T 164293

บทคัดย่อ

ปลาทรายแดง (*Nemipterus* spp.) เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตซูริมิของประเทศไทย แต่องค์ความรู้เกี่ยวกับการเกิดเจลโดยเฉพาะการเกิดเซทติ้งในซูริมิปลาทรายแดงมีจำกัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาการเกาะตัว (aggregation) ของโปรตีนกล้ามเนื้อที่อุณหภูมิเซทติ้ง (25 และ 40 °ซ) และศึกษาบทบาทของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดงในการเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อ โครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลาทรายแดงเริ่มเปิดตัว (unfold) ที่ 36.1 °ซ แคลเซียมคลอไรด์ไม่เพียงแต่มีผลต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสที่มีอยู่ในเนื้อปลาในการเชื่อมข้ามของมัยโอซินสายหลัก (myosin heavy chain) แต่ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของ แอคโตมัยโอซิน มัยโอซิน และ แอคตินอีกด้วย แคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 10-100 มิลลิโมลาร์ เหนี่ยวนำให้มัยโอซินเปิดตัวออกมากขึ้นที่ 40 °ซ ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (S_0 ANS) และการลดลงของโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ นอกจากนี้ปริมาณกลุ่มซัลฟไฮดริลทั้งหมดลดลง เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้น แสดงว่า แคลเซียมส่งเสริมการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในระหว่างการเกิดเซทติ้งด้วย ดังนั้นนอกจากพันธะไอโซเปปไทด์ซึ่งเกิดจากการเชื่อมข้ามโดยทรานสกลูทามิเนสแล้ว พันธะที่สำคัญในการเกิดเซทติ้งของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดงคือ แรงกระทำไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์

กิจกรรมของ crude ทรานสกลูทามิเนสจากน้ำล้างเนื้อปลาทรายแดงแสดงค่าสูงสุดที่ 40 °ซ พีเอช 7.5 และที่แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เอนไซม์สามารถเร่งกิจกรรมการเชื่อมข้ามอัลบูมินจากวัว (bovine serum albumin) แต่ไม่สามารถเชื่อมข้ามเคซีนได้ จากนั้นจึงทำบริสุทธิ์ทรานสกลูทามิเนสจากทั้งตับและกล้ามเนื้อโดยใช้ DEAE-Sephacel, Sephacryl S-200 และ Ca hydroxyapatite ซึ่งพบว่าสามารถทำบริสุทธิ์เอนไซม์จากตับและจากกล้ามเนื้อได้เพิ่มขึ้น 43.1 และ 37.6 เท่า ตามลำดับ เอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้จากตับแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 °ซ พีเอช 7.5 แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่เอนไซม์จากกล้ามเนื้อแสดงกิจกรรมสูงสุดที่ 50 °ซ พีเอช 8.5 แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ กิจกรรมของทราน-สกลูทามิเนสจากตับลดลงเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น ในขณะที่เอนไซม์จากกล้ามเนื้อมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์จนถึง 1.2 โมลาร์ Sr^{2+} มีผลลดกิจกรรมของทรานสกลู-ทามิเนสจากกล้ามเนื้อ แต่กระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์จากตับ ทรานสกลูทามิเนสจากทั้ง 2 แหล่งถูกยับยั้งด้วยสาร iodoacetic acid (IAA), N-ethylmaleimide (NEM), phenyl methanesulfonyl fluoride (PMSF) และ ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) ซึ่งเป็นสารยับยั้งโดยทั่วไปของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส นอกจากนี้ยังถูกยับยั้งด้วยไอออนหลายชนิด เอนไซม์จากกล้ามเนื้อสามารถเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามมัยโอซินที่ 30 °ซ

Abstract

TE 164293

Threadfin bream (*Nemipterus* spp.) is a main species for surimi production of Thailand. But, knowledge of threadfin bream gelation, especially setting, is limited. The objective of this study was to investigate aggregation of muscle proteins incubated at 25 and 40 °C, typical setting temperatures of threadfin bream surimi. In addition, to elucidate the role of endogenous transglutaminase in cross-linking of muscle protein during setting. Threadfin bream actomyosin began to unfold at 36.1 °C. $CaCl_2$ not only activated endogenous transglutaminase to catalyze the protein cross-linking but also induced conformational changes of actomyosin, myosin, and actin. Ca^{2+} ion at 10-100 mM induced the unfolding of myosin and actin as evident by an increase of surface hydrophobicity (S_0-ANS) at 40 °C and a decrease of helical content. In addition, total SH groups also decreased with an increased Ca^{2+} concentration, suggesting that Ca^{2+} promoted the formation of disulfide bonds during setting at 40 °C. Besides isopeptide bonds mediated by endogenous transglutaminase, hydrophobic interactions and disulfide linkages were important bonding formed during setting.

Activity of crude transglutaminase from threadfin bream wash water was maximal at 40 °C, pH 7.5, 5 mM $CaCl_2$. The crude enzyme catalyzed the cross-linking of bovine serum albumin, but not casein. Liver and muscle transglutaminases were partially purified using DEAE-Sephacel, Sephacryl S-200, and Ca-hydroxyapatite. Purity of the partially purified liver and muscle transglutaminases increased to 43.1 and 37.6 folds, respectively. Optimal conditions of liver transglutaminase were at 50 °C, pH 7.5, 1 mM $CaCl_2$, whereas those of muscle transglutaminase were at 50 °C, pH 8.5, 2 mM $CaCl_2$. Activity of liver transglutaminase decreased with an increased NaCl concentration, while NaCl up to 1.2 M appeared to activate muscle transglutaminase. Sr^{2+} inhibited muscle transglutaminase, but activated liver transglutaminase. Both transglutaminases were inhibited by iodoacetic acid (IAA), N-ethylmaleimide (NEM), phenyl methanesulfonyl fluoride (PMSF), and ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA), which are typical transglutaminase inhibitors. In addition, both enzymes were inhibited by various ions. Muscle transglutaminase efficiently catalyzed the cross-linking of threadfin myosin at 30 °C.