

ปัญญาภรณ์ ทัดพิชญางกูร : ผลของพีเอชและกระบวนการปรับพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลง
โครงสร้างและการเกิดเจลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกจากปลาสาวย (*Pangasius
hypophthalmus*) (EFFECT OF pH AND pH SHIFT PROCESS ON
CONFORMATIONAL CHANGES AND GELATION OF SARCOPLASMIC
PROTEINS FROM STRIPED CATFISH (*Pangasius hypophthalmus*)) อาจารย์ที่ปรึกษา :
รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล, 142 หน้า.

การเปรียบเทียบคุณสมบัติทางเคมีกายภาพและเนื้อสัมผัสของเนื้อปลาสาวยบดเตรียมด้วย
วิธีการล้าง (ล้างน้ำและสารละลายต่าง) หรือการสกัดด้วยด่าง พบว่า กระบวนการสกัดด้วยด่าง/
ตกตะกอนด้วยกรดมีปริมาณโปรตีนสูงสุทธ้อยู่ที่ 98.77 ของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง ปริมาณไขมัน
ต่ำสุทธ้อยู่ที่ 0.98 ของน้ำหนักตัวอย่างแห้ง และพบกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ำเนื้อต่ำสุด
ปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้แก่ กรดโอเลอิก (Oleic acid), กรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) และ กรด
โดโคซาเฮกซะอีโนอิก (Docosahexaenoic acid) ลดลงหลังผ่านกระบวนการสกัดด้วยด่าง/ตกตะกอน
ด้วยกรด นอกจากนี้กระบวนการสกัดด้วยด่าง/ตกตะกอนด้วยกรดก่อให้เกิดการเสียสภาพของ
โปรตีนไมโอสิสและซาร์โคพลาสมิก เนื่องจากโปรตีนส่วนใหญ่ไม่ละลายในสารละลายเกลือ
ความเข้มข้น 0-0.6 โมลาร์ ยกเว้นโปรตีนมวลโมเลกุลขนาด 38 กิโลดาลตัน กระบวนการล้างน้ำเป็น
วิธีที่มีประสิทธิภาพในการปรับปรุงความสามารถในการเกิดเจลของปลาสาวย แต่อย่างไรก็ตาม เจลปลา
เตรียมด้วยวิธีการสกัดด้วยด่าง/ตกตะกอนด้วยกรด (Fish protein isolate, FPI) มีค่าแรง ณ จุดแตกหัก
(Breaking force) สูงกว่าเจลปลาล้างน้ำและเจลปลาเตรียมจากการล้างด้วยด่าง แต่มีค่าระยะทางเสียรูป
(deformation) ต่ำกว่า การเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ส่งเสริมให้ค่าระยะทาง ณ จุดแตกหักลดลง
นอกจากนี้การบ่มเนื้อปลาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที มีผลเพิ่มค่าแรง ณ จุดแตกหัก
ของเจลให้สูงขึ้น

การศึกษาผลของพีเอชต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกเพื่อความ
เข้าใจเกี่ยวกับบทบาทของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกระหว่างกระบวนการปรับพีเอช (pH shift process)
พบว่า จุดไอโซอิเล็กทริก (Isoelectric point) ของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกคือพีเอช 5 จากการวิเคราะห์
ด้วยเอสดีเอสเพจ (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) พบว่า
โปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 11-97 กิโลดาลตัน โดยองค์ประกอบหลักของ
โปรตีนซาร์โคพลาสมิกมีมวลโมเลกุล 43 กิโลดาลตันซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นเอนไซม์ครีเอติน
ไคเนส (Creatine kinase) การลดลงของปริมาณหมู่ซัลไฟด์ไรลทั้งหมดพบที่พีเอชต่ำหรือสูงกว่าจาก
พีเอช 6 แสดงถึงการเกิดพันธะไดซัลไฟด์และค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (Surface hydrophobicity)
ทดสอบโดยใช้สารจับแอนีลีน (1-Anilino-8-naphthalene-sulfonate, ANS) และ โปรตีน (6-

Propionyl-2-dimethylaminonaphthlene, PRODAN) เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นจาก 6 ถึง 12 มีนัยว่าอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการสกัดด้วยด่าง/ตกตะกอนด้วยกรด เมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงค่าพลังงานการคายความร้อน (Exothermic peak) ในแผนภาพดีเอสซี (Differential scanning calorimetry, DSC) โพรตีนซาร์โคพลาสมิกที่พีเอช 5-9 เกิดอันตรกิริยาระหว่างโพรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์และอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกส่งผลให้ค่าโมดูลัสสะสม (Storage modulus, G') เพิ่มขึ้นซึ่งแสดงถึงการเพิ่มขึ้นของเครือข่ายร่างแหของเจล นอกจากนี้ไม่พบการจัดเรียงตัวเป็นโครงสร้างเจลของโพรตีนซาร์โคพลาสมิกที่มีพีเอชต่ำกว่า 4 และสูงกว่า 9 แต่พบที่ช่วงพีเอช 5 ถึง 9 จุดเกิดเจลซึ่งนิยามโดยค่าโมดูลัสสะสม (G') เท่ากับค่าโมดูลัสการสูญเสีย (Loss modulus, G'') เพิ่มขึ้นเมื่อพีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่า 7

การศึกษาผลของกระบวนการปรับพีเอชที่ประกอบด้วยผลของการสกัดด้วยกรดและด่าง การตกตะกอนที่พีเอช 5.5 และการปรับพีเอชมาที่ 7 ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและคุณสมบัติเชิงวิทยากระแส (Rheological properties) ของโพรตีนซาร์โคพลาสมิก พบว่าโพรตีนซาร์โคพลาสมิกสกัดที่พีเอช 3 ตกตะกอนที่พีเอช 5.5 และปรับพีเอชกลับมาที่พีเอช 7 มีค่าความสามารถในการละลายต่ำกว่าการสกัดด้วยด่างที่พีเอช 11 ซึ่งมีนัยว่าเนื้อปลาเตรียมด้วยกระบวนการปรับพีเอชในสภาวะกรดมีปริมาณโพรตีนซาร์โคพลาสมิกอยู่รวมกับโพรตีนไมโอไฟบิลาร์มากกว่าในเนื้อปลาเตรียมในสภาวะด่าง กระบวนการปรับพีเอชก่อให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์เนื่องจากปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมดลดลง ผลรามานสเปกตรัม (Raman spectra) พบว่าโครงสร้างเกลียวแอลฟาเป็นโครงสร้างหลักในระดับทุติยภูมิ (Secondary structure) ของโพรตีนซาร์โคพลาสมิก โครงสร้างทุติยภูมินี้ถูกทำให้กลับมามีอยู่ในสภาวะเดิมหลังกระบวนการปรับพีเอชเป็น 7 กระบวนการตกตะกอน และการปรับพีเอชเป็นสาเหตุให้เกิดการลดลงของค่าการยืดหดของพันธะระหว่างไฮโดรเจนกับคาร์บอนที่มีพันธะเดี่ยวหรือคู่ ($-C-H$ and $=C-H$ stretching band) และการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนของไทโรซีนดับเบิลท (Tyrosyl doublet) ซึ่งแสดงถึงการเกิดอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกของโพรตีนซาร์โคพลาสมิก โพรตีนซาร์โคพลาสมิกเกิดการเสียสภาพระหว่างการสกัดด้วยกรดและด่างเนื่องจากไม่แสดงการเกิดเจลเมื่อวิเคราะห์ค่าโมดูลัสสะสม (G' pattern) และไม่แสดงแผนภาพพลังงานเมื่อวิเคราะห์ด้วยดีเอสซี อย่างไรก็ตามโพรตีนซาร์โคพลาสมิกสามารถกลับสู่สภาพเดิมได้หลังกระบวนการตกตะกอนและการปรับพีเอชให้เป็นกลาง

PANCHAPORN TADPITCHAYANGKOON : EFFECT OF pH AND pH
SHIFT PROCESS ON CONFORMATIONAL CHANGES AND GELATION
OF SARCOPLASMIC PROTEINS FROM STRIPED CATFISH (*Pangasius
hypophthalmus*). THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT
YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 142 PP.

STRIPED CATFISH/SARCOPLASMIC PROTEINS/ pH SHIFT PROCESS/ DSC/
FT-RAMAN SPECTROSCOPY/ DYNAMIC RHEOLOGICAL PROPERTIES

Striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) mince was prepared using either washing treatments (water and alkali washing) or alkali extraction. Their physicochemical and textural properties were compared. Alkali extraction/acid precipitation process resulted in the highest protein recovery of 98.77% (dry matter) and the lowest fat content of 0.98 % (dry matter) and autolytic activity. Unsaturated fatty acids, namely oleic, linoleic, and docosahexaenoic acid were greatly reduced from fish tissue after alkali extraction/acid precipitation. In addition, alkali extraction/acid precipitation induced myofibrillar and sarcoplasmic proteins to undergo denaturation as only protein with molecular mass of 38 kDa remained soluble in a buffer containing 0-0.6 M NaCl. Water washing process was effective to improve gel-forming ability of striped catfish. However, the alkali-extracted fish protein isolate (FPI) gel showed higher breaking force but lower deformation than water-washed and alkali-washed gels. Addition of NaCl to alkali-extracted FPI gel improved deformation and whiteness but adversely affected breaking force. In addition, setting at 40°C for 30 min improved the breaking force of striped catfish gels.

To understand the role of sarcoplasmic proteins during pH shift process, the effect of pH on conformation changes of sarcoplasmic proteins was elucidated. Isoelectric point of striped catfish sarcoplasmic proteins was determined to be pH 5. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of soluble sarcoplasmic proteins treated at various pHs showed molecular mass ranging from 11 to 97 kDa with the abundant component at 43 kDa, presumably creatine kinase. A decrease in total sulfhydryl (SH) content was observed when the pH was shifted away from 6, indicating disulfide formation at pH lower and higher than 6. S_0 -ANS and S_0 -PRODAN increased gradually as the pH was shifted away from 6 to 12, implying that hydrophobic interactions were promoted during alkali extraction/acid precipitation process. Regarding changes of exothermic peak of Differential scanning calorimetry (DSC) thermogram, sarcoplasmic proteins treated at pH 5-9 enhanced protein-protein interaction probably due to disulfide bond formation and hydrophobic interaction, corresponding to an increase in storage modulus (G'). Gel network formation of sarcoplasmic proteins did not take place at extreme pHs (< 4 or > 9) while the viscoelastic properties of sarcoplasmic proteins were observed at pH 5.5 to 9. The gel point determined from a temperature which $G' = G''$ (loss modulus) was shifted to higher temperature when pH was either lower or higher than 7.

The effects of pH shift process including acid or alkali extraction, isoelectric precipitation and neutralization to pH 7 on structural changes of sarcoplasmic proteins and their rheological properties were determined. Sarcoplasmic proteins treated at extremely acidic pH (3) followed by isoelectric precipitation at pH 5.5 and then readjusting to pH 7 showed lower solubility than that treated at alkaline pH (pH =11), implying that sarcoplasmic proteins were recovered along with myofibrillar proteins

in FPI to a greater extent than under alkali condition. Various pH treatments induced disulfide formation as the total SH content was decreased. Raman spectra demonstrated that α -helix was a major secondary structure of sarcoplasmic proteins. Secondary structure was recovered after readjusting pH to 7. Isoelectric precipitation and pH readjustment caused the decreases in the -C-H and =C-H stretching band intensity and the changes in the ratio of the tyrosyl doublet, reflecting that pH shift process induced hydrophobic interaction of sarcoplasmic proteins. Sarcoplasmic proteins underwent denaturation during extreme acid and alkali extraction as G' pattern and DSC thermogram were not observed. However, sarcoplasmic proteins were refolded after isoelectric precipitation and pH readjustment to 7.

School of Food Technology

Academic Year 2008

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____