รหัสโครงการ SUT3-305-43-24-35

รายงานการวิจัย

โปรติเนสและทรานสกลูทามิเนสในปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ

Proteinases and Transglutaminase in Freshwater Fish

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

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 ($p>0.05$)

จากการศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ต่อการปรับปรุงเนื้อสัมผัสของเจลปลานิลพบว่านอกจากแคลเซียมมีผลกระตุ้นการทำงานของทรานสกลูทามิเนสในเนื้อปลาแล้ว 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.