รหัสโครงการ SUT3-305-43-24-35

รายงานการวิจัย

โปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ
Proteinases and Transglutaminase in Freshwater Fish

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-43-24-35

รายงานการวิจัย

โปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ
Proteinases and Transglutaminase in Freshwater Fish

คณะผู้วิจัย
หัวหน้าโครงการ
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปี งบประมาณ พ.ศ. 2543 - พ.ศ. 2544

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2543-2544 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัย คุณเพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์ คุณอนุลักษณ์ วรเท่า คุณวรรณา ไหวพริบ และคุณศรชัย สินสุวรรณ ที่ทำงานอย่างอดทน มุมานะ จนทำให้โครงการสำเร็จลุล่วง ขอขอบคุณ คุณศรชัย สินสุวรรณ และ คุณจารุณี ผลมาตย์ ที่ช่วยจัดรูปเล่มของรายงาน ขอขอบคุณ คุณศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยจัดทำเอกสารการเบิกจ่ายและจัดทำบัญชีเป็นที่เรียบร้อย

บทคัดย่อ

จากการศึกษาปลาน้ำจืด 8 ชนิดได้แก่ปลานิล(*Oreochromis niloticus*) ปลายี่สกเทศ *(Labeo rohita*) ปลานวลจันทร์ (*Cirrhina microlepis*) ปลาดุกแอฟริกัน(*Clarias gariepinus*) ปลาจีน (*Hypophthalmichthys molitrix)* ปลาช่อน (*Channa striatus*) ปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) และปลาไน (*Cyprinus carpio*) พบว่าปลานิลมีกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสสูงสุดคือ 60.3±0.3 unit/g muscle ส่วนปลาดุกแอฟริกันมีกิจกรรมโปรติเนสสูงสุด คือ 3.27±0.6 μmol of tyrosine/g muscle/h รองลงมาคือปลายี่สกเทศซึ่งมีกิจกรรมโปรติเนส 2.03±0.2 μmol of tyrosine/g muscle/h โปรติเนสในกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ 65 องศาเซลเซียส การเร่งกิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลานิลเกิดสูงสุดที่พีเอช 5 และลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ส่วนในปลายี่สกเทศเกิดสูงสุดในช่วงพีเอช 5.5, 7, และ 8.5 กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศเกิดสูงสุดเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ 0.5% และมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น โปรติเนสในปลานิลเป็นประเภทที่ยึดติดกับกล้ามเนื้อซึ่งไม่สามารถถูกกำจัดได้ด้วยการล้าง กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลถูกยับยั้งโดย phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), ρ-tosyl-L-lysyl-chloromethylmethyl ketone (TLCK) และ leupeptinซึ่งบ่งชี้ว่า ซีรีนโปรติเนสมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิล ส่วน trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64) สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลายี่สกได้สูงสุด ซึ่งแสดงถึงบทบาทของโปรติเนสกลุ่มซิสติอีนต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลายี่สกเทศ

ค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหัก เพิ่มขึ้นเมื่อบ่มเนื้อปลานิลที่ 40 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) แต่ลดลงพร้อมกับปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส การเติมแคลเซียมในระดับ 0.1-0.3% ร่วมกับการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส สามารถปรับปรุงลักษณะเนื้อสัมผัสของเจลปลานิลบดให้ดีขึ้น ($p<0.05$) โดยตัวอย่างดังกล่าวมีการลดลงของมัยโอซินสายหลัก (MHC) พร้อมกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนขนาดใหญ่ (HMW) ซึ่งบ่งชี้ถึงกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลา ผลของเซทติ้งเกิดเพียงเล็กน้อยในเจลปลายี่สกเทศ แต่เกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้ออย่างเด่นชัดที่ 65 องศาเซลเซียส ลักษณะทางเนื้อสัมผัสของเจลปลานวลจันทร์ดีขึ้นเมื่อบ่มที่ 40-55 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) แต่แคลเซียมคลอไรด์ไม่มีผลต่อการปรับปรุงคุณภาพเจลปลานวลจันทร์ ($p>0.05$)

จากการศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลปลานิลพบว่า นอกจากแคลเซียมมีผลกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนสในเนื้อปลาแล้ว แคลเซียมยังมีผลต่อ

รูปแบบโครงสร้าง (conformation) ของแอคโตมัยโอซินด้วย การเกาะตัว (aggregation) ของแอคโตมัยโอซินที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นตามปริมาณแคลเซียม แรงกระทำไฮโดรโฟบิกเป็นแรงกระทำที่เด่นในการเกาะตัวของแอคโตมัยโอซินที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ทั้งแรงกระทำไฮโดรโฟบิกและพันธะโควาเลนท์ที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์เกี่ยวข้องกับการเกาะตัวของแอคโตมัยโอซินที่ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณแอลฟา-เฮลิกซ์ของแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงและ 40 องศาเซลเซียส 30 นาทีลดลงเมื่อระดับการเติมแคลเซียมเพิ่มขึ้น โดยมีค่าต่ำสุดที่แคลเซียมเข้มข้น 30-50 มิลลิโมลาร์ การสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิเกิดขึ้นพร้อมกับการเพิ่มพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ส่งผลให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นระหว่างแอคโตมัยโอซิน คุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของแอคโตมัยโอซินเจลเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณแคลเซียมเพิ่มขึ้นถึง 100 มิลลิโมลาร์

Abstract

Proteolytic and transglutaminase (TGase) activities of various freshwater fish species were investigated. These species included tilapia (*Oreochromis niloticus*), rohu (*Labeo rohita*), small scale mud carp (*Cirrhina microlepis*), African catfish (*Clarias gariepinus*), silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), striped snake-head fish (*Channa striatus*), common silver barb (*Puntius gonionotus*), and common carp (*Cyprinus carpio*). Tilapia contained the highest TGase activity of 60.3 ± 0.3 unit/g muscle, while African catfish contained the highest autolytic activity of 3.27 ± 0.6 μmol of tyrosine/g muscle/h , followed by rohu of 2.03 ± 0.2 μmol of tyrosine/g muscle/h. Optimum temperature for autolytic activity of both tilapia and rohu was at 65°C. Autolytic activity of tilapia was highest at pH 5 and decreased as pH increased. Optimum pH for autolytic activity of rohu was at pH 5.5, 7, and 8.5. Autolytic activity of both species was the highest at 0.5% NaCl and decreased as NaCl concentration increased. Proteinases in tilapia appeared to be myofibril-bound proteinases which could not be completely removed by washing. Autolytic activity of tilapia was inhibited by phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), ρ-tosyl-L-lysyl-chloromethyl ketone (TLCK), and leupeptin, indicating the involvement of serine proteinase in textural degradation of tilapia mince. In contrast, autolytic activity of rohu was somewhat inhibited by trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64), suggesting that cysteine proteinase(s) were responsible for textural degradation in rohu.

Breaking force and deformation of tilapia mince gel increased when preincubated at 40°C ($p<0.05$), but decreased in concomitant with an increased oligopeptides when preincubated at 65°C. Addition of 0.1-0.3% $CaCl_2$ in conjunction with preincubation at 40°C improved textural properties of tilapia mince gel ($p<0.05$). In these samples, loss of myosin heavy chain (MHC) was found in concomitant with an increased higher molecular weight proteins (HMW), suggesting the cross-linking reaction catalyzed by endogenous TGase. Setting effect appeared to be minimal in rohu mince. In contrast, proteolytic degradation was obvious at 65°C. Textural properties of small scale mud carp were improved when preincubated at 40-55°C ($p<0.05$), but $CaCl_2$ had no effect on improving textural properties ($p>0.05$).

Gel enhancing effect of $CaCl_2$ in tilapia gel was further studied. Besides activating endogenous TGase, Ca^{2+} appeared to affect actomyosin conformation. Aggregation of tilapia actomyosin increased with Ca^{2+} concentration. Hydrophobic interaction was predominant in aggregates induced at 4°C, while both hydrophobic interaction and nondisulfide covalent bondings were involved in aggregates formed at 40°C. α-Helical content of actomyosin incubated at either 4°C for 24 h or 40°C for 30 min decreased with Ca^{2+} concentration and reached the minimum at 30-50 mM $CaCl_2$. Loss of secondary structure occurred in concomitant with an increased surface hydrophobicity, which in turn promoted hydrophobic interaction of actomyosin. Textural properties of actomyosin gels also increased with Ca^{2+} concentration up to 100 mM.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ i

บทคัดย่อภาษาไทย ii

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iv

สารบัญ vi

สารบัญตาราง vii

สารบัญภาพ viii

บทนำ 1

วัตถุประสงค์ 7

ขอบเขตการวิจัย 7

วิธีดำเนินการวิจัย 9

- ชุดการทดลองที่ 1 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ 9
- ชุดการทดลองที่ 2 การย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ 10
- ชุดการทดลองที่ 3 ผลของระดับแคลเซียมต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด 12
- ชุดการทดลองที่ 4 ผลของแคลเซียมไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล 14

ผลการวิจัย

1. กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ 17
2. การย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ 19
3. ผลของระดับแคลเซียมต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด 25
4. ผลของแคลเซียมไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล 35

สรุป 48

เอกสารอ้างอิง 49

ประวัตินักวิจัย 53

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลผลิตและมูลค่ารวมของปลาน้ำจืดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544 1

ตารางที่ 2 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและทรานกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดสายพันธุ์ต่างๆ 18

ตารางที่ 3 ระดับการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อโดยสารยับยั้งโปรติเนสต่างๆ 24

ตารางที่ 4 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและทรานกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลา 26

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ 20

รูปที่ 2 ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ 20

รูปที่ 3 SDS-PAGE ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิล (a) และปลายี่สกเทศ (b) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0.5-4 ชั่วโมง R = เนื้อปลาที่ไม่ได้บ่ม , S = Molecular weight standard, MHC = myosin heavy chain 21

รูปที่ 4 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการบ่มเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่างๆ 21

รูปที่ 5 ผลของระดับโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ 22

รูปที่ 6 ผลของการล้างต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลานิลและปลายี่สกเทศ 23

รูปที่ 7 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ. จุดแตกหักของเจลจากเนื้อปลานิลที่ระดับการเติมแคลเซียมไอออนต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 4C = บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง 25C = บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง 40C 55C 65C = บ่มที่ 40, 55, 65 องศาเซลเซียสตามลำดับ 1 ชั่วโมง 90C = ให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที 27

รูปที่ 8 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ. จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลายี่สกเทศที่ระดับการเติมแคลเซียมไอออนต่างๆ ตัวอักษรย่อเหมือนรูปที่ 7 29

รูปที่ 9 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ. จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลานวลจันทร์ที่ระดับการเติมแคลเซียมไอออนต่างๆ ตัวอักษรย่อเหมือนรูปที่ 7 30

รูปที่ 10 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในเจลเนื้อปลาชนิดต่างๆ ที่ไม่ได้เติมแคลเซียมไอออนและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 31

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 11 SDS-PAGE ของเจลโปรตีนจากปลานิล (a) ปลายี่สกเทศ (b) และปลานวลจันทร์ (c) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ S = standard molecular weight, P = paste, 4-65 = อุณหภูมิในการบ่มก่อนให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส, 90 = ตัวอย่างให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสโดยไม่ได้บ่ม, MHC = myosin heavy chain 33

รูปที่ 12 SDS-PAGE (5% acylamide) ของเจลปลานิลที่เติมแคลเซียมในระดับ 0 - 0.3% และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง และให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที (a) และไม่ได้บ่มโดยให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที (b) S = Standard molecular weight, 0 – 0.3 = ระดับการเติมแคลเซียมเป็น %, MHC = Myosin heavy chain, HMP = high molecular weight protein 34

รูปที่ 13 ผลของระดับแคลเซียมต่อการละลายของแอคโตมัยโอซินปลานิล N = Negative control (เติม EGTA), C = control, 10-100 = ความเข้มข้นของแคลเซียมในหน่วยมิลลิโมลาร์ 36

รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่นของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิลบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที ที่ระดับแคลเซียม 0 – 100 มิลลิโมลาร์ 36

รูปที่ 15 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิล ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 10 มิลลิโมลาร์ (a), 20 – 40 มิลลิโมลาร์ (b), 50 – 100 มิลลิโมลาร์ (c) S = standard molecular weight, N = megative control (+EGTA), C = control, 10 – 100 = ความเข้มข้นของแคลเซียมในหน่วยมิลลิโมลาร์และไม่มีการบ่ม, 10H – 100H = ตัวอย่างซึ่งมีแคลเซียมและบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที 37

รูปที่ 16 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิล ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออน 70 มิลลิโมลาร์ (a), 100 มิลลิโมลาร์ (b) S = standard molecular weight, C = control, 0.5 – 4 = เวลาในการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสมีหน่วยเป็นชั่วโมง 38

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 17 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิล ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ (C) และมีสารยับยั้งทรานกลูทามิเนส, NEM และ PMSF โดยบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง S = standard molecular weight 39

รูปที่ 18 รูปแบบ SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ในภาวะที่ไม่เติมแคลเซียม (a) และ แคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์และละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3 – 10% และ SDS เข้มข้น 5% + BME เข้มข้น 2%, S = standard molecular weight, C = ตัวอย่างที่ไม่ได้ละลายใน SDS 40

รูปที่ 19 รูปแบบ SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิล ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยไม่มีแคลเซียม (a) และ แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (b) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง 0-24 = ตัวอย่างบ่มเป็นเวลาต่างๆ และผสมกับ treatment buffer, sds0 - sds24 = ตัวอย่างที่ละลาย SDS เข้มข้น 5% ก่อนผสม treatment buffer, S = standard molecular weight 42

รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินปลานิลที่ระดับแคลเซียมต่างๆ และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส (a) และ 40 องศาเซลเซียส (b) เป็นระยะเวลาต่างๆ 43

รูปที่ 21 CD spectra ของแอคโตมัยโอซินปลานิลที่แคลเซียมระดับต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส (a) และเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที (b) 45

รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเฮลิกซ์ของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียมและสภาวะการบ่มต่างๆ 46

รูปที่ 23 ค่าแรง (a) และระยะทาง ณ จุดแตกหัก (b) ของเจลแอคโตมัยโอซินปลานิลที่ระดับการเติมแคลเซียมและสภาวะในการบ่ม 47

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ ที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัยและทบทวนเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยมีอัตราการขยายตัวการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำตั้งแต่ปี พ.ศ. 2526-2536 ประมาณร้อยละ 10.85 (www.fao.org) ซึ่งนับเป็นประเทศที่มีการขยายตัวของการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดในระดับสูงรองจากประเทศเวียดนาม (ร้อยละ 15.97) และประเทศจีน (ร้อยละ 13.86) ในปี 2544 มูลค่าผลผลิตปลาน้ำจืดของประเทศคิดเป็น 279,696 ตัน คิดเป็นมูลค่า 9.3 พันล้านบาท (www.fisheries.go.th) โดยปลาที่มีผลผลิตและมูลค่าสูง ได้แก่ ปลานิล ปลาดุก ปลาตะเพียน ปลาสลิดและปลาสวาย ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลผลิตและมูลค่ารวมของปลาน้ำจืดในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2544

ชนิดของปลา	ผลผลิตรวม (ตัน)	มูลค่า (พันบาท)
ปลานิล (Nile tilapia)	84,480	2,269,588
ปลาดุก (Walking catfish)	77,905	2,032,625
ปลาตะเพียน (Thai silver carp)	42,152	1,119,297
ปลาสลิด (Nake skin gourami)	22,519	898,385
ปลาสวาย (Striped catfish)	14,638	215,691
ปลาช่อน (Striped snakle-head)	6,830	345,610
ปลาไน (Common carp)	4,773	146,659
ปลายี่สกเทศ (Rohu)	1,610	44,525
ปลาแรด (Giant gourami)	1,167	65,380
ปลานวลจันทร์ (Small scale mud carp)	799	17,007
ปลาหมอไทย (Common climbing perch)	403	16,428

ที่มา: กรมประมง (www.fisheries.go.th)

นอกจากปลานิลซึ่งมีการส่งออกในรูปปลาแช่แข็งแล้ว ปลาน้ำจืดชนิดอื่นมักนิยมบริโภคภายในประเทศ โดยบริโภคในครัวเรือน และไม่มีการใช้ประโยชน์ในเชิงอุตสาหกรรมมากนัก ดังนั้นความต้องการปลาน้ำจืดของตลาดภายในประเทศจึงไม่แน่นอน ปลาน้ำจืดจึงมีมูลค่าต่ำ อย่างไรก็ตามหากมีการใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืดเพื่อเป็นวัตถุดิบในระดับอุตสาหกรรม ความต้องการปลาน้ำจืดจะเพิ่มขึ้น เป็นผลให้ราคามีเสถียรภาพมากขึ้น

โปรตีนจากกล้ามเนื้อปลาสามารถแบ่งออกเป็นประเภทใหญ่ ๆ ได้ 3 ประเภท คือ

1. **มัยโอฟิบริลลาร์ (Myofibrillar proteins)** คือโปรตีนโครงสร้างหลักของกล้ามเนื้อซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ ในกล้ามเนื้อปลาโดยทั่วไปมีโปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์คิดเป็นร้อยละ 70-79 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดในกล้ามเนื้อ (Lanier, 2000) โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยมัยโอซิน (myosin) แอคติน (actin) โทรโปมัยโอซิน (tropomyosin) โทรโปนิน (troponin) เป็นต้น โปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นของไอออน (ionic strength) สูงคือที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1-8 โปรตีนโปรตีนเหล่านี้ไม่ละลายในน้ำหรือสารละลายที่ความเข้นข้นไอออนต่ำ (ร้อยละ 0.05-0.5) โปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์มีโครงสร้างเป็นเส้นใย (fibrous) และเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการเกิดเจล ซึ่งเป็นการเรียงตัวอย่างมีระเบียบของโปรตีนเกิดเป็นโครงร่าง 3 มิติ ทำให้มีความสามารถในการอุ้มน้ำ และเกิดเนื้อสัมผัสหลากหลาย นอกจากนี้โปรตีนมัยโอฟิบิลลาร์ยังมีความสามารถในการเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) โปรตีนหลักที่มีความสามารถในการเกิดเจลคือมัยโอซิน

2. **โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Sarcoplasmic proteins)** โปรตีนในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่ละลายน้ำหรือละลายในสารละลายความเข้นข้นไอออนต่ำ โดยทั่วไปกล้ามเนื้อปลาประกอบด้วยโปรตีนซาร์โคพลาสมิกร้อยละ 18-25 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด โปรตีนซาร์โคพลาสมิกเป็นโปรตีนที่มีรูปร่างกลม (globular proteins) และประกอบไปด้วยโปรตีนชนิดต่างๆ เช่น ฮีม (heme) และเอนไซม์ต่างๆ ในกล้ามเนื้อเช่น เอนไซม์ในกลุ่มโปรติเนส (proteinases) เอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส (transglutaminase) เป็นต้น

3. **โปรตีนสโตรมา (Stroma proteins)** คือโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เป็นโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำและสารละลายเกลือ แต่สามารถละลายได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างสูง โปรตีนสโตรมาไม่มีบทบาทต่อการเกิดเจล ในกล้ามเนื้อมีองค์ประกอบของโปรตีนสโตรมาประมาณร้อยละ 3-5 ของปริมาณโปรตีนทั้งหมด คอลลาเจนเป็นโปรตีนสำคัญในกลุ่มนี้

การเกิดเจลเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (functionality) ที่สำคัญประการหนึ่งของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา คุณสมบัติภายใน (intrinsic protperties) ของโปรตีนกล้ามเนื้อ เช่นปริมาณเอนไซม์ในโปรตีนซาร์

โคพลาสมิก จะแตกต่างกันตามแต่ชนิดของปลา ดังนั้นองค์ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลา จะทำให้เกิดการใช้ประโยชน์จากในปลาน้ำจืดได้เหมาะสมและสูงสุด และยังสามารถปรับปรุงคุณภาพของเจลปลาน้ำจืดได้อย่างเป็นระบบ อันจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของปลาน้ำจืดต่อไป

เอนไซม์โปรติเนส (Proteinases)

โปรติเนสเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน ซึ่งสามารถจำแนกประเภทตามตำแหน่งของพันธะเปปไทด์ที่ย่อยสลาย (hydrolyse) ได้ 2 ประเภทคือ เอนโดโปรติเนส (endoproteinase) และ เอกโซโปรติเนส (exoproteinases) โดยเอนโดโปรติเนสนั้นจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเปปไทด์ที่อยู่ภายในสายโปรตีนทำให้เกิดเปปไทด์สายสั้น (oligopeptides) ในขณะที่เอกโซโปรติเนสจะสลายพันธะเปปไทด์ที่อยู่ด้านนอกของสายโปรตีนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะมิโน เอนโดโปรติเนสเป็นเอนไซม์ที่มีผลกระทบต่อคุณสมบัติในการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยตรง เมื่อสายโปรตีนกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายเกิดเป็นเปปไทด์สายสั้น ความสามารถในการเกิดเจลย่อมลดลง เอนโดโปรติเนสสามารถจำแนกออกเป็น 4 ประเภทตามชนิดของกรดอะมิโนที่ active site ของเอนไซม์ ได้เป็น ซีรีน (serine) ซิสติอีน (cysteine) แอสพาติก (aspartic) และเมธทาลโล (metallo) โปรติเนส นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งประเภทของโปรติเนสตามค่าพี-เอช ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาได้เป็น acid, netural และ alkaline proteinase ซึ่งคือโปรติเนสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาในสภาวะที่เป็นกรด เป็นกลาง และเป็นด่าง ตามลำดับ

Acid proteinases โปรติเนสประเภทนี้อยู่ในส่วนของไลโซโซม (lysosome) ของเซลล์ ซึ่งมีชื่อโดยรวมว่าคาเธพซิน (cathepsins) เอนไซม์กลุ่มนี้ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์ มีรายงานการพบเอนไซม์ประเภทนี้ในกล้ามเนื้อปลาหลายชนิด ปลาซาลมอนในระยะวางไข่มีกิจกรรมของเอนไซม์ในกลุ่มคาเธพซิน-บี (B) คาเธพซิน-ดี (D) คาเธพซิน-เอช (H) และ คาเธพซิน-แอล (L) สูงกว่าในช่วงปกติ (Yamashita and Konagaya 1990b; Yamashita and Konagaya, 1991) คาเธพซิน-บี จัดเป็นซีสติอีนโปรติเนสเนื่องจากมีกรดอะมิโนซิสติอีนที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (activie site) เอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีในช่วงพี-เอช 5.5-6 และที่พบในปลาไน (carp) ปลากระบอก (grey mullet) และปลานิล (tilapia) มีขนาดประมาณ 23-29 กิโลดาลตัน (Makinodan et al., 1971; Sherekar et al., 1988) เอนไซม์คาเธพซิน-บีในปลาแปซิฟิกไวท์ติ้ง (Pacific whiting) มีกิจกรรมลดลงเมื่อล้างกล้ามเนื้อปลาด้วยน้ำ (An et al., 1994) ดังนั้นจึงสันนิษฐานว่าเอนไซม์นี้น่าจะอยู่ในส่วนของเหลวซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic fluid)

คาเธพซิน-ดี เป็นเอนไซม์ที่เชื่อว่ามีบทบาทสำคัญต่อการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อขณะแช่เย็น เอนไซม์นี้มีกรดอะมิโนแอสพาติกที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่

ค่าพี-เอช 3-4.5 มีรายงานว่าคาเธพซิน-ดี สามารถย่อยสลายไททิน (titin) คอนเนคติน (connectin) โปรตีน-ซี (C-protein) โปรตีน-เอ็ม (M-protein) และมัยโอซิน (myosin) ได้ดี และสลายโปรตีนแอคติน (actin) โทรโปนิน-ที (troponin-T) โทรโปนิน-ไอ (troponin-I) และโทรโปมัยโอซิน (tropomyosin) ในอัตราที่ช้ากว่า เอนไซม์นี้สามารถถูกยับยั้งได้โดย pepstatin ซึ่งเป็นสารยับยั้งจำเพาะสำหรับแอซิดโปรติเนส อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าคาเธพซิน-ดีไม่ใช่เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในระหว่างการเกิดเจล เนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงที่ค่าพี-เอชที่เป็นกลาง (Kang and Lanier, 2000)

คาเธพซิน-เอช เป็นเอนโดโปรติเนสที่มีซิสติอีนที่บริเวณเร่ง และสามารถแสดงกิจกรรมของอะมิโนเปปติเดส (aminopeptidase) ซึ่งจัดเป็นเอกโซเปปติเดสได้อีกด้วย คาเธพซิน-เอช มีขนาดโมเลกุลประมาณ 28 กิโลดาลตัน และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่พี-เอช 7 Schwartz and Bird (1977) รายงานว่าคาเธพซิน-เอช สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายมัยโอซินได้เร็วกว่าคาเธพซิน-บี 2-3 เท่า นอกจากนี้ An et al. (1994) รายงานว่าพบกิจกรรมของคาเธพซิน-เอชในเนื้อปลาแปซิฟิคไวท์ติ้ง สูงสุดที่ 20 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามหลังกระบวนการล้าง ตรวจไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าว เนื่องจากคาเธพซิน-เอชแสดงค่ากิจกรรมที่อุณหภูมิที่ค่อนข้างต่ำ (25-30 องศาเซลเซียส) ดังนั้นเอนไซม์นี้อาจไม่มีบทบาทต่อการเสื่อมสลายของเจล เนื่องจากการเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาจำเป็นต้องได้รับการเหนี่ยวนำโดยความร้อน

คาเธพซิน-แอล จัดเป็นเอนโดโปรติเนสที่สามารถย่อยสลายมัยโอซินในอัตราที่เร็วกว่าคาเธพซิน-บีประมาณ 10 เท่า (Schwartz and Bird, 1977) เอนไซม์นี้มีหลายไอโซฟอร์ม (isoform) โดยมีค่าพี-ไอประมาณ 3.0-6.5 และสามารถเร่งปฏิกิริยาในช่วงค่าพี-เอชที่กว้างประมาณ 3.0-6.5 (Kang and Lanier, 2000) คาเธพซิน-แอลถูกยับยั้งโดย ไอโอโดอะซีเตท (iodoacetate) ลูเปปทิน (leupeptin) และ แอนติเพน (antipain) แต่ไม่ถูกยับยั้งโดย เพปสตาติน (pepstatin) และ ฟีนิลมีเธนซัลโฟนิลฟลูออไรด์ (phenylmethane sulfonyl fluoride) นอกจากนี้คาเธพซิน-แอล สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยสารประกอบที่มีหมู่ซัลฟไฮดริล (sulfhydryl group) เช่น ซีสติอีน (cysteine) เบต้า-เมอแคปโทเอทธานอล (β-mercaptoethanol) คาเธพซิน-แอลเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการเสื่อมสลายของเนื้อปลาซาลมอนในช่วงระยะหลังวางไข่ ทำให้เกิดลักษณะเนื้อสัมผัสที่ยุ่ยเละ (Yamashita and Konagaya, 1990a) นอกจากนี้ An et al. (1994) คาเธพซิน-แอล เป็นเอนไซม์หลักที่ทำให้เกิดเนื้อสัมผัสยุ่ยเละในเนื้อปลาและซูริมิจากปลาแปซิฟิคไวท์ติ้ง เอนไซม์นี้ถูกกำจัดออกไม่หมดขั้นตอนการล้าง คาเธพซิน-แอลจากปลาแปซิฟิคไวท์ติ้ง มีขนาดประมาณ 28.8 กิโลดาลตัน สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงสุดที่ 55 องศาเซลเซียส ที่ค่าพี-เอช 5.5 แต่ก็สามารถย่อยสลายโปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์ได้ที่ค่าพีเอชที่เป็นกลาง (Seymour et al., 1994)

Neutral proteinases คือเอนไซม์ในกลุ่มคาลเพน (calpain) ซึ่งสามารถย่อยสลายมัยโอซินและแอคตินในสภาวะที่พี-เอชเป็นกลาง และจำเป็นต้องมีแคลเซียมไอออนเป็นตัวกระตุ้น คาลเพนจัดเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะเดสมิน (desmin) นิบูลิน (nebulin) และไททิน (titin) ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของ Z-disk และเนื้อนุ่มขึ้น (tenderization) สามารถพบคาลเพนได้ในปลานิล (tilapia) และปลาไน (carp) (Jiang et al., 1991; Toyohara and Makinodan, 1989) และเนื่องจากเอนไซม์สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ที่อุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) คาลเพนจึงอาจมีบทบาทต่อการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในช่วงระยะเวลาเริ่มต้นของการเก็บปลา คาลเพนถูกยับยั้งโดย Zn^{2+}

Alkaline proteinases คือเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาได้ดีในช่วงค่าพี-เอชที่เป็นด่าง (7.7-8.1) สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง (60-65 องศาเซลเซียส) เอนไซม์ประเภทนี้จะฝังตัวติดกับโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยเฉพาะมัยโอซินและแอคติน ดังนั้นจึงเป็นเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดปัญหาเนื้อยุ่ยเละได้มากกว่าเอนไซม์ในกลุ่มคาเธพซิน ซึ่งถูกจำกัดอยู่เฉพาะในส่วนของไลโซโซม (lysosome) Makinodan et al. (1985) รายงานว่า alkaline proteinase เป็นเอนไซม์หลักที่ทำให้เกิดเนื้อสัมผัสยุ่ยเละในเจลที่เตรียมจากปลา croaker เมื่อสกัด alkaline proteinase จากปลาไน (carp) พบว่าเอนไซม์นี้มีขนาด 780 กิโลดาลตัน (Iwata et al., 1974) ในขณะที่ alkaline proteinase ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อปลา croaker แสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่พี-เอช 8 และประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (subunit) ซึ่งแต่ละหน่วยย่อยมีขนาดประมาณ 45-57 กิโลดาลตัน (Makinodan et al., 1985) เนื่องจากมีหลายหน่วยย่อยเอนไซม์จึงไม่มีเสถียรภาพที่อุณหภูมิสูง และสามารถแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำกว่า alkaline proteinase ที่พบในปลาชนิดอื่น นอกจากนี้ Choi et al. (1999) ทำบริสุทธิ์ (purify) alkaline protienases จากกล้ามเนื้อปลา Atlantic menhaden ซึ่งพบเอนไซม์ 2 รูปแแบบที่มีขนาด 707 และ 450 กิโลดาลตัน และสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่ค่าพี-เอช 8.0 ที่ 55 องศาเซลเซียส และมีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ทั้งสองนี้สามารถเร่งปฏิกิริยาแม้ว่าจะมีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงน่าที่จะเป็นสาเหตุของการเกิดเนื้อยุ่ยเละของเจล การเกิดเนื้อยุ่ยเละในปลาทรายแดงก็มีสาเหตุมาจาก alkaline proteinase ซึ่งสามารถย่อยสลายมัยโอซินสายหลัก (myosin heavy chain) ในสภาวะที่มีเกลือได้ (Toyohara et al., 1990)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาเอนไซม์โปรติเนสในเนื้อปลานั้น ส่วนใหญ่เป็นงานวิจัยจากต่างประเทศที่ศึกษาในปลาทะเล อาจมีปลาน้ำจืดบ้างแต่ไม่มากนัก ยังไม่มีการศึกษาถึงปัญหาเอนไซม์โปรติเนสในปลาน้ำจืดที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย หากมีการศึกษาในประเด็นดังกล่าว จะทำให้เกิดความเข้าใจต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นแนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์และการใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืด

เอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส (Transglutaminase, TGase)

ทรานสกลูทามิเนสเป็นเอนไซม์ในกลุ่ม ทรานสเฟอเรส (transferase) ที่มีชื่อตามระบบว่า protein-glutamineγ-glutamyl transferase (EC 2.3.2.13) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายกลุ่มเอซิล (acyl transfer reaction) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวจะต้องมีสารตั้งต้นที่ให้กลุ่มเอซิล (acyl donor) และสารตั้งต้นที่รับกลุ่มเอซิล (acyl acceptor) สารที่ให้กลุ่มเอซิลคือ กลุ่ม γ-carboxyamide ของกลูทามีนบนสายโปรตีนหรือเปปไทด์ ส่วนสารที่รับกลุ่มเอซิลคือเอมีนปฐมภูมิ (primary amine) หากเกิดปฏิกิริยาระหว่างกลูทามีนและไลซีนซึ่งมีกลุ่มอะมิโนที่ตำแหน่งเอพซิลอน (ε-amino) ของสายโปรตีน จะทำให้เกิดการเชื่อมโยงของสายโปรตีนทั้งภายในโมเลกุลของโปรตีน (intra-molecular crosslinking) และระหว่างสายโปรตีน (inter-molecular crosslinking) เกิดพันธะไอโซเปปไทด์ (isopeptide) ที่เรียกว่า ε-(γ-glutamyl)lysine ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์ การเพิ่มจำนวนพันธะดังกล่าวในเจลโปรตีน จะทำให้ลักษณะเนื้อสัมผัสมีความยืดหยุ่นดีขึ้น

ทรานสกลูทามิเนสมีหลายชนิด แบบที่ 1 (type I) เอนไซม์จับอยู่กับ membrane ของไลโซโซมหรือไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ดังนั้นในการสกัดเอนไซม์ส่วนนี้อาจหลุดออกมาไม่หมด เอนไซม์แบบที่ 2 (type II) อยู่ในส่วนของ cytosol ซึ่งสามารถละลายออกมาได้เมื่อสกัด ขนาดของเอนไซม์จะแตกต่างตามแหล่ง เช่นทรานสกลูทามิเนสจากตับหนูตะเภาเป็นเปปไทด์สายเดี่ยว (monomer) มีขนาด 75-80 กิโลดาลตัน ในขณะที่ทรานสกลูทามิเนสจากเชื้อรา *Physarum polycephalum* มี 2 หน่วยย่อย (subunit) ซึ่งมีขนาด 77 กิโลดาลตัน ส่วน plasma factor XIII ซึ่งจัดเป็นรูปหนึ่งของทรานสกลูทามิเนสมี 4 หน่วยย่อย และมีขนาด 300-350 กิโลดาลตัน (Ashie and Lanier 2000) ทรานสกลูทามิเนสที่พบในปลาเป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยโปรตีนสายเดียว (monomer) และมีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์นี้ในปลาไน *(Cyprius carpio)* ปลา rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss)* ปลา chum salmon *(Oncorhynchus keta)* ปลา atka mackerel *(Pleurogrammus azonus)* และ white croaker *(Argyrosomus argentatus)* (Kishi et al., 1991; Kumazawa et al., 1997; Nozawa et al., 1997) ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยการเชื่อมต่อของกรดอะมิโน 5 ตัวคือ Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp และเนื่องจากซิสติอีน (cys) มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยา (Folk, 1980) ทรานสกลูทามิเนสจึงถูกยับยั้งโดยสารที่ทำปฏิกิริยากับกลุ่มซิสติอีน เช่น N-ethylmaleimide (NEM), iodoacetic acid (IAA), p-chloromercuribenzoate (PCMB) นอกจากนี้ทรานสกลูทามิเนสยังถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} Zn^{2+} (Kumazawa et al., 1997) เนื่องจากไอออนเหล่านี้สามารถจับกับซิสติอีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

ทรานสกลูทามิเนสจากเนื้อปลาจำเป็นต้องมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นสารกระตุ้น (activator) ซึ่งเป็นคุณสมบัติจำเพาะของทรานสกลูทามิเนสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนทรานสกลูทามิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ไม่จำเป็นต้องใช้แคลเซียมไอออนในการเร่งปฏิกิริยา Folk and Cole (1966) รายงานว่า

แคลเซียมไอออนเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (conformation) ของทรานสกลูทามิเนส ทำให้กลุ่ม SH ของซิสติอีนอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ปริมาณแคลเซียมไอออนที่ต้องการสำหรับ ทรานสกลูทามิเนสแตกต่างกันตามแหล่งของเอนไซม์ ปริมาณแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมสำหรับทรานสกลูทามิเนสจากปลา walley pollock คือ 3 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ปริมาณที่เหมาะสมสำหรับปลา red sea bream และปลาไนคือ 0.5 และ 5 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (Kishi et al., 1991; Kumazawa et al., 1997; Yasueda et al., 1994)

เนื่องจากปลาแต่ละชนิดมีปริมาณโปรติเนสและทรานกลูทามิเนสที่แตกต่างกัน จึงทำให้มีลักษณะเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกัน ปลาที่มีโปรติเนสในปริมาณสูง จะเกิดลักษณะเนื้อสัมผัสที่เหลวเละเมื่อได้รับความร้อน ในขณะที่ปลาซึ่งมีทรานกลูทามิเนสในปริมาณสูง จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีเมื่อนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ดังนั้นความรู้ในเรื่องชนิดและปริมาณของเอนไซม์ในกล้ามเนื้อปลาจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญเพื่อนำปลาชนิดนั้นๆ มาแปรรูปเพื่อเพิ่มมูลค่า ซึ่งจะนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาปริมาณโปรติเนส และปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละอันเนื่องจากเอนไซม์ในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น ปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์ เป็นต้น
2. เพื่อศึกษาปริมาณทรานสกลูทามิเนสและการเชื่อมโยงสายโปรตีนอันเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญในข้อ 1
3. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเจลของโปรตีนปลาน้ำจืด

ขอบเขตการวิจัย

เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์โปรติเนสในปลาน้ำจืดชนิดต่าง ๆ และศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ต่อการเกิดปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละในปลาแต่ละชนิด และศึกษากิจกรรมของทรานกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดแต่ละชนิด นอกจากนี้ศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเชื่อมโยงโปรตีน (cross-linking) ในปลาน้ำจืด รวมถึงบทบาทของโปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสและแคลเซียมไอออนต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด

วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

ศึกษากิจกรรมของโปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดสายพันธุ์ต่างๆ เช่น ปลานิล ปลาใน ปลาตะเพียน และอื่นๆ เป็นต้น โดยวิเคราะห์กิจกรรมของโปรติเนสจากการย่อยสลายตัวเองของโปรตีนกล้ามเนื้อ (autolysis assay) และใช้วิธีสกัดเอนไซม์โดยใช้เคซีน (casein) เป็นสารตั้งต้น วิเคราะห์การเสื่อมสลายโปรตีนกล้ามเนื้อด้วยเทคนิค sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) วิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูทามิเนสโดยสารตั้งต้นสังเคราะห์ monodansyl cadaverine และ N,N'-dimethylated casein จากนั้นคัดเลือกปลาที่มีศักยภาพมาศึกษาคุณสมบัติในการเกิดเจล และปัจจัยที่มีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัส เช่นอุณหภูมิในการบ่ม ปริมาณการเติมแคลเซียมไอออน นอกจากนี้ศึกษาผลของแคลเซียมไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของปลาน้ำจืดที่มีศักยภาพที่สามารถพัฒนาและแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ และทำให้ทราบถึงสภาวะในการแปรรูปที่เหมาะสมเพื่อหลีกเลี่ยงการทำงานของโปรติเนส และสภาวะที่ส่งเสริมการทำงานของทรานกลูทามิเนส ความรู้ดังกล่าวจะเป็นข้อมูลสำคัญในการพัฒนาการแปรรูปปลาน้ำจืดที่เหมาะสมและการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด

หน่วยงานที่นำผลวิจัยไปใช้ประโยชน์

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กองประมงน้ำจืด โรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์ประมงขนาดเล็ก ขนาดกลางและขนาดใหญ่

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา มีขนาดประมาณ 500-800 กรัม/ตัว จับปลาแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นชำแหละเอาส่วนเนื้อเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป ส่วนปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลานวลจันทร์ (*Cirrhiana microlepis*) นั้นซื้อจากตลาดค้าส่งปลาน้ำจืดประจำจังหวัดนครราชสีมา (ตลาดย่าโม) ส่วนปลาชนิดอื่นเป็นปลาสดที่ซื้อจากตลาดค้าปลา สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (Analytical grade)

การเตรียมตัวอย่าง

ทำการชำแหละแล่เอาเฉพาะส่วนเนื้อปลา บดให้ละเอียด เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ต่อไป

วิธีการทดลอง

ชุดการทดลองที่ 1 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ (Autolytic and transglutaminase activity of freshwater fish muscle proteins)

1.1 การวิเคราะห์กิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

วิเคราะห์กิจกรรมโปรติเนสในกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ คือ ปลานิล *(Oreochromis niloticus*) ปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias garispinus*) ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลาจีน ((*Hypophthalmichthys molitrix* ปลาไน (*Cyprinus carpio)* ปลาช่อน(*Chana striatus*) ปลานวลจันทร์ (*Cirrhino microlepis*) และปลาตะเพียน (*Puntius gonionotus*) ตามวิธีของ Yongsawatdigul and Piyadhammaviboon (2004) ชั่งตัวอย่างเนื้อปลาบด 3 กรัม บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) เข้มข้น 5% ปริมาตร 27 มิลลิลิตร ปั่นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสมเนื้อเยื่อ (IKA Works Asia, Bhd, Malaysia) และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที (Rotor PK 121R, ACCEL Co., Italy) เป็น

เวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส วัดปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในสารละลายส่วนใสตามวิธี Lowry (1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน

1.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส

วิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ ตามข้อ 1.1 โดยดัดแปลงจากวิธีของ Takagi et al. (1986) บ่มสารละลายผสมซึ่งประกอบด้วยสารตั้งต้น N,N′-dimethylated casein (DMC) ความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ monodansyl cadaverine (MDC) เข้มข้น 18.75 ไมโครโมลาร์ และ DTT เข้มข้น 3.75 มิลลิโมลาร์ แคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 6.25 มิลลิโมลาร์, Tris-HCl เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์, pH 7.5 และ crude enzyme ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย EDTA เพื่อให้ได้ความเข้มข้นรวมสุดท้ายเป็น 20 มิลลิโมลาร์ วัดการเรืองแสง (fluorescence) ของผลิตภัณฑ์ โดยใช้ excitation และ emission wavelength ที่ 350 และ 480 นาโนเมตรตามลำดับ เตรียมตัวอย่างควบคุมโดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น ยกเว้นเติมสารละลาย EDTA ก่อนที่จะเติมเอนไซม์ กำหนดให้ 1 ยูนิตคือปริมาณของเอนไซม์ที่เชื่อมโยงเชื่อมโยง MDC 1นาโนโมลกับ DMC ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 1 นาที โดยใช้ค่า enhancement factor (EF) ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงเนื่องจากการเชื่อมโยง MDC กับ DMC เท่ากับ 1.93 ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการทดลองตามรายละเอียดใน Takagi et al. (1986)

ชุดการทดลองที่ 2 การย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ (Autolytic activity of tilapia and rohu)

เนื่องจากปลานิลและปลายี่สกเทศเป็นปลาที่มีไขมันต่ำ และมีผลผลิตค่อนข้างสูงโดยเฉพาะปลานิล เนื้อปลาทั้งสองสายพันธุ์สามารถนำมาแปรรูปเป็นเจลโปรตีนปลาได้ กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองจึงมีผลกระทบต่อคุณสมบัติการเกิดเจลโดยตรง ดังนั้นจึงศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด

2.1 ผลของอุณหภูมิ

ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับข้างต้น โดยบ่มตัวอย่างที่ 0, 27, 40, 50, 60, 65, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 ผลของพีเอช

ศึกษาผลของพี-เอชต่อการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด โดยบ่มเนื้อปลา 3 กรัมในสารละลายบัฟเฟอร์ McIlvaine เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พี-เอช 5-8) สารละลายบัฟเฟอร์ Tris เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (พี-เอช 8.5-10) ปริมาตร 18 มิลลิลิตร ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยใช้สารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 7.5% ปริมาตร 18 มิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ ดังกล่าวข้างต้น

2.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์

ศึกษาผลของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิด โดยบดผสมเนื้อปลากับเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 2, 3, 4% บ่มตัวอย่างที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ ตามรายละเอียดข้างต้น

2.4 ผลของการล้าง

ศึกษาผลของการล้างต่อการเกิดกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง โดยล้างเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศในน้ำกลั่นเย็นในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ปั่นเหวี่ยงส่วนผสมที่ 5,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำอีกครั้ง ส่วนครั้งที่ 3 ใช้น้ำเกลือเข้มข้น 0.3% แทนการใช้น้ำกลั่น วิเคราะห์การย่อยสลายตัวเองของตัวอย่างที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.5 ผลของสารยับยั้งโปรติเนส

บดผสมเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศโดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 1% และสารยับยั้งโปรติเนสชนิดต่างๆ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ soybean trypsin inhibitor (500 μg/g) trans-epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)-butane (E-64) (3 mmole/g), pepstatin A (3 mg/g), leupeptin (2 mmole/g), phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF) (4 mmole/g), ethylenediamine tetraacetic acid

(EDTA) (5 μmole/g), และ ρ-tosyl-L-lysyl-chloromethylmethyl ketone (TLCK) (1 mmole/g) คำนวณระดับการยับยั้ง (Degree inhibition) ตามสมการ

$$Degree\ inhibition\ (\%) \quad = \quad \frac{(TC - TC_b) - (TI - TI_b)}{TC - TC_b} \times 100$$

เมื่อ TC คือปริมาณไทโรซีนของตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส

TC_b คือปริมาณไทโรซีนของตัวอย่างควบคุมที่ไม่ได้เติมสารยับยั้งและไม่ได้บ่ม

TI คือปริมาณไทโรซีนของตัวอย่างที่เติมสารยับยั้งและบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส

TI_b คือคือปริมาณไทโรซีนของตัวอย่างที่เติมสารยับยั้งและไม่ได้บ่ม

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานค่าเฉลี่ยจากผลการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SAS (1996)

ชุดการทดลองที่ 3 ผลของระดับแคลเซียมต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด (Effect of calcium on gel-forming ability of freshwater fish muscle proteins)

ศึกษาผลของแคลเซียมไอออนต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด 3 ชนิดคือ ปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์ เตรียมเจลโดยสับผสมเนื้อปลาในเครื่องสับผสม silent cutter (UM5; Stephan Machinery Co., Columbus, Ohio, USA) เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณ 2% ของน้ำหนักทั้งหมด เติมแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับ 0, 0.1, 0.2 และ 0.3% โดยละลายในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ก่อนเติมลงในเพส (paste) ปั่นผสมเนื้อปลาเป็นเวลา 6 นาที โดยปั่นผสมภายใต้สุญญากาศเป็นเวลา 3 นาทีเพื่อกำจัดฟองอากาศ บรรจุเพสในถุงบรรจุ (casing) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 25 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ที่ 40, 55, และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างทั้งหมด และตัวอย่างที่ไม่มีการบ่มไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาทำให้ตัวอย่างเย็นโดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เก็บตัวอย่างทั้งหมดเพื่อวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนด้วย SDS-PAGE

3.1 การวิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัส

ตัดตัวอย่างเจลให้มีความสูง 3 เซนติเมตร วัดค่าแรงเจาะทะลุ (puncture force) โดยใช้เครื่อง Texture Analyzer (Stable Micro System, Surrey, England) และหัววัด spherical probe ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร อัตราการเคลื่อนที่ของหัววัดคือ 1 มิลลิเมตร/วินาที บันทึกค่าแรง ณ. จุดแตกหัก (breaking force) และระยะทาง ณ. จุดแตกหัก (deformation)

3.2 การวิเคราะห์โอลิโกเปปไทด์

ชั่งตัวอย่างเจล 3 กรัม บดผสมกับสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 5% ปริมาตร 27 มิลลิลิตร โดยใช้เครื่องปั่นผสมเนื้อเยื่อ(IKA Works Asia, Bhd, Malaysia) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบ/นาที (Rotor PK 121R, ACCEL Co., Italy) เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส วัดปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในสารละลายส่วนใสตามวิธี Lowry (1951) โดยใช้สารละลายไทโรซีน (tyrosine) เป็นสารมาตรฐาน คำนวณปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่ละลายได้ในหน่วยนาโนโมลต่อกรัมตัวอย่าง

3.3 การวิเคราะห์ SDS-PAGE

บดผสมตัวอย่าง 3 กรัมในสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate) เข้มข้น 5% ด้วยเครื่องปั่นผสมเนื้อเยื่อ ((IKA Works Asia, Bhd, Malaysia) บ่มตัวอย่างที่ 85 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนของสารละลายส่วนใส และวิเคราะห์องค์ประกอบของโปรตีนด้วย SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970)

3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ split plot โดย main plot คือระดับแคลเซียม (0, 0.1, 0.2, 0.3%) และ sub-plot คืออุณหภูมิ (4, 25, 40, 55, 65, 90 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 2 ซ้ำโดยแต่ละซ้ำเป็น block วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAS (1996)

ชุดการทดลองที่ 4 ผลของแคลเซียมไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล (Effect of calcium ion on conformational changes of tilapia actomyosin)

4.1 การสกัดแอคโตมัยโอซิน

ดัดแปลงตามวิธีของ Ogawa et al. (1999) โดยใช้กล้ามเนื้อปลา 50 g ปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และ imidazole buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งมีส่วนผสมของ PMSF (Phenylmethanesulfonyl fluoride) เข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนไปปั่นผสมกับสารละลายข้างต้น และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนตะกอนและนำไปปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (10 mM Imidazole buffer, pH 7.0) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เจือจางสารละลายส่วนใสด้วยน้ำกลั่นกำจัดไอออน (distilled deionized water) ที่เย็นในปริมาตร 3 เท่าของสารละลายส่วนใส นำสารละลายที่เจือจางไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนและนำไปปั่นผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (10 mM Imidazole buffer, pH 7.0) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนแอคโตมัยโอซินนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,520×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

4.2 การละลายของแอคโตมัยโอซิน

นำตะกอนแอคโตมัยซินละลายกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.4 โมลาร์ (10 mM Imidazole buffer, pH 7.0) ที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (10 - 100 มิลลิโมลาร์) หรือ Ethylene glycol-O, O'-bis(2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid (EGTA) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 กวนผสมที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บสารละลายส่วนใสวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนหรือใช้ในการทดลองต่อไป

4.3 พื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซิน

วิเคราะห์ Surface hydrophobicity ตามวิธีของ Kato and Nakai (1980) โดยเจือจางสารละลายแอคโตมัยโอซินเข้มข้น 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, และ 1 mg/ml ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.4 โมลาร์, 10 mM Imidazole buffer (pH 7.0) ที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 10, 50, และ 100 มิลลิโมลาร์ เติมสารละลาย 1-anilinonapthlene-8-sulfonic acid (ANS) เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตรในสารละลายโปรตีน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเก็บไว้ในที่มืด 10 นาที วัดค่าการเรืองแสง (Fluorescence) ที่ความยาวคลื่น excitation 374 นาโนเมตร และ ความยาวคลื่น emission 485 นาโนเมตรด้วยเครื่อง spectrofluorometer (RF-1501; Shimadzu Co., Tokyo, Japan) คำนวณค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกจากค่าความชันของเส้นกราฟที่พล็อตระหว่างค่าการเรืองแสงและค่าความเข้มข้นโปรตีน (w/v)

4.4 การวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิ

เจือจางสารละลายแอคโตมัยโอซินด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 0.4 โมลาร์, 20 mM Tris-Cl buffer (pH 7.0) ที่มีส่วนผสมของแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 10, 30, 50, 70, และ 100 มิลลิโมลาร์ ให้มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร วัด circular dichroism spectra ของแอคโตมัยโอซิน ด้วยเครื่อง spectropolarimeter (PS150J; JASCO, Tokyo, Japan) โดยใช้ quartz cell ซึ่งมี path length 200 ไมโครเมตร และควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการวัดที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียส กำหนดให้ค่า molar ellipticity ของแอคโตมัยโอซินคือ 115 กรัม/โมล และคำนวณค่า α-helical (%) จากสมการของ Ogawa et al. (1995)

$$\alpha\text{-Helicity (\%)} \quad = \quad 100 \times \{ [\theta]_{222} / -40{,}000 \}$$

เมื่อ $[\theta]_{222}$ คือค่า ellipticity ที่ความยาวคลื่น 222 nm

4.5 การวิเคราะห์ SDS-PAGE

การวิเคราะห์ SDS-PAGE โดยใช้ polyacrylamide เข้มข้น 10% ตามรายละเอียดในข้อ 3.3 ส่วนที่ความเข้มข้นของ polyacrylamide 5% นั้นดัดแปลงจากวิธีของ Huff-Lonergan et al. (1996) โดยนำสารละลายส่วนใสผสมกับ treatment buffer (Tris-HCl เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์, EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, SDS เข้มข้น 2%, glycerol เข้มข้น 20 %, BME เข้มข้น 2%, bromophenol blue จำนวนเล็กน้อย (อัตราส่วน 1 : 1 ต้มในน้ำเดือด 3นาที ปริมาณตัวอย่างที่ใช้คือ 80ไมโครกรัม เตรียมเจล acrylamide เข้มข้น 5 % จากสารละลาย acrylamide (acrylamide: N,N'-bis methylene acrylamide

100:1) เข้มข้น 30%, สารละลาย Tris-HCl เข้มข้น 0.375 โมลาร์ พี-เอช 8.8, EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, SDS เข้มข้น 1%, ammonium persulfate เข้มข้น 0.1%, TEMED เข้มข้น 0.67% ใช้กระแสไฟฟ้า 20 มิลลิแอมแปร์ต่อเจล ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue R-250

4.6 การประเมินลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล

บดผสมแอคโตมัยโอซินกับโซเดียมคลอไรด์โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 0.4 โมลาร์ และ imidazole buffer เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (pH 7.0) และแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10, 20, 30, 40, 50, 70 และ 100 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ใน mortar and pestle บรรจุเพส (paste) ในไมโครเพลต (microplate) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สูง 10 มิลลิเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที จากนั้นให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำให้เย็นและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน วิเคราะห์ลักษณะเนื้อสัมผัสโดยเครื่อง Texture analyzer TA-XT2 (Stable Micro System, England) โดยใช้หัววัดรูปทรงกระบอก (cylinder probe) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร อัตราการเคลื่อนที่ของหัววัด 1 มิลลิเมตร/วินาที

4.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ split plot โดย main plot คือระดับแคลเซียม และ sub-plot คืออุณหภูมิ (4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที, 40 องศาเซลเซียส 30 นาทีจากนั้นให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที, 90 องศาเซลเซียส 15 นาที) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ โดยแต่ละซ้ำเป็น block วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรม SAS (1996)

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ (Autolytic and transglutaminase activity of freshwater fish muscle proteins)

จากการศึกษากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลาน้ำจืดชนิดต่างๆ พบว่าปลาดุกแอฟริกัน (African catfish) เป็นปลาที่มีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองสูงสุด รองลงมาคือ ปลายี่สกเทศ (rohu) ปลานิล (tilapia) ปลานวลจันทร์ (small scale mud carp) และปลาจีน (silver carp) ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ปลาดุกแอฟริกันเป็นปลาที่ไม่นิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีเนื้อสัมผัสที่ยุ่ยเละ ซึ่งจากการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าสาเหตุดังกล่าวเกิดจากกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของโปรติเนสในกล้ามเนื้อ ปลาดุกแอฟริกันเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย มีอัตราการเจริญเติบโตสูง มีความต้านทานโรคสูง (มาณพและคณะ 2536) และมีขนาดใหญ่ (น้ำหนักตัวประมาณ 1-1.5 กิโลกรัม) มีปริมาณเนื้อมาก และมีไขมันสูงด้วย (ประมาณ 17-25%) ซึ่งอาจเหมาะสำหรับการนำมาเป็นวัตถุดิบในการแปรรูปผลิตภัณฑ์ที่ต้องเติมไขมัน เช่นไส้กรอก อย่างไรก็ตามปัญหาการเกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อโดยโปรติเนส เป็นปัจจัยสำคัญซึ่งมีผลกระทบต่อคุณภาพเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ดังนั้นการใช้ประโยชน์จากเนื้อปลาดุกแอฟริกันจึงจำเป็นต้องคำนึงถึงปัญหาของกิจกรรมโปรติเนสในกล้ามเนื้อเป็นสำคัญ

ปลายี่สกเทศ ปลานิล ปลานวลจันทร์ และปลาจีน เป็นปลาเนื้อขาวที่มีไขมันค่อนข้างต่ำ (1-3%) จึงเหมาะที่จะใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นเจล กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลานิล ปลานวลจันทร์และปลายี่สกเทศ มีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2) ส่วนปลาจีน ปลาช่อน (stripe snake-head fish) ปลาตะเพียน (silver barb) และปลาใน (common carp) จัดเป็นปลาที่มีกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองค่อนข้างน้อย ดังนั้นปัญหาเนื้อยุ่ยเละอาจไม่ใช่ปัญหาสำคัญในปลาเหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ทั้งปลาจีน ปลาช่อน และปลาตะเพียน เป็นปลาที่มีราคาสูงและมีปริมาณการบริโภคที่แน่นอน จึงอาจไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในเชิงอุตสาหกรรมโดยเฉพาะในส่วนของเนื้อปลาบด ปลาไน อาจเป็นปลาที่มีศักยภาพเนื่องจากเป็นปลาที่มีปริมาณเนื้อสูง และไม่มีปัญหาในการเกิดเนื้อยุ่ยเละ

เมื่อพิจารณากิจกรรมทรานสกลูทามิเนส พบว่าปลานิลเป็นปลาที่มีกิจกรรมเนื้อปลาดังกล่าวสูงที่สุด (ตารางที่ 2) ส่วนปลาดุกแอฟริกัน ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์และปลาไน เป็นกลุ่มปลาที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสรองลงมา ส่วนปลาจีน ปลาช่อน และปลาตะเพียนจัดเป็นปลาที่มีกิจกรรมของเอนไซม์น้อย จากข้อมูลนี้อาจสามารถอนุมานได้ว่า ปลานิล ปลาไน ปลายี่สกเทศ และ

ปลานวลจันทร์ อาจเป็นปลาน้ำจืดที่สามารถเกิดเจลได้ดี หากมีการใช้กระบวนการแปรรูปที่เหมาะสม โดยเฉพาะหากสามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนส และส่งเสริมกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส ส่วนเนื้อปลาดุกแอฟริกันนั้น แม้จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสค่อนข้างสูง แต่ก็จัดว่ามีกิจกรรมโปรติเนสที่ค่อนข้างสูงเช่นกัน การแปรรูปจำเป็นต้องใช้สภาวะที่สามารถยับยั้งกิจกรรมโปรติเนสได้รวดเร็ว นอกจากนี้ปลาดุกแอฟริกันเป็นปลาที่มีไขมันสูง ซึ่งไขมันอาจมีผลต่อการเกิดโปรตีนเจล แต่อาจเหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์เจลอิมัลชั่น (emulsion) ได้หากมีวิธีการในการยับยั้งกิจกรรมโปรติเนสที่มีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 2 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดสายพันธุ์ต่างๆ

Species	Autolytic activity[1] (μmole/g muscle/h)	TGase activity[1] (Unit/g muscle)
African catfish (*Clarias gariepinus*)	3. 27± 0.6	14.6 ± 0.8
Rohu (*Labeo rohita*)	2. 03± 0.2	11.4 ± 0.4
Tilapia (*Oreochromis niloticus*)	1.97 ±2 .1	60.8 ± 0.3
Small scale mud carp (*Cirrhina microlepis*)	1. 82± 0.06	10.5 ± 0.2
Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*)	1. 24± 0.07	3.3 ± 1.0
Striped snake-head fish (*Channa striatus*)	0. 62± 0.04	2. 7± 0.1
Common silver barb (*Puntius gonionotus*)	0. 40± 0.01	3.9 ± 0.6
Common carp (*Cyprinus carpio*)	0. 36± 0.06	18.0 ± 0.7

[1] ค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนตัวอย่าง = 6)

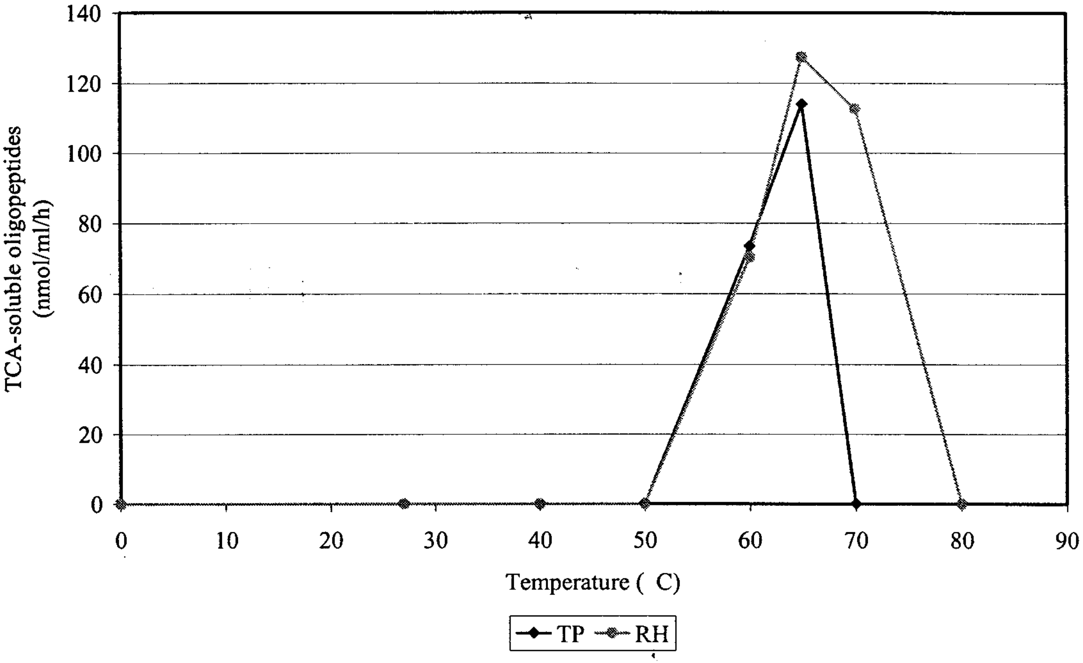
2. การย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ (Autolytic activity of tilapia and rohu)

2.1 สภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

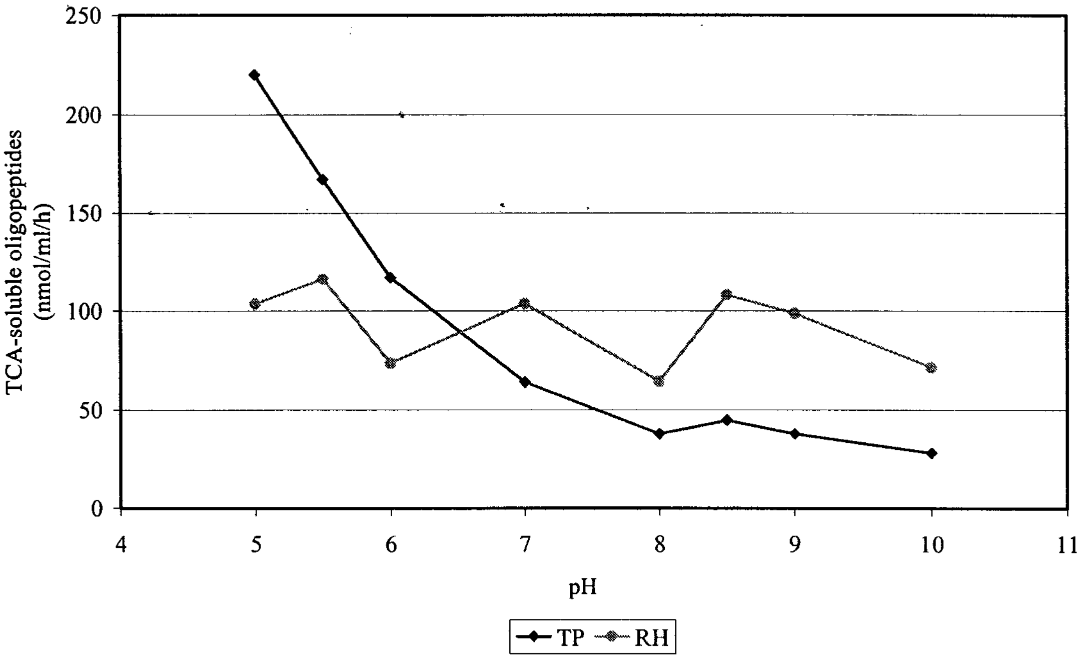
ระดับการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศเกิดขึ้นในระดับที่สามารถตรวจพบได้เมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส และเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิ จนมีค่าสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส (รูปที่ 1) นอกจากนี้ยังพบกิจกรรมการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อที่ 70 องศาเซลเซียสในปลายี่สกเทศ ซึ่งนับเป็นอุณหภูมิที่ค่อนข้างสูง การเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาส่วนใหญ่พบในช่วง 60-65 องศาเซลเซียส Yongsawatdigul et al. (2000) พบการเสื่อมสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของซูริมิปลานิลเกิดสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส ส่วนในปลาปากคมพบว่าเกิดขึ้นสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียสเช่นกัน (Yongsawatdigul and Piyadhammaviboon, 2004)

การย่อยสลายกล้ามเนื้อของปลานิลลดลงเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น ปลานิลเกิดการย่อยสลายสูงสุดที่พีเอช 5 (รูปที่ 2) ซึ่งสูงกว่าที่เกิดขึ้นในปลายี่สกเทศ Acid protienase คือกลุ่มโปรติเนสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้สูงที่สภาวะกรด ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า acid proteinase อาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของปลานิล Jiang et al. (1992) รายงานว่า คาเธพซินดี (cathepsin D) สามารถย่อยสลายมัยโอฟิบริลของปลานิลได้สูงสุดที่พีเอช 5.5 ในขณะที่โปรติเนสจากไลโซโซม (lysosomal proteinases) สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดีที่สุดที่พีเอช 6.5 พีเอชในช่วงที่ศึกษา (5-10) ไม่มีผลต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของปลายี่สกเทศมากเท่ากับในปลานิล ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เกิดจากการเสื่อมสลายมีค่าใกล้เคียงกัน เนื่องจากในสภาวะจริงของการนำเนื้อปลาไปใช้นั้นค่าพีเอชของระบบมักอยู่ในช่วง 6.5-7.5 ซึ่งยังคงเกิดการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อในปลาทั้งสอง โดยการเสื่อมสลายที่ค่าพีเอช 7-7.5 นั้นเกิดในปลายี่สกเทศสูงกว่าในปลานิล ปลาส่วนใหญ่ที่มีการศึกษามาแล้ว จะพบการเสื่อมสลายในช่วงพีเอชที่เป็นด่าง (7.7-8.1) เนื่องจากเอนไซม์ในกลุ่ม alkaline proteinase (Iwata et al., 1974) จากผลการศึกษานี้ alkaline proteinases ไม่มีบทบาทเด่นที่ย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลานิลและปลายี่สกเทศ

การเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลัก (myosin heavy chain, MHC) ของปลานิลเกิดขึ้นเมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และการเสื่อมสลายเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการบ่มจนถึง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 3a) นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักในปลายี่สกเทศ (รูปที่ 3b) กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของปลายี่สกเทศสูงกว่าปลานิลที่ระยะเวลาการบ่มใดๆ ในช่วง 4 ชั่วโมง (รูปที่ 4) อย่างไรก็ตามการเสื่อมสลายของกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศน้อยกว่าปลาปากคม (lizardfish) หรือปลาแปซิฟิคไวท์ติ้ง (Pacific whiting) (An et al., 1994) ซึ่งเป็นปลาที่มีปัญหาเกี่ยวกับเอนไซม์โปรติเนสในกล้ามเนื้ออย่างรุนแรง เป็นที่น่าสังเกตว่าแอคตินหรือโปรตีนอื่นๆไม่มีการเสื่อมสลายอย่าง

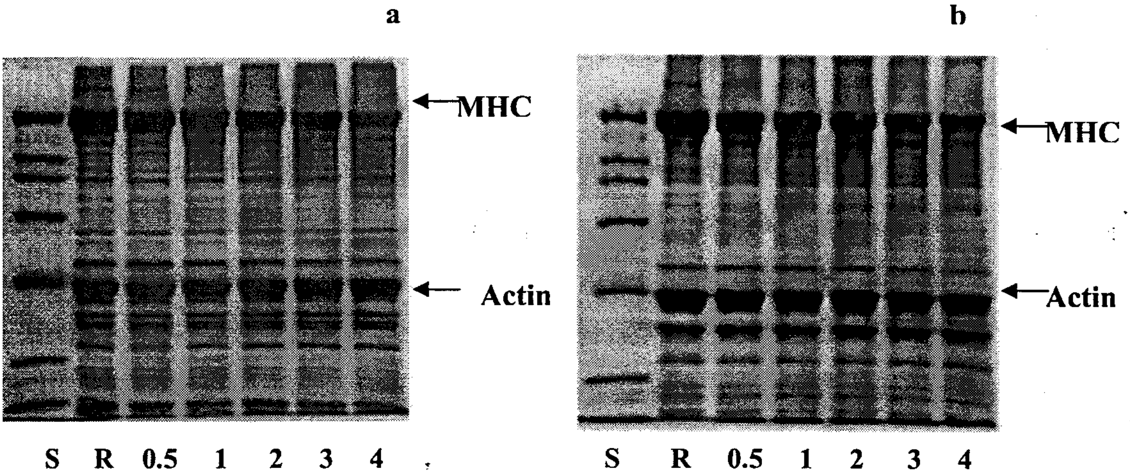


รูปที่ 1 ผลของอุณหภูมิต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ

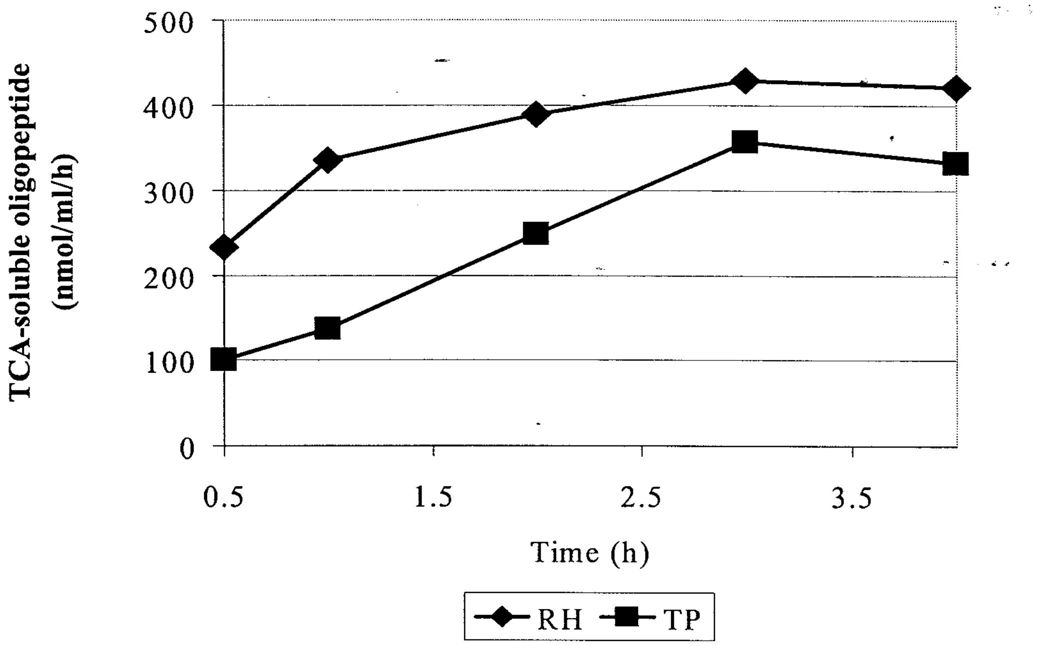


รูปที่ 2 ผลของพีเอชต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ

เด่นชัด (รูปที่ 3a, b) ซึ่งอาจเป็นการบ่งชี้ว่าระดับของกิจกรรมโปรติเนสในกล้ามเนื้อไม่สูงมากนัก


a
b
MHC
Actin
MHC
Actin
S R 0.5 1 2 3 4
S R 0.5 1 2 3 4

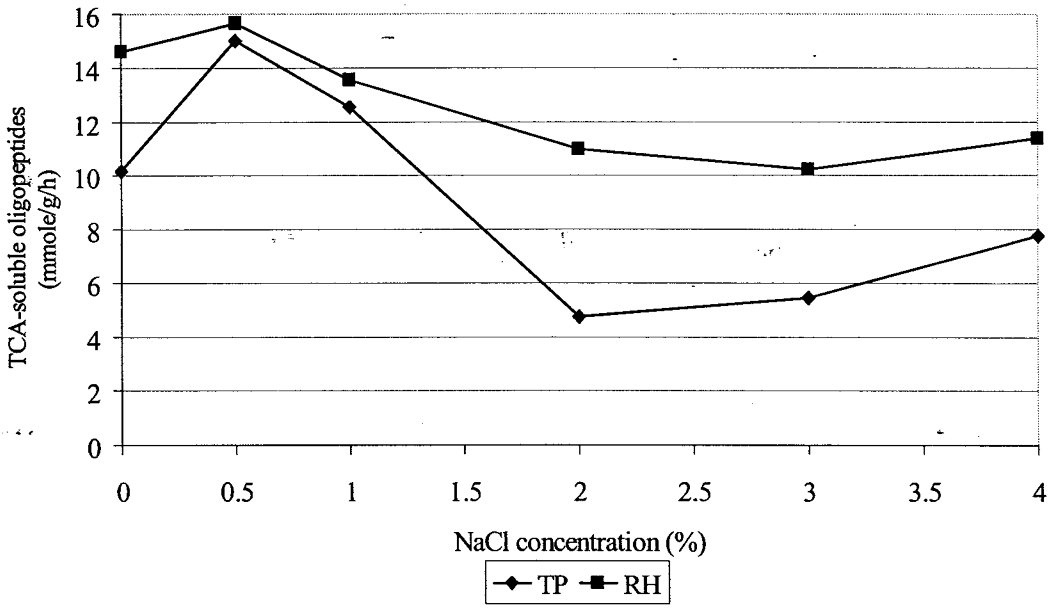
รูปที่ 3 SDS-PAGE ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิล (a) และปลายี่สกเทศ (b) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 0.5-4 ชั่วโมง R=เนื้อปลาที่ไม่ได้บ่ม, S = Molecular weight standard, MHC = myosin heavy chain



รูปที่ 4 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เกิดขึ้นจากการบ่มเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลาต่างๆ

2.2 ผลของความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่อการย่อยสลายตัวเอง

เนื่องจากในกระบวนการผลิตเจลจากเนื้อปลาจำเป็นต้องเติมเกลือเพื่อละลายโปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์ จึงศึกษาผลของเกลือต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งพบว่ากิจกรรมการย่อยสลายตัวเองเพิ่มสูงสุดที่ความเข้มเข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0.5% จากนั้นลดลงเมื่อความเข้มข้นเกลือเพิ่มขึ้น (รูปที่ 5) เนื่องจากโปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์เป็นโปรตีนที่ละลายในน้ำเกลือหรือสารละลายที่มีความเข้มไอออน (ionic strength) สูง เมื่อความสามารถในการละลายของโปรตีนกล้ามเนื้อซึ่งเป็นสารตั้งต้นดีขึ้น จึงทำให้เอนไซม์สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นได้ดีขึ้น กิจกรรมการย่อยสลายจึงมากขึ้น แต่เมื่อความเข้มข้นของไอออนเพิ่มขึ้นเกิน 0.5% อาจมีผลยับยั้งการทำงานของโปรติเนส กิจกรรมการย่อยสลายจึงลดลง เนื่องจากระดับโซเดียมคลอไรด์ที่เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อปลาบดเพื่อให้เกิดเจลคือประมาณ 1-2% ซึ่งปริมาณดังกล่าวสามารถยับยั้งกิจกรรมของโปรติเนสได้สูงถึง 50% ในเนื้อปลานิล และ 30% ในปลายี่สก ดังนั้นปัญหาในการเกิดโปรติเนสในเจลปลานิลจึงไม่อาจรุนแรงนัก

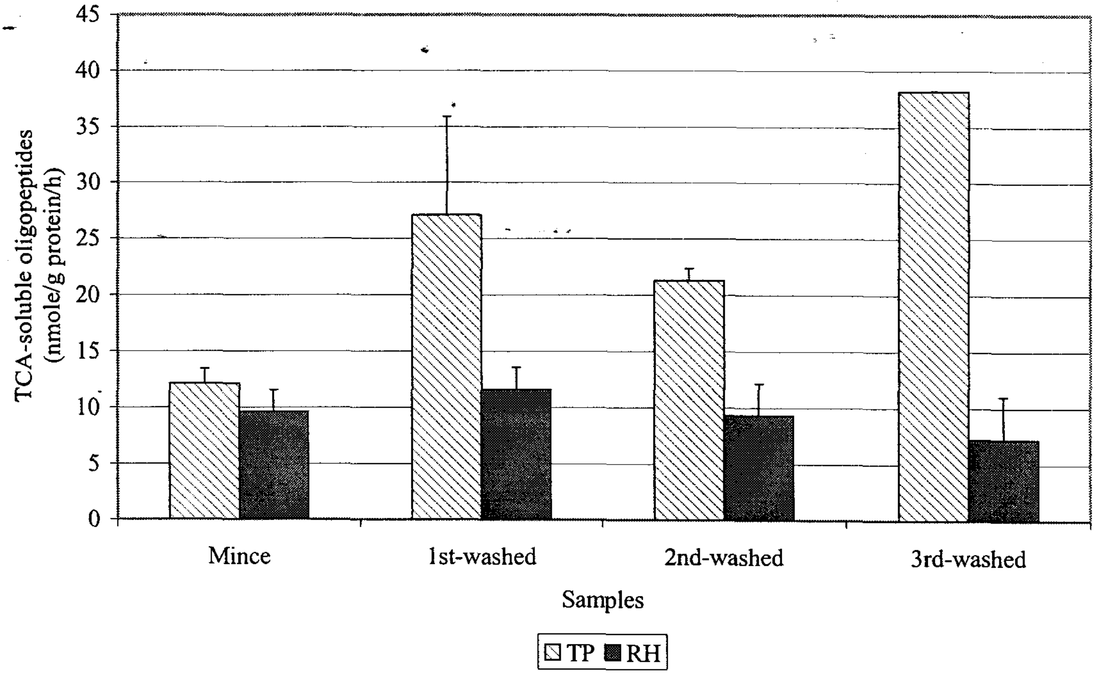


รูปที่ 5 ผลของระดับโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองของเนื้อปลานิลและปลายี่สกเทศ

2.3 ผลของการล้างเนื้อปลาต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง

กระบวนการล้างเนื้อปลาดังเช่นในกระบวนการผลิตซูริมิ มีผลลดกิจกรรมโปรติเนสโดยเฉพาะหากเป็นโปรติเนสที่อยู่ในส่วนของ sarcoplasmic fraction ซึ่งเป็นส่วนที่ละลายน้ำ ดังนั้นจึงศึกษาผลของการล้างต่อกิจกรรมการย่อยสลายตัวเอง ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากิจกรรมของโปรติเนสในเนื้อปลานิลเพิ่มขึ้นตามจำนวนรอบของการล้าง ($p<0.05$) (รูปที่ 6) โปรติเนสในเนื้อปลานิลอาจเป็นโปรติเนสที่ยึดเกาะกับส่วนของเส้นใยกล้ามเนื้อ หรือที่เรียกว่า myofibril-bound proteinase ซึ่งไม่สามารถถูกกำจัดออกโดยการล้าง การเพิ่มจำนวนรอบของการล้างทำให้โปรตีนมัยโอฟิบริลลาร์เข้มข้นขึ้น ซึ่งหากโปรติเนสยึดเกาะที่เส้นใยกล้ามเนื้อ กิจกรรมโปรติเนสจะเพิ่มขึ้น Cao et al. (2000) รายงานการพบ myofibril-bound proteinase ในปลาปากคม (lizardfish) ซึ่งเร่งกิจกรรมการย่อยสลายมัยโอซินสายหลักที่ 55-60 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Cao et al. (1999) ยังพบโปรติเนสที่ยึดเกาะกับเส้นใยกล้ามเนื้อในปลาไน

การเพิ่มจำนวนรอบของการล้างมีแนวโน้มลดกิจกรรมการย่อยสลายตัวเองในเนื้อปลายี่สกเทศ แต่ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) โปรติเนสที่มีบทบาทในปลายี่สกเทศอาจอยู่ในส่วน sarcoplasmic fraction ซึ่งสามารถถูกกำจัดออกในระหว่างการล้างแต่อาจไม่มากอย่างมีนัยสำคัญ การล้างเนื้อปลาจึงไม่ใช่แนวทางที่มีประสิทธิภาพในการลดปัญหาโปรติเนสทั้งในปลานิลและปลายี่สกเทศ ในทางตรงกันข้ามเป็นการลดปริมาณผลผลิตลงอีกด้วย



รูปที่ 6 ผลของการล้างต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลานิลและปลายี่สกเทศ

2.4 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ

ศึกษาผลของสารยับยั้งโปรติเนสต่อกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งพบว่า leupeptin, phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) และ ρ-tosyl-L-lysyl-chloromethylmethylketone (TLCK) สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลานิลได้สูงสุด (ตารางที่ 3) ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มซีรีนโปรติเนสอาจมีบทบาทสำคัญต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิล เนื่องจาก EDTA สามารถยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลได้มากกว่า 50% ซึ่งอาจบ่งชี้ว่า metallo proteinase อาจเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อเช่นกัน

ตารางที่ 3 ระดับการยับยั้งกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อโดยสารยับยั้งโปรติเนสต่างๆ

Inhibitors	**Concentration**	**Degree inhibition (%)**	
		Tilapia	**Rohu**
Leupeptin	3 mmole/g	62.41±1.54	0
STI	500 μg/g	40.74±0.37	11.66±0.64
PMSF	12 mmole/g	73.88±3.17	0
TLCK	1 mmole/g	57.60±2.54	0
E-64	6 mmole/g	39.25±0.48	48.89±0.007
EDTA	15 μmole/g	56.49±2.35	100
Pepstatin A	3 mg/g	7.30±1.03	0

แอซิดโปรติเนส (acid proteinase) ไม่ใช่กลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อในปลานิล เนื่องจากค่าพีเอชที่ศึกษานั้นอยู่ในช่วง 6.5-6.8 ซึ่งเอนไซม์ในกลุ่มแอซิดโปรติเนสไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี

การย่อยสลายกล้ามเนื้อปลายี่สกเทศถูกยับยั้งได้สมบรูณ์เมื่อเติม EDTA ที่ความเข้มข้น 15 µmole/g (ตารางที่ 3) ส่วน E-64 ซึ่งเป็นสารยับยั้งซีสติอีนโปรติเอสสามารถยับยั้งได้ประมาณ 48% และสารยับยั้งในกลุ่มซีรีนโปรติเนสและแอซิดโปรติเนสไม่แสดงผลการยับยั้ง จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า metallo proteinase อาจเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการเกิดปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละในปลายี่สกเทศ ในขณะที่ซีสติอีนโปรติเอสอาจมีบทบาทรองลงมา

3. ผลของระดับแคลเซียมต่อการเกิดเจลของปลาน้ำจืด (Effect of calcium on gel-forming ability of freshwater fish muscle proteins)

3.1 คุณลักษณะทางเนื้อสัมผัส

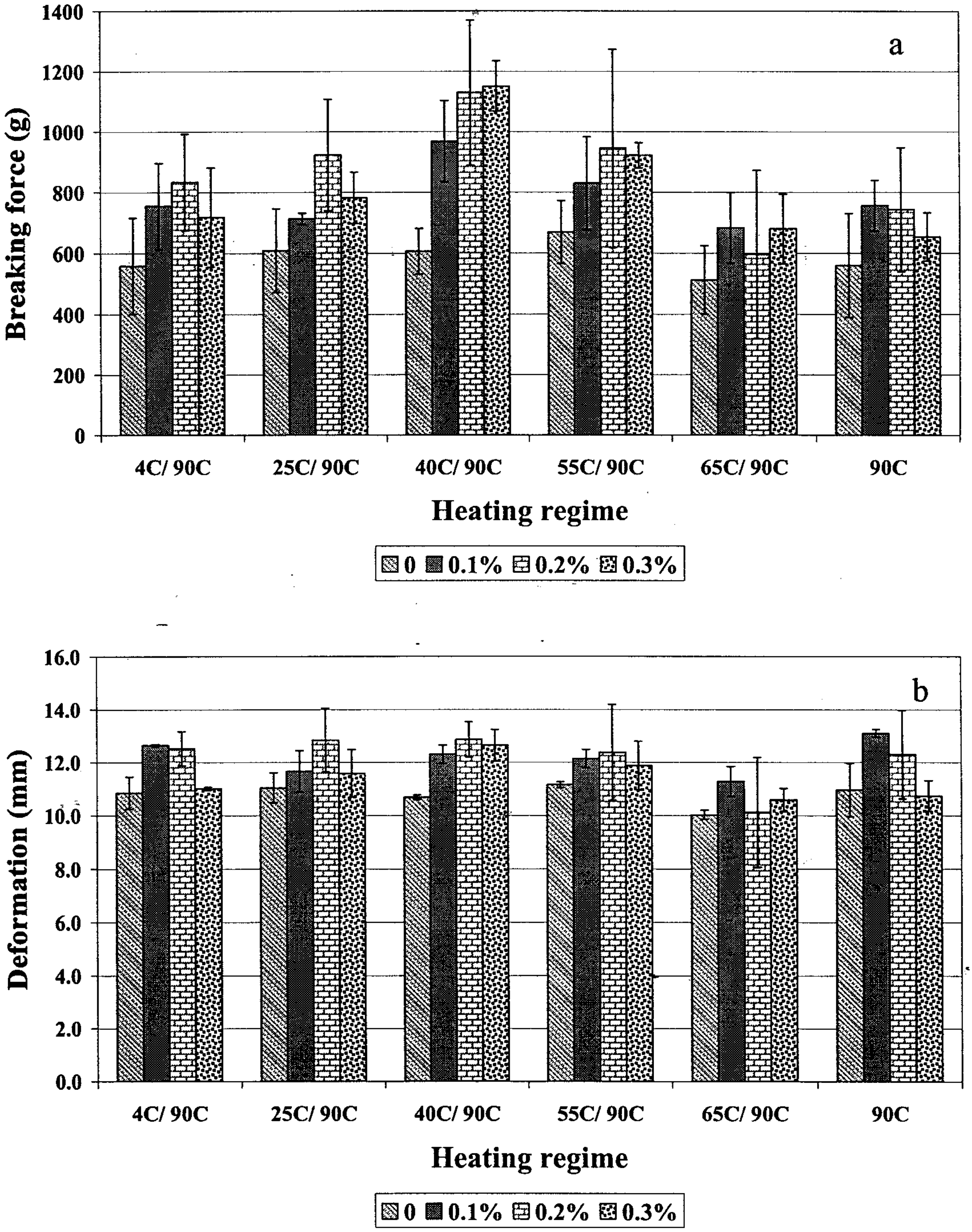
อุณหภูมิในการบ่มและระดับแคลเซียมมีผลต่อค่าแรง ณ. จุดแตกหักของเจลเนื้อปลานิล ($p<0.05$) การบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสทำให้ได้ค่าแรงสูงสุดที่ระดับการเติมแคลเซียม 0.1-0.3% ($p<0.05$) ส่วนในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียมนั้นการบ่มเพส (paste) ของเนื้อปลานิลที่ 40 หรือ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือที่ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำให้ค่าแรง ณ จุดแตกหักของเจลเพิ่มขึ้น (รูปที่ 7a) การบ่มที่ 55 องศาเซลเซียสทำให้ได้เจลที่มีค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงการเกิดเซทติ้ง (setting) ซึ่งโดยทั่วไปปลาที่อาศัยในแถบน้ำอุ่นเช่นปลา croaker มักเกิดเซทติ้งที่ 40 องศาเซลเซียส (Kamath et al., 1992) อย่างไรก็ตาม Yongsawatdigul et al. (2002) พบว่าซูริมิจากปลาทรายแดง ซึ่งเป็นปลาในแถบศูนย์สูตรสามารถเกิดเซทติ้งที่ 25 องศาเซลเซียสได้ เซทติ้งเกิดเนื่องจากปฏิกิริยาการเชื่อมโยงสายโปรตีนโดยกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส ซึ่งจากการวิเคราะห์กิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสพบว่ามีค่าสูงสุดในเนื้อปลานิล (ตารางที่ 4) เป็นที่น่าสังเกตว่าในเนื้อปลานิลนั้นสามารถเกิดเซทติ้งได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 55 องศาเซลเซียส ซึ่งยังไม่มีการรายงานมาก่อน จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสบริสุทธิ์จากปลานิล Worratao and Yongsawatdigul (2004) พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวแสดงกิจกรรมได้สูงสุดที่ 37-50 องศาเซลเซียส การบ่มเจลซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตรในอ่างน้ำร้อน 55 องศาเซลเซียส มีผลทำให้อุณหภูมิภายในเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากข้อจำกัดของการนำความร้อน ดังนั้นตัวอย่างจึงอาจอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส (37-50 องศาเซลเซียส) ในระยะเวลาหนึ่ง

ตารางที่ 4 กิจกรรมการย่อยสลายตัวเองและทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลา

Species	**Autolytic activity (µmol/g muscle/h))**	**TGase activity (Unit/g sample)**
Tilapia	1.80±0.55	154.48 ± 34.18
Rohu	2.0±0.85	6.64 ±3.80
Small scale mud carp	1.68±0.29	9.27 ± 1.75

การบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงมีผลทำให้ค่าแรง ณ จุดแตกหักลดลงมากกว่าตัวอย่างที่บ่มที่อุณหภูมิอื่น และตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม (90C) (รูปที่ 7a) ซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมของโปรติเนสในปลานิล การไม่ได้บ่มตัวอย่าง (90C) ไม่ได้เป็นการส่งเสริมกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสขณะเดียวกันก็ไม่ได้ส่งเสริมกิจกรรมโปรติเนส ลักษณะเนื้อสัมผัสจึงดีกว่าตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส แต่ด้อยกว่าตัวอย่างซึ่งบ่มที่ 40 หรือ 55 องศาเซลเซียส ส่วนการบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ได้เป็นการส่งเสริมให้เกิดเซทติ้งในเจลปลานิล

การเพิ่มแคลเซียมเป็นการกระตุ้นให้เอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสมีกิจกรรมสูงขึ้น และเมื่อพิจารณาอุณหภูมิการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณของแคลเซียมคลอไรด์ที่เหมาะสมคือที่ระดับ 0.2% ($p<0.05$) การเพิ่มปริมาณแคลเซียมให้สูงขึ้นเป็น 0.3% ไม่มีผลต่อการเพิ่มค่าแรง Yongsawatdigul et al. (2002) รายงานว่าปริมาณแคลเซียมไอออนที่ระดับ 0.2% เพิ่มค่าแรง ณ จุดแตกหักของซูริมิจากปลาทรายแดงได้สูงสุด นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการเพิ่มค่าแรงโดยแคลเซียมจะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งผลที่ได้คล้ายคลึงกับเจลปลานิล นอกจากนี้ Lee and Park (1998) พบว่าปริมาณของแคลเซียมที่เหมาะสมแตกต่างตามสายพันธุ์ปลา โดยระดับของแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มค่าความแข็งของเจลซูริมิจากปลา Alaska pollock คือ 0.05-0.1% ในขณะที่ระดับที่เหมาะสมในเจลซูริมิจากปลา Pacific whiting คือ 0.2% ความแตกต่างดังกล่าวเกิดจากปริมาณแคลเซียมไอออนในเนื้อปลาแตกต่างกัน (Lee and Park, 1998) เนื้อปลาที่มีปริมาณไอออนต่ำจำเป็นต้องมีการเติมแคลเซียมในปริมาณที่สูงกว่าเพื่อกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนส นอกจากนี้กิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสในเนื้อปลาที่แตกต่างกันอาจส่งผลให้ระดับแคลเซียมที่เหมาะสมต่อการเพิ่มค่าความแข็งของเจลแตกต่างกัน



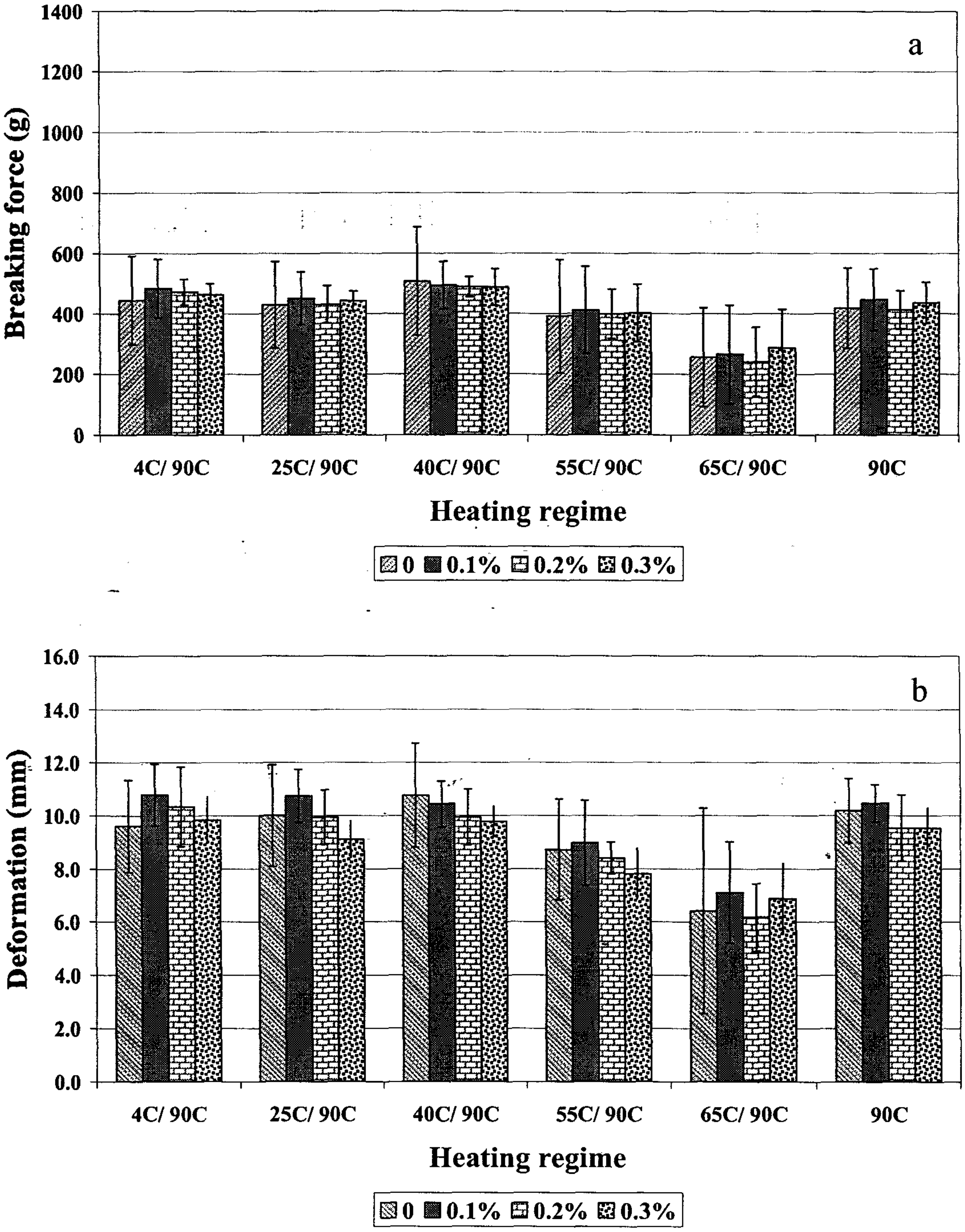
รูปที่ 7 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ.จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลานิลที่ระดับการเติมแคลเซียมไอออนต่างๆและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ 4C=บ่มที่ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง 25C=บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง 40C 55C 65C = บ่มที่ 40, 55, 65 องศาเซลเซียสตามลำดับ 1 ชั่วโมง 90C=ให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที

ระดับแคลเซียมไม่มีผลต่อค่าระยะทาง ณ จุดแตกหัก ($p>0.05$) เจลซึ่งบ่มที่ 4, 25, 40, 55 องศาเซลเซียส และเจลที่ไม่ได้บ่ม มีค่าระยะทางสูงกว่าตัวอย่างบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) (รูปที่ 7b) จากการศึกษาที่มีมาก่อน พันธะไอโซเปปไทด์ที่เกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมทรานสกลูทามิเนส มักส่งผลเพิ่มค่าแรงและ shear stress แต่จะไม่มีผลต่อค่าระยะทางและ shear strain (Lee and Park, 1998; Yongsawatdigul et al., 2002)

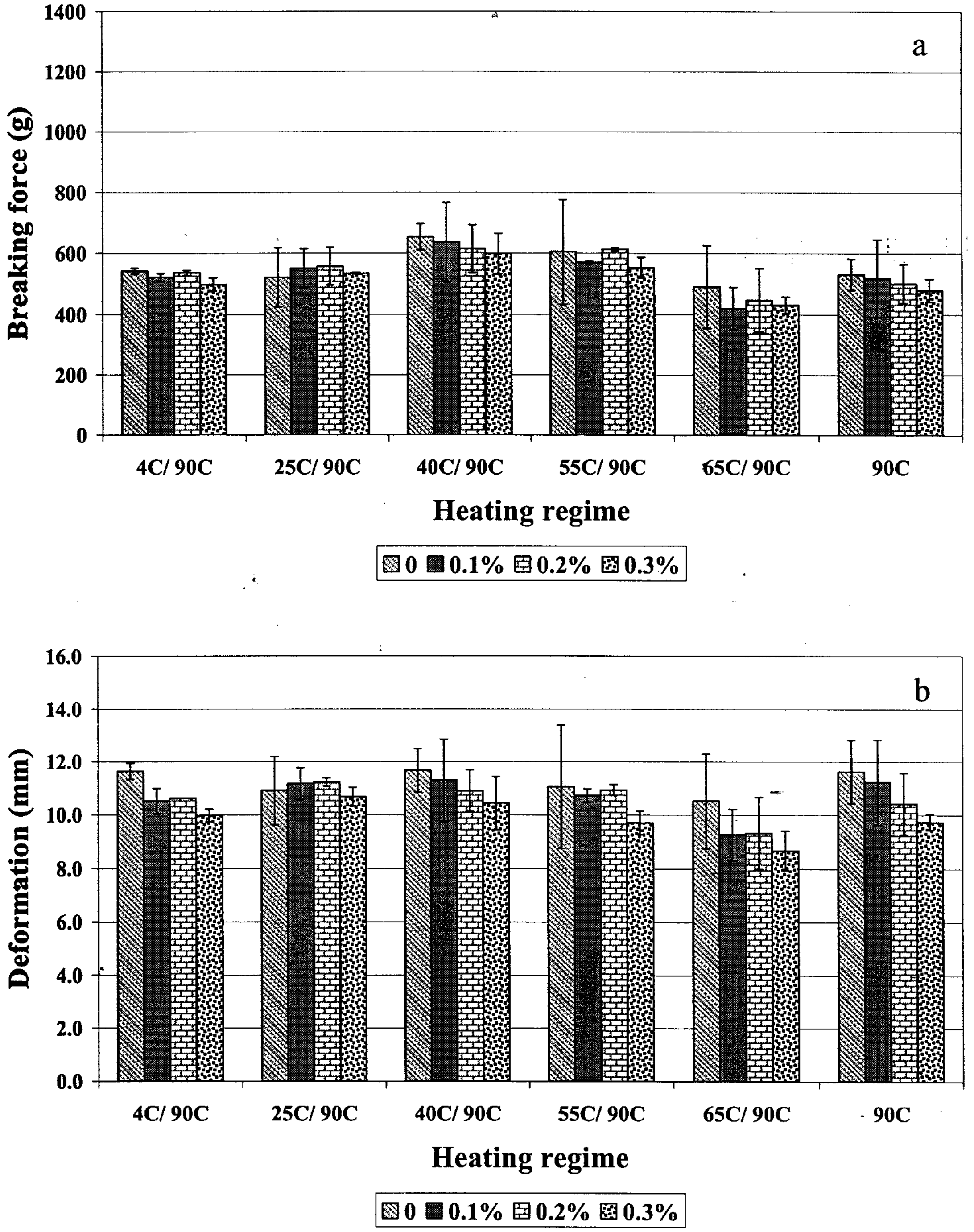
เจลจากเนื้อปลายี่สกเทศมีค่าแรง ณ จุดแตกหักต่ำกว่าเจลจากปลานิลที่อุณหภูมิการบ่มใดๆ ($p<0.05$) (รูปที่ 8a,b) และเจลจากปลายี่สกเทศมีค่าระยะทาง ณ จุดแตกหักต่ำกว่าปลานิลและปลานวลจันทร์ (รูปที่ 9a,b) อุณหภูมิที่เหนี่ยวนำให้เกิดเซทติ้งในเจลปลายี่สกเทศคือที่ 40 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) (รูปที่ 8a) การลดลงของค่าแรงและระยะทางเกิดขึ้นอย่างเด่นชัดเมื่อบ่มเจลที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ($p<0.05$) (รูปที่ 8a) ทั้งนี้อาจเกิดจากกิจกรรมโปรติเนส ดังจะเห็นได้จากกิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อของปลายี่สกเทศมีค่าสูงสุด (ตารางที่ 4) และเมื่อพิจารณากิจกรรมทรานสกลูทามิเนสแล้วพบว่ามีกิจกรรมต่ำกว่าปลานิล ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่าแรงเนื่องจากเซทติ้งจึงไม่สูงเมื่อเทียบกับปลานิล เป็นที่น่าสังเกตว่าการบ่มที่ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมงมีผลเสียต่อคุณภาพทางเนื้อสัมผัสของเจลปลายี่สกเทศทั้งในด้านค่าแรงและระยะทาง (รูปที่ 8a,b) เนื่องจากกิจกรรมโปรติเนสที่ค่อนข้างสูง การบ่มที่อุณหภูมิสูง (55-65 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานานทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเจล

อุณหภูมิที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซทติ้งในปลานวลจันทร์คือ 40-55 องศาเซลเซียส (รูปที่ 9a) การบ่มที่ 4 หรือที่ 25 องศาเซลเซียส ไม่มีผลเพิ่มความแข็งของเจล (gel strength) ดังจะเห็นว่าค่าความแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักของตัวอย่างที่บ่มที่สภาวะทั้งสองมีค่าไม่แตกต่างจากตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม (90C) ($p>0.05$) การเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อเนื่องจากกิจกรรมโปรติเนสเกิดขึ้นที่ 65 องศาเซลเซียส ทำให้ค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักลดลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม

แคลเซียมไม่มีผลเพิ่มค่าความแข็งแรงและระยะทางของเจลจากปลายี่สกเทศและปลานวลจันทร์ ($p<0.05$) ไม่ว่าที่สภาวะการบ่มใดๆ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลาทั้ง 2 ชนิดนี้มีค่าต่ำกว่าในเนื้อปลานิล (ตารางที่ 4) การเพิ่มแคลเซียมจึงไม่มีผลต่อการกระตุ้นกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส นอกจากนี้ปลาทั้งสองสายพันธุ์เป็นปลาที่มีก้างฝอยในกล้ามเนื้อ แม้ว่าในกระบวนการเตรียมเนื้อปลาบดมีการใช้รูตะแกรงขนาดเล็ก (เส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร) เพื่อกำจัดก้างฝอยดังกล่าว แต่อาจไม่สามารถแยกก้างฝอยได้สมบรูณ์ ซึ่งเมื่อนำมาสับผสมในขั้นตอนการเตรียมเจล สามารถทำให้ก้างฝอยเป็นชิ้นละเอียดเล็กได้ ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาณ



รูปที่ 8 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ.จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลายี่สกเทศที่ระดับการเติม แคลเซียมต่างๆ ตัวอักษรย่อเหมือนรูปที่ 7

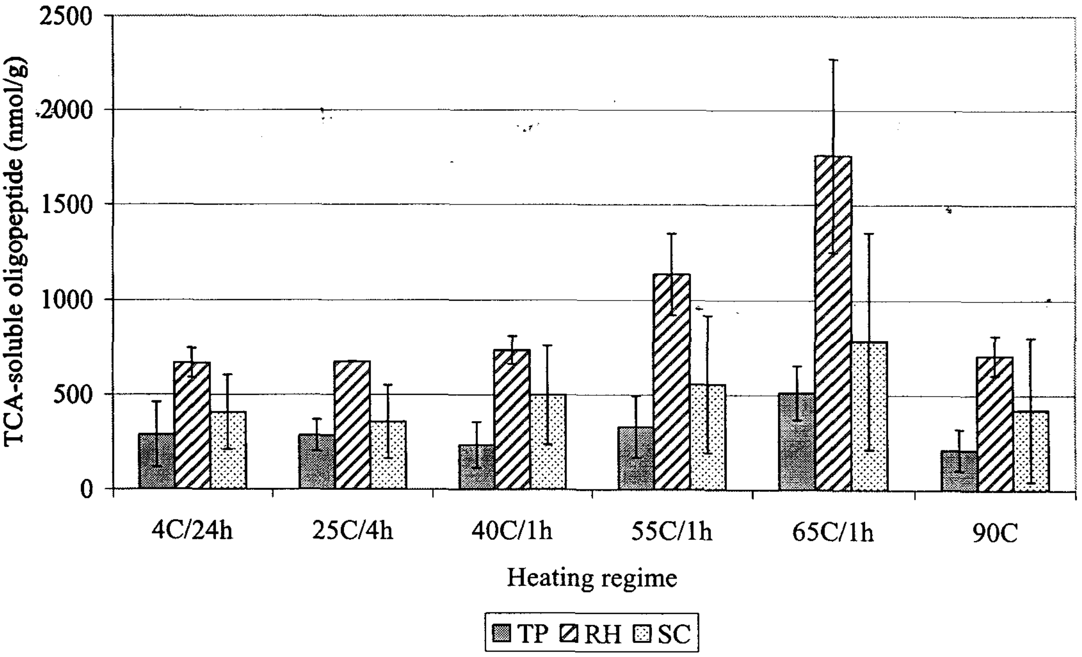


รูปที่ 9 ค่าแรง (a) และระยะทาง (b) ณ.จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลานวลจันทร์ที่ระดับการเติมแคลเซียมไอออนต่างๆ ตัวอักษรย่อเหมือนรูปที่ 7

แคลเซียมในเนื้อปลาทางอ้อม ด้วยปริมาณแคลเซียมดังกล่าวประกอบกับกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสที่ต่ำอยู่แล้วในเนื้อปลา จึงส่งผลให้การเติมแคลเซียมในระดับ 0.1-0.3% ไม่มีผลเพิ่มค่าความแข็งแรงของเจลจากทั้งปลายี่สกเทศและปลานวลจันทร์

3.2 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์

ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ของเจลจากปลา 3 ชนิดที่ศึกษาไม่แตกต่างกัน $(p>0.05)$ (รูปที่ 10) การบ่มเนื้อปลาบดที่ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทั้ง 3 ชนิดเกิดขึ้นสูงสุด $(p<0.05)$ (รูปที่ 10) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับลักษณะทางเนื้อสัมผัส การบ่มที่ 4, 25 และ 40 องศาเซลเซียส ไม่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของโปรตีนกล้ามเนื้ออย่างเด่นชัดเนื่องจากปริมาณโอลิโกเปปไทด์ของตัวอย่างทั้ง 3 ไม่แตกต่างกัน $(p>0.05)$ ในปลานวลจันทร์กิจกรรมการย่อยสลายกล้ามเนื้อโดยโปรติเนสเริ่มพบที่ 40 องศาเซลเซียส และเพิ่มสูงสุดที่ 65 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามหากพิจารณาค่าแรง ณ จุดแตกหักของเจลปลานวลจันทร์มีค่าสูงสุดที่ 40 และ 55 องศาเซลเซียส การลดกิจกรรมของโปรติเนสอาจสามารถทำได้โดยการใช้สารยับยั้งโปรติเนส เช่น ไข่ขาว โปรตีนจากเวย์ เป็นต้น แนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่ความ



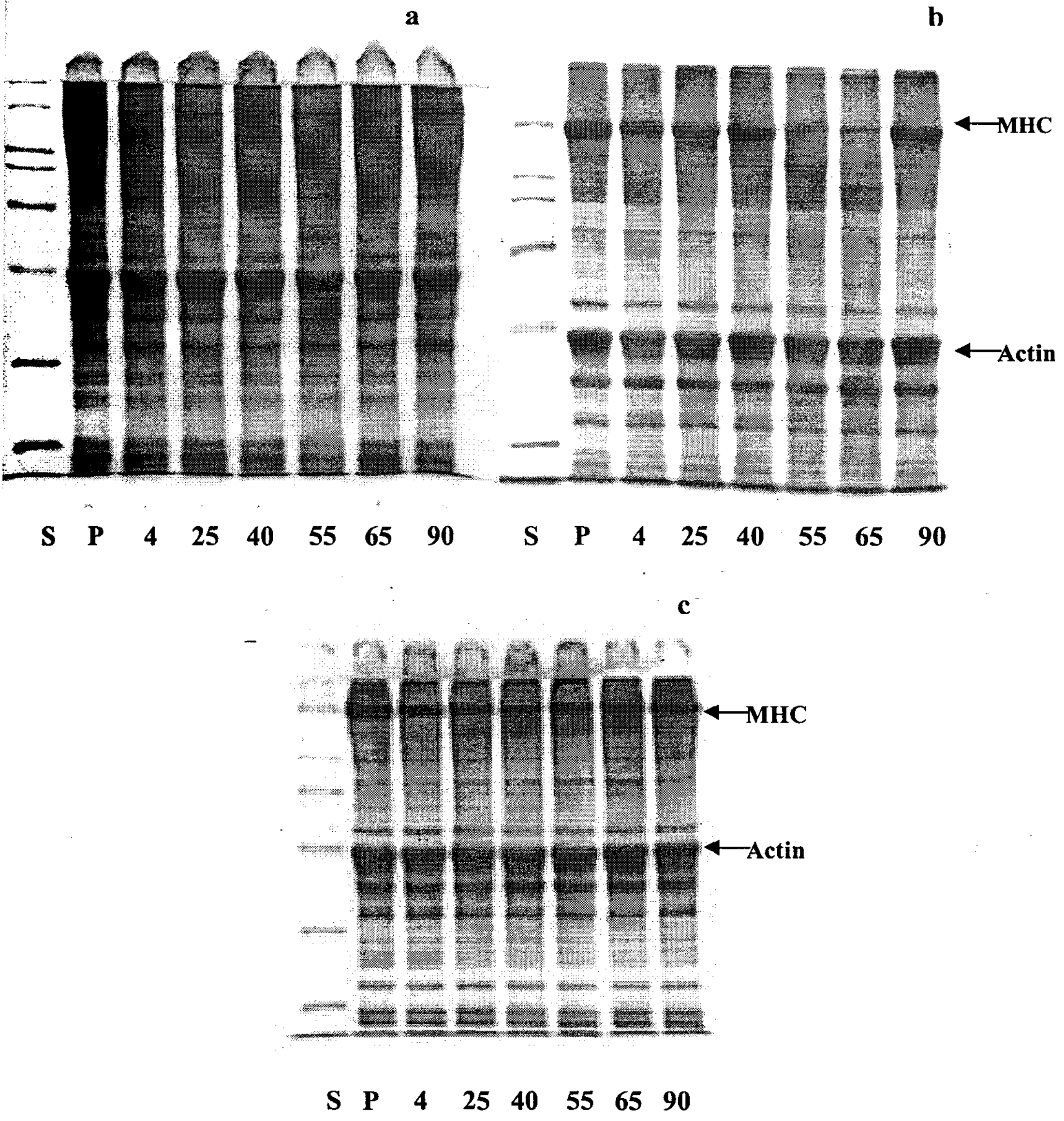
รูปที่ 10 ปริมาณโอลิโกเปปไทด์ในเจลเนื้อปลาชนิดต่างๆที่ไม่ได้เติมแคลเซียมไอออนและบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

เข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ต่างๆ เป็นเช่นเดียวรูปที่ 10 จึงไม่ได้แสดงไว้ ณ ที่นี้ จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าแคลเซียมไม่มีผลต่อการเกิดปริมาณโอลิโกเปปไทด์

3.3 การเปลี่ยนแปลงโปรตีนกล้ามเนื้อจากการวิเคราะห์ SDS-PAGE

มัยโอซินสายหลัก (myosin heavy chain) ของเจลปลานิลบ่มที่สภาวะต่างๆลดลง เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับความร้อน (รูปที่ 11a) การลดลงของมัยโอซินสายหลักที่แต่ละอุณหภูมิการบ่มไม่แตกต่างกันโดยเฉพาะเมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม (90C) ดังนั้นการลดลงของมัยโอซินสายหลักที่สังเกตเห็นน่าจะเกิดเนื่องจากการให้ความร้อนมากกว่าเกิดจากการบ่มตัวอย่าง นอกจากนี้ไม่พบการเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักอย่างเด่นชัดที่ 65 องศาเซลเซียส มัยโอซินสายหลักของปลายี่สกเทศลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง (รูปที่ 11b) นอกจากนี้ยังพบการเสื่อมสลายของแอคตินหรือซาร์โคพลาสมิกโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 45 กิโลดาลตัน แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมโปรติเนสที่สูงของปลายี่สกเทศซึ่งสอดคล้องกับปริมาณโอลิโกเปปไทด์ที่เกิดขึ้นสูงสุด (รูปที่ 10) จากผลของโอลิโกเปปไทด์และ SDS-PAGE จะเห็นได้ว่าปลายี่สกเทศเป็นปลาที่เกิดปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละมากที่สุดเมื่อเทียบกับปลานิลและปลานวลจันทร์ ซึ่งผลดังกล่าวอาจอธิบายสาเหตุที่เจลจากปลายี่สกเทศมีค่าต่ำ ดังนั้นการนำเนื้อปลายี่สกเทศมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อปลาบด หรือผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่ต้องมีกระบวนการให้ความร้อนจึงจำเป็นที่จะต้องคำนึงถึงกิจกรรมโปรติเนสในเนื้อปลาด้วย การให้ความร้อนอย่างรวดเร็วเพื่อยับยั้งโปรติเนสเช่น ohmic heating (Yongsawatdigul et al., 1995) หรือ microwave heating เป็นแนวทางหนึ่งในการลดปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละในผลิตภัณฑ์เนื้อปลายี่สกเทศ

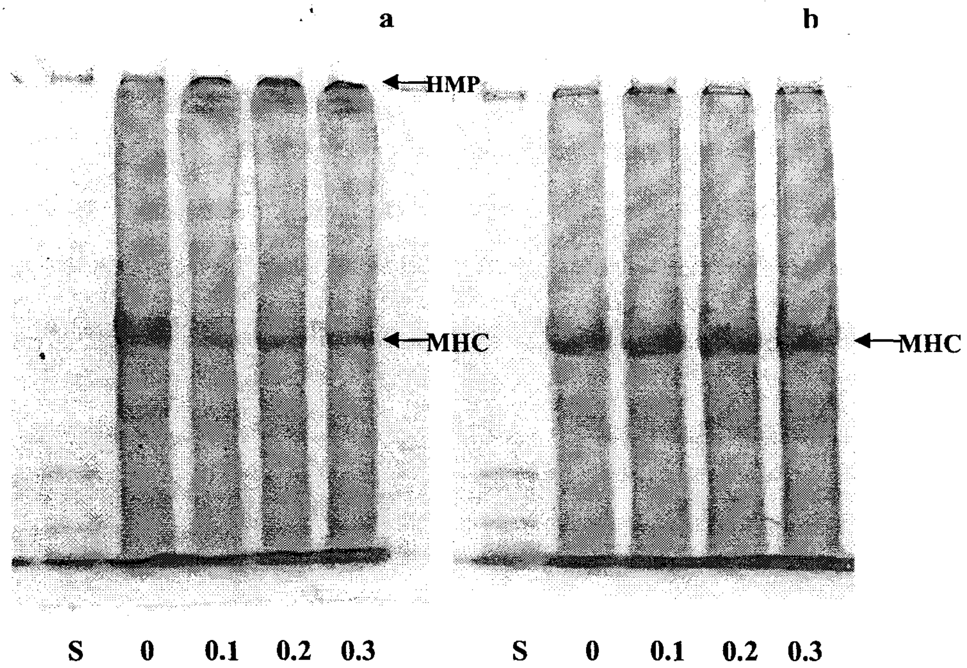
การเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักในปลานิลและปลานวลจันทร์ไม่แตกต่างมากนัก (รูปที่ 11a,c) พบการเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักในปลานิลและปลานวลจันทร์เมื่อบ่มที่ 65 องศาเซลเซียส แต่ในระดับที่น้อยกว่าปลายี่สกเทศ ระดับความเข้มของแอคตินไม่เปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิการบ่มที่ศึกษา จะเห็นได้ว่าปรากฏการณ์เนื้อยุ่ยเละอาจไม่ใช่ปัญหาสำคัญในปลานิลและปลานวลจันทร์ ดังนั้นปลาทั้งสองชนิดจึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตภัณฑ์ประเภทเจล แม้การเสื่อมสลายของมัยโอซินสายหลักในปลานวลจันทร์จะดูใกล้เคียงกับปลานิล (รูปที่ 11a,c) แต่ปริมาณโอลิโกเปไทด์ในปลานวลจันทร์มีค่าสูงกว่าในปลานิล (รูปที่ 10) ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าการเสื่อมสลายอาจไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะที่มัยโอซินสายหลัก หรือแอคตินเท่านั้น แต่อาจเกิดขึ้นกับโปรตีนอื่นด้วย ซึ่งการเสื่อมสลายของโปรตีนเหล่านั้นอาจแสดงผลได้ไม่ชัดเจนบน SDS-PAGE เนื่องจากโปรตีนกล้ามเนื้อประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดที่มีขนาดหลากหลาย การเสื่อมสลายของโปรตีนโดยโปรติเนสอาจ


a
b
MHC
Actin
S P 4 25 40 55 65 90
S P 4 25 40 55 65 90
c
MHC
Actin
S P 4 25 40 55 65 90

รูปที่ 11 SDS-PAGE ของเจลโปรตีนจากปลานิล (a) ปลายี่สกเทศ (b) และปลานวลจันทร์ (c) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ S= standard molecular weight, P=paste, 4-65=อุณหภูมิในการบ่มก่อนให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส, 90=ตัวอย่างให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียสโดยไม่ได้บ่ม, MHC=myosin heavy chain

ทำให้ได้โปรตีนที่มีขนาดเล็กลงจนมีขนาดใกล้เคียงกับโปรตีนชนิดอื่น ทำให้เกิดการซ้อนทับบน SDS-PAGE ได้

เนื่องจากค่าแรง ณ. จุดแตกหักของเจลปลานิลบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นตามระดับแคลเซียม (รูปที่ 7a,b) ซึ่งคาดว่าเกิดขึ้นจากการเชื่อมโยงสายโปรตีนด้วยพันธะ ε-(γ-glutamyl)lysine ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์จากการเร่งปฏิกิริยาโดยทรานสกลูทามิเนส ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE ที่ความเข้มข้น 5% acylamide พบแถบโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ (high molecular weight protein, HMP) ซึ่งไม่สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่แผ่นเจลได้ในตัวอย่างที่เติมแคลเซียม 0.1-0.3% (รูปที่ 12a) ส่วนตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียม หรือเติมแคลเซียมแต่ไม่ได้บ่มจะไม่พบโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ดังกล่าว (รูปที่ 12b) ผลดังกล่าวสนับสนุนสมมุติฐานที่ว่าคุณลักษณะทางเนื้อสัมผัสที่ดีขึ้นของเจลปลานิลเมื่อเติมแคลเซียมในระดับ 0.1-0.3% บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเกิดจากกิจกรรมทรานสกลูทามิเนส



รูปที่ 12 SDS-PAGE (5% acylamide) ของเจลปลานิลเติมแคลเซียมในระดับ 0-0.3% บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมงและให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที (a) และให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส 30 นาที โดยไม่ได้บ่ม (b) S= Standard molecular weight, 0-0.3=ระดับการเติมแคลเซียมเป็น%, MHC = myosin heavy chain, HMP = high molecular weight protein

4. ผลของแคลเซียมไอออนต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล (Effect of calcium ion on conformational changes of tilapia actomyosin)

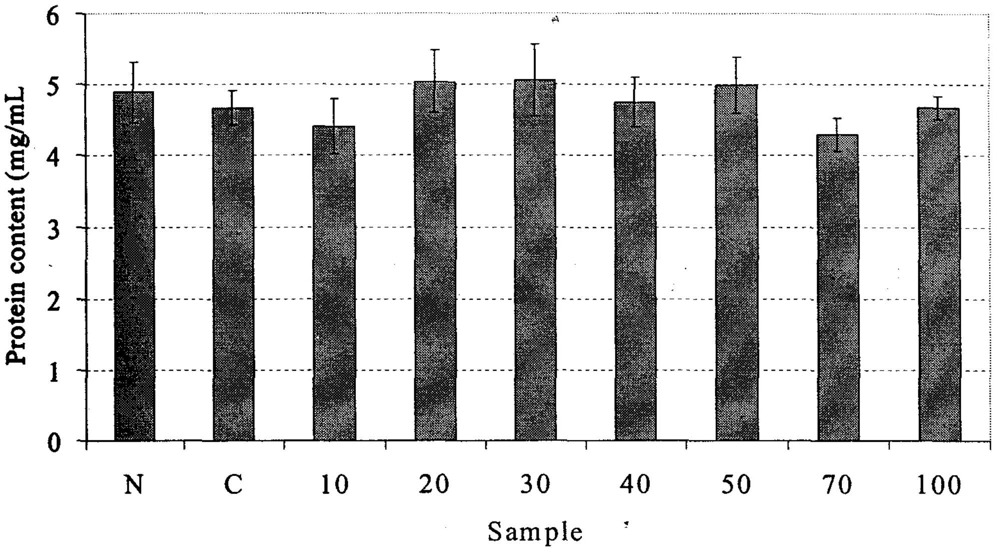
จากผลข้างต้นจะเห็นว่าแคลเซียมมีบทบาทในการเพิ่มค่าความแข็งของเจล เนื่องจากการกระตุ้นกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสในเนื้อปลานิล ทำให้เกิดการเชื่อมโยงสายโปรตีน แต่เนื่องจากแคลเซียมไอออนมีผลในการทำให้โครงสร้างโปรตีนเกิดความไม่เสถียร (destabilize) โปรตีนเปิดตัวออก และมีความสามารถในการละลายมากขึ้น (salting in) ดังนั้นการเติมแคลเซียมจึงอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้าง (conformational changes) ของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจมีผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสก็เป็นได้ ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้จึงมุ่งศึกษาผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลานิล

4.1 ผลของแคลเซียมต่อการละลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ

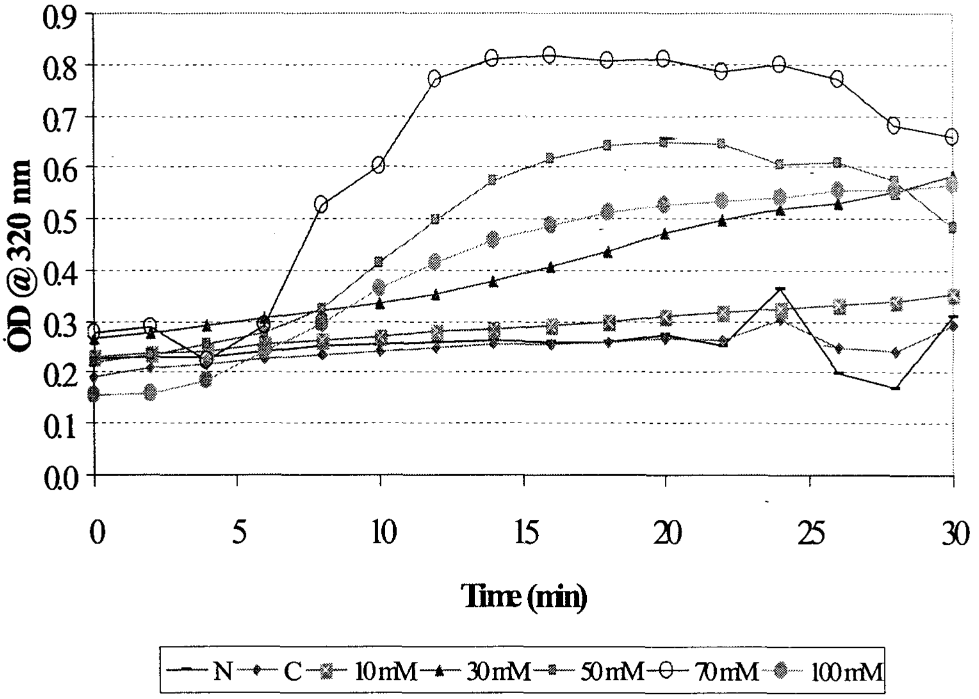
การเติมแคลเซียมในระดับ 10-100 มิลลิโมลาร์ไม่มีผลต่อการละลายของแอคโตมัยโอซิน ($p>0.05$) (รูปที่ 13) ตัวอย่างควบคุม (C) คือตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียม แต่เนื่องจากในกล้ามเนื้อปลาอาจมีแคลเซียมอยู่ตามธรรมชาติบ้างในปริมาณน้อย เพื่อขจัดผลของแคลเซียมในเนื้อปลา (endogenous calcium) ต่อการละลาย จึงเติม EGTA ซึ่งเป็นสารที่สามารถจับแคลเซียม (N) และจากการศึกษาพบว่าปริมาณแคลเซียมในกล้ามเนื้อปลาก็ไม่ได้มีผลต่อการละลายของแอคโตมัยโอซินปลานิล

4.2 ผลของแคลเซียมต่อค่าความขุ่นของสารละลายแอคโตมัยโอซิน

ค่าความขุ่น (turbidity) ของสารละลายแอคโตมัยโอซินควบคุม (ไม่มีแคลเซียม C และ N) เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที ค่าความขุ่นเพิ่มสูงขึ้นเมื่อระดับแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 14) การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 320 นาโนเมตร เกิดจากการเกาะตัวของแอคโตมัยโอซิน (aggregation) ซึ่งเมื่อมีอนุภาคใหญ่ขึ้น การกระเจิงของแสงจึงมากขึ้น ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน ทำให้แอคโตมัยโอซินเกาะตัวมากขึ้นที่ 40 องศาเซลเซียส การเกาะตัวของแอคโตมัยโอซินที่แคลเซียมเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ เพิ่มสูงขึ้นมากกว่า 2 เท่าเมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุม เป็นที่น่าสังเกตว่าหากเพิ่มแคลเซียมจนถึงระดับ 100 มิลลิโมลาร์ ความสามารถในการเกาะตัวมีค่าลดต่ำลง ความเข้มข้นของแคลเซียมที่สูงเกินไปมีผลทำให้เกิดแรงกระทำทางประจุไฟฟ้า (electrostatic interaction) ที่ไม่สมดุล และลดอันตรกิริยา (interaction) ระหว่างโปรตีนและโปรตีนลงได้



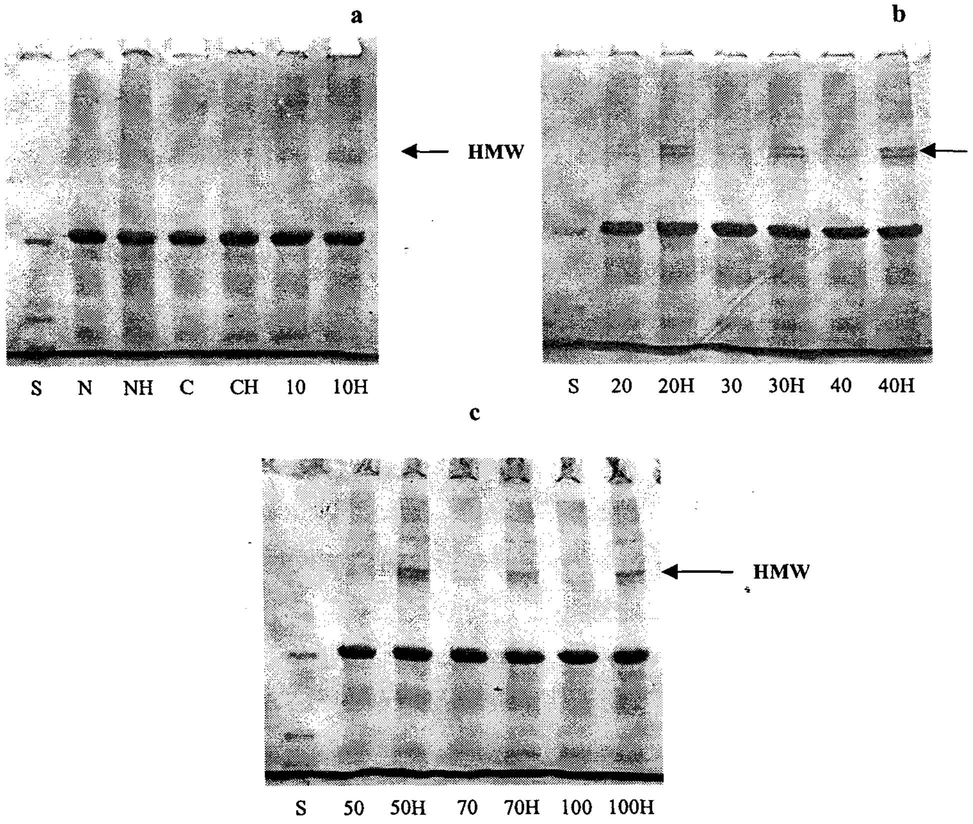
รูปที่ 13 ผลของระดับแคลเซียมต่อการละลายของแอคโตมัยโอซินปลานิล N=negative control (เติม EGTA), C=control, 10-100 = ความเข้มข้นของแคลเซียมในหน่วยมิลลิโมลาร์



รูปที่ 14 การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่นของสารละลายแอคโตมัยโอซินปลานิลบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาทีที่ระดับแคลเซียม 0-100 มิลลิโมลาร์

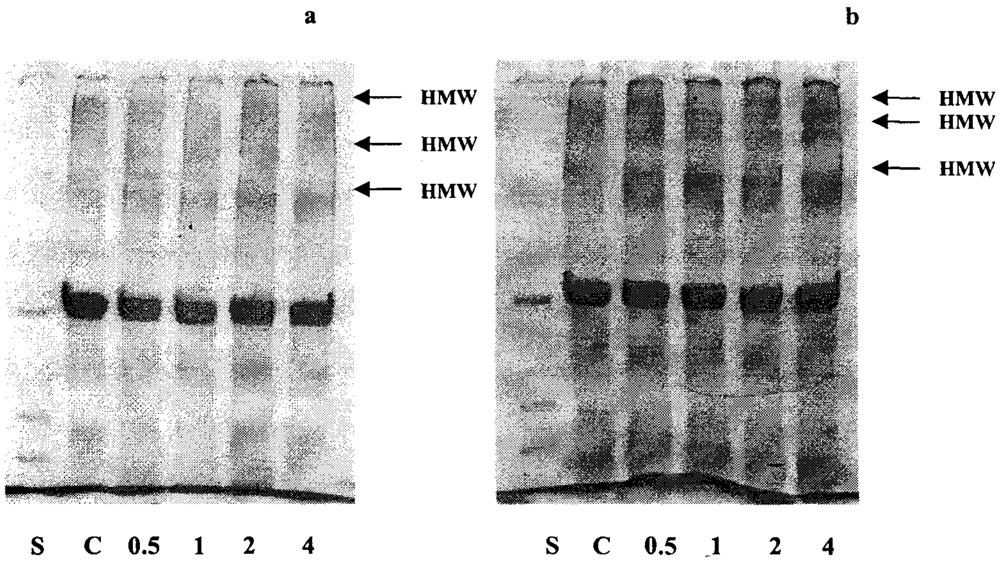
4.3 ผลของแคลเซียมต่อองค์ประกอบโปรตีนจากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

เมื่อพิจารณาผลของ SDS-PAGE พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมโยงโมเลกุลขนาดใหญ่ (high molecular weight, HMW) เพิ่มขึ้นที่ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 15) ซึ่งสอดคล้องกับผลของความขุ่น (turbidity) (รูปที่ 14) โมเลกุลขนาดใหญ่นี้ไม่สามารถถูกแยกให้เป็นหน่วยเล็กได้ด้วยสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β-mercaptoethanol (BME) แสดงว่าการเกาะตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่นี้ไม่ได้เกิดจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิก และ/หรือ พันธะไดซัลไฟด์ พันธะไอโซเปปไทด์ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสที่อยู่ในกล้ามเนื้อปลา อาจเป็น



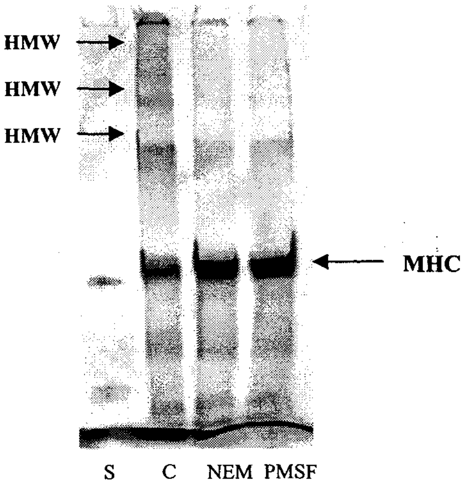
รูปที่ 15 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ (บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 10 มิลลิโมลาร์ (a), 20-40 มิลลิโมลาร์ (b), 50-100 มิลลิโมลาร์ (c) S = standard molecular weight, N = negative control (+EGTA), C = control, 10-100 = ความเข้มข้นของแคลเซียมในหน่วยมิลลิโมลาร์และไม่มีการบ่ม, 10H-100H = ตัวอย่างซึ่งมีแคลเซียมและบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที

พันธะสำคัญที่ทำให้เกิดการยึดเกาะเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่นี้ และเนื่องจากเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการเพิ่มแคลเซียมไอออนจึงส่งผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาดีขึ้น เกิดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาใน 3.3 เป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มแคลเซียม ยังมีผลเพิ่มสารที่ขนาดโมเลกุลใหญ่แม้ในตัวอย่างที่ไม่ได้ให้ความร้อนโดยเฉพาะที่แคลเซียมเข้มข้น 70 และ 100 มิลลิโมลาร์ โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม (รูปที่ 16) ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจมีผลเนื่องจากกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสที่ไม่ได้ถูกกำจัดออกโดยสมบูรณ์ในช่วงของการสกัดแอคโตมัยโอซิน



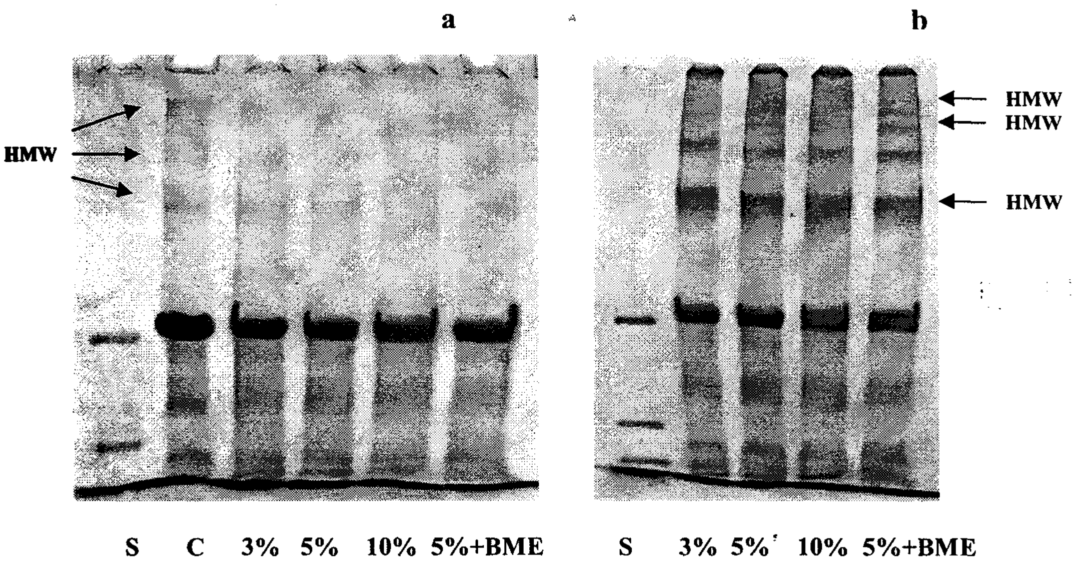
รูปที่ 16 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออน 70 มิลลิโมลาร์ (a), 100 มิลลิโมลาร์ (b) S = standard molecular weight, C = control, 0.5-4 = เวลาในการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสมีหน่วยเป็นชั่วโมง

เพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น เกิดจากกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลา จึงได้ทดลองบ่มแอคโตมัยโอซินกับสารยับยั้งทรานสกลูทามิเนสคือ phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และ N-ethylmaleimide (NEM) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และพบว่าตัวอย่างที่เติมสารยับยั้งมีปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่ลดลง (รูปที่ 17) ซึ่งแสดงว่ากิจกรรมทรานสกลูทามิเนสในเนื้อปลามีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มปริมาณโปรตีนโมเลกุลใหญ่



รูปที่ 17 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ (C) และมีสารยับยั้งทรานสกลูทามิเนส, NEM และ PMSF โดยบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง S = standard molecular weight

นอกจากพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยทรานสกลูทามิเนสแล้ว ยังพบว่าแรงกระทำไฮโดรโฟบิกมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพอลิเมอร์ของแอคโตมัยโอซินปลานิล โดยแคลเซียมมีผลเพิ่มแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างแอคโตมัยโอซิน เมื่อบ่มแอคโตมัยโอซินโดยไม่มีแคลเซียมที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารละลายแอคโตมัยโอซินสามารถละลายใน treatment buffer ได้ และสังเกตพบพอลิเมอร์ของแอคโตมัยโอซินเล็กน้อย (HMW) (รูปที่ 18a) แต่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และสารละลาย SDS+BME พบว่า HMW หายไป ซึ่งบ่งชี้ว่า HMW ในตัวอย่างที่ไม่มีแคลเซียมอาจเกิดจากการรวมตัวด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก แต่เมื่อบ่มสารละลายแอคโตมัยโอซินที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าสารละลายแอคโตมัยโอซินที่บ่มได้ไม่สามารถละลายใน treatment buffer และไม่สามารถ load ลงเจลได้ (รูปที่ 18b) แต่เมื่อนำสารละลายแอคโตมัยโอซินดังกล่าวมาละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และสารละลาย SDS และ BME ปรากฏว่าสามารถแยกองค์ประกอบของแอคโตมัยโอซินได้(รูปที่ 18b) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมเข้มข้น100 มิลลิโมลาร์ เหนี่ยวนำให้เกิด soluble aggregate ซึ่งเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกเป็นสำคัญ นอกจากนี้พันธะไดซัลไฟด์ไม่ใช่พันธะหลักใน soluble aggregate เนื่องจากรูปแบบของ



รูปที่ 18 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่เติมแคลเซียม (a) และ แคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์และละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และ SDS เข้มข้น 5%+BME เข้มข้น 2%, S = standard molecular weight, C = ตัวอย่างที่ไม่ได้ละลายใน SDS

โปรตีนไม่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่ละลายในสารละลาย SDS และที่ละลายใน SDS+BME (รูปที่ 18b) HMW ที่ปรากฏในสภาวะที่มีแคลเซียมคือพันธะโควาเลนท์ที่ไม่ใช่ไดซัลไฟด์ ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส แต่ HMW ที่เกิดขึ้นในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียมนั้นเกิดจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิกเป็นสำคัญ ผลดังกล่าวอธิบายลักษณะเนื้อสัมผัสของปลานิลใน 3.1 การบ่มเนื้อปลาโดยไม่เติมแคลเซียมที่ 40 องศาเซลเซียสทำให้ได้ค่าแรงที่สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิกที่เพิ่ม แต่การบ่มในสภาวะที่มีแคลเซียมจะยิ่งทำให้ค่าแรงเพิ่มขึ้นทั้งนี้เนื่องจากการเกิด HMW ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงโดยพันธะโควาเลนท์ที่ไม่ใช่ไดซัลไฟด์ (non-disulfide covalent bond)

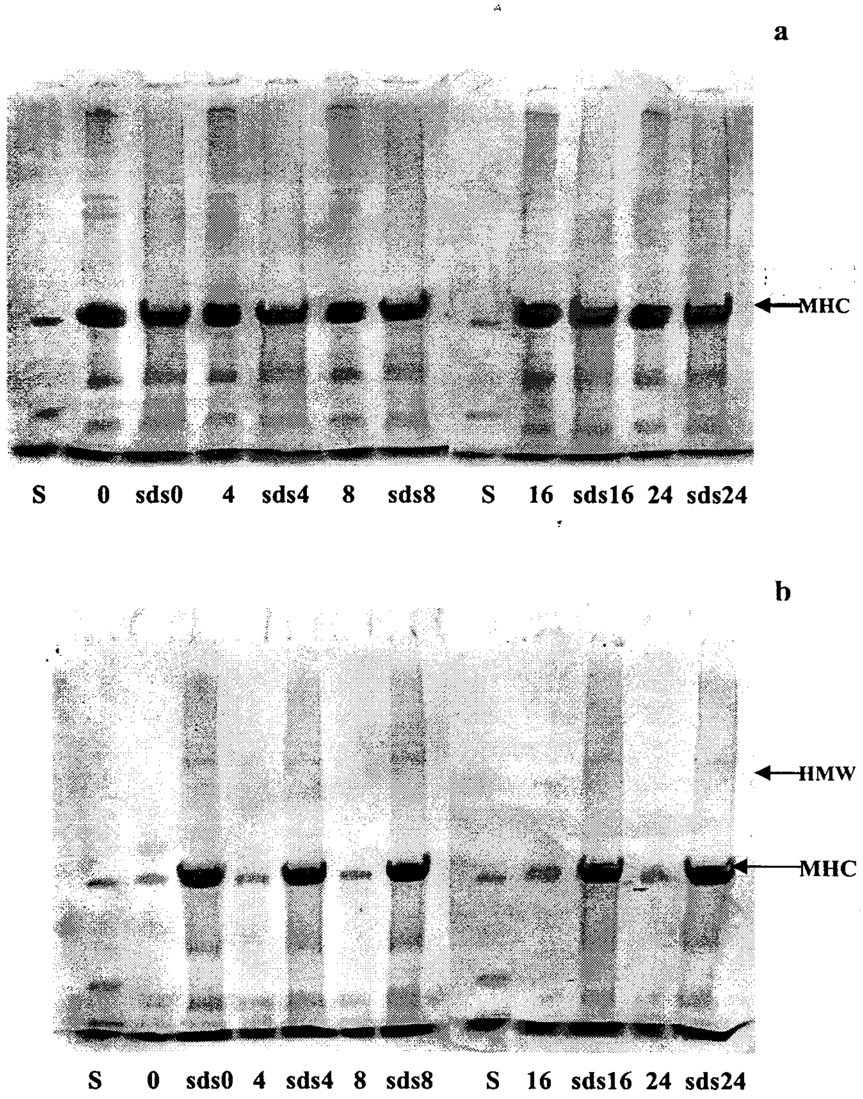
กล่าวโดยสรุปการบ่มแอคโตมัยโอซินปลานิลที่ 40 องศาเซลเซียสในสภาวะที่มีแคลเซียมจะเหนี่ยวนำให้เกิด soluble aggregate และ HMW โดย soluble aggregate นั้นเป็นการเกาะตัวกันของแอคโตมัยโอซินด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ส่วน HMW เกิดจากกิจกรรมของ ทรานสกลูทามิเนส การบ่มแอคโตมัยโอซินที่ 40 องศาเซลเซียสในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียมเหนี่ยวนำให้เกิด HMW เช่นกัน แต่

พันธะหลักที่เกิดขึ้นคือแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ปริมาณแคลเซียมที่จำกัดในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียมอาจไม่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนสให้เกิดพันธะโควาเลนท์ได้

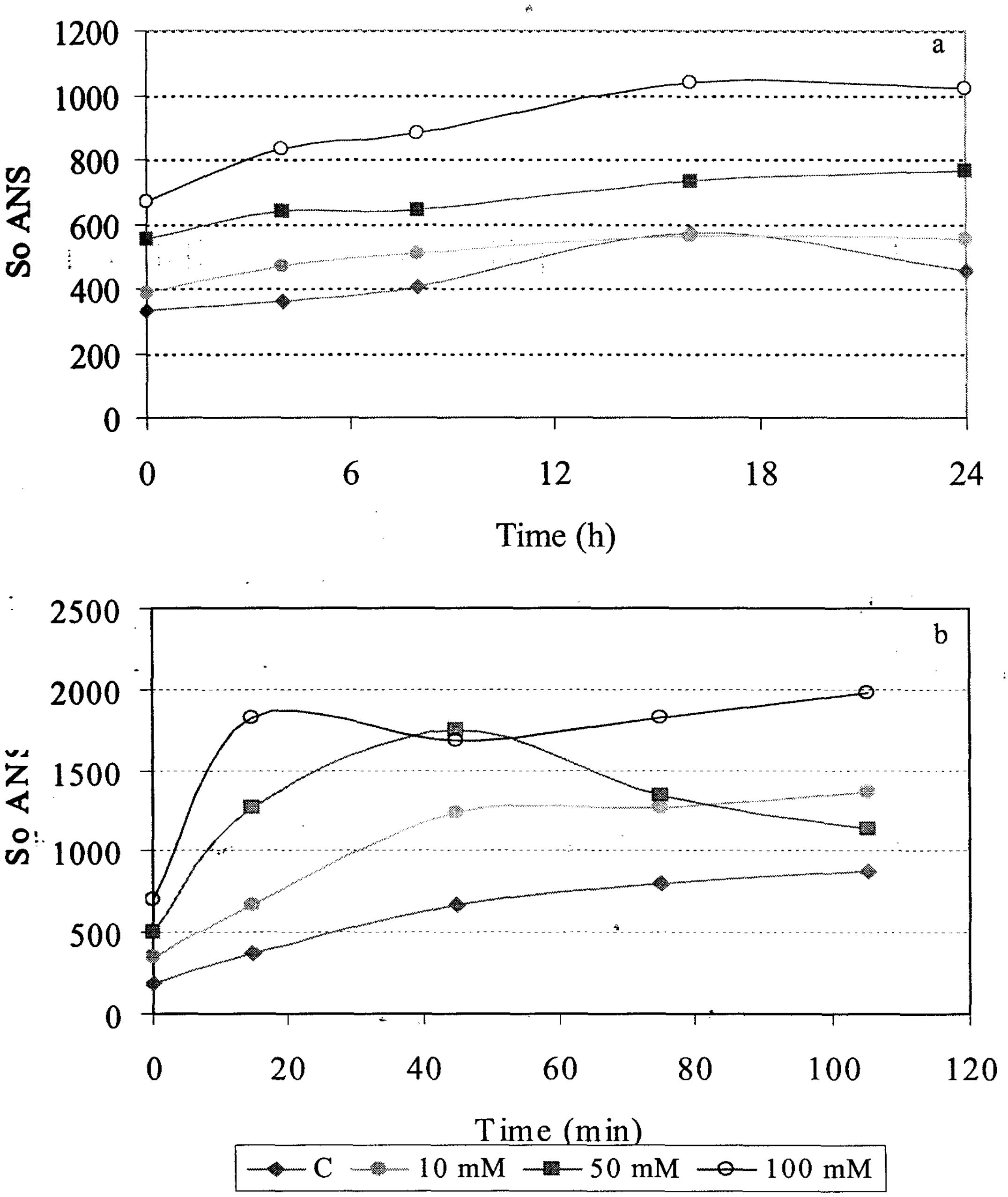
การเติมแคลเซียมนอกจากจะมีผลต่อการเกิด soluble aggregate ของแอคโตมัยโอซินที่ 40 องศาเซลเซียสแล้ว ยังมีผลต่อการเกิด soluble aggregate ที่ 4 องศาเซลเซียสด้วย ในสภาวะที่ไม่มีแคลเซียมองค์ประกอบของแอตโตมัยโอซินที่ไม่ได้เติม SDS (0-24, รูปที่ 19a) และที่เติม SDS (sds0-24, รูปที่ 19a) มีลักษณะคล้ายกัน แสดงว่าไม่เกิด soluble aggregate แต่ที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ตัวอย่างที่ไม่ได้ละลายด้วย sds พบมัยโอซินสายหลักเพียงเล็กน้อย (0-24, รูปที่ 19b) และเมื่อนำไปละลายด้วย SDS พบมัยโอซินสายหลักกลับคืนมา (sds0-24, รูปที่ 19b) ซึ่งแสดงว่าแอคโตมัยโอซินเกิด soluble aggregate ขึ้นในสภาวะที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยพันธะที่ทำให้เกิด soluble aggregate คือพันธะไฮโดรโฟบิก เนื่องจากถูกทำลายด้วยสารละลาย SDS

4.4 ผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซิน

จากผล SDS-PAGE ได้บ่งชี้ว่านอกจากแคลเซียมจะมีผลต่อการเกิดพันธะโควาเลนท์โดยทรานสกลูทามิเนสแล้ว แคลเซียมยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกทั้งที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งแรงกระทำดังกล่าวทำให้เกิด soluble aggregate ของแอคโตมัยโอซิน เพื่อพิสูจน์ว่าแคลเซียมมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก จึงวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซิน ในตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่มีแคลเซียม ค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น (รูปที่ 20a,b) โดยค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส การเพิ่มขึ้นของค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเป็นการบ่งชี้ถึงการเปิดตัวออก (unfold) ของโปรตีน การเปิดตัวออกของโปรตีนที่ 40 องศาเซลเซียสเกิดขึ้นมากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่แอคโตมัยโอซินในปลาสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denature) คือที่ 30-40 องศาเซลเซียส (Lanier, 2000; Yongsawatdigul and Park, 2003) การเพิ่มปริมาณแคลเซียมมีผลให้การเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้นทั้งที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 20a,b) ดังนั้นแคลเซียมจึงมีผลเหนี่ยวนำให้แอคโตมัยโอซินเปิดตัวออกมากขึ้นทั้งที่ 4 และ 40 องศาเซลเซียส เมื่อแอคโตมัยโอซินเปิดตัวออก จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ทำให้เกิด soluble aggregate ของแอคโตมัยโอซิน


a
MHC
S
0
sds0
4
sds4
8
sds8
S
16
sds16
24
sds24
b
HMW
MHC
S
0
sds0
4
sds4
8
sds8
S
16
sds16
24
sds24

รูปที่ 19 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยไม่มีแคลเซียม (a) และแคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (b) บ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง 0-24 = ตัวอย่างบ่มเป็นเวลาต่างๆและผสมกับ treatment buffer, sds0-sds24 =ตัวอย่างที่ละลาย SDS เข้มข้น 5% ก่อนผสม treatment buffer, S = standard molecular weight



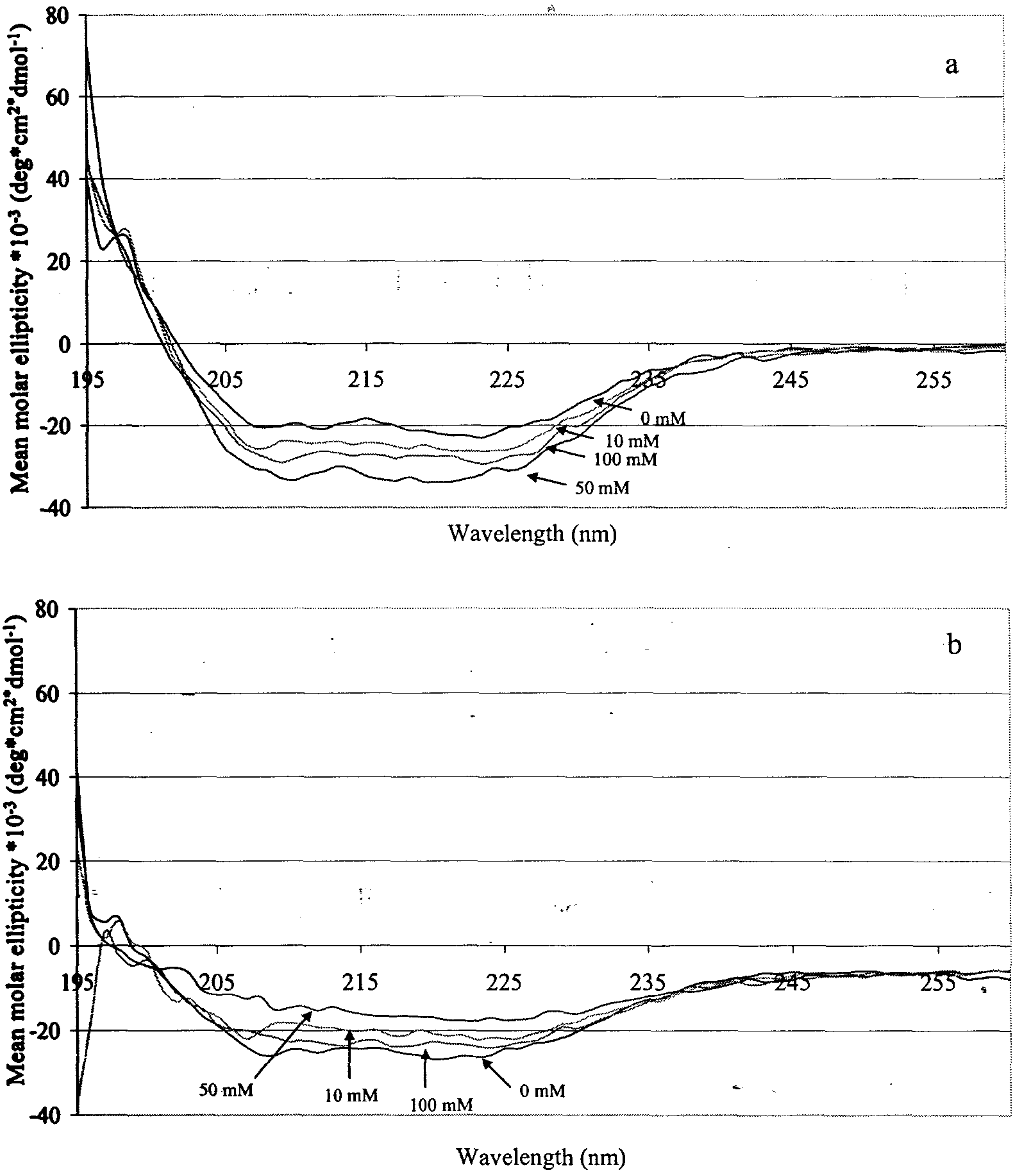
รูปที่ 20 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินปลานิลที่ระดับแคลเซียมต่างๆ และบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส (a) และ 40 องศาเซลเซียส (b) เป็นระยะเวลาต่างๆ

4.5 ผลของแคลเซียมต่อโครงสร้างทุติยภูมิของแอคโตมัยโอซิน

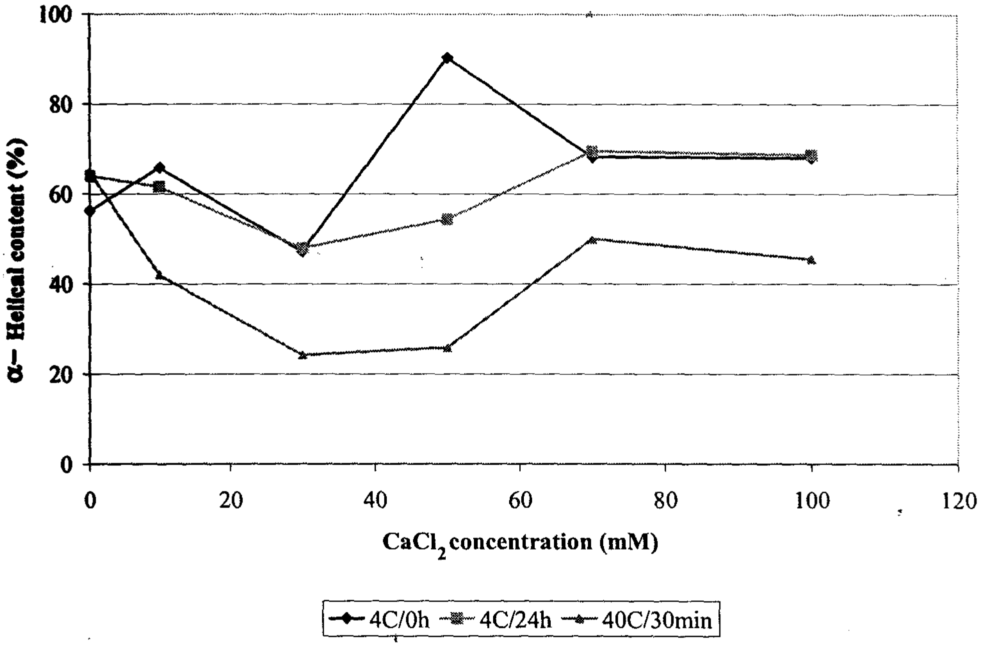
ที่ 4 องศาเซลเซียส แคลเซียมมีผลคล้ายกับช่วยเสถียรโครงสร้างทุติยภูมิของแอคโตมัยโอซินปลานิล (รูปที่ 21a) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โครงสร้างเฮลิกซ์ (helix) เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเริ่มต้นที่ทุกระดับความเข้มข้นของแคลเซียม (ไม่ได้แสดง) ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกซึ่งเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเช่นกันเมื่อบ่มที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 20a) แต่เมื่อให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที เกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิของแอคโตมัยโอซินอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 21b) ซึ่งเกิดขึ้นจากความร้อน แคลเซียมมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างในระดับทุติยภูมิมากขึ้น โดยเกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิมากที่สุดที่ระดับแคลเซียม 50 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 21b) โครงสร้างเฮลิกซ์ลดลงตามระดับแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 22) การสูญเสียโครงสร้างในระดับทุติยภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีน การบ่มแอคโตมัยโอซินที่ 40 องศาเซลเซียสทำให้โปรตีนเปิดตัวออก เกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างเฮลิกซ์ลดลง การเพิ่มแคลเซียมมีผลทำให้ระดับการเปิดตัวออกของโปรตีนมากขึ้น และโครงสร้างทุติยภูมิลดลงมากขึ้นด้วย การเปลี่ยนแปลงดังการส่งผลให้ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้น ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นการเกิดเซทติ้งที่ 40 องศาเซลเซียสนั้น เป็นผลมาจากกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสซึ่งถูกกระตุ้นเมื่อมีปริมาณแคลเซียมที่เหมาะสม ทำให้เกิดพันธะε-(γ-glutamyl)lysine นอกจากนี้แคลเซียมยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของแอคโตมัยโอซินที่ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดังกล่าวเป็นการส่งเสริมแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างสายแอคโตมัยโอซิน

4.6 ผลของแคลเซียมต่อคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของแอคโตมัยโอซิน

เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายแอคโตมัยโอซินที่ 90 องศาเซลเซียส 15 นาที ปรากฏว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียมและที่เติมแคลเซียม 10-30 มิลลิโมลาร์ไม่เกิดเจล (รูปที่ 23a,b) สามารถวัดลักษณะเนื้อสัมผัสได้ที่ระดับแคลเซียม 40-100 มิลลิโมลาร์ การบ่มตัวอย่างที่ไม่มีแคลเซียมที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เหนี่ยวนำให้เกิดเจล การเพิ่มปริมาณแคลเซียมทำให้ได้เจลที่ได้มีค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมเหนี่ยวนำให้เกิดการเซทตัวของสารละลายแอคโตมัยโอซินที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาข้างต้นพันธะที่เหนี่ยวนำให้เกิดเจลในสภาวะการบ่มนี้คือแรงกระทำไฮโดรโฟบิก เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าโปรตีนจากปลาในแถบร้อนไม่เกิดการเซทตัวที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากโครงสร้างของมัยโอซินมีความเสถียรสูง อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้แสดงให้



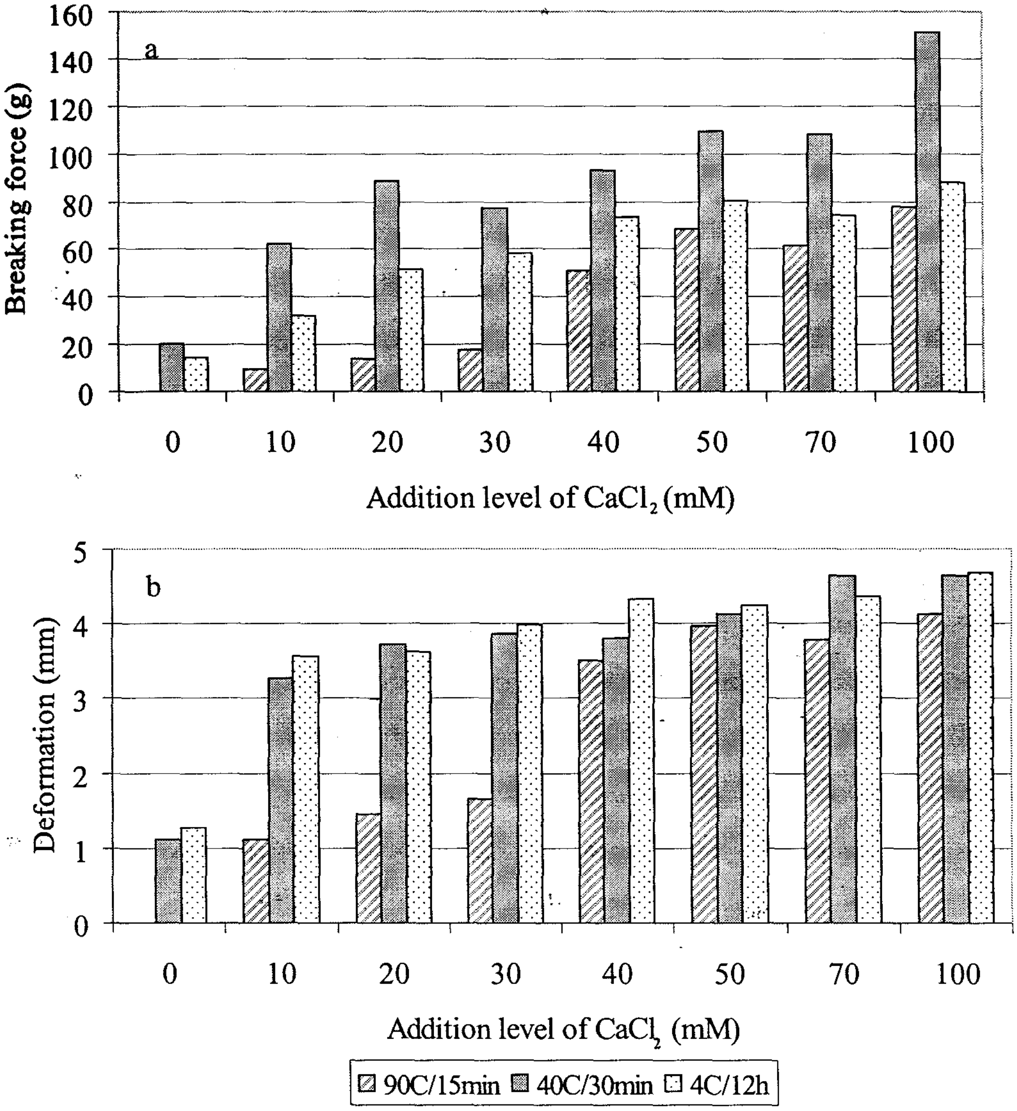
รูปที่21 CD spectra ของแอคโตมัยโอซินปลานิลที่แคลเซียมระดับต่างๆ ที่ 4 องศาเซลเซียส (a) และเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที (b)



รูปที่ 22 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเฮลิกซ์ของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียมและสภาวะการบ่มต่างๆ

เห็นว่าโปรตีนกล้ามเนื้อจากปลาแถบร้อนเช่นปลานิล สามารถเกิดเซทติ้งได้เมื่อมีปริมาณแคลเซียมเพียงพอ (> 10 มิลลิโมลาร์) ที่จะเหนี่ยวนำให้โปรตีนเปิดตัวออก และเกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกได้

ปริมาณแคลเซียมมีผลเพิ่มคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลแอคโตมัยโอซินอย่างเด่นชัดเมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส 30 นาที (รูปที่ 23b) ที่ระดับแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ เจลแอคโตมัยโอซินมีค่าแรงสูงสุด ($p<0.05$) การเพิ่มปริมาณแคลเซียมส่งผลให้เกิดการเร่งกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส ทำให้เกิดการเชื่อมโยงสายแอคโตมัยโอซินด้วยพันธะไอโซเปปไทด์ ε-(γ-glutamyl) lysine จึงทำให้ได้เจลที่มีความยืดหยุ่นมากขึ้น นอกจากนี้การเพิ่มแคลเซียมยังมีผลเพิ่มแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ซึ่งเกิดจากการเพิ่มพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซิน การเพิ่มทั้งพันธะเปปไทด์และแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ส่งผลให้ได้เจลที่มีความแข็งและยืดหยุ่นเพิ่มขึ้น



รูปที่ 23 ค่าแรง (a) และระยะทาง ณ จุดแตกหัก (b) ของเจลแอคโตมัยโอซินปลานิลที่ระดับการเติมแคลเซียมและสภาวะในการบ่ม

สรุป

กิจกรรมโปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในกล้ามเนื้อปลามีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการเกิดเจล จากการศึกษาปลาน้ำจืด 9 ชนิดได้แก่ปลานิล ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์ ปลาดุกแอฟริกัน ปลาตะเพียน ปลาจีน ปลาตะเพียน ปลาไน และปลาช่อน พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสองแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ โดยปลานิลเป็นปลาที่มีกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสสูงสุด ในขณะที่ปลาดุกแอฟริกันมีกิจกรรมโปรติเนสสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์ ปลานิลมีกิจกรรมทรานสกลูทามิเนสที่สูงและมีกิจกรรมโปรติเนสที่ค่อนข้างต่ำ การบ่มเนื้อปลาที่ 40-55 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ทรานสกลูทามิเนสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้ดี จะทำให้เกิดการเชื่อมโยงสายโปรตีนด้วยพันธะ ε-(γ-glutamyl)lysine มากขึ้น ในขณะที่การบ่มที่ 65 องศาเซลเซียสมีผลเร่งกิจกรรมโปรติเนส ทำให้เกิดปรากฏการณ์เนื้อยุ่ย (texture softening) ซึ่งเห็นได้เด่นชัดในปลายี่สกเทศ การเติมแคลเซียมในระดับ 0.1-0.3% ร่วมกับการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส มีผลเพิ่มค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักของเจลปลานิล เนื่องจากแคลเซียมมีผลกระตุ้น (activate) การทำงานของทรานสกลูทามิเนส นอกจากนี้แคลเซียมยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโครงสร้าง (conformation) ของโปรตีนกล้ามเนื้อ ทำให้แอคโตมัยโอซินเปิดตัว สูญเสียโครงสร้างในระดับทุติยภูมิโดยเฉพาะโครงสร้างแอลฟา-เฮลิกซ์ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดังกล่าวทำให้พื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างสายแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุจินต์ หนูขวัญ, ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ และ กำชัย ลาวัณยวุฒิ 2536. การเพาะเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

An, H., Seymour, T. A., Wu, J. W., Morrissey, M. T. 1994. Assay systems and characterization of Pacific whiting (*Merluccius productus*) protease. J Food Sci 59: 277-281.

Ashie, I.N.A., Lanier, T.C. 2000. Transglutaminases in seafood processing. . In *Seafood Enzymes Utilization and Influence on Postharvest Seafood Quality*, N.F. Haard and B.K. Simpson (Eds.), p. 147-166. Marcel Dekker, Inc., New York.

Cao, M.J., Hara, K., Osatomi, K., Tachibana, K., Isumi, T., Ishihara, T. 1999. Myofibril-bound serine proteinase (MBP) and its degradation of myofibrillar proteins. J. Food Sci. 64: 644-647.

Cao, M.J., Osatomi, K., Hara, K., Ishihara, T. 2000. Identification of a myofibril-bound proteinase (MBSP) in the skeletal muscle of lizard fish Saurida wanieso which specially cleaves the arginine site. Comp. Biochem Physio B. 125: 255-264.

Choi, Y.J., Cho, Y.J., Lanier, T.C. 1999. Purification and characterization of proteinase from Atlantic menhaden muscle. J. Food Sci. 64: 772-775.

Folk, J.E. 1980. Transglutaminase. Ann. Rev. Biochem. 49:517-531.

Folk, J.E., Cole, P.W. 1966. Identification of a functional cysteine essential for the activity of guinea pig liver transglutaminase. J. Bio. Chem. 41: 3238-3240.

Huff-Lonergan, E., Mitsuhashi, T., Parrish, F. C. Jr., Robson, R. M. 1996. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and western blotting comparisons of purified myofibrils and whole muscle preparation for evaluating titin and nebulin in postmortem bovine muscle. J. Anim. Sci. 74: 779-785.

Iwata, K., Kobashi, K., Hase, J. 1974. Studies on muscle alkaline proteinase III distribution of alkaline protease in muscle of freshwater fish, marine fish, and in internal organs of carp. Bull Jpn Soc Sci Fish. 40: 201-209.

Jiang, S.T., Wang, Y.T., Chen, C.S. 1992. Lysisomal enzyme effects on the postmortem changes in tilapia (Tilapia nilotica x T. aurea) muscle myofibrils. J. Food Sci. 57: 277-279, 282.

Jiang, S.T., Wang, J.H., Chen, C.S. 1991. Purification and some properties of calpain II from tilapia muscle (*Tilapia nilotica* × *Tilapia aurea*). J. Agric. Food Chem. 39: 237-241.

Kamath, G.G., Lanier, T.C., Foegeding, E.A., and Hamann, D.D. 1992. Nondisulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in "setting" of Alaska pollock and Atlantic croaker surimi. Food Biochem. 16: 151-172.

Kang, I.S., Lanier, T.C. 2000. Heat-induced softening of surimi gels by proteinases. In *Surimi and Surimi Seafoods*, J.W. Park (Ed.), p. 445-474. Marcel Dekker, Inc., New York.

Kato, A., Nakai, S. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of proteins. Biochemi. Biophys. Acta. 624: 13-20.

Kishi, H., Nozawa, H., Seki, N. 1991. Reactivity of muscle transglutaminase on carp myofibrils and myosin B. Nippon Suisan Gakkaishi. 57: 1203-1210.

Kumazawa, Y., Sano, K., Seguro, K., Yasueda, H., Nio, N., Motoki, M. 1997. Purification and characterization of transglutaminase from Japanese oyster (*Crassostrea gigas*). J. Agric. Food Chem. 45: 604-610.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680-685.

Lanier, T.C. 2000. Surimi gelation chemistry. In *Surimi and Surimi Seafood,* J.W. Park (Ed.), p. 237-266. Marcel Dekker, Inc., New York.

Lee, N., Park, J.W. 1998. Calcium compounds to improve gel functionality of Pacific whiting and Alaska pollock surimi. J. Food Sci. 63: 969-974.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 256-275.

Makinodan, Y., Ikeda, S. 1971. Study on fish muscle protease V. On the existence of cathepsin A, B and C. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 37: 1002-1006.

Makinodan, Y., Toyohara, H., Niwa, E. 1985. Implication of muscle alkaline proteinase in the textural degradation of fish meat gel. J. Food Sci. 50: 1351-1355.

Nozawa, H., Mamegoshi S., Seki N. 1997. Partial purification and characterization of six transglutamianse from ordinary muscles of various fishes and marine invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. 118B: 313-317.

Ogawa, M., Kanamura, J., Miyashita, H., Tamiya, T., Tsuchiya, T. 1995. Alpha-helical structure of fish actomyosin: changes during setting. J Food Sci, 60: 297-299.

Ogawa, M., Nakamura, S., Horimoto, Y., An, H., Tsuchiya, T., Nakai, S. 1999. Raman spectroscopic study of changes in fish actomyosin during setting. J. Agric. Food Chem. 47: 3309-3318.

SAS. 1996. Statistical Analysis System Software. Version 6.08. Cary: SAS Institute, Inc.

Schwartz, W.N., Bird, J.W.C. 1977. Degradation of myofibrillar proteins by cathepsins B and D. Biochem J. 167: 811-820.

Seymour, T. A., Morrissey, M. T., Peters, M. Y., An, H. 1994. Purification and characterization of Pacific whiting proteases. J. Agric. Food Chem. 42: 2421-2427.

Sherekar, S.V., Gore, M.S., Ninjoor, V. 1988. Purification and characterization of cathepsin B from the skeletal muscle of freshwater fish, *Tilapia mossambica*. J. Food Sci. 53: 1018-1023.

Takagi, J., Saito, Y., Kikuchi, T., Inada, Y. 1986. Modification of transglutaminase assay: use of ammonium sulfate to stop the reaction. Anal. Biochem. 153: 295-298.

Toyohara, H., Kinoshita, M., Shimizu, Y. 1990. Proteolytic degradation of threadfin bream meat gel. J. Food Sci. 55: 259-260.

Toyahara, H., Makinodan, Y. 1989. Comparison of calpain I and II from carp muscle. Comp. Biochem Physiol 92B: 577-581.

Yamashita, M., Konagaya, S. 1990a. Purification and characterization of cathepsin L from white muscle of chum salmon, *Oncorhynchu keta*. Comp. Biochem. Physiol. 96B: 247-252.

Yamashita, M., Konagaya, S. 1990b. Participation of cathepsin L into extensive softening of the muscle of chum salmon caught during spawning migration. Nippon Suisan Gakkaishi. 56: 1271-1277

Yamashita, M., Konagaya, S. 1991. Hydrolytic action of salmon cathepsin B and L to muscle structural proteins in respect to muscle softening. Nippon Suisan Gakkaishi. 57: 1917-1922.

Yasueda, H., Kumazawa, Y., Motoki, M. 1994. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 2041-2045.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Kolbe, E., AbuDagga, Y., and Morrissey, M.T. 1995. Ohmic heating maximizes gel functionality of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 60: 10-14.

Yongsawatdigul, J., Park, J. W., Virulhakul, P., Viratchakul, S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia. J. Food Sci. 65: 129-133.

Yongswatdigul, J., Worratao, A., Park, J. W. 2002. Effect of endogenous transglutaminase on threadfin bream surimi gelation. J. Food Sci. 67: 3258-3263.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chem. 83: 406-416.

Yongsawatdigul, J., Piyadhammaviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chem. 87: 447-455.

www.fao.org Freshwater fish from aquaculture.

www.fisheries.go.th. Yield of freshwater culture by species and type of culture, 2001.

ประวัตินักวิจัย

EDUCATION

Ph.D., Food Science and Technology, Oregon State University, USA, 1996.
M.S., Food Science, University of Wisconsin-Madison, Madison, USA, 1992.
B.S. (Honor), Food Technology, Chulalongkorn University,
Thailand, 1989.

EXPERIENCE

June 1999-Present	**ASSISTANT PROFESSOR** *School of Food Technology* *Suranaree University of Technology* *Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*
May 1997-June 1999	**LECTURER** *School of Food Technology* *Suranaree University of Technology* *Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*
Feb. 1996-May 1997	**RESEARCH ASSOCIATE** *Department of Food Science and Technology* *Seafood Laboratory* *Oregon State University* *Astoria, OR. USA.*
Sept. 1992-Jan 1996	**GRADUATE RESEARCH ASSISTANT** *Department of Food Science and Technology* *Oregon State University* *Corvallis, OR, USA.*
Sept. 1991-May 1992	**GRADUATE RESEARCH ASSISTANT** *Department of Food Science* *Univeristy of Wisconsin-Madison* *Madison, WI, USA.*
1988-1990	**PRODUCTION SUPERVISOR** Leamthong Flour Mill Co. Samutprakarn, Thailand

HORNORS AND AWARDS

1995 Recipient of Research Associate Assistance Award from The American Institute of Fishery Research Biologists. USA.

1994 Recipient of Walter G. Jones Fisheries Development Memorial Award. Recognition of an outstanding graduate student who conducts research work contributing to fisheries development. Oregon State University, USA.

1994 Recipient of Graduate Paper Competition Award from Seafood Technology Division. Institute of Food Technologists. USA.

1988 Recipient of Outstanding Food Science Student from The Food Technologists Association of Thailand.

Member:
-Institute of Food Technologists, USA
-Food Science and Technology Association Thailand

FUNDED RESEARCH GRANTS

1. **Factors affecting histamine in fish sauce fermentation**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (1999-2001).
   Funding: 600,000 Baht

2. **Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2000-2001).
   Funding: 500,000 Baht

3. **Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2001-2002).
   Funding: 500,000 Baht

4. **Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus spp.*) muscle proteins**
   Funded by Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand (1999-2000).
   Funding: 400,000 Baht

5. **Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)**
   Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2001-2002).
   Funding: 450,000 Baht

6. **Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)**
   Funded by Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand (2001-2003).
   Funding: 1,080,000 Baht

7. **Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi**
   Funded by Internation Foundation for Science, Sweden (2002-2003).
   Funding: US$11,000

8. **Process development of fishball and fish sausage from freshwater fish species**
   Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2002-2004).
   Funding: 750,000 Baht

9. **Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products**
   Funded by Suranaree University of Technology, Thailand (2003-2005)
   Funding: 990,000 Baht

10. **Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases**
   Funded by National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand (2003-2005)
   Funding: 1,200,000 Baht

11. **Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF**
   Funded by Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, in collaboration with Peter Sporns, Ph.D. of University of Alberta, Edmonton, Canada. (Scholarship provided to a prospective Ph.D. student to work with me and Dr. Sporns) (2002-2005).

12. **Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.**
   Funded by Royal Golden Jubilee Ph.D. Scholarship, Thailand Research Fund, Bangkok, Thailand, in collaboration with Eunice Li-Chan, Ph.D. of University of British Columbia, Vancouver, Canada. (Scholarship provided to a prospective Ph.D. student to work with me and Dr. Sporns) (2003-2006).

SELECTED PUBLICATION

Yongsawatdigul, J. and Piyadhammaviboon, P. 2005. Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. J. Sci Food Agric. In press.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2005. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). Food Chemistry. In press.

Rodtong, S., Nawong, S, **Yongsawatdigul, J.** 2005. Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indain anchovy (*Stolephorus indicus*). Food Microbiol. In press.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2004. Effect of alkaline and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish proteins. J. Food Sci. 69(7):C499-505.

Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., Udompom, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). J. Food Sci. 69(4):FCT312-319.

Yongsawatdigul, J. and Piyadhammaviboon, P. 2004. Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. Food Chem. 87: 447-455.

Yongsawatdigul, J. and Park, J. 2004. Effect of alkali and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish muscle proteins. J. Food Sci. 69(7): C499-505.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. Food Chem. 83(3): 406-416.

Worratao, A and **Yongsawatdigul, J.** 2003. Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. J. Food Biochem. 27: 35-51.

Yongsawatdigul, J., Worratao, A., and Park, J. 2002. Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. J. Food Sci. 67(9): 3258-3263.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2002. Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. J. Food Sci. 67(3): 985-990.

Klesk, K., **Yongsawatidigul, J.**, Park, J.W., Viratchakul, S., and Virulhakul, P. 2000. Physical behavior of tilapia (*Oreochromis niloticus*) surimi gels at various thermal treatments as compared with Alaska pollock and Pacific whiting surimi. J. Aquat. Food Prod. 9: 91-104.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Virulhakul, P., and Viratchakul, S. 2000. Proteolytic degradation of tropical tilapia surimi. J. Food Sci. 65: 129-133.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 1999. Thermal aggregation and dynamic rheological properties of Pacific whiting and cod myosin as affected by heating rate. J. Food Sci. 64: 679-683.

Park. J.W. and **Yongsawatdigul, J.** 1999. Gelation properties of fish proteins under ohmic heating. In *Quality Attributes of Muscle Foods*, (Eds.), Xiong et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 421-429.

Park, J.W., **Yongsawatdigul, J.**, and Kolbe, E. 1998. Proteolysis and gelation of fish proteins under ohmic heating. In *Process-Induced Chemical Changes in Foods*, (Eds.), F. Shahidi, C.T. Ho, and V.C. Nguyen. pp25-34.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., and Kolbe, E. 1997. Degradation kinetics of myosin heavy chain of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 62: 724-728.

Park, J.W., Mein, T.M., and **Yongsawatdigul, J.** 1997. New developments in manufacturing of surimi and surimi seafood. Food Rev. Int. 13(4): 577-610

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 1996. Linear heating rate affects gel formation of Alaska pollock and Pacific whiting. J. Food Sci. 61: 432-438.

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Kolbe, E., AbuDagga, Y., and Morrissey, M.T. 1995. Ohmic heating maximizes gel functionality of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 60: 10-14.

Park, J.W., **Yongsawatdigul, J.**, and Lin, T.M. 1994. Rheological behavior and potential cross-linking of Pacific whiting surimi. J. Food Sci. 59: 773-776.

Book chapters

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2004. Gelation of threadfin bream surimi as affected by thermal denaturation, transglutaminase, and proteinase(s) activities. In More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products. M. Sakaguchi (Ed.) Elsevier, Oxford, UK.

Park, J.W., **Yongsawatdigul, J.**, and Kolbe, E. 1998. Proteolysis and gelation of fish proteins under ohmic heating. In *Process-Induced Chemical Changes in Foods*, (Eds.), F. Shahidi, C.T. Ho, and V.C. Nguyen. Plenum Publishing Corp, New York. pp25-34.

Park. J.W. and **Yongsawatdigul, J.** 1999. Gelation properties of fish proteins under ohmic heating. In *Quality Attributes of Muscle Foods*, (Eds.), Xiong et al. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. p. 421-429.

Yongsawatdigul, J. 1998. Ohmic heating of surimi seafood. In *Advanced Technology in Surimi Seafood Manufacturing Workshop Manual.* August 18-20, 1998. Bangkok Thailand.

Scientific Presentation

International Meeting

McGill, J., **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Hunt, A.L. 2004. Quantitative analysis of myofibrillar proteins in commercial surimi seafood. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2004, Las Vegas, USA.

Park, J.W., Choi, Y.J., **Yongsawatdigul, J.**, Kim, Y.S., Thawornchinsombut, S. 2004. Biochemical and functional properties of isolated fish proteins from Pacific whiting and rockfish using pH shifts. **Symposium.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2004, Las Vegas, USA.

Yongsawatdigul, J., Piyathamviboon, P., Worratao, A. 2003. Effect of protteinase inhibitors and microbial tranglutaminase on gelation of lizardfish surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., Choi, Y.J., Udomporn, S. 2003. Changes of biogenic amines during fish sauce fermentation. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2003. Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Poster presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 12-16, 2003, Chicago, USA.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Biochemical characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Oral presentation.** 7th International Conference on Transglutaminase and Protein Cross-linking Reaction, September 14-17, 2002, Ferrara, Italy.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Biochemical changes of threadfin bream during ice storage and their effect on thermal denatruation pattern. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 23-27, 2001. New Orleans, USA.

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Gelation characteristics of alkaline and acid solubilization of fish mucle proteins. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, June 23-27, 2001. , New Orleans, USA.

Yongsawatdigul, J., Kim, Y.S., and Park, J.W. 2001. Biochemical and gelation properties of acid- and alkaline-aided solubilization of fish muscle proteins. **Oral presentation.** International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Yongsawatdigul, J. and Park, J.W. 2001. Gelation of threadfin bream surimi as affected by thermal denaturation, transglutaminase, and proteinase(s) activities. **Oral presentation.** International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2001. Actomyosin cross-linking induced by crude transglutaminase. **Poster presentation**. International Symposium on More Efficient Utilization of Fish and Fisheries Products, October 7-10, 2001, Kyoto, Japan

Yongsawatdigul, J., Park, J.W., Virulhakul, P., and Viratchakul, S. 1999. Proteolytic degradation in tropical tilapia surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 24-28, 1999, Chicago, USA.

Klesk, K., **Yongsawatdigul, J.**, Park, J.W., Viratchakul, S, Virulhakul, P. 1999. Functional properties of tropical tilapia surimi compared with Alaska Pollock and Pacific whiting surimi. **Oral presentation.** Institute of Food Technologists (IFT) Annual Meeting, July 24-28, 1999, Chicago, USA.

*Name of presenter is underlined

Meeting held in Thailand

Siringan, P., Raksakulthai, N., **Yongsawatdigul, J.** 2004. Biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian Anchovy (*Stolephorus indicus*) **Oral presentation.** The 4th National Symposium on Graduate Research, Aug 10-11, 2004, Chiang Mai, Thailand.

Nawong, S., **Yongsawatdigul, J.**, and Rodtong, S. 2004. Histamine-forming bacteria from Jullien's mud carp (*Cirrhina jullieni*) **Oral presentation.** The 4th National Symposium on Graduate Research, Aug 10-11, 2004, Chiang Mai, Thailand.

Siringan, P., Raksakulthai, N., Yongsawatdigul, J. 2004. Proteinase activity and autolytic activity of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

Phetploy, J. and **Yongsawatdigul, J.** 2004. Physico-chemical changes of actomyosin from some freshwater fish during frozen storage. **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand.

Phunphiphud, V. and **Yongsawatdigul, J.** 2004. Total omega-3 fatty acids, iodine content, and emulsifying properties of freshwater fish species. **Poster presentation**. The 6th Agro-industry Annual Meeting, May 28-29, 2004. Bangkok, Thailand. (*The second place for the excellent poster presentation*)

Piyadhammaviboon, P., **Yongsawatdigul, J**., and Worratao, A. 2003. Effect of egg white, whey protein concentrate, and microbial transglutaminase on lizardfish surimi gel. Oral presentation. 29th Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 Oct, 2003. Khon Kean Univerisity.

Nawong, S., **Yongsawatdigul, J.**, and Rodtong, S. 2003. Isolation and identification of histamine forming bacteria from anchovy. **Poster presentation.** The 5th Agro-industry Annual Meeting, May 31-June 1, 2003. Bangkok, Thailand. *(Won the third prize award for poster presentation)*

Yongsawatdigul, J. and Worratao, A. 2002. Role of endogenous transglutaminase on gelation of fish proteins. **Oral presentation.** The 4th Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2002. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Autolytic activities of tilapia (*Oreochromis niloticus*) and rohu (*Labeo rohital*) **Oral presentation.** The 4th Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2002. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2002. Gelation protperties of lizardfish surimi induced by microbial tramsglutaminase. **Poster presentation.** The 28th Congress on Science and Technology, Bangkok, Thailand.

Yongsawatdigul, J., Worratao, A., Park, J. 2001. Proteolytic and transglutaminase activities in threadfin bream surimi. **Oral presentation.** The 3rd Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2001. Bangkok, Thailand.

Worratao, A. and **Yongsawatdigul, J.** 2001. Cross-linking of actomyosin induced by crude tilapia transglutaminase. **Oral presentation.** The 3rd Agro-industry Annual Meeting, May 30-June 1, 2001. Bangkok, Thailand.

*Name of presenter is underlined