียบกับส่วน LMM พบว่า HMM เกิดเจลที่แข็งแรงน้อยกว่า LMM แต่มีความแข็งแรงมากกว่าเจลที่เตรียมจากเอส-1 นอกจากนี้เจลที่เกิดจาก LMM มีความแข็งแรงใกล้เคียงกับตัวอย่างที่เตรียมจากส่วนแอลฟา-เฮลิกซ์ ซึ่งแสดงว่าส่วนหางที่มีโครงสร้างแอลฟา-เฮลิกซ์ มีความสำคัญต่อการเกิดโครงสร้างและลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลซูริมิ

Sano และคณะ (1990 a, b) รายงานว่าไมโอซินจากปลาคาร์ฟเริ่มจัดเรียงตัวเป็นร่างแหที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส โดยเกิดจากส่วนของ LMM เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 50 องศาเซลเซียส บริเวณ HMM โดยเฉพาะส่วนหัว (globular head) นั้นจะเกาะตัวรวมกันด้วยอันตรกิริยา

ไฮโดรโฟบิก เนื่องจากบริเวณดังกล่าวมีกรดอะมิโนที่ไม่ชอบน้ำอยู่เป็นจำนวนมาก และถูกปล่อยระหว่างการให้ความร้อน (Sano *et al*., 1990b) นอกจากนี้ Sano และคณะ (1990b) พบว่า HMM ไม่สามารถเกิดเจลได้ในขณะที่ LMM สามารถเกิดการเรียงตัวเป็นร่างแหซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Samejima และคณะ (1981) ที่กล่าวมาข้างต้น อย่างไรก็ตาม Taguchi และคณะ (1987) ได้เสนอกลไกการเกิดเจลที่แตกต่างออกไป คือ การจัดเรียงตัวของ HMM โดยเฉพาะในส่วนของเอส-1 เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นถึง 50 องศาเซลเซียส ส่วนของ LMM เริ่มคลายตัวออกจากกันและจัดเรียงตัวเป็นร่างแห ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gill และ Conway (1989) ที่พบว่า ส่วนหางของไมโอซินซึ่งสกัดจากปลาคอดคลายตัวออกทำให้กรดอะมิโนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic amino acids) หันออกสู่ภายนอกและเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกระหว่างสายไมโอซินที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Chan และคณะ (1993) พบว่าการจับตัวของไมโอซินจากปลาคอด และปลาแฮริ่งเริ่มต้นที่บริเวณ HMM S-2 ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ส่วนของ LMM เริ่มจับตัวเป็นร่างแหที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส ซึ่งความแตกต่างระหว่างสองกลไกนี้สามารถเปรียบเทียบดังแสดงในภาพที่ 1.5

การให้ความร้อนกับโซลที่อุณหภูมิสูงกว่า 60-70 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดโครงสร้างโปรตีนที่มีการจัดเรียงตัวอย่างมีระเบียบ (Stone and Stanley, 1992) โดย Itoh และคณะ (1980a) รายงานว่าการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลโปรตีนโดยผ่านกระบวนการ S-S interchange หรือ SH–SS–interchange มีผลต่อการเกิดโครงข่ายของเจลโมเลกุลไมโอซินประกอบด้วยหมู่ซัลฟ์ไฮดริลมากกว่า 40 หมู่ โดยส่วนใหญ่จะพบบริเวณส่วนหัวของไมโอซิน HMM S-1 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chan และคณะ (1995) ที่พบว่าพันธะโควาเลนต์ชนิดที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์มีส่วนร่วมในการเกิดพอลิเมอไรเซชั่นของไมโอซินเส้นหนัก



ภาพที่ 1.5 กลไกการเกิดเจลของไมโอซินด้วยความร้อน

Myosin gelation induced by heating

Source: a. Sano *et al*. (1990a); b. Chan *et al.* (1993)

2. ผลของการใช้ความดันสูงต่อโปรตีน

2.1 ผลของความดันต่อโครงสร้างและพันธะภายในของโปรตีน

ความดันมีผลต่อโครงสร้างทุติยภูมิ ตติยภูมิ และจตุรภูมิของโปรตีน โดยจะทำให้พันธะแตกออก และเกิดการสร้างพันธะใหม่ภายในโมเลกุล และระหว่างโมเลกุลของโปรตีน (Messens *et al*., 1997) ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงของแต่ละพันธะภายในกระบวนการใช้ความดันสูง มีการเปลี่ยนแปลงแต่ละพันธะ ดังนี้

2.1.1 อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ซึ่งเป็นพันธะที่มีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างตติยภูมิ และจตุรภูมิจะถูกทำลายเมื่อมีการเพิ่มความดัน หรือมีการลดลงของปริมาตร แต่ถ้าเกิดกับโครงสร้างวงแหวน (aromatic ring) ปริมาตรจะเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามยังเกิดการสร้างพันธะใหม่ได้เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของปริมาตร (Mozhaev *et al*., 1994)

2.1.2 อันตรกิริยาแรงกระทำระหว่างประจุ (electrostatic) เป็นแรงกระทำที่เกิดระหว่างกรดนิวคลีอิก และโปรตีน ซึ่งไม่คงตัวที่สภาวะความดัน เนื่องจากการเกิดพันธะนี้อาจเกิดในสภาวะที่หมู่ที่มีประจุอยู่ในตัวกลางที่มีประจุ โดยประจุที่กระจายตัวอยู่จะรวมตัวกลายเป็นชั้นล้อมรอบหมู่ประจุตรงกลางเกิดเป็นชั้นของประจุไฟฟ้า 2 ชั้น ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของปริมาตร แต่เมื่อให้ความดันจะมีผลต่อการลดลงของปริมาตรจึงทำให้พันธะนี้ถูกทำลายด้วยความดัน (Masson, 1992)

2.1.3 พันธะไฮโดรเจน มีความคงตัวต่อความดันสูง จึงทำให้โครงสร้างทุติยภูมิไม่ถูกทำลาย และอาจถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาวะความดัน แต่พันธะนี้อาจถูกทำลายได้ เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาตร (ΔV) เข้าใกล้ศูนย์ (Messens *et al*., 1997)

2.1.4 พันธะโควาเลนต์ ซึ่งเป็นโครงสร้างปฐมภูมิของสารชีวโมเลกุลใหญ่ รวมทั้งโปรตีนด้วย จะไม่ถูกทำลายที่ความดันไม่เกิน 1,000-2,000 เมกกะปาสคาล เพราะสามารถทนต่อการบีบอัดได้ (Messens *et al*., 1997)

2.1.5 พันธะไดซัลไฟด์ เป็นพันธะที่ถูกสร้างขึ้นภายใต้สภาวะความดัน จะทำให้เกิดการจับกัน (aggregation) และเกิดเจลของโปรตีนที่ความเป็นกรดด่างที่เป็นกลางและด่าง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีนที่ความเป็นกรดด่างนี้ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของหมู่ซัลฟ์ไฮดริลส่งผลให้มีการจับกันของโปรตีนเพิ่มขึ้น (Messens *et al*., 1997)

นอกจากนี้ยังพบว่า ความดันในระดับ 100-200 เมกกะปาสคาลมีผลต่อโปรตีนแบบผันกลับได้ (Cheftel and Culioli, 1997) โดยโปรตีนโอลิโกเมอริก (oligomeric) และโปรตีนที่ประกอบด้วยหลายชนิด (multiprotein) จะเกิดการแยกออกจากกัน และผลการลดลงของปริมาตรทำให้เกิดการทำลายอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกและไอออนิกในระหว่างโปรตีนแต่ละชนิด เมื่อมีการ

แยกตัวด้วยความดันแล้ว โปรตีนแต่ละชนิดอาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและเกิดคลายตัวบางส่วน เมื่อปลดปล่อยความดัน โปรตีนโอลิโกเมอริกมีแนวโน้มกลับมาขดตัวอีกครั้งอย่างช้าๆ ซึ่งโปรตีนที่มีการเสียสภาพด้วยความดันน่าจะมีการอัดตัวกันแน่นกว่าโปรตีนที่เสียสภาพด้วยอุณหภูมิหรือสารเคมี (Mozhaev *et al*., 1994) และถ้าให้ความดันมากกว่า 300 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ไม่สามารถผันกลับได้ และในสภาวะที่ความดันมากกว่า 100 เมกกะปาสคาลจะมีผลของการเสียสภาพเนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นร่วมได้ด้วย แต่การเพิ่มขึ้นของความดันในระดับหนึ่งจะช่วยลดการเสียสภาพของโปรตีนเนื่องจากความร้อนได้ (Leadley and Williams, 1997)

2.2 ผลของความดันต่อการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อ

จากสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนกล้ามเนื้อที่สามารถเกิดเจลได้เมื่อมีการสูญเสียสภาพ ความดันก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้โปรตีนเกิดการเสียสภาพ และเกิดเจลได้ Shoji และคณะ (1990) พบว่าการให้ความดันที่ระดับ 200-250 เมกกะปาสคาล ทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อของปลาอลาสก้าพอลล็อค (alaska Pollock) เกิดเจลได้ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิต่ำกว่า ซึ่งเกิดจากการสร้างพันธะระหว่างโมเลกุล โดยส่วนใหญ่จะเป็นอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก พันธะไดซัลไฟด์ และพันธะโควาเลนต์อื่นๆ ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ ซึ่ง Heremans และ Heremans (อ้างโดย Gilleland *et al*., 1997) ได้อธิบายกลไกการเกิดเจลด้วยความดันไว้ว่า ความดันมีผลในการทำลายอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกซึ่งมีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างโปรตีน และเมื่อมีการให้ความดันสูงขึ้นจะทำให้พันธะนี้ถูกทำลายได้มากขึ้น ส่งผลให้โครงสร้างของโปรตีนเปิดออก และทำให้หมู่ไม่ชอบน้ำออกมาในสิ่งแวดล้อมของน้ำ ซึ่งมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบมากขึ้นภายใต้ความดัน นอกจากนี้ความดันยังส่งผลต่อการสูญเสียความคงตัวของโปรตีนเนื่องจากความดันทำให้เกิดการลดลงของปริมาตรจากการเกิดแรงกระทำระหว่างประจุรอบๆ หมู่ที่มีประจุ การเรียงตัวของน้ำรอบๆ หมู่ที่ไม่มีขั้ว และการละลายของหมู่ที่มีขั้วโดยพันธะไฮโดรเจน และ Gilleland และคณะ (1997) ได้คาดการณ์ถึงช่วงการปลดปล่อยความดันไว้ว่า หมู่ที่ไม่ชอบน้ำจะถูกปล่อยออกมาในสิ่งแวดล้อมของน้ำได้น้อยลง นอกจากนี้พันธะไดซัลไฟด์ และพันธะไฮโดรเจนจะถูกสร้างขึ้น รวมทั้งจะเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกขึ้นใหม่เมื่อมีความเข้มข้นของโปรตีนที่มากเพียงพอ จึงทำให้เกิดเจลได้ภายใต้สภาวะความดัน เช่นเดียวกัน Ko และคณะ (2003) มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลไมโอซินของปลานิล (tilapia) ที่สภาวะความดัน 50-200 เมกกะปาสคาล ในช่วงเวลา 0-60 นาที พบว่า ที่ความดัน 100 และ150 เมกกะปาสคาลไมโอซินมีการคลายตัว และเพิ่มขึ้นของปริมาณไฮโดรโฟบิกที่พื้นผิว และพบว่าที่ความดัน 150 เมกกะปาสคาล ไมโอซินมีกิจกรรม Ca-ATPase ลดลง มีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Angsupanich และคณะ (1999) ได้ศึกษา

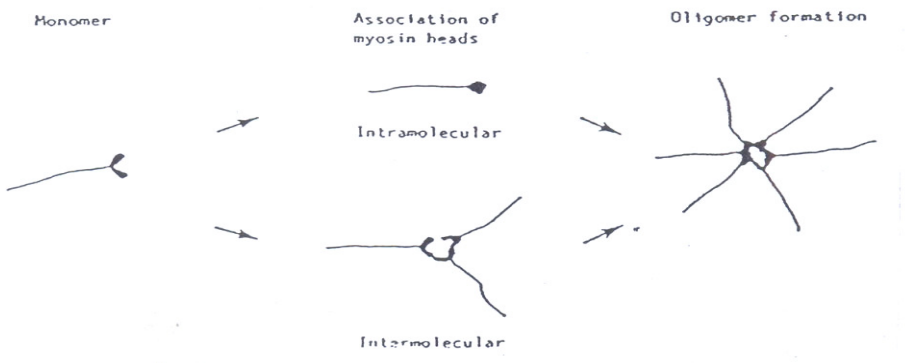
ผลของความดันที่มีต่อการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาคอด และไก่งวง พบว่า ความดันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงไมโอซินให้เกิดเจลที่คงตัวด้วยพันธะไฮโดรเจน และพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งแตกต่างจากการเกิดเจลด้วยความร้อนที่มีความคงตัวด้วยพันธะไดซัลไฟด์ และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ซึ่งลักษณะของเจลที่ได้จากการให้ความดันมีลักษณะเงามัน เรียบเนียน มีความแน่นเนื้อ นุ่มแต่เหนียว และอุ้มน้ำได้ดี จึงมีความยืดหยุ่นมากกว่าเจลที่ได้จากความร้อน เนื่องจากการจัดเรียงตัวของโมเลกุลน้ำที่อยู่รอบกรดอะมิโนในเจล (Cheftel and Culioli, 1997)

Nagashima และคณะ (1993) ได้มีการใช้ความดันสูงในการทำให้เกิดเจลกับปลาหมึกซึ่งมีความสามารถต่ำในการเกิดเจลด้วยความร้อน โดยเนื้อปลาหมึกสามารถเกิดเจลได้ที่ความดันตั้งแต่ 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที โดยเจลมีความยืดหยุ่นสูงกว่าเจลที่ได้จากความร้อน ซึ่งเกิดจากการเสียสภาพและการเกิดโพลิเมอไรเซชันของโปรตีนไมโอซิน การสร้างแรงกระทำระหว่างโปรตีน และการเปลี่ยนแปลงกิจกรรม ATPase ของไมโอซิน และพบว่าการให้ความดันก่อนการให้ความร้อนช่วยส่งเสริมความสามารถการเกิดเจลด้วยความร้อนได้ นอกจากนี้การให้ความร้อนแบบสองขั้นตอน (อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) มีผลทำให้ค่าความแข็งแรงเจลน้อยกว่าการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) เนื่องจากผลของกิจกรรมเอนไซม์โปรติเอส โดยให้ความดันที่ระดับตั้งแต่ 800 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ก่อนการให้ความร้อนสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวได้

ธิติมา จันทโกศล (2547) ได้ศึกษาการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำด้วยความดัน โดยเนื้อกุ้งกุลาดำสามารถเกิดเจลได้ที่ความดันตั้งแต่ 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที และเกิดเจลได้ดีที่สุดที่ความดัน 600 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที โดยมีค่าแรงเจาะทะลุ เท่ากับ 330 g และระยะทางก่อนเจาะทะลุ เท่ากับ 12 มิลลิเมตร และยังศึกษาผลของการใช้ความดันร่วมกับความร้อนในการเกิดเจลของเนื้อกุ้งกุลาดำ พบว่า เนื้อกุ้งกุลาดำเกิดเจลได้ดีที่สุดที่ความดัน 400 เมกกะปาสคาล นาน 20 นาที ร่วมกับการให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว (อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที)โดยมีค่าแรงเจาะทะลุ เท่ากับ 175 g และระยะทางก่อนเจาะทะลุ เท่ากับ 4.8 มิลลิเมตร แต่การให้ความดันแล้วให้ความร้อนแบบขั้นตอนเดียว และแบบสองขั้นตอน (อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที) มีค่าแรงเจาะทะลุ และระยะทางก่อนเจาะทะลุน้อยกว่าการให้ความดันเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากการให้ความร้อนทั้งสองแบบมีผลส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสภายในเนื้อกุ้งกุลาดำ

Yamamoto และคณะ (1990) มีการศึกษาการเกิดเจลของไมโอซิน พบว่าเมื่อมีการให้ความดันกับสารละลายไมโอซินที่มีความเข้มข้น เท่ากับ 1-5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของกล้ามเนื้อ

กระต่ายที่ละลายอยู่ในสารละลายที่มีค่าความแข็งแรงของไอออนิกต่ำ (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6) สารละลายไมโอซินที่มีความเข้มข้น 3 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเกิดเจลได้ที่ความดัน 210 และ 280 เมกกะปาสคาล นาน 10 นาที ตามลำดับ ค่าความแข็งแรงของเจลมีค่าเพิ่มขึ้นในช่วงแรกจนถึงระดับหนึ่ง ค่าความแข็งแรงของเจลจะคงที่ถึงแม้ว่าระยะเวลาในการให้ความดันเพิ่มมากขึ้น ต่อมา Yamamoto และคณะ (1993) ได้ศึกษาเพิ่มเติมถึงการเปลี่ยนแปลงไมโอซินด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope) โดยตรวจสอบการเกิดเจลของสารละลายไมโอซินของกระต่ายที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่อยู่ในสารละลายที่มีค่าความแรงของไอออนิกสูง (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6) พบว่า ไมโอซินทั่วไปที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัว 2 หัวต่อไมโอซิน 1 โมเลกุล เมื่อมีการให้ความดันที่ 70 เมกกะปาสคาลจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโมโนเมอร์บางส่วนเป็นโมโนเมอร์ที่มีหัวเดียว และเมื่อให้ความดันในระดับ 140 เมกกะปาสคาล ไมโอซินในส่วนหัวจะเกิดแรงอันตรกิริยาต่อกันเกิดเป็นโอลิโกเมอร์ แต่จะไม่มีผลต่อไมโอซินในส่วนหาง และเมื่อเพิ่มความดันเท่ากับ 210 เมกกะปาสคาล กลุ่มของไมโอซินจะจับตัวกันแน่นมากขึ้น แสดงดังภาพที่ 6 และยังพบว่าเมื่อให้ความดันที่ระดับ 210 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที ไมโอซินที่อยู่ในสารละลายที่มีค่าความแรงของไอออนสูงไม่สามารถเกิดเจลได้ด้วยความดันเพียงอย่างเดียว ต้องมีการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีร่วมด้วย นอกจากนี้ Ishizaki และคณะ (1995) ได้ศึกษาถึงผลของความดันต่อการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของไมโอซิน ทั้งในส่วนหัว (S1) และส่วนหาง (rod) พบว่า ที่ความดัน 300-500 เมกกะปาสคาล ทำให้ค่าการละลาย การคลายตัวของโปรตีน และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก



ภาพที่ 1.6 การเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของไมโอซินระหว่างการให้ความดันสูง

Schematic diagram for the formation of oligomeric species of myosin molecules by hydrostatic pressure.

Source: Yamamoto *et al*. (1993)

ที่พื้นผิวของส่วนหัวของไมโอซินมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีผลมาจากการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของพันธะที่เกี่ยวข้องกับการรวมตัวของน้ำ (hydration) แต่ไม่มีผลต่อค่าต่างๆ ของส่วนหาง ดังนั้นความดันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในส่วนหัวของไมโอซินเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่า ส่วนหัวของไมโอซินที่อยู่ในสารละลายที่มีค่าความแรงของไอออนสูง (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์) มีความคงตัวต่อความดันมากกว่าส่วนที่อยู่ในสารละลายที่มีค่าความแรงของไอออนต่ำ (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์)

Ikeuchi และคณะ (1992) ได้ศึกษาผลของความดันต่อกิจกรรม ATPase ของไมโอซินและแอกโตไมโอซินของกระต่ายที่ละลายอยู่ในสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.6 โมลาร์ ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 พบว่า กิจกรรมของ Mg^{2+}-ATPase มีค่าลดลงเมื่อให้ความดันสูงกว่า 100 เมกกะปาสคาล นาน 5 นาที ขณะที่กิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ลดลงเมื่อให้ความดันสูงกว่า 200 เมกกะปาสคาล จึงสรุปได้ว่า แอกตินมีการเสียสภาพตั้งแต่ระดับ 100 เมกกะปาสคาลขึ้นไป และไมโอซินเสียสภาพที่ระดับความดันมากกว่า 200 เมกกะปาสคาล

Ko และคณะ (1991) ได้ศึกษาผลความดันต่อกิจกรรม ATPase ของแอกโตไมโอซินและไมโอซินของปลาฟลายอิงฟิช (flying fish) และซาร์ดีน (sardine) พบว่า ในกิจกรรมของ Mg^{2+}-ATPase ของแอกโตไมโอซินและกิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ของไมโอซินทั้งที่ละลายอยู่ในสารละลายที่มีความแรงของไอออนิกต่ำ (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.05 โมลาร์) และสูง (สารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 0.5 โมลาร์) มีค่าลดลงเมื่อให้ความดันสูงขึ้น (100-300 เมกกะปาสคาล) และระยะเวลาที่ให้ความดันเพิ่มขึ้น (0-60 นาที) และพบว่า ที่ระดับความดันเดียวกัน กิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ของไมโอซินของปลาซาร์ดีนลดลงมากกว่าปลาฟลายอิงฟิช และกิจกรรม Ca^{2+}-ATPase ของไมโอซินลดลงอย่างรวดเร็วกว่ากิจกรรม Mg^{2+}-ATPase ของแอกโตไมโอซิน ดังนั้นความดันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไมโอซินมากกว่าแอกโตไมโอซิน และมีผลต่อการเปลี่ยนไมโอซินของปลาซาร์ดีนมากกว่าปลาฟลายอิงฟิช

นอกจากนี้ Jwasaki และ Yamamoto (2002) ยังได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงในส่วน S1 ของไมโอซินของไก่ที่ผ่านการให้ความดัน พบว่า เมื่อให้ความดันมากกว่า 150 เมกกะปาสคาล มีผลทำให้ส่วน S1 ที่เป็นทรงกลมมีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ แต่ไม่มีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยา ดังเช่น กิจกรรม ATPase กับแอกติน แต่เมื่อให้ความดันมากกว่า 250 เมกกะปาสคาล ทำให้เกิดการแยกกันของ ATPase กับแอกติน โดยตรวจสอบจากกิจกรรมของ Mg^{2+}-ATPase ซึ่งจะลดลงเมื่อให้ความดันมากกว่า 250 เมกกะปาสคาล นอกจากนี้ความดันยังมีผลให้แฟรกเมนต์ 50 กิโลดาลตันที่มีความเกี่ยวข้องกับ ATPase เปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้าง ซึ่งแตกต่างจากการเกิดเจลด้วยความร้อน

เมื่อตรวจสอบด้วย SDS-PAGE จะไม่พบแฟรกเมนต์ 50 กิโลดาลตัน ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าความดันสามารถทำให้เนื้อไก่เกิดเจลได้ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง S1 ของไมโอซิน

การปรับปรุงคุณภาพการเกิดเจล

การปรับปรุงคุณภาพของเจล สามารถกระทำได้โดยใช้สารเติมแต่งหลายชนิด โดยแบ่งเป็นประเภทต่างๆ ได้ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549) ดังนี้

1. สารเติมแต่งที่มีผลเร่งการเชื่อมประสานของโปรตีน โดยทำหน้าที่ในการเร่งการเชื่อมประสานระหว่างหมู่เอมีนของกรดอะมิโนกับไลซีน เช่น เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์

2. สารเติมแต่งที่ช่วยคืนสภาพโปรตีนก่อนการเกิดเจล

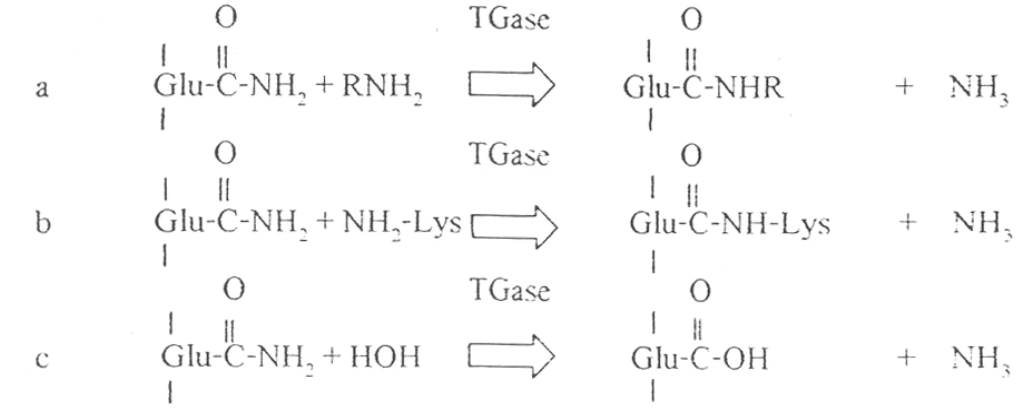
3. สารเติมแต่งที่มีบทบาทในการลดหรือป้องกันการอ่อนตัวของเจล ซึ่งเติมไปเพื่อยับยั้งเอนไซม์โปรติเอสที่มีอยู่ในโปรตีนกล้ามเนื้อ เช่น โปรตีนพลาสมาของสัตว์ชนิดต่างๆ โปรตีนไข่ขาว โปรตีนถั่วเหลือง ซิสเตอีน และ E-64

4. สารเติมแต่งที่เป็นสารเติมเต็ม เป็นสารที่เติมลงไปแล้วอาจเกิดเจลร่วมกับโปรตีนหรือไม่เกิดก็ได้ และไม่ขัดขวางการเกิดเจลของโปรตีน แต่ส่งผลให้เจลที่เกิดขึ้นมีคุณลักษณะที่ดีขึ้น เช่น แป้ง โปรตีนบางชนิด และสารพอลิเมอร์อื่นๆ ได้แก่ กัม คาร์ราจีแนน อัลจิเนต

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส

เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและปลา ที่บริเวณเร่ง (active site) มีหมู่ซีสเตอีนที่ช่วยให้เกิดปฏิกิริยากับ γ-carboxyamide ของกลูตามีนเกิดเป็น γ-glutamyl thioester และปลดปล่อยแอมโมเนีย หลังจากนั้น γ-glutamyl thioester จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอมีนเกิดเป็นพันธะ isopeptide หรือพันธะ γ-glutamyl polyamine (Greenberg *et al*., 1991) ในกรณีที่ไม่มีเอมีน น้ำสามารถทำหน้าที่เป็นตัวรับหมู่ acyl เป็นผลให้กลูตามีนเปลี่ยนเป็นกรดกลูตามิค (Folk and Chung, 1973) ดังภาพที่ 1.7 นอกจากนี้กลุ่มอะมิโนปฐมภูมิ (primary amino) ที่มีส่วนไลซีน หรือพอลิเอมายสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนปลายของกลูตามีนเกิดเป็นพันธะ ε-(γ-glutamyl) lysine ระหว่างโปรตีน หรือ γ-glutamyl polyamine เป็นผลให้เกิดพันธะโควาเลนต์ที่มีความคงตัวและทนต่อการย่อยสลาย (Greenberg *et al*., 1991) และเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสก่อให้เกิดการเชื่อมประสานของโปรตีนโดยพันธะโควาเลนต์ทั้งในและนอกโมเลกุล (Folk and Chung, 1973)

Gilleland และคณะ (1997) ได้ศึกษาพบว่า การทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในการผลิตซูริมิจากปลาอลาสก้าพอลล็อค (Alaska Pollack) เมื่อมีการให้ความดันที่ระดับ 300 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ร่วมกับบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ทำให้เจลมีความแข็งแรงมากขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากภายหลังจากการให้ความดันเกิดการเสียสภาพของไมโอซินทำให้เกิดการโผล่ของตำแหน่งที่เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส (transglutaminase) ที่มีอยู่ภายในเนื้อปลาสามารถสร้างพันธะที่เชื่อมประสานได้มากขึ้นโดยเกิด ε-(γ-glutamyl) lysine ดังนั้นเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจะมีความสัมพันธ์กับค่าความแข็งแรงของเจล และพบว่าเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสไม่ถูกทำลายด้วยความดัน ดังการศึกษาของ Lauber และคณะ (2001) ที่พบว่าความคงตัวของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ละลายอยู่ในสารละลายบัพเฟอร์ทริส-อะซีเตท (Tris-acetate) ที่มีความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 40 และ 60 องศาเซลเซียส ร่วมกับการให้ความดัน มีความคงตัวสูง แต่กิจกรรมของเอนไซม์ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อให้ความดันมากกว่า 400 เมกกะปาสคาลเช่นเดียวกันในการศึกษาของ Montero และคณะ (2005) พบว่า การให้ความดันลดกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส แต่ค่าความแข็งแรงของเจลไม่ได้ลดลงด้วยเมื่อมีการบ่มเนื้อปลาฮอร์สแมคเคอเรล (horse mackerel) บดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ก่อนให้ความดันที่ระดับ 300 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที



ภาพที่ 1.7 การทำงานของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสในสภาวะที่มีตัวร่วมทำปฏิกิริยาต่างๆ กัน

Reaction catalyzed by tranglutaminase

a: Acyl transfer reaction

b: Cross-linking of lysine and Glutamine residues of proteins

c: Deamidation

Source: Ashie and Lanier (2000)

Ashie และ Lanier (1999) ได้ศึกษาผลของการใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ *Streptovericillium spp.*ร่วมกับการใช้ความดัน และอุณหภูมิที่มีต่อตัวอย่างซูริมิที่ได้จากปลา alaska pollock และเนื้อไก่งวงบด โดยในตัวอย่างซูริมิมีการเติมเอนไซม์ 1.5 ยูนิตต่อกรัม และในเนื้อไก่งวงบดมีการเติมเอนไซม์ 5 ยูนิตต่อกรัมโปรตีน พบว่า เจลซูริมิที่ได้จากการให้ความดันที่ระดับ 250 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที มีค่าความแข็งแรงของเจลซูริมิสูงสุด และพบว่าในตัวอย่างซูริมิที่มีการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสมีค่าความแข็งแรงของเจลสูงกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ทุกตัวอย่าง และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในช่วงการบ่มตัวอย่างเท่ากับ 25 องศาเซลเซียส ส่วนเนื้อไก่งวงบดสามารถเกิดเจลได้ดีที่สุด เมื่อมีการเติมเอนไซม์แล้วให้ความดันที่ระดับ 250 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ Gómez-Guillén และคณะ (2005) ได้ศึกษาการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้น ร้อยละ 0.02 ร่วมกับไคโตซานที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ในเนื้อปลาฮอร์สแมคเคอเรล (horse mackerel) บด ที่มีการให้ความดันที่ 300 เมกกะปาสคาล อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีเพียงอย่างเดียว หรือร่วมกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมงก่อนหรือหลังให้ความดัน พบว่า ในทุกชุดการทดลองที่มีการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสจากจุลินทรีย์เพิ่มค่าความแข็งของเจล แต่ลดความยืดหยุ่นของเจลและไม่พบการออกฤทธิ์เสริมกันของการใช้เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ร่วมกับไคโตซานและการให้ความดันก่อนการบ่มเพิ่มความยืดหยุ่นและความแข็งของเจล ดังนั้นเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสมีผลต่อการเพิ่มค่าความแข็งแรงของเจลได้ เนื่องจากความดันมีผลทำให้โครงสร้างโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงโครงร่างให้เหมาะกับการเชื่อมต่อของพันธะ โดยทำให้หมู่เอมีนอยู่ในส่วนปลายอิสระมากขึ้น และเอนไซม์มีผลทำให้เกิดการเชื่อมต่อของพันธะเพิ่มขึ้น รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสไม่ถูกทำลายด้วยความดัน

นอกจากนี้ Uresti และคณะ (2006) ได้ศึกษาการเติมเอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนสที่ได้จากจุลินทรีย์ในเนื้อปลาแอโรทูธฟลาวเดอร์ (arrowtooth flounder) บด โดยมีการศึกษาอุณหภูมิในการบ่มก่อนการให้ความดันร่วมกับการให้ความร้อนทั้งแบบขั้นตอนเดียว (ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) และการให้ความร้อน 2 ขั้นตอน (ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) พบว่าอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมก่อนให้ความดันที่ 600 เมกกะปาสคาล นาน 5 นาที คือ 25 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และการบ่มร่วมกับ

การให้ความดันสามารถปรับปรุงคุณลักษณะทางเนื้อสัมผัสของเจลได้ ทั้งนี้การบ่มก่อนหรือหลังให้ความดันอาจเหมาะสมกับชนิดของสัตว์ที่แตกต่างกัน

โปรตีนพลาสมาเลือดวัว

โปรตีนพลาสมาเลือดวัว เป็นสารที่ใช้เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเนส ซึ่งเอนไซม์โปรตีเนสเป็นเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ มีผลต่อโปรตีนกล้ามเนื้อ และส่งผลต่อความแข็งแรง และความยืดหยุ่นของเจลซูริมิ โปรตีนพลาสมาประกอบด้วย อัลบูมิน โกลบูลิน และไฟบริโนเจน ซึ่งโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ในโปรตีนพลาสมาเลือดวัว มีดังต่อไปนี้

1. แอลฟา-2-แมโครโกลบูลิน (α_2-macroglobulin, α_2M) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 800,000 ดาลตัน และเป็นไกลโคโปรตีนซึ่งประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตร้อย 8-11 และ มีซับยูนิตที่เหมือนกัน 4 ซับยูนิต แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินสามารถยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสทั้ง 4 ประเภท ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนชนิดซีรีน ซีสเตอีน แอสพาร์ติก และเมทัลโล แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินแต่ละโมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีเนสเพียง 1 โมเลกุล กลไกการทำงานของแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินในการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสแตกต่างจากสารยับยั้งเอนไซม์โดยทั่วไป โดยทำงานแบบ “Trap hypothesis” เมื่อแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินจับกับเอนไซม์โปรตีเนส เอนไซม์โปรตีเนสจะไฮโดรไลซ์แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินบางส่วนที่ตำแหน่ง “bait” ส่งผลให้โครงสร้างหรือการจัดเรียงตัวของโปรตีนในแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินเปลี่ยนแปลงและกักเอนไซม์โปรตีเนสไว้ภายในสมมติฐานของการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสโดยแอลฟา-2-แมโครโกลบูลิน สามารถแยกเป็น 2 ขั้นตอน ดังนี้ (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549)

$$E + M \longleftrightarrow EM \longleftrightarrow EM' \qquad \text{(ขั้นที่ 1)}$$

$$EM' \longrightarrow EM^* \qquad \text{(ขั้นที่ 2)}$$

ขั้นตอนแรก เอนไซม์ (E) จะจับกับแอลฟา-2-แมโครโกลบูลิน (M)

ขั้นตอนที่สอง แอลฟา-2-แมโครโกลบูลิน ที่ถูกย่อยโดยเอนไซม์บางส่วน (M′) จะเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (M*)

ดังนั้นโมเลกุลของโปรตีนขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปสัมผัสบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์ แต่สับสเตรท (substrate) ที่มีขนาดเล็กยังคงสามารถเข้าไปจับกับบริเวณเร่ง และเกิดการไฮโดรไลซ์ของโปรตีนดังกล่าว ดังนั้นแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินจึงสามารถยับยั้งการย่อยสลายของโปรตีนโมเลกุลใหญ่ได้มีประสิทธิภาพมากกว่าโปรตีนโมเลกุลเล็ก แต่แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินไม่สามารถยับยั้งเอกโซเพปทิเดส หรือ เอนไซม์ไฮโดรไลซ์ที่ไม่ใช่โปรตีเนส (non-proteolytic hydrolase) เช่น hyaluronidase, β-glucuronidase หรือ เอนโดเพปทิเดสที่ไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยา (Barrett and Starkey, 1973 อ้างโดยสุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549) และเมื่อเอนไซม์โปรตีเนสถูกกักโดย

แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินจะเกิดปฏิกิริยาระหว่าง ε-amino ของเอนไซม์ และ β-Cysteinyl-γ-glutamyl thiol ester ของ α_2M (Salvesen *et al*., 1980, 1981 อ้างโดย สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549; Kang and Lanier, 1999) นอกจากนี้ Seymour และคณะ (อ้างโดย Kang and Lanier, 1999) ยังพบกิจกรรม Monodansyl cadaverine (MDC)-incorpration ในส่วนของพลาสมาเลือดวัวที่เป็นของเหลว ซึ่งมีกิจกรรมมากกว่าร้อยละ 85 เป็นกิจกรรมที่ไม่ต้องการแคลเซียม ดังนั้นจึงแสดงให้เห็นว่าพันธะ ε-(γ-glutamyl) lysine เกิดจาก α_2M มากกว่าเอนไซม์พลาสมาทรานส์กลูตามิเนส (PTGase)

นอกจากนี้ยังพบว่า แอลฟา-2-แมโครโกลบูลินมีความคล้ายคลึงกับสับสเตรทของเอนไซม์คาเธปซินซึ่งมีอยู่มากในกล้ามเนื้อของสัตว์น้ำ ดังนั้นเอนไซม์จึงจับกับส่วนแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินของโปรตีนพลาสมาเลือดวัวแทนหมู่ซิสเตอีนที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลา จึงทำให้โครงสร้างโปรตีนกล้ามเนื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเอนไซม์ และมีความสามารถในการเกิดเจลได้ตามปกติ (Garcia-Carreno and Hernandez-Cortes, 2000)

2. คินิโนเจน (Kininogens) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ชนิดซีสเตอีน คินิโนเจนประกอบด้วยโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ คินิโนเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (L-Kininogen) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 50,000 – 78,000 ดาลตัน และคินิโนเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (H-Kininogen) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 108,000 – 120,000 ดาลตัน คินิโนเจนที่มีโมเลกุลต่ำสามารถยับยั้งเอนไซม์ปาเปนและคาเธปซิน L (Machleidt, 1986 และ Salvesen *et al.,* 1986 อ้างโดยสุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549)

3. แอลบูมินจากโบวีนซีรัม (Bovine serum albumin; BSA) ทำหน้าที่เป็นสารยับยั้งชนิดแข่งขันไม่จำเพาะ (nonspecific competitive inhibitor) (สุทธวัฒน์ เบญจกุล, 2549)

Morrissey และคณะ (1993) ได้ศึกษาผลการยับยั้งเอนไซม์โปรตีเนสของโปรตีนพลาสมาเลือดวัว ไข่ขาว และสารสกัดมันฝรั่งในตัวอย่างซูริมิที่ผ่านกระบวนการทำให้เกิดเจลด้วยไมโครเวฟ พบว่า โปรตีนพลาสมาเลือดวัวมีผลให้ค่าความแข็งแรงของเจลซูริมิมากที่สุด และ Sareevoravitkul และคณะ (1996) ได้ศึกษาการเติมโปรตีนพลาสมาเลือดวัวที่มีแอลฟา-2-แมโครโกลบูลินในเนื้อปลาบลูฟิช (bluefish) บด พบว่า เมื่อเติมสารสกัดโปรตีนพลาสมาเลือดวัวที่ระดับความเข้มร้อยละ 0-0.2 ร่วมกับการให้ความดันที่ 379.19 เมกกะปาสคาล นาน 30 นาที ไม่ได้เพิ่มค่าความแข็งและความยืดหยุ่นของเจล แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ค่าความแข็งและความยืดหยุ่นของเจลมีค่ามากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของโปรตีนพลาสมาเพิ่มมากขึ้น แต่ Ashie และคณะ (1996) ได้ศึกษาการใช้ α_2M เป็นตัวควบคุมกิจกรรมเอนไซม์ที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาภายใต้สภาวะความดัน พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนลดลง เมื่อมีการเพิ่มความดันในระดับ 101.32-303.98 เมกกะปาสคาลและความเข้มข้นของ α_2M ในปริมาณร้อยละ 0.1-0.3 น้ำหนักต่อน้ำหนัก และค่าความหนืดของกล้ามเนื้อปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอลฟา-2-แมโครโกลบูลิน