วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 29:3(96-103)

บทบาทของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อ

Involvement of Muscle Proteinase Enzyme to Meat Tenderness

ปิยะดา ทวิชศรี[1]

คำนำ

ความนุ่มของเนื้อ (tenderness) เป็นคุณลักษณะสำคัญประการหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญในการตัดสินใจเพื่อเลือกซื้อเนื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งเนื้อโคที่มีคุณภาพ ความนุ่มของเนื้อขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการทั้งปัจจัยก่อนสัตว์ตาย ได้แก่ ชนิด พันธุ์ เพศ และอายุสัตว์ ชนิดของกล้ามเนื้อและเส้นใยกล้ามเนื้อ ระดับการสะสมไขมัน รวมไปถึงการใช้สารเร่งการเจริญเติบโต และปัจจัยหลังสัตว์ตายซึ่งได้แก่ อัตราการเกิดปฏิกิริยาไกลโคไลซิส ปริมาณและความสามารถในการละลายของคอลลาเจน สภาวะของกล้ามเนื้อก่อนและหลังการเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) และการย่อยสลายของเส้นใยย่อยในกล้ามเนื้อ (myofibrillar protein) โดยปัจจัยต่างๆ ภายหลังสัตว์ตายนี้จะเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยเนื้อทั้งสิ้น (Morton, 1999) ในการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อนั้นจำเป็นต้องเข้าใจถึงการทำงานของเอนไซม์ที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อ ดังนั้นการศึกษาถึงบทบาทการทำงานของเอนไซม์ที่มีต่อความนุ่มของเนื้อจึงเป็นสิ่งสำคัญที่ผู้ผลิตเนื้อสัตว์ควรทำความเข้าใจ

1. การย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย

ภายใน 24 ชั่วโมงแรกหลังสัตว์ตาย เนื้อสัตว์จะมีความเหนียวมากเนื่องมาจากการเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่กล้ามเนื้อเกิดการหดตัวอย่างถาวรภายหลังสัตว์ตาย เกิดขึ้นหลังจากที่พลังงานสะสมทั้งที่อยู่ในรูป glycogen, ADP และ ATP ถูกใช้ไปจนหมด สภาวะเช่นนี้เนื้อสัตว์จะมีสภาพเกร็งตัว เนื่องจากเส้นใยกล้ามเนื้อหดสั้นเข้าหากันทำให้ sarcomere มีความยาวสั้นลงอย่างมากส่งผลให้เนื้อที่ได้ภายหลังสัตว์ตายมีความเหนียวมากกว่าปกติ ซึ่งพบว่าความยาวของ sarcomere ที่ระยะคลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อจะมีความยาว 2.24 μm แต่เมื่อเวลาผ่านไปและเข้าสู่ระยะหดตัวอย่างถาวรจะมีความยาวลดลงเหลือ 1.69 μm (Koohmaraie *et al*., 2002) เมื่อทำการบ่มเนื้อเป็นระยะเวลาหนึ่งเนื้อจะมีความนุ่มเพิ่มมากขึ้น การที่เนื้อนุ่มขึ้นเกิดเนื่องจากเมื่อระยะเวลาผ่านไปเอนไซม์ที่อยู่ภายในเนื้อสัตว์ (indigenous enzyme) จะออกมาทำการย่อยโปรตีนในเนื้อทำให้เกิดความนุ่มขึ้น โปรตีนกล้ามเนื้อกลุ่มที่สำคัญและมีปริมาณมากถึง 60% ของโปรตีนทั้งหมด ได้แก่ โปรตีน myosin, actin, titin หรือ connectin, nebulin, α-actinin, troponin-T, vinculin, desmin, filamin, tropomyosin, c-protein และ m-protein (Hui *et al*., 2001) การย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อจะเกิดขึ้นกับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกล้ามเนื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่งในโปรตีน myofibrillar เช่น titin, โปรตีน myofibril cytoskeleton เช่น desmin และโปรตีน costamere เช่น vinculin (Figure 1)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายมีดังนี้ (Hedrick *et al*., 1993)

1. เกิดการย่อยสลายบริเวณ Z disk ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อฉีกขาด
2. โปรตีน desmin ถูกทำลายทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเส้นใยย่อยในกล้ามเนื้อฉีกขาด
3. troponin T ซึ่งทำหน้าที่ยึด actin-myosin complex หายไปในขณะที่ polypeptides ชนิดหนึ่งที่มีน้ำหนักโมเลกุล 28-32 kDa เกิดขึ้น

[1]หลักสูตรสัตวศาสตร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร ชุมพร 86160

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. โปรตีน titin ซึ่งเป็นองค์ประกอบย่อยของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในเส้นใยกล้ามเนื้อและควบคุมการยืดหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลาย จึงทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว

5. โปรตีน nebulin ถูกทำลาย

6. การย่อยสลายโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อเหล่านี้ เช่น titin ทำให้เกิดโปรตีนใหม่ที่มีขนาดแตกต่างกันขึ้น

7. เส้นใยย่อยของ actin และ myosin ซึ่งเป็น myofibrillar protein สำคัญที่เป็นองค์ประกอบของเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งทำหน้าที่ในการหดตัวของกล้ามเนื้อไม่ได้ถูกย่อย แม้ว่าจะยืดระยะการบ่มนานถึง 56 วันก็ตาม

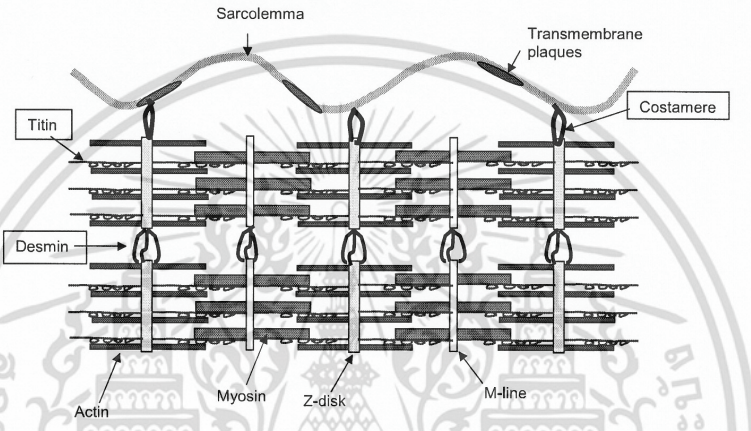

Figure 1 Shematic of muscle myofibrillar proteins showing the major components of the sarcomere. Box indicate the cytosleletal structures and proteins susceptible to post-mortem cleavage (Kemp *et al.*, 2010)

2. ระบบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความนุ่มของเนื้อ

ในกล้ามเนื้อสัตว์มีเอนไซม์อยู่หลายชนิดเอนไซม์เหล่านี้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนภายในเนื้อสัตว์ โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) จะทำหน้าที่เป็นตัวย่อยสลายโปรตีนของเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์บางชนิดที่ทำปฏิกิริยาย่อยสลายโมเลกุลของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้มีความนุ่มและฉ่ำน้ำเพิ่มขึ้นจึงทำให้เนื้อมีรสชาติดีขึ้น (Levie, 1970) ระบบเอนไซม์ช่วยย่อยโปรตีนในเนื้อที่สำคัญได้แก่

2.1 Lysosomal cathepsins

เอนไซม์ cathepsins มีหลายกลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม cysteine proteinase (cathepsins B, H, L และ X), กลุ่ม aspartic proteinase (cathepsins D และ E) และกลุ่ม serine proteinase (cathepsins G) โดยมี cystatin เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ ในสภาวะปกติเอนไซม์ cathepsins จะอยู่ใน lysosome และจะสามารถทำงานได้เมื่อทำให้ออกมาอยู่ใน cytosol ซึ่งเป็นส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ แต่จากการทดลองพบว่าแม้จะมีการใช้กระแสไฟฟ้าในการกระตุ้นซากร่วมกับการบ่มซากที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาถึง 28 วัน ก็ตาม lysosomal cathepsin จะยังคงอยู่ภายใน lysosome (Koohmaraie, 1994; Kemp *et al.*, 2010) Lawrie and Ledward (2006) รายงานว่าเอนไซม์ cathepsin H ไม่ได้มีส่วนช่วยในการย่อยโปรตีน actin และ myosin แต่ในสภาวะที่เนื้อมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5 แล้วเอนไซม์ cathepsin D จะสามารถย่อยสลายโปรตีนดังกล่าวได้ ทั้งนี้โดยปกติแล้วกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้าย (ultimate pH) ประมาณ 5.5 ซึ่งที่สภาวะดังกล่าวเอนไซม์ cathepsin B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ L จะสามารถเข้าย่อยสลายโปรตีน actin และ myosin ได้ดีกว่า และที่สภาวะนี้เอนไซม์ cathepsin L สามารถย่อยสลายโปรตีน troponin T, I และ C, titin, nebulin, α-actinin และ tropomyosin ได้เช่นกัน

เอนไซม์ cathepsin จะทำหน้าที่ได้อย่างมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงและค่าความเป็นกรด-ด่างของเนื้อค่อนข้างต่ำเนื่องจากที่สภาวะนี้จะสามารถทำลายเยื่อหุ้ม lysosome เพื่อให้เอนไซม์ที่อยู่ภายในออกมาอยู่ใน cytosol ได้กล่าวคือช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการทำงานจะค่อนข้างต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายในเนื้อ (Table 1) ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์นี้จึงมีความสำคัญต่อการย่อยโปรตีนกล้ามเนื้อไม่มากนัก แต่กลับมีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เช่น collagen และ mucopolysaccharides ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ไม่เป็นเส้นใย (ground substance)

Table 1 Endogenous proteinases implicated with meat ageing

Location	Proteinase	M.W. (kDa)	pH range	Action
Lysosome	Cathepsin B	25	3.5-6.5	Degrades myosin, actin, troponin T and collagen
	Cathepsin L	28	3.0-6.5	Degrades myosin, actin, troponin T and I, tropomyosin, α-actinin and collagen
	Cathepsin D	42	3.0-6.0	Degrades myosin, actin, troponin T and I, tropomyosin, α-actinin and collagen
Sarcoplama	Proteasome	700	7.5-8.0	Degrades myosin, actin, troponin C, tropomyosin, nebulin
	μ-Calpain	110	6.5-7.5	Releases α–actinin, Z-line
	m-Calpain	110	6.5-7.5	Degrades desmin, connectin, nebulin, troponin T and I, tropomyosin, C- and M- proteins

Modified from Jiang (1998)

2.2 Proteasome หรือ Multicatalytic proteinase complex (MPC)

เป็นเอนไซม์ขนาดใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 700 kDa พบทั่วไปในร่างกายสัตว์และพบที่กล้ามเนื้อในปริมาณมาก (Lawrie and Ledward, 2006) เอนไซม์ proteasome จะเข้าย่อยสลายเฉพาะ troponin C และเส้นใย myosin chain -1 และ chain -2 เท่านั้น และทำงานได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5-8.0 (Table 1) ที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ดังนั้นบทบาทของเอนไซม์ในระบบนี้จึงไม่เด่นชัดมากนักต่อการย่อยสลายโปรตีนในกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายซึ่งจะทำให้เนื้อนุ่มขึ้น เนื่องจากสภาวะของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายไม่เอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์นี้ (Koohmaraie, 1994) แต่อาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์นี้สามารถช่วยย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อในช่วงระยะแรกภายหลังสัตว์ตายซึ่งค่าความเป็นกรด-ด่างยังคงสูงอยู่ Koohmaraie (1992) รายงานว่าเอนไซม์ proteasome ที่สกัดได้จากเนื้อแกะไม่ได้มีส่วนช่วยในการย่อยเนื้อแต่อย่างใด ขณะที่ Robert *et al*. (1999) พบว่าเอนไซม์นี้สามารถย่อยโปรตีน nebulin, myosin, actin และ tropomyosin ในเส้นใยกล้ามเนื้อของโคได้ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ให้ผลขัดแย้งกันเกี่ยวกับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อหรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 Calpain (calcium-dependent enzymes)

เอนไซม์ calpain จัดเป็นเอนไซม์จำพวก intracellular cystein protease เนื่องจากต้องการสารบางชนิดที่สามารถป้องกัน -SH group ซึ่งเป็น active site ให้ยังคงสภาพสมบูรณ์พร้อมทำงานได้ สารดังกล่าวได้แก่ cystein, dithiothreitol (DTT) และ 2-mercaptoethanol เอนไซม์นี้สามารถพบได้ทั่วไปใน sarcoplasm ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อสัตว์ ทำหน้าที่ในการย่อยสลายโปรตีน desmin, α-actinin, tropomyosin, troponin T และ titin รวมถึงโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อบริเวณ Z-line, N2 line และ M line ด้วย จึงจัดว่าเป็นเอนไซม์สำคัญที่มีบทบาทในการทำให้เนื้อนุ่มภายหลังสัตว์ตาย (Lawrie and Ledward, 2006)

ระบบเอนไซม์ calpain ในกล้ามเนื้อสัตว์ประกอบด้วย isoenzyme 8 ชนิด ได้แก่ calpain 1, 2, 5, 7, 10, 12, 14 และ 15 รวมถึง tissue-specific (p94) หรือ calpain-3 (Ilian *et al*., 2004) แต่เอนไซม์ในเนื้อสัตว์ที่สำคัญซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของระบบเอนไซม์ calpain คือ μ-calpain (calpain I) และ m-calpain (calpain II) ซึ่งจัดเป็น isoform ของ calcium dependent thiol protease ที่สามารถทำงานได้เมื่อมีความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในระดับที่ต่างกัน โดยเอนไซม์ μ-calpain ต้องการ Ca^{2+} มากระตุ้นการทำงานในระดับ micromolar (30 μM) ส่วนเอนไซม์ m-calpain ต้องการ Ca^{2+} ในระดับ millimolar (1 mM) และทำงานได้ดี ณ สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Sensky *et al*., 1996)

เอนไซม์ calpain (μ- และ m- calpains) มีลักษณะเป็น heterodimers ประกอบด้วย large catalytic subunit ขนาด 80 kDa และ small regulatory subunit ที่มีขนาด 30 kDa เอนไซม์ทั้งสองมี catalytic subunit แตกต่างกันเนื่องจากมีลำดับของกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน แต่ก็ยังมีลำดับที่เหมือนกันอยู่ประมาณ 50% subunit ชนิดนี้ประกอบด้วย 4 domains (I - IV) ในส่วน small regulatory subunit ของเอนไซม์ทั้ง 2 ตัว จะมีลักษณะเหมือนกันซึ่งประกอบด้วย 2 domains คือ N-terminal glycine rich domain (V) และ C-terminal Ca^{2+}-binding domain (VI) ในสภาวะปกติ μ- และ m- calpain จะอยู่ในรูป inactive proenzyme ต่อเมื่อมี Ca^{2+} มากระตุ้นจึงเปลี่ยนไปอยู่ในรูป active proteinase และสามารถทำงานได้ ทั้ง large catalytic subunit และ small regulatory subunit จะแยกออกจากกันในสภาวะที่มี Ca^{2+} มากในระดับหนึ่งและชักนำให้เอนไซม์ calpain เกิด autolysis ขึ้น การเติม Ca^{2+} จะทำให้เกิด autolysis ขึ้นทันทีนั่นแสดงว่าเริ่มเกิดการย่อยสลายเซลล์กล้ามเนื้อ (Nishimura and Goll, 1991; Juszczuk-Kubiak *et al*., 2002)

การทำงานของเอนไซม์ calpain จะต้องมี Ca^{2+} ที่ถูกปลดปล่อยออกมาสู่ภายนอกเซลล์กล้ามเนื้อมากระตุ้นการทำงาน Ca^{2+} ดังกล่าวถูกปล่อยออกมาจาก mitochondria ผ่านมาทาง sarcoplasmic recticulum ออกสู่ภายนอกเซลล์กล้ามเนื้อ ดังนั้นหากมีการเพิ่มปริมาณ Ca^{2+} โดยการฉีดสารละลาย $CaCl_2$ เข้าเข้าไปในซากหรือในเนื้อโคจึงเป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpain ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้เกิดการฉีกขาดบริเวณ Z-line มากขึ้น ส่งผลให้เนื้อโคมีความนุ่มเพิ่มขึ้น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpain นอกจากเกิดขึ้นจาก endogenous inhibitor ซึ่งคือโปรตีน calpastatin แล้ว สารประกอบในกลุ่ม chelating agents เช่น EDTA, EGTA, E-64, calpeptin และ leupeptin ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวได้อีกด้วย นอกจากนี้หาก Ca^{2+} รวมตัวกับโลหะ เช่น Zn ions เกิดเป็น chelate ขึ้นจะทำให้ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ย่อยเนื้อลดลง ทำให้ความนุ่มของเนื้อลดลงตามไปด้วย (Lawrie and Ledward, 2006)

2.4 Calpastatin

โปรตีน calpastatin (EC 3.4.22.17, Ca^{2+}-dependent cysteine proteinase) มีน้ำหนักโมเลกุล 130 kDa เป็น endogenous inhibitor ของทั้ง μ- และ m- calpain ต้องการ Ca^{2+} ปริมาณ 40-50 uM และ 250-500 uM ในการจับกับเอนไซม์ μ- และ m- calpains ตามลำดับ และเข้าจับกับโปรตีน titin ที่ N2 line ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิดปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนขณะเริ่มกระบวนการปรับปรุงความนุ่มของเนื้อสัตว์ภายหลังสัตว์ตาย ทำให้เป็นการเข้าไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ calpain (Taylor *et al*., 1995) โปรตีน calpastatin ประกอบด้วยส่วน repeating inhibitory domain 4 ส่วน คือ domain I - IV และส่วน NH_2-terminal domain (domain XL/L) ซึ่งไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpain แต่อาจมีบทบาทในการควบคุม calcium ion channels

ในแต่ละ repetitive domain ประกอบไปด้วย conserved subdomain 3 ส่วน คือ A, B และ C (Cong *et al*., 1998) การทำงานของโปรตีน calpastatin ในการจับกับ calpain นั้นพบว่าโปรตีน calpastatin จะใช้ domain I และ IV เข้าจับกับบางส่วนของ domain III และ culmodulin-like domain (IV และ VI) แต่ไม่จับกับ domain I และ II ของ calpain นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน calpastatin ในส่วน subdomain A จะเข้าไปจับกับ domain IV ซึ่งเป็นส่วน catalytic subunit ของ calpain ในขณะที่ subdomain C เข้าไปจับกับ domain VI ในส่วน regulatory subunit (Betts *et al*., 2003)

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน calpastatin กับความเหนียวของเนื้อ

Calpastatin จะมีปริมาณมากน้อยแตกต่างกันไปตามชนิด พันธุ์ และกล้ามเนื้อของสัตว์ เนื้อที่มีปริมาณ calpastatin สูงจะมีความเหนียวมากกว่า (Dransfield, 1994) Hedrick *et al*. (1993) รายงานว่าเนื้อโคจะเหนียวกว่าเนื้อแกะและเนื้อสุกร เนื่องจากมีปริมาณ calpastatin ในกล้ามเนื้อมากกว่า และพบว่าเนื้อของโคที่มีระดับเลือดของสายพันธุ์ *Bos indicus* อยู่ในระดับที่สูงจะมีความเหนียวมากกว่าเพราะมีปริมาณ calpastatin สูง เนื่องจาก calpastatin เป็นตัวจำกัดการทำงานของเอนไซม์ calpain ในระหว่างการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตาย ทำให้ความนุ่มของเนื้อลดลง ดังนั้นการคัดเลือกโคที่มี calpastatin ในปริมาณต่ำจะทำให้เนื้อโคที่ได้มีความนุ่มมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของ calpastatin ยังขึ้นอยู่กับระดับความเครียดที่สัตว์ได้รับ หากว่าสัตว์เกิดความเครียดอย่างรุนแรงก็จะส่งผลให้ฮอร์โมน adrenaline มีปริมาณสูงซึ่งทำให้ปริมาณ calpastatin สูงตามไปด้วยเนื้อที่ได้จึงมีความเหนียวมากขึ้น

ปัจจัยอันเนื่องมาจากพันธุ์สัตว์ที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณของ calpastatin Pringle *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษา calpain proteinase system ที่มีผลต่อความนุ่มของโคลูกผสมเพศผู้ตอนระหว่างพันธุ์ Angus และ Brahman ที่ระดับเลือดต่างๆ คือ 0%, 25%, 37%, 50%, 75% และ 100% Brahman ผลพบว่าที่ระดับเลือด 37% Brahman มีปริมาณเอนไซม์ μ-calpain สูงที่สุด ส่วนปริมาณของ calpastatin จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของ Brahman สูงขึ้น โดยที่ระดับเลือดจาก 0% ถึง 100% Brahman ปริมาณ calpastatin จะเพิ่มขึ้น 31% สำหรับปริมาณเอนไซม์ m-calpain ในทุกระดับเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน (Table 2) เช่นเดียวกับ Wheeler *et al*. (1990) ที่รายงานว่าปริมาณของ calpastatin จะสัมพันธ์กับการถ่ายทอดระดับเลือดของโคพันธุ์ Brahman โดยปริมาณ calpastatin จะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับเลือดของ Brahman เพิ่มขึ้น

Table 2 Calpain and calpastatin activities in longissimus muscle from steers varying in percentage Brahman (B) and Angus breeding.

Traits	Breed composition						P-value
	0% B	25% B	37% B	50% B	75% B	100% B	
No. of steers	11	13	10	12	12	11	-
μ-calpain, U/50 g	60.4^{b}	58.2^{ab}	72.1^{c}	58.4^{ab}	53.0^{ab}	49.7^{a}	<0.01
m-calpain, U/50 g	47.7	49.2	48.4	46.2	41.1	49.0	0.25
calpastatin, U/50 g	173.8^{a}	193.8^{ab}	181.4^{ab}	198.1^{ab}	205.8^{bc}	227.7^{c}	<0.01
calpastatin: **μ**-calpain	3.03^{ab}	3.36^{ab}	2.60^{a}	3.66^{b}	4.40^{c}	4.68^{c}	<0.01

^{a,b,c}Means in the same row with different superscripts differ, P<0.05

Source: Adapted from Pringle *et al*. (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 Caspase

จากหลายงานวิจัยได้รายงานว่านอกจากเอนไซม์ cathepsins, protease และ calpain จะมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อแล้ว ยังพบเอนไซม์อีกกลุ่มหนึ่งที่มีผลต่อความนุ่มของเนื้อภายหลังสัตว์ตายเช่นกัน นั่นคือเอนไซม์ caspase ที่มีถึง 14 ชนิดด้วยกัน เอนไซม์นี้จัดอยู่ในกลุ่ม cysteine aspartate-specific protease เพราะมีกรดอะมิโน cysteine อยู่ตรงตำแหน่ง active site และเข้าไปย่อยโปรตีนตรงตำแหน่งที่มีกรดอะมิโน aspartate Kemp *et al*. (2010) รายงานว่าโดยปกติแล้วเอนไซม์นี้จะทำหน้าที่เกี่ยวกับการเสื่อมสลายของเซลล์ (apoptosis) และกระบวนการเกิดการอักเสบ (inflammation) ในร่างกายสัตว์ เอนไซม์ caspase ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือ initiator capases ได้แก่ caspases 8 9 10 และ 12 กลุ่มที่สองคือ effector caspases ได้แก่ caspases 3, 6 และ 7 เอนไซม์ทั้งสองกลุ่มจะทำหน้าที่แตกต่างกันโดยกลุ่มแรกสามารถทำงานได้ทันทีเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาวะต่างๆ ในขณะที่เอนไซม์ในกลุ่มที่สองต้องได้รับการกระตุ้นจากเอนไซม์ในกลุ่มแรกก่อนจึงจะสามารถทำงานได้

เอนไซม์ caspase ในกลุ่ม initiator capases ถูกกระตุ้นให้ทำงานได้ 3 วิถี วิถีแรกคือ cell death pathway หรือ extrinsic pathway วิถีนี้เกิดขึ้นกับเอนไซม์ caspase 8 และ 10 ซึ่งจะเกิดการกระตุ้นโดยตัวรับที่ผิวเซลล์ วิถีที่สองคือ intrinsic pathway ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ caspase 9 ที่ถูกกระตุ้นเมื่อร่างกายเกิดภาวะผิดปกติ เช่น ภาวะเลือดมีออกซิเจนต่ำมาก (hypoxia) หรือภาวะการขาดเลือดเฉพาะที่ (ischaemia) วิถีที่สามคือ ER mediated pathway เกิดการกระตุ้นเมื่อ endoplasmic reticulum ผิดปกติ เช่น ภาวะสมดุล Ca^{2+} ถูกขัดขวางทำให้เอนไซม์ caspase 12 ถูกกระตุ้นให้ทำงาน (Figure 2) ส่วนเอนไซม์ในกลุ่ม effector caspase จะถูกกระตุ้นโดยเอนไซม์ในกลุ่ม initiator capase จากนั้นจึงทำการย่อยสลายเซลล์เนื้อเยื่อต่างๆ รวมถึงโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อด้วย ดังนั้นสภาวะภายหลังสัตว์ตายในระยะแรกอาจจะเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ caspase ทำงานผ่านวิถีต่างๆ ทำให้เกิดการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อและทำให้เนื้อนุ่มขึ้นได้

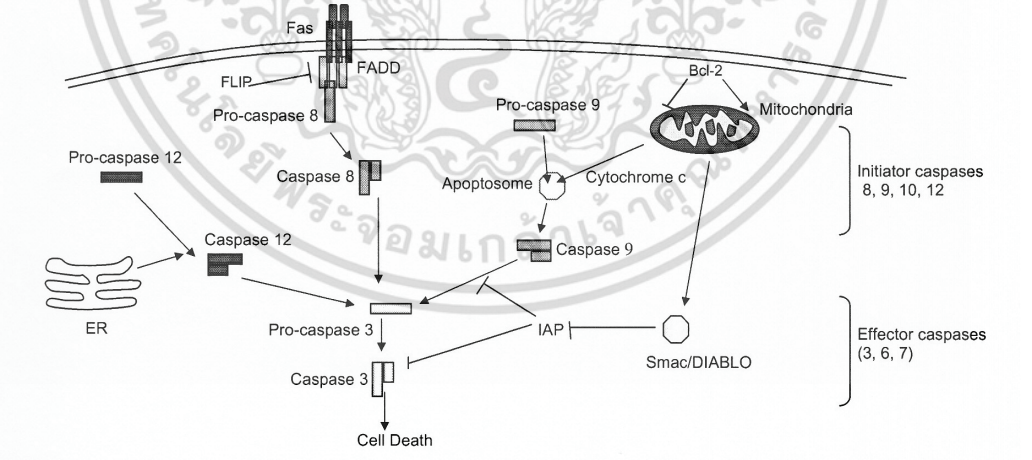

Figure 2 Schematic diagram of the intrinsic, extrinsic and ER-mediated apoptosis pathway showing caspases involve in each pathway. FADD – Fas associated death domain, IAP – inhibitor of apoptosis, Smac – secondary mitochondrial activator of caspases, DIABLO – direct IAP biding protein with low pI (Kemp *et al*., 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ caspase โดย Kemp and Parr (2008) ในกล้ามเนื้อสันนอกของสุกรเมื่อตรวจสอบโดยใช้ MULDI-TOFF mass spectrometry พบว่าเอนไซม์ caspase 3 สามารถย่อยโปรตีน actin, troponin T และ myosin light chain ได้ และพบว่าการทำงานของเอนไซม์ calpain ที่ถูกยับยั้งโดยโปรตีน calpastatin จะเป็นการเพิ่มความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ caspase ด้วย นอกจากนี้ Wang *et al*. (1998) รายงานว่าเอนไซม์ caspase 1, 3 และ 7 สามารถทำลายเอนไซม์ calpastatin ได้ซึ่งจะส่งผลให้เอนไซม์ calpain สามารถทำงานได้ดีขึ้นและทำให้เนื้อนุ่มขึ้นได้

2.6 เอนไซม์กลุ่มอื่นที่ย่อยโปรตีนเนื้อสัตว์ (Proteinase enzyme)

อบเชยและขนิษฐา (2554) กล่าวถึงเอนไซม์ในกลุ่มอื่นที่สามารถย่อยโปรตีนเนื้อสัตว์ได้มีอยู่หลายชนิด ได้แก่

- เอนไซม์ปาเปอิน (papain) เป็นเอนไซม์ในกลุ่ม cysteine protease ที่พบในยางส่วนใบและผลมะละกอดิบ จะทำงานอย่างประสิทธิภาพที่อุณหภูมิ 60 – 80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นความร้อนที่เนื้อได้รับขณะปรุงให้สุก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องหมักเนื้อด้วยเอนไซม์นี้ทิ้งไว้นาน เพราะหากทิ้งระยะเวลาการหมักไว้นานเกินไปหรือใช้ในปริมาณมากเกินไปจะทำให้เนื้อเปื่อยยุ่ยและทำให้เนื้อมีรสเฝื่อน
- เอนไซม์โบรมิลิน (bromelain) ได้จากสับปะรด เนื้อที่หมักด้วยเอนไซม์นี้จะมีกลิ่นและรสชาติดี
- เอนไซม์ฟิซิน (ficin) จากผลมะเดื่อฝรั่ง

นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ทริพซิน (trypsin) จากตับอ่อนของสัตว์ โรไซม์ (rhozyme) จากรา และ meat tenderizer ซึ่งเป็นผงสำเร็จรูปที่ใช้หมักทำให้เนื้อนุ่มมักมีส่วนผสมของเอนไซม์ปาเปอิน

สรุป

การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อภายหลังสัตว์ตายแม้ว่าจะทำให้เนื้อสัตว์มีความเหนียวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อผ่านไประยะหนึ่งเนื้อจะกลับนุ่มขึ้นได้ ทั้งนี้ด้วยการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ภายในเนื้อสัตว์เองที่ทำให้เกิดการย่อยสลายโปรตีนเนื้อสัตว์ การทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยสลายเส้นใยกล้ามเนื้อมีด้วยกันหลายระบบโดยจะทำงานในสภาวะแวดล้อมที่ต่างกัน ในระยะแรกภายหลังสัตว์ตายเอนไซม์ protease จะเริ่มทำงานเนื่องจากสภาวะหลังสัตว์ตายในช่วงแรกนั้นจะเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์นี้ ระยะต่อมาจึงเป็นการทำงานของเอนไซม์ calpain ซึ่งในปัจจุบันสามารถกล่าวได้ว่าเอนไซม์ calpain นี้มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในการทำให้เนื้อนุ่มแม้ว่าจะมีโปรตีน calpastatin เป็นตัวยับยั้งการทำงานก็ตาม หลังจากความเป็นกรด-ด่างลดต่ำลงจนถึงค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายแล้วจึงเป็นสภาวะที่เอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์ cathepsin แม้ว่าค่าของความเป็นกรด-ด่างจะยังไม่ต่ำจนถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่กล่าวมาด้วย อย่างไรก็ตามยังมีเอนไซม์อีกหลายระบบที่ทำงานเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อสัตว์ หนึ่งในนั้นคือเอนไซม์ caspase ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของเซลล์ต่างๆ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเอนไซม์กลุ่มนี้มีความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อซึ่งจะส่งผลต่อความนุ่มของเนื้อได้เช่นกัน

เอกสารอ้างอิง

อบเชย วงศ์ทอง และขนิษฐา พูนผลกุล. 2554. หลักการประกอบอาหาร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 163 น.

Betts, R., S. Weinsheimer, G.E. Blouse and J. Anagli. 2003. Structural determinants of calpain inhibitory activity of calpastatin peptide B27-WT. J. Biol. Chem. 278(10): 7800-7809.

Cong, M., V.F. Thomsons, D.E. Goll and P.B. Antin. 1998. The bovine calpastatin gene promoter and a new N-terminal region of the protein are targets for cAMP-dependent protein kinase activity. J. Biol. Chem. 273: 660-666.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dransfield, E. 1994. Tenderness of meat, poultry and fish, pp. 289-315. In A.M. Pearson and T.R. Dutson, eds. Quality Attributes and their Measurement in Meat, Poultry and Fish Product. Blackie Academic & Professional, London.

Hedrick, H.B., E.D. Aerle, J.C. Forrest, M.D. Judge and R.A. Merkel. 1993. Principles of Meat Science. Kendall/Hunt Publ. Co., Iowa.

Hui, Y.H., W.K. Nip, R.W. Rogers and O.A. Young. 2001. Meat Science and Application. Marcel Deccer, Inc., New York.

Ilian, M.A., A.E.A. Bekhit and R. Bickerstaffe. 2004. Does the newly discovered calpain 10 play a role in meat tenderization during post-mortem storage?. Meat Sci. 66: 317-327.

Jiang, S.T. 1998. Contribution of muscle proteinases to meat tenderization. Proc. Nat. Sci. Council. 22: 97-107.

Juszczuk-Kubiak, E., S.J. Rosochacki and K. Wicińska. 2002. A note on restriction fragment length polymorphism for *Hha*I in the bovine calpain gene. Animal Science Papers and Reports. 20(3): 181-185.

Kemp, C.M. and T. Parr. 2008. The effect of recombinant caspase 3 on myofibrillar proteins in porcine skeletal muscle. Animal. 2: 1254-1264.

Kemp, C.M., P.L. Sensky, R.G. Bardsley, P.J. Buttery, and T. Parr. 2010. Tenderness - an enzymatic view. Meat Sci. 84: 248-256.

Koohmaraie, M. 1992. The role of Ca^{2+}-dependent protease (calpains) in postmortem proteolysis and meat tenderness. Biochimie. 74: 239-245.

Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. Meat Sci. 36: 93-104.

Koohmaraie, M., M.P. Kent, S.D. Shackelford, E. Veiseth, and T.L. Wheeler. 2002. Meat tenderness and muscle growth: is there any relationship?. Meat Sci. 62: 345-352.

Lawrie, R.A., and D.A. Ledward. 2006. Lawrie's meat science. Woodhead Publishing Limited, Cambridge.

Levie, A. 1970. The Meat Handbook. The Avi Publ. Co. Inc., Connecticut.

Morton, J.D., R. Bickerstaffe , M.P. Kent, E. Dransfield and G.M. Keeley. 1999. Calpain-calpastatin and toughness in *M. longissimus* from electrically stimulated lamb and beef carcasses. Meat Sci. 52: 71-79.

Nishimura, T. and D.E. Goll. 1991. Binding of calpain fragments to calpastatin. J. Biol. Chem. 266(18): 11842-11850.

Pringle, T.D., S.E. Williams, B.S. Lamb, D.D. Johnson and R.L. West. 1997. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. J. Anim. Sci. 75: 2955-2961.

Robert, N., M. Briand, R. Taylor, and Y. Briand. 1999. The effect of proteasome on myofibrillar structures in bovine skeletal muscle. Meat Sci. 51: 149-153.

Sensky, P.L., T. Parr, R.G. Bardsley and P.J. Buttery. 1996. The relationship between plasma epinephrine concentration and the activity of the calpain enzyme system in porcine longissimus muscle. J. Anim. Sci. 74: 380-387.

Taylor, R.G., G.H. Geesink, V.F. Thompson, M. Koohmaraie and D.E. Goll. 1995. Is Z-disk degradation responsible for post-mortem tenderization?. J. Anim. Sci. 73: 1351-1367.

Wang, K.K., R. Posmantur, R. Nadimpalli, R. Nath, P. Mohan and R.A. Nixon. 1998. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. Arch. Biochem. Biophys. 356: 187-196.

Wheeler, T.L., J.W. Savell, H.R. Cross, D.R. Lunt and S.B. Smith. 1990. Mechanisms associated with the variation in tenderness of meat from Brahman and Hereford cattle. J. Anim. Sci. 68: 4206-4220.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้