บังอร เหมัง : การเร่งปฏิกิริยาเชื่อมข้ามของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาโดยทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดงและจากจุลินทรีย์ (CROSS-LINKING REACTION OF FISH MUSCLE PROTEINS CATALYZED BY THREADFIN BREAM AND MICROBIAL TRANSGLUTAMINASES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 193 หน้า.

แคลเซียมไอออนเข้มข้น 10 - 100 มิลลิโมลาร์เหนี่ยวนำการเปิดตัวของมัยโอซินและแอคตินจากปลาทรายแดง (*Nemipterus* sp.) เมื่อบ่มที่ 25 และ 40 °ซ ทำให้ความเป็นไฮโดรโฟบิกที่พื้นผิวของโปรตีนเพิ่มขึ้น แคลเซียมไอออนมีผลให้ปริมาณแอลฟา-เฮลิกซ์ของมัยโอซินและแอคตินที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิคเซอร์คูลาร์ไดโครอิซึม (Circular dichroism) ลดลง กิจกรรมแคลเซียมเอทีพีเอส (Ca-ATPase activity) ของมัยโอซินลดลงเมื่อแคลเซียมไอออนเข้มข้นมากกว่า 50 มิลลิโมลาร์ ซึ่งบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงโครงร่างที่ส่วนหัวของมัยโอซิน (Globular head) ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมดของโปรตีนลดลงเมื่อความเข้มข้นแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้นจาก 10-100 มิลลิโมลาร์ แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมไอออนส่งเสริมการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ในระหว่างการบ่มอันตรกริยาไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์มีบทบาทสำคัญต่อการเกาะตัว (Aggregation) ของมัยโอซินและมีค่าเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (10-100 มิลลิโมลาร์)

การทำบริสุทธิ์บางส่วนของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากตับปลาทรายแดงด้วยหลักการการแลกเปลี่ยนไอออน การแยกตามขนาด และการแยกแบบจำเพาะ ทำให้ได้โปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดต่างๆคือ 95 63 และ 43 กิโลดาลตัน แต่พบโปรตีนเพียงหนึ่งแถบที่เรืองแสงฟลูออเรสเซนต์บนแผ่นเจลอะคริลาไมด์ (Acrylamide) เมื่อทำปฏิกิริยากับไดเมททิลเลเต็ด เคซีน (Dimethylated casein) และแดนซิลคาดาเวอรีน (Dansylcadaverine) เมื่อวิเคราะห์มวลโมเลกุลของแถบโปรตีนดังกล่าวด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซีสแบบสูญเสียสภาพดั้งเดิม (Denaturing electrophoresis) พบว่ามีขนาด 95 กิโลดาลตัน ทรานสกลูทามิเนสบริสุทธิ์บางส่วน (Partially purified transglutaminase) จากตับปลาทรายแดงต้องการแคลเซียมไอออนเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ในการเร่งปฏิกิริยา กิจกรรมของ ทรานสกลูทามิเนสถูกยับยั้งด้วยสารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับหมู่ซัลฟ์ไฮดริล สภาวะเหมาะสมต่อการทำงานคือที่อุณหภูมิ 50 °ซ และพีเอช 8.5-9.0 เอนไซม์ยังคงกิจกรรมได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์และกิจกรรมลดลงเหลือ 75% ที่ความเข้มข้น 1.2 โมลาร์

การเปลี่ยนแปลงปริมาณแอลฟา-เฮลิกซ์ของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาแปซิฟิกไวทิง (Natural actomyosin from Pacific whiting) เกิดขึ้นที่ 31.8 และ 43.1 °ซ ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาทรายแดงเกิดขึ้นที่ 35.0 และ 49.3 °ซ การเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานแบบดูดความร้อน (Endothermic peak) ของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติจาก

ปลาแปซิฟิกไวทิงที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค ดิฟเฟอเรนเชียล สแกนนิง แคลอรีเมทรี (Differential scanning calorimetry) เกิดขึ้นที่ 31.8, 42.1 และ 75.3 °ซ ในขณะที่แอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาทรายแดงเกิดการเปลี่ยนแปลงที่ 36.1 50.9 และ 78.4 °ซ แอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาแปซิฟิกไวทิงเปิดตัว (Unfold) อย่างมากที่ 25 °ซ ทำให้กิจกรรมแคลเซียมเอทีพีเอสลดลง ในทางตรงกันข้าม แอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาทรายแดงเปิดตัวเพียงเล็กน้อยทำให้การเชื่อมข้ามมัยโอซินเส้นหนัก (Myosin heavy chain) โดยทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดงและจากจุลินทรีย์เกิดได้น้อย ระดับการเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติจากปลาทั้งสองเพิ่มขึ้นเมื่อบ่มที่ 40°ซ ทรานสกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์เร่งการเชื่อมข้ามมัยโอซินเส้นหนักจากปลาทั้งสองได้มากกว่าเอนไซม์จากปลาทรายแดง ทำให้มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลแอคโตมัยโอซินธรรมชาติได้มากกว่าเอนไซม์จากปลาทรายแดง การเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเชื่อมข้ามโปรตีนที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์จากปลาทรายแดง กิจกรรมแคลเซียมเอทีพีเอสของแอคโตมัยโอซินธรรมชาติลดลงเท่ากันในสภาวะที่มีและไม่มีเอนไซม์ แสดงให้เห็นว่าจุดเชื่อมข้ามที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้อยู่ที่ส่วนหัวของมัยโอซิน

ทรานสกลูตามิเนสจากจุลินทรีย์มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูงทำให้เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามมัยโอซินเส้นหนักและการเชื่อมสารไบโอทินอะมิโดเพนทิลเอมีน (5-(Biotinamido) pentylamine, $BPNH_2$) เข้ากับกลูตามีนบนสายเปปไทด์ของมัยโอซินปลาทรายแดงได้มากกว่าทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง การบ่งชี้ลำดับกรดอะมิโนของเปปไทด์ที่เชื่อมอยู่กับสารไบโอทินอะมิโดเพนทิลเอมีนด้วยเทคนิคแทนเดม แมสสเปคโทรเมทรี (Tandem mass spectrometry) โดยมีลำดับกรดอะมิโนของมัยโอซินเส้นหนักจากปลาแอมเบอร์แจคเป็นต้นแบบ พบว่าเปปไทด์เหล่านั้นอยู่บริเวณส่วนหางของมัยโอซิน กรดอะมิโนที่อยู่ปลายกลูทามินิลเอไมด์ (Glutaminylamide) ของกลูทามีนที่เกิดปฏิกิริยา (Reactive glutamine, Q*) ส่วนมากมีโซ่ข้างเป็นไฮโดรฟิลิก เช่น ไลซีน อาร์จีนีน และ กลูตามิก เปปไทด์ที่เชื่อมอยู่กับสารไบโอทินอะมิโดเพนทิลเอมีนด้วยการเร่งของเอนไซม์จากปลาทรายแดง ส่วนมากมีกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิก เช่น ไกลซีน วาลีน ลิวซีน ไอโซลิวซิน อยู่ด้านแอลฟา-อะคริลาไมด์ (α-Acrylamide) ของกลูทามีนที่เกิดปฏิกิริยา ซึ่งกรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกเหล่านั้นมักพบที่บริเวณไฮโดรโฟบิกภายในส่วนหางของมัยโอซิน กรดอะมิโนที่อยู่ด้านแอลฟา-อะคริลไมด์ของกลูทามีนที่เกิดปฏิกิริยาที่เร่งด้วยทรานสกลูทามิเนสจากจุลินทรีย์มีโซ่ข้างที่เป็นทั้งไฮโดรโบิกและไฮโดรฟิลิก ชี้ให้เห็นว่าทรานสกลูทามิเนสจากจุลินทรีย์มีความจำเพาะเจาะจงต่อสารตั้งต้นกลูทามีนน้อยกว่าทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

BUNG-ORN HEMUNG : CROSS-LINKING REACTION OF FISH MUSCLE PROTEINS CATALYZED BY THREADFIN BREAM AND MICROBIAL TRANSGLUTAMINASES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 193 PP.

THREADFIN BREAM MYOSIN/FISH LIVER TRANSGLUTAMINASE/CROSS-LINKING/NATURAL ACTOMYOSIN/MASS SPECTROMETRY

Ca^{2+} at 10-100 mM induced the unfolding of threadfin bream (*Nemipterus* sp., TB) myosin and actin after incubation at 25 and 40 °C as evident by an increase of surface hydrophobicity. Circular dichroism spectra demonstrated that Ca^{2+} reduced the α-helical content of myosin and actin. Myosin Ca-ATPase activity decreased at Ca^{2+} > 50 mM, indicating conformational changes of myosin head. Total SH groups decreased with an increased Ca^{2+} concentration, suggesting that Ca^{2+} (10-100 mM) promoted the formation of disulfide bonds. Both hydrophobic interactions and disulfide linkages were possibly important in formation of myosin aggregates, and were promoted by addition of Ca^{2+} (10-100 mM).

Transglutaminase (TGase) from TB liver was partially purified by ion exchange, size exclusion and affinity chromatography. Three protein bands with molecular weight (Mw) of 95, 63, and 43 kilodalton (kDa) were observed on denaturing electrophoresis whereas only one distinct fluorescent band appeared on TGase activity staining on native-PAGE. Protein from the fluorescent band exhibited Mw of 95 kDa when it was eluted and analyzed on SDS-PAGE. Partially purified TB liver TGase (FTG) required Ca^{2+} up to 1 mM for full activation. TGase activity was markedly

inhibited by sulfhydryl reagents. Optimal conditions for catalytic activity were at 50 °C and pH of 8.5-9.0. TGase activity was not affected by NaCl up to 0.6 M and reduced to 75% at 1.2 M NaCl.

Changes in α-helical content revealed that transition temperatures of natural actomyosin (NAM) from Pacific whiting (PW) were at 31.8 and 43.1 °C, compared to at 35 and 49.3 °C of TB-NAM. Endothermic transitions of PW-NAM measured by differential scanning calorimetry were at 31.8, 42.1, and 75.3 °C, while those of TB were at 36.1, 50.9, and 78.4 °C. PW-NAM unfolded greatly after incubation at 25 °C and the cross-linking of PW-myosin heavy chain (MHC) catalyzed by FTG and microbial TGase (MTG) was observed. In contrast, TB-NAM slightly unfolded at 25 °C, resulting in less TB-MHC cross-linking. Unfolding of NAM from both species at 40 °C was greater than that at 25°C. MTG catalyzed MHC cross-linking to the greater extent than did FTG, resulting in higher textural improvement of NAM gels. Unfolding NAM played a much more critical role for FTG in catalyzing protein cross-linking than MTG. The decreases in Ca-ATPase activity of TB- and PW-NAM after incubation at 25 and 40 °C were not changed by either TGase, suggesting that the cross-linking sites might not be at myosin head.

MTG exhibited higher thermal stability, leading to its ability to catalyze TB-MHC cross-linking and 5-(biotinamido) pentylamine ($BPNH_2$) incorporation into TB-peptides to the greater extent than FTG. The amino acid sequences of $BPNH_2$-tagged peptides were identified by tandem mass spectrometry based on amberjack-MHC sequence. The identified sites of $BPNH_2$ modification catalyzed by both TGases were at the myosin rod and most $BPNH_2$-tagged peptides contained hydrophilic amino acids e.g. lysine, arginine, and glutamic acid at glutaminylamide site of reactive glutamine

(Q*). FTG tended to catalyze $BPNH_2$ incorporation of peptides that contain hydrophobic amino acids including glycine, valine, leucine, and isoleucine at the α-acrylamide site of Q*. Those hydrophobic amino acids located at the hydrophobic core of the intact myosin rod. Amino acids at α-acrylamide site of Q* for MTG were either hydrophobic or hydrophilic amino acids, suggesting broader glutamyl substrate specificity.

School of Food Technology Student's Signature_____

Academic Year 2007 Advisor's Signature_____