



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การเชื่อมโยงโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดงด้วยพันธะโควาเลนต์

โดยทราณสกุฑาามิเนส

โดย

นาย จิรวัดน์ ยงสวัสดิ์กุล

สิงหาคม 2548

โครงการ

การเชื่อมโยงโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดงด้วยพันธะโควาเลนต์ โดยทรานสกลูตามิเนส

โดย

นาย จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
จังหวัดนครราชสีมา

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ทางโครงการฯใคร่ขอขอบพระคุณสำนักงานสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุน
เงินทุนวิจัยอย่างยิ่ง ขอขอบคุณนางสาวบังอร เหม้ง นางสาวเพ็ญประภา ปิยธรรมวิบูลย์ และนายศร
ชัย สิ้นสุวรรณ นักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชา
เทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อุทิศตน และมุ่งมั่นในการทำวิจัยด้วยความ
อุสาหะเพื่อให้ได้ผลงานที่ดี ขอขอบคุณ นางศุภกาญจน์ บุญอยู่ ที่ช่วยเหลือในการจัดทำบัญชี
งบประมาณและการเบิกจ่ายเงินของโครงการฯ และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือ
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในงานวิจัยนี้

บทคัดย่อ

ปลาทรายแดง (*Nemipterus spp.*) เป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตซูริมิของประเทศไทย แต่องค์ความรู้เกี่ยวกับการเกิดเจลโดยเฉพาะการเกิดเซตติงในซูริมิปลาทรายแดงมีจำกัด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือ เพื่อศึกษาการเกาะตัว (aggregation) ของโปรตีนกล้ามเนื้อที่อุณหภูมิเซตติง (25 และ 40 °ซ) และศึกษาบทบาทของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากปลาทรายแดงในการเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อ โครงสร้างของแอคโตมัยโอซินจากปลาทรายแดงเริ่มเปิดตัว (unfold) ที่ 36.1 °ซ แคลเซียมคลอไรด์ไม่เพียงแต่มีผลต่อการเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสที่มีอยู่ในเนื้อปลาในการเชื่อมข้ามของมัยโอซินสายหลัก (myosin heavy chain) แต่ยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของ แอคโตมัยโอซิน มัยโอซิน และ แอคตินอีกด้วย แคลเซียมไอออนที่ความเข้มข้น 10-100 มิลลิโมลาร์ เหนี่ยวนำให้มัยโอซินเปิดตัวออกมากขึ้นที่ 40 °ซ ดังจะเห็นได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (S_0 ANS) และการลดลงของโครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ นอกจากนี้ปริมาณกลุ่มซัลไฟด์ครีโอลทั้งหมดลดลง เมื่อความเข้มข้นของแคลเซียมไอออนเพิ่มขึ้น แสดงว่า แคลเซียมส่งเสริมการเกิดพันธะไดซัลไฟด์ในระหว่างการเกิดเซตติงด้วย ดังนั้นนอกจากพันธะไอโซเปปไทด์ซึ่งเกิดจากการเชื่อมข้ามโดยทรานสกลูตามิเนสแล้ว พันธะที่สำคัญในการเกิดเซตติงของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดงคือ แรงกระทำไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์

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

Abstract

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

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

Executive summary

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase, EC 2.3.2.13) คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (cross-link) สายโปรตีนระหว่างกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) และ ไลซีน (lysine) ทำให้เกิดพันธะโคเวเลนต์ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ระหว่างสายโปรตีน การเชื่อมข้ามสายโปรตีนกล้ามเนื้อปลาในซูริมิโดยทรานสกลูตามิเนส เรียกอีกอย่างหนึ่งว่าปรากฏการณ์ suwari หรือ เซตติง (setting) ซึ่งทำให้ได้เจลที่มีเนื้อสัมผัสยืดหยุ่น จากงานวิจัยของ Yongsawatdigul et al. (2002) ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) พบว่าปลาทรายแดงซึ่งเป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตซูริมิของประเทศไทย มีเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในปริมาณสูง กระบวนการล้างมีผลลดกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสลงประมาณ 50% แต่ปริมาณที่เหลืออยู่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซตติงได้ที่ 25 และ 40 °ซ นอกจากนี้ในกล้ามเนื้อแล้ว ยังมีรายงานการพบเอนไซม์ในตับปลา อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานทางวิชาการเกี่ยวกับทรานสกลูตามิเนสจากปลาทรายแดง องค์ความรู้เกี่ยวกับเอนไซม์ในกล้ามเนื้อจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้ปรับปรุงคุณภาพของเจล และทำให้เกิดความเข้าใจถึงปัจจัยในการเกิดเซตติงในซูริมิปลาทรายแดงมากขึ้น ในขณะที่ยังต้องการความรู้เกี่ยวกับทรานสกลูตามิเนสจากตับอาจนำไปสู่การใช้ของเสีย (ตับ) ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การเกิดเซตติงนอกจากจำเป็นต้องมีทรานสกลูตามิเนสแล้ว โปรตีนกล้ามเนื้อที่เป็นสารตั้งต้นจำเป็นต้องเปิดตัว (unfold) เพื่อให้เกิดการยึดจับกับเอนไซม์ โปรตีนกล้ามเนื้อในซูริมิเป็นระบบที่ซับซ้อนประกอบด้วยโปรตีนหลักคือ มัยโอซิน (myosin) และ แอคติน (actin) ในรูปแอคโตมัยโอซิน (actomyosin) มัยโอซินเป็นโมเลกุลสายใหญ่ประกอบด้วย myosin heavy chain และ myosin light chain สำหรับ myosin heavy chain ยังประกอบด้วยส่วนย่อย (subfragments) ต่างๆ คือ heavy meromyosin, light meromyosin, S₁-subfragment และ S₂-subfragment ความเข้าใจในปฏิกิริยาการเชื่อมโยงสายโปรตีนด้วยพันธะโคเวเลนต์โดยทรานสกลูตามิเนสจำเป็นต้องการควบคุม (control) และปรับเปลี่ยน (manipulate) การเกิดเซตติงในซูริมิปลาทรายแดงเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัมผัสตามต้องการ ในปัจจุบัน การผลิตซูริมิและการนำซูริมิไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องล้วนแล้วแต่พึ่งพาเทคโนโลยีต่างชาติซึ่งพัฒนามาจากองค์ความรู้ของปลาในแถบกระแสน้ำเย็น ซึ่งลักษณะธรรมชาติทางชีวเคมี (biochemical nature) แตกต่างจากปลาทรายแดงอย่างสิ้นเชิง องค์ความรู้เกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์โปรตีนกล้ามเนื้อและของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส จะก่อให้เกิดความเข้าใจในปรากฏการณ์เซตติงในปลาทรายแดงได้ดีขึ้น อันจะนำไปสู่การปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตให้สอดคล้องกับลักษณะธรรมชาติของซูริมิปลาทรายแดง และยังเป็นการลดการพึ่งพาเทคโนโลยีต่างชาติด้วย

2. วัตถุประสงค์

1. ทำปฏิกิริเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากตับและกล้ามเนื้อและศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาได้
2. ศึกษาการเชื่อมโยงของแอคโตมัยโอซินและมัยโอซิน ในสภาวะการเกิดเซตติง
3. ศึกษาการเชื่อมโยงโปรตีนกล้ามเนื้อโดยทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง

3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การรวมตัวของแอคโตมัยโอซินและมัยโอซิน ที่ 25 และ 40 °ซ

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงสภาพธรรมชาติ (denaturation) ของแอคโตมัยโอซินโดยการวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (surface hydrophobicity) และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับทุติยภูมิโดยวัด circular dichroism

นอกจากนี้ศึกษาการเกาะตัว (aggregation) ของมัยโอซินและแอคตินที่ 25 และ 40 °ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิในการเกิดเซตติงของปลาทรายแดง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (turbidity) ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดการเกาะตัว การเปลี่ยนแปลงปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (surface hydrophobicity) การเปลี่ยนแปลงปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (total sulfhydryl group) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับทุติยภูมิ โดยศึกษาในสภาวะที่ไม่มี CaCl_2 และสภาวะที่มี CaCl_2 ในระดับ 10-100 มิลลิโมลาร์

3.2 ทำปฏิกิริเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง

ทำปฏิกิริเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนสจากตับและกล้ามเนื้อโดยอาศัยเทคนิค ion exchange และ gel filtration chromatography ติดตามกิจกรรม (activity) ของเอนไซม์โดยอาศัยหลักการการเชื่อมโยงระหว่าง monodansyl cadaverine (MDC) กับ dimethylated casein และยับยั้งปฏิกิริยาด้วย EDTA ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีคุณสมบัติเรืองแสงซึ่งสามารถวัดค่า fluorescence intensity ที่ความยาวคลื่น excitation และ emission ที่ 350 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ

3.3 ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ทรานสกลูทามิเนส

3.2.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยา (temperature optimum) ของเอนไซม์ที่ทำปฏิกิริยาได้

3.2.2 พีเอชที่เหมาะสม ศึกษาสภาพความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา (pH optimum) ในช่วง 5-10

3.2.3 สารยับยั้ง ศึกษาผลของ N-ethylmaleimide (NEM), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), iodoacetic acid (IAA) ต่อการยับยั้งเอนไซม์ นอกจากนี้ศึกษาผลของสารจับยึด (chelate) Ca^{2+} ได้แก่ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

3.2.4 ผลของ CaCl_2 และ NaCl ศึกษาความเข้มข้นของ CaCl_2 และ NaCl ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ ช่วงความเข้มข้นของ CaCl_2 และ NaCl ที่ทำการศึกษาคือ 0-5 มิลลิโมลาร์ และ 0-1.2 โมลาร์ ตามลำดับ

3.2.5 ผลของ DTT ศึกษาความเข้มข้นของ DTT ที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิโมลาร์

3.2.6 ผลของโควาเลนต์ ศึกษาผลของ SrCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , และ CuCl_2 ต่อการเร่งปฏิกิริยาของทรานสกลูตามิเนส

3.2.7 Activity staining วิเคราะห์การเชื่อมข้าม MDC เพื่อตรวจจับเอนไซม์บน Native-PAGE

3.4 การรวมตัวของโปรตีนที่ 25 และ 40 °C เมื่อเติมเอนไซม์บริสุทธิ์

ทดสอบความสามารถในการเชื่อมข้ามโปรตีนมัยโอซินและแอกตินของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ โดยบ่มที่ 30 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์มีความเสถียรและยังคงแสดงกิจกรรม โดยบ่มเป็นเวลาต่าง ๆ 0-24 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยให้ความร้อนที่ 90 °C เป็นเวลา 15 นาที นำไปวิเคราะห์การเชื่อมโยงสายโปรตีนโดย SDS-PAGE

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อไทย	ii
บทคัดย่ออังกฤษ	iii
สรุปย่อผู้บริหาร	iv
สารบัญ	vii
สารบัญตาราง	viii
สารบัญภาพ	ix
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	
- การเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงและผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอคตินจากปลาทรายแดง	5
- การศึกษากิจกรรมทรานสกลูทามิเนสจากน้ำล้างปลาทรายแดง	9
- คุณสมบัติของทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง	12
ผลการทดลอง	
- การเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงและผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอคตินจากปลาทรายแดง	15
- ผลของแคลเซียมต่อการเชื่อมข้ามและเกาะตัวของแอคโตมัยโอซิน	25
- คุณลักษณะทางชีวเคมีของ crude ทรานสกลูทามิเนสจากน้ำล้างปลาทรายแดง	37
- คุณสมบัติของทรานสกลูทามิเนสจากปลาทรายแดง	43
- ความสามารถในการเชื่อมข้ามมัยโอซินโดยทรานสกลูทามิเนส	54
สรุปผลการทดลอง	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	62

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ผลของ CaCl_2 ต่อกิจกรรม Ca-ATPase ของมัยโอซินจากปลาทรายแดง	23
ตารางที่ 2 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ทรานสกลูทามิเนสจากตับปลาทรายแดง	44
ตารางที่ 3 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ทรานสกลูทามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดง	44
ตารางที่ 4 ผลของไอออนต่อกิจกรรมทรานสกลูทามิเนส	52
ตารางที่ 5 ผลของสารยับยั้งต่อกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส	53

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดง ที่ได้รับความร้อนใน อัตรา $1^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	15
รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่า molar ellipticity และปริมาณแอลฟาฮีลิกซ์ของ แอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงซึ่งได้รับอัตราการให้ความร้อน $1^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$	16
รูปที่ 3 มัยโอซินและแอคตินที่สกัดจากปลาทรายแดง	17
รูปที่ 4 ผลของแคลเซียมต่อความขุ่นของมัยโอซิน บ่มที่ 25°C (a) และ 40°C (b) และแอคตินบ่มที่ 25°C (c) และ 40°C (d)	18
รูปที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่คงเหลือหลังจากบ่มมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่สภาวะเซตติง	19
รูปที่ 6 ผลของแคลเซียมต่อค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่ความเข้มข้นแคลเซียมระดับต่างๆ	21
รูปที่ 7 ผลของแคลเซียมต่อค่ากลุ่มซัลไฟดริลทั้งหมดของโปรตีนมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่ความเข้มข้นแคลเซียมระดับต่างๆ	22
รูปที่ 8 CD spectra ของมัยโอซิน (a) และ แอคติน (b) บ่มที่ 4°C ที่ความเข้มข้น CaCl_2 ต่างๆ	24
รูปที่ 9 ผลของ CaCl_2 ต่อปริมาณโครงสร้างฮีลิกซ์ของมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) บ่มที่สภาวะเซตติง	25
รูปที่ 10 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 10 มิลลิโมลาร์ (a), 20 - 40 มิลลิโมลาร์ (b), 50 - 100 มิลลิโมลาร์ (c)	27
รูปที่ 11 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออน 70 มิลลิโมลาร์ (a), 100 มิลลิโมลาร์ (b)	28
รูปที่ 12 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ (C) และมีสารยับยั้ง ทรานสกลูตามิเนส, NEM และ PMSF โดยบ่มที่ 40°C 2 ชั่วโมง	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 13 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 40 °ซ 2 ชั่วโมง	
ในสภาวะที่ไม่เติมแคลเซียม (a) และ แคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์และละลายใน	
สารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และ SDS เข้มข้น 5%+BME เข้มข้น 2%	30
รูปที่ 14 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยซินที่ไม่มีแคลเซียม (a) และแคลเซียม	
เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (b) บ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง	31
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียมต่างๆ	
และบ่มที่ 4 °ซ (a) และ 40 °ซ (b) เป็นระยะเวลาต่างๆ	33
รูปที่ 16 CD spectra ของแอคโตมัยโอซินที่แคลเซียมระดับต่างๆ ที่ 4 °ซ (a)	
และบ่มที่ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที (b)	34
รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอีลิกซ์ของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียม	
และสภาวะการบ่มต่างๆ	35
รูปที่ 18 ค่าแรง (a) และระยะทาง ณ จุดแตกหัก (b) ของเจลแอคโตมัยโอซิน	
ที่ระดับการเติมแคลเซียมและสภาวะในการบ่มต่างๆ	36
รูปที่ 19 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสในน้ำล้างปลาทรายแดง	37
รูปที่ 20 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของ crude ทรานสกลูตามิเนสจากน้ำล้างปลาทรายแดง	38
รูปที่ 21 ผลของระดับแคลเซียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของ crude ทรานสกลูตามิเนส	
จากน้ำล้างปลาทรายแดง	38
รูปที่ 22 ผลของระดับความเข้มข้น DTT ต่อกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส	39
รูปที่ 23 ความคงทนต่ออุณหภูมิที่ 4 (a), 25 (b), 30 (c) และ 40 °ซ (d) ของ crude	
ทรานสกลูตามิเนสจากน้ำล้างปลาทรายแดง	40
รูปที่ 24 รูปแบบโปรตีนของน้ำล้างครั้งที่ 1 โดยการวิเคราะห์ Native-PAGE (8.0 %	
polyacrylamide)	41
รูปที่ 25 การเชื่อมข้ามโปรตีน BSA (B1-B3) และเคซีน (C1-C3) โดย crude ทรานสกลู-	
ตามิเนสจากน้ำล้าง	42
รูปที่ 26 การทำบริสุทธิ์ทรานสกลูตามิเนสจากตับปลาทรายแดงโดยใช้ DEAE-Sephacel (a),	
Sephacryl S-200 (b), Ca hydroxyapatite (c)	43

สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
รูปที่ 27 การทำบริสุทธิ์ทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดงโดยผ่าน ชั้นตอน DEAE-Sephacel (a), Sephacryl S-200 (b), Ca hydroxyapatite (c)	45
รูปที่ 28 Native-PAGE ของทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดง โดยการย้อมแบบ activity staining (a) และ protein staining (b)	46
รูปที่ 29 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสจากตับ (a) และกล้ามเนื้อ (b)	47
รูปที่ 30 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสจากตับ (a) และกล้ามเนื้อ (b)	48
รูปที่ 31 ผลของแคลเซียมต่อกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสจากตับ (a) และกล้ามเนื้อ (b) ปลาทรายแดง	49
รูปที่ 32 ผลของ DTT ต่อกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสจากตับ (a) และกล้ามเนื้อ (b) ปลาทรายแดง	50
รูปที่ 33 ผลของ NaCl ต่อกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสจากตับ (a) และกล้ามเนื้อ (b) ปลาทรายแดง	51
รูปที่ 34 SDS-PAGE ของการเชื่อมข้ามโปรตีนมัยโอซินสายหลักโดยทรานสกลูตามิเนสจากกล้ามเนื้อปลาทรายแดง	54

บทนำ

ซูริมิคือ ผลิตภัณฑ์เนื้อปลาแช่แข็ง ที่ผ่านการล้างน้ำเพื่อกำจัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิก ซูริมิเป็นวัตถุดิบสำคัญสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารทะเลต่างๆ เช่น ปูอัด ลูกชิ้น ปลาเส้น ชิคุว (ปลาหมึกเทียม) เป็นต้น ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตซูริมียักษ์ใหญ่ของโลกรองจาก สหรัฐอเมริกา ในช่วงปี พ.ศ. 2538-2547 การส่งออกปลาแช่แข็งและผลิตภัณฑ์ซูริมิมียอดการเติบโตเฉลี่ยร้อยละ 8.93 ในปี พ.ศ. 2547 มีมูลค่าการส่งออกสูงถึง 25,000 ล้านบาท ซึ่งนับเป็นผลิตภัณฑ์ประมงที่มีมูลค่าการส่งออกสูงเป็นอันดับ 3 รองจากกุ้ง และปลาทูน่า (นุซจรินทร์ 2548) ปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมิในประเทศไทยมีหลายชนิด เช่น ปลาทรายแดง (Threadfin bream, *Nemipterus* spp.) ปลาปากคม (Lizardfish, *Saurida* spp.) ปลาทาหวาน (Bigeye snapper, *Priacanthus* spp.) ปลาจวด (Croaker, *Pennahia* และ *Johnius* spp.) โดยปลาทรายแดงเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตซูริมิของประเทศไทย กำลังการผลิตซูริมิปลาทรายแดงในปี พ.ศ. 2547 คิดเป็น 180,000 เมตริกตัน ซึ่งเป็นผลผลิตมากเป็นอันดับสองของโลกรองจากปลา Alaska pollock

ทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase, EC 2.3.2.13) คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้าม (cross-link) สายโปรตีนระหว่างกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) และ ไลซีน (lysine) ทำให้เกิดพันธะโควาเลนต์ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ระหว่างสายโปรตีน ทำให้โครงสร้างของเจลโปรตีนมีความแข็งแรงและมีความยืดหยุ่น (elastic) Yongsawatdigul et al. (2002) พบว่า ในปลาทรายแดงมีกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส แต่กิจกรรมดังกล่าวลดลง เมื่อผ่านกระบวนการล้างเนื้อปลา (washing) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ในกระบวนการผลิตซูริมิ หลังจากกระบวนการล้างเนื้อปลาแล้ว กิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสลดลงประมาณ 50% แต่กิจกรรมที่หลงเหลืออยู่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้เกิดการเชื่อมข้าม (Cross-linking) ของสายโปรตีน

การเชื่อมข้ามของสายโปรตีนซึ่งเหนี่ยวนำโดยทรานสกลูตามิเนส นั้นเกิดขึ้นเมื่อบดซูริมิกับเกลือ ทำให้เกิดลักษณะของเพส (paste) ซึ่งเมื่อบ่มเพสนั้นในสภาวะที่เหมาะสมเช่นที่ 25 หรือ 40 °C เป็นเวลาประมาณ 0.5-4 ชั่วโมง เกิดการเหนี่ยวนำให้ทรานสกลูตามิเนสเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมข้ามขั้นตอนดังกล่าวเรียกว่าเซตติง (setting) หรือซูวารี (suwari) ในภาษาญี่ปุ่น เจลที่ได้หลังจากขั้นตอนเซตติงจะมีค่าความแข็งแรง (gel strength) สูงกว่าเจลที่ให้ความร้อนทันที เนื่องจากการเพิ่มจำนวนของพันธะโควาเลนต์ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ทำให้เกิดโครงสร้างของเจลที่แข็งแรง องค์ความรู้ดังกล่าวมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตลูกชิ้น และ kamaboko เป็นต้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการเซตติงมีประโยชน์สามารถปรับปรุงคุณภาพของเจลซูริมิและผลิตภัณฑ์จากซูริมิได้ ความเข้าใจเกี่ยวกับการ

เกิดเซตติงในปลาทรายแดงจะนำไปสู่การปรับปรุงและพัฒนาคุณภาพของซูริมิปลาทรายแดงอย่างมีประสิทธิภาพ

ทรานสกลูตามิเนส (protein-glutamine γ -glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TGase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มทรานสเฟอเรส (transferase) ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการย้ายกลุ่มเอซิล (acyl-transfer reaction) จาก γ -carboxyamide ของกรดอะมิโนกลูตามีน หรือที่เรียกว่า acyl donor ไปยังกลุ่มสารที่สามารถรับกลุ่มเอซิล (acyl acceptor) ซึ่งได้แก่น้ำ สารประกอบเอมีน หรือกลุ่มอะมิโนของกรดอะมิโนไลซีนบนสายโปรตีน การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จำเป็นต้องมี Ca^{2+} เมื่อ acyl acceptor คือ กรดอะมิโนไลซีนบนสายโปรตีน จะทำให้เกิดการเชื่อมข้ามของสายโปรตีนทั้งภายในโมเลกุล (Intramolecular cross-linking) และระหว่างสายโปรตีน (Intermolecular cross-linking) ด้วยพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine ซึ่งเป็นพันธะไอโซเปปไทด์ (isopeptide) ที่มีค่าพลังงานพันธะ (bond energy) สูง จึงมีความเสถียรสูง (Folk, 1980) ทรานสกลูตามิเนสสามารถแบ่งตามแหล่งของเอนไซม์ได้เป็น 5 ประเภทคือ (Wilhelm et al., 1996)

1. Secretory TGase คือเอนไซม์ที่ผลิตจากต่อมลูกหมากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า dorsal prostate protein-1 (DP1) โดยเอนไซม์นี้มีบทบาทต่อการสร้าง plug ในช่วงคลอดหลังการหลั่งน้ำอสุจิ เป็นเอนไซม์ที่มีพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวและมีขนาดประมาณ 65-70 กิโลดาลตัน

2. Tissue TGase (TGase C) เป็นเอนไซม์ที่ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์สายเดี่ยว อยู่ในส่วนของ cytoplasm พบได้โดยทั่วไปในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น ดับ กล้ามเนื้อ เซลล์เม็ดเลือดแดง และถุงอัมชะ บทบาทของเอนไซม์นี้ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด แต่สันนิษฐานว่ามีบทบาทต่อการสร้างเซลล์ ซ่อมแซมเนื้อเยื่อ และเกี่ยวข้องกับการเสื่อมสลายของเซลล์ (programmed cell death)

3. Plasma TGase (Factor XIII) หรือที่รู้จักในอีกชื่อหนึ่งว่า fibrinoligase หรือ blood coagulation factor XIII หรือ fibrin-stabilizing factor ประกอบด้วย 4 หน่วยย่อย (tetramer) แบ่งเป็นหน่วยย่อย a (Factor XIIIa) และหน่วยย่อย b ซึ่งยึดเหนี่ยวกันด้วยแรงกระทำ noncovalent หน่วยย่อย a เป็นส่วนที่เป็นบริเวณเร่งของเอนไซม์ (active site) เอนไซม์นี้จะอยู่ในรูปที่ไม่เร่งปฏิกิริยา (zymogen) ซึ่งพบในส่วนของน้ำเลือด (plasma) เกร็ดเลือด (platelet) และสายรก (placenta) เอนไซม์นี้จะถูกกระตุ้นโดย thrombin และ Ca^{2+} และเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยง fibrin โมเลกุลเดี่ยวให้เป็นโมเลกุลคู่และพอลิเมอร์ ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือด (blood coagulation)

4. Keratinocyte TGase (TGase K) เป็นเอนไซม์ที่จับอยู่กับส่วน membrane ของเซลล์ ซึ่งพบโดยมากใน keratinocyte ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการสร้าง cell envelope เอนไซม์ที่พบในคนและหนูมีขนาด 89-90 กิโลดาลตัน (Phillips et al., 1990)

5. Epidermal TGase (TGase E) เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการสร้าง epidermis และ hair follicle เป็นเอนไซม์ที่มีพอลิเปปไทด์สายเดี่ยวและมีขนาดประมาณ 77 กิโลดาลตัน อยู่ในรูปที่ไม่ active (zymogen) สามารถถูกกระตุ้นโดยโปรตีนเอส

ทรานสกลูตามิเนสที่พบในปลาเป็น tissue TGase มีการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์นี้ในปลาใน (Cyprius carpio) ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ปลา chum salmon (*Oncorhynchus keta*) ปลา atka mackerel (*Pleurogrammus azonus*) ปลา white croaker (*Argyrosomus argentatus*) ปลา Alaska pollock (*Theraga chalcogramma*) และปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Kishi et al., 1991; Kumazawa et al., 1997; Nozawa et al., 1997; Worratao and Yongsawatdigul, 2005) ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 5 ตัวคือ Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp และเนื่องจากซิสตีอีน (Cys) มีบทบาทในการเร่งปฏิกิริยา (Folk, 1980) ทรานสกลูตามิเนสจึงถูกยับยั้งโดยสารที่ทำปฏิกิริยากับกลุ่มซิสตีอีน เช่น N-ethylmaleimide (NEM), iodoacetic acid (IAA), p-chloromercuribenzoate (PCMB) นอกจากนี้ทรานสกลูตามิเนสยังถูกยับยั้งโดย Cu^{2+} Zn^{2+} (Kumazawa et al., 1997) เนื่องจากไอออนเหล่านี้สามารถจับกับซิสตีอีนที่บริเวณเร่งของเอนไซม์

ทรานสกลูตามิเนสจากเนื้อปลานี้จำเป็นต้องมีแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) เป็นสารกระตุ้น (activator) ซึ่งเป็นคุณสมบัติจำเพาะของทรานสกลูตามิเนสจากสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมและจากสัตว์น้ำ ส่วนทรานสกลูตามิเนสจากเชื้อจุลินทรีย์ไม่จำเป็นต้องใช้แคลเซียมไอออนในการเร่งปฏิกิริยา Folk and Cole (1966) รายงานว่าแคลเซียมไอออนเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ (conformation) ของทรานสกลูตามิเนส มีผลให้กลุ่ม SH ของซิสตีอีนอยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา ปริมาณแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาแตกต่างกันตามแหล่งของเอนไซม์ ปริมาณแคลเซียมไอออนที่เหมาะสมสำหรับทรานสกลูตามิเนสจากปลา 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)

แม้ว่าทรานสกลูตามิเนสในปลาทรายแดงจะมีบทบาทต่อการเกิดเซตติงและมีผลเพิ่มคุณภาพเจล แต่ยังไม่มีการศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีเกี่ยวกับเอนไซม์นี้ ความเข้าใจในปรากฏการณ์เซตติงในปลาทรายแดงเกิดจากการนำองค์ความรู้ที่ศึกษาในปลาชนิดอื่นโดยนักวิทยาศาสตร์ในต่างประเทศ เช่น ในประเทศญี่ปุ่น หรือสหรัฐอเมริกา มาอธิบาย ซึ่งคุณลักษณะของเอนไซม์และโปรตีนกล้ามเนื้อซึ่งเป็นสารตั้งต้นอาจแตกต่างกันตามแหล่งของปลา เอนไซม์จากปลาในแถบหนาวอาจมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเร่งปฏิกิริยา (optimum temperature) ความเสถียรต่ออุณหภูมิ (thermal stability) แตกต่างจากปลาทรายแดงซึ่งเป็นปลาในเขตร้อนเขตร้อน ดังนั้นเพื่อให้เกิดความเข้าใจในปรากฏการณ์

เซตังในซูริมิปลาทรายแดงอย่างแท้จริง จึงควรศึกษาการทำปฏิกิริยาระหว่างทรานสกลูตามีนในปลาทรายแดง และศึกษาคุณลักษณะของเอนไซม์ทรานสกลูตามีนในประเด็นที่สัมพันธ์กับการเกิดเซตัง

องค์ประกอบที่สำคัญอีกประการหนึ่งของการเกิดเซตังคือ โปรตีนกล้ามเนื้อที่เป็นสารตั้งต้น เพื่อให้เกิดการเร่งปฏิกิริยาโปรตีนจำเป็นต้องเปิดตัว (unfold) เพื่อให้กลุ่มกลูตามีน และไลซีนสามารถสัมผัสกับบริเวณเร่งของเอนไซม์ได้ โปรตีนกล้ามเนื้อในซูริมิเป็นระบบที่ซับซ้อนประกอบด้วยโปรตีนหลักคือ มัยโอซิน (myosin) และ แอคติน (actin) ในรูปแอคโตมัยโอซิน (actomyosin) มัยโอซินเป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งมีอยู่มากกว่าร้อยละ 50 ประกอบด้วย myosin heavy chain 2 สาย และ myosin light chain 4 สาย โดย myosin heavy chain และ myosin light chain แต่ละสายมีขนาด 200 และ 18-25 กิโลดาลตัน ในขณะที่แอคตินมีสัดส่วนคิดเป็นร้อยละ 30 แอคตินในรูปพอลิเมอร์สายเดี่ยว (monomer) เรียกว่า globular actin หรือ G-actin ซึ่งในโครงสร้างของมัดกล้ามเนื้อแอคตินจะเรียงต่อกันเป็นสายพอลิเมอร์เรียกว่า fibrous actin หรือ F-actin Ogawa et al. (1993) รายงานว่าแหล่งที่อยู่อาศัยของปลาที่มีอิทธิพลอย่างมากต่อการเปิดตัวของโปรตีนกล้ามเนื้อ ปลาที่มีถิ่นอาศัยในแถบน้ำเย็นโปรตีนกล้ามเนื้อจะมีเสถียรภาพต่ำ เปิดตัวออกได้ง่าย ในขณะที่ปลาในแถบศูนย์สูตรมีความเสถียรสูง จึงเปิดตัวที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ (physico-chemical properties) อื่นๆ ของโปรตีนเหล่านี้ในปลาทรายแดง

Lee and Park (1998) พบว่าการเติมแคลเซียมในซูริมิปลา Alaska pollock และ Pacific whiting มีผลเพิ่มค่าความแข็งแรงของเจล โดยเฉพาะเมื่อบ่มที่อุณหภูมิที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดเซตังในปลานั้นๆ นอกจากนี้ Yongsawatdigul et al. (2002) ได้ผลการทดลองเช่นเดียวกันในซูริมิปลาทรายแดง การเพิ่มขึ้นทางลักษณะเนื้อสัมผัส สอดคล้องกับการเกิดพอลิเมอร์ของสายโปรตีนซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นผลผลิตจากการเชื่อมข้ามโดยทรานสกลูตามีนในซูริมิ การเติมแคลเซียมมีผลกระตุ้นกิจกรรมของทรานสกลูตามีนให้สูงขึ้น อย่างไรก็ตามแคลเซียมจัดเป็นเกลือที่มีผลลดเสถียรภาพของโปรตีน (destabilizing salt) ดังนั้นแคลเซียมอาจไม่เพียงแต่มีผลต่อการกระตุ้นเอนไซม์ทรานสกลูตามีน แต่อาจมีผลต่อการเปลี่ยนรูปแบบโครงสร้าง (conformation) ของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยตรง ซึ่งผลของแคลเซียมต่อสารตั้งต้นนี้อาจเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้เจลที่เกิดขึ้นมีค่าความแข็งแรงมากขึ้น อย่างไรก็ตามบทบาทของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนกล้ามเนื้อยังไม่มีการศึกษา โดยเฉพาะในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเซตัง

ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกซูริมิปลาทรายแดงที่สำคัญของโลก แต่ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับคุณลักษณะจำเพาะทางชีวเคมี (biochemical characteristics) ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดง เอนไซม์ทรานสกลูตามีนในปลาทรายแดง และกลไกการเกิดเซตังในปลาทรายแดง มีน้อยมาก

การผลิตและนำซูริมิไปใช้ในอุตสาหกรรมต่อเนื่องแล้วแต่พึ่งพาเทคโนโลยีต่างชาติ ซึ่งพัฒนามาจากองค์ความรู้ของปลาในแถบกระแสน้ำเย็นทั้งสิ้น ซึ่งคุณลักษณะจำเพาะทางชีวเคมีของกล้ามเนื้อและเอนไซม์ย่อมแตกต่างจากปลาทรายแดงโดยสิ้นเชิง องค์ความรู้เกี่ยวกับทรานสกลูตามิเนสและบทบาทของทรานสกลูตามิเนสในปลาทรายแดงต่อการเชื่อมข้ามโปรตีนกล้ามเนื้อ เป็นสิ่งสำคัญที่จะนำไปสู่การปรับปรุงเทคโนโลยีการผลิตให้สอดคล้องกับลักษณะธรรมชาติของซูริมิปลาทรายแดง และยังเป็นการลดการพึ่งพาเทคโนโลยีต่างชาติด้วย วัตถุประสงค์ของการวิจัยในครั้งนี้จึงเพื่อทำบริสุทธิ์เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส และศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของเอนไซม์ที่ทำบริสุทธิ์ได้โดยเฉพาะคุณลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการเกิดเซตติง และศึกษาคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาทรายแดง นอกจากนี้ศึกษาการเชื่อมข้ามของโปรตีนกล้ามเนื้อโดยทรานสกลูตามิเนสจากปลาทรายแดง

วิธีการทดลอง

1.การเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงและผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอคตินจากปลาทรายแดง

1.1 การเตรียมตัวอย่างโปรตีน

1.1.1 แอคโตมัยโอซิน

ปลาทรายแดง (*Nemipterus* spp) ซึ่งจับจากอ่าวไทยและขนส่งมายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทันทีหลังจับ โดยบรรจุในกล่องโฟมแช่น้ำแข็ง ปลา มีขนาด 50-100 กรัม คั่วได้ ล้างทำความสะอาดและนำเนื้อปลามาใช้เพื่อสกัดแอคโตมัยโอซิน มัยโอซินและแอคตินทันที สกัดแอคโตมัยโอซินโดยดัดแปลงตามวิธีของ Ogawa et al. (1999) ใช้กล้ามเนื้อปลา 50 กรัม ปั่นผสมกับสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มีฟอสเฟตเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และฟีนิลมีเทนซัลโฟนิล ฟลูออไรด์ (phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) เข้มข้น 0.05 มิลลิโมลาร์ ที่พีเอช 7 ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $5,000 \times g$ ที่ $4^{\circ}C$ เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนไปปั่นผสมกับสารละลายข้างต้น และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เก็บส่วนตะกอนและนำไปปั่นผสมกับสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่มีฟอสเฟตเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000 \times g$ เป็นเวลา 5 นาที ที่ $4^{\circ}C$ เก็บ

สารละลายส่วนใสม่าทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเย็นในปริมาตร 3 เท่า นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ $10,000\times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที ตะกอนที่ได้คือแอคโตมัยโอซิน

1.1.2 มัยโอซิน

สกัดมัยโอซินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Martone et al. (1986) ทำการทดลองทุกขั้นตอนในระหว่างการสกัดที่ $0-4^{\circ}\text{C}$ เพื่อลดอัตราการย่อยสลายโดยโปรตีนสและการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation) ของโปรตีน นำเนื้อปลาทรายแดงบดผสมกับบัฟเฟอร์ A (0.10 M KCl , $1\text{ mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF)}$, $0.02\% \text{ NaN}_3$ and 20 mM Tris-HCl , $\text{pH}7.5$) ในปริมาตร 10 เท่า ด้วยเครื่อง homogenizer (AM-8, Nihonseiki Kaisha, Ltd., Tokyo, Japan) จากนั้นกวนผสมเป็นเวลา 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ $1,000\times g$ (Sorvall RC-5C Plus, Dupont, Del., USA) เป็นเวลา 10 นาที เก็บตะกอนไปล้างด้วยบัฟเฟอร์ A 2 ครั้ง จากนั้นนำมาสกัดด้วยบัฟเฟอร์ B (0.45 mM KCl , $5\text{ mM } \beta\text{-mercaptoethanol (BME)}$, $0.2\text{ M Mg (CH}_3\text{COO)}_2$, $1\text{ mM ethylene glycol bis (}\beta\text{-aminoethyl ether)}$ $\text{N,N,N',N'- tetraacetic acid (EGTA)}$, and $20\text{ mM Tris-maleate}$, $\text{pH}, 6.8$) ในปริมาตร 5 เท่า ซึ่งมีสาร Adenosine 5'-triphosphate (ATP) ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิโมลาร์ โดยกวนสารผสมในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000\times g$ เป็นเวลา 15 นาที เก็บตะกอนที่ได้เพื่อนำไปสกัดแอคตินต่อไป นำสารละลายส่วนใสไปเจือจางด้วยสารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ในปริมาตร 25 เท่า ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $12,000\times g$ เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนจากขั้นตอนนี้ไปละลายในบัฟเฟอร์ C (0.50 M KCl , 5 mM BME , and 20 mM Tris-HCl , $\text{pH}7.5$) ในปริมาตร 5 เท่า ตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม MgCl_2 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10 มิลลิโมลาร์ ตกตะกอนมัยโอซินโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 40-50 เก็บมัยโอซินที่ -40°C เพื่อใช้ตลอดการทดลอง ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของมัยโอซินที่สกัดได้ด้วย sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และวิเคราะห์ความเข้มของแถบสีโปรตีน (densitometric analysis) ด้วยซอฟต์แวร์ Lab works Version 4.0 (UVB Ltd., New York, USA) นำมัยโอซินมาละลายใน 0.6 M NaCl , $20\text{ mM Tris-maleate}$, $\text{pH } 7.0$ และนำไป dialyze ผ่านโซเดียมคลอไรด์บัฟเฟอร์ในปริมาตร 100 เท่า จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000\times g$ เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปใช้ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Lowry (Lowry et al., 1951)

1.1.3 แอคติน

เติมสารละลายบัฟเฟอร์ D (0.80 M KCl, 5 mM BME, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) ลงในตะกอนแอคติน กวนผสมเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $10,000\times g$ เป็นเวลา 15 นาที เติมสารละลาย NaHCO_3 เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ เพื่อละลายตะกอนที่ได้ เก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $75,000\times g$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำสารละลายแอคตินซึ่งเป็นส่วนใสไป dialyze ในสารละลาย 0.6 M NaCl, 20 mM Tris-maleate, pH 7.0 จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยอัลตราฟิลเทรชันที่มีขนาดของแผ่นเยื่อกรอง 10,000 ดาลตัน (molecular weight-cut-off 10,000 Da, Viva flow 50, Vivascience Sartorius AG, Goettingen, Germany) ตรวจสอบความบริสุทธิ์ด้วย SDS-PAGE ตามที่กล่าวไว้ในมัยโอซิน

1.2 การวัดความขุ่น (Turbidity)

ความขุ่นเป็นดัชนีบ่งชี้การเกาะตัว (aggregation) ของสารละลายโปรตีน โดยเตรียมสารละลายมัยโอซินเข้มข้น 3 มก./มล. และแอคตินเข้มข้น 1.5 มก./มล. ในสารละลายบัฟเฟอร์ 0.6 M NaCl, 20 mM Tris-maleate, pH 7.0 ซึ่งมี CaCl_2 เข้มข้น 0, 10, 30, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ วัดค่าความขุ่นของสารละลายโปรตีนเมื่อนำไปบ่มที่ 25 และ 40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิในการเหนี่ยวนำการเกิดเซตติง โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 350 นาโนเมตรด้วยเครื่อง UV/VIS 916 spectrophotometer (GBC Scientific Equipment, Ltd., Victoria, Australia.) โดยช่องใส่ควมวัดต่อเข้ากับอ่างน้ำไหลเวียนเพื่อควบคุมอุณหภูมิที่ 25 และ 40 °C ติดตามการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงเป็นเวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.3 ความสามารถในการละลาย (Protein solubility)

บ่มสารละลายมัยโอซินเข้มข้น 3.2 มก./มล. และแอคตินเข้มข้น 1 มก./มล. ที่ 25 หรือ 40 °C ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี CaCl_2 ความเข้มข้น 0-100 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ หมั่นตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ $84,000\times g$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่ 4 °C (XL-100 Ultracentrifuge, Beckman instruments, Inc., California, USA) เพื่อตกตะกอนกลุ่มก้อนโปรตีน (aggregate) วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในสารละลายส่วนใสตามวิธีของ Bradford (1976) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารละลายมาตรฐาน คำนวณปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่ (remaining proteins) ในหน่วยร้อยละ เทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนที่ไม่เติม CaCl_2 ที่ 4 °C

1.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (Surface hydrophobicity, S_0 ANS)

ติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกตามวิธีของ Li-Chan et al. (1985) โดยใช้สารตรวจจับ (probe) 1-anilino-8-naphthalenesulfonate (ANS) เจือจางสารละลายมัยโอซินและแอคตินที่ความเข้มข้น CaCl_2 0-100 มิลลิโมลาร์ ให้ได้ความเข้มข้น 0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1 มก./มล. นำไปบ่มที่ 25 หรือ 40 °C เป็นเวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ สุ่มตัวอย่างมา 2.0 มล. และเติมสารละลาย ANS (20 mM Tris-maleate (pH 7.0)) เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 10 ไมโครลิตร วัดความเข้มของการเรืองแสงด้วยเครื่อง RF-1501 spectrofluorophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่น excitation และ emission ที่ 374 และ 485 นาโนเมตร ตามลำดับ เติร์มเบงค์ (blanks) โดยไม่มีสารละลายโปรตีนคำนวณค่า S_0 ANS จากค่าความชันของเส้นกราฟระหว่างความเข้มของการเรืองแสงและความเข้มข้นของโปรตีนในหน่วยร้อยละ

1.5 ปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (Total sulfhydryl groups)

วิเคราะห์ปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของมัยโอซินและแอคตินโดยใช้ 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) เติร์มสารละลายมัยโอซินและแอคตินที่ความเข้มข้น 3 มก./มล. และ 1 มก./มล. ที่มีความเข้มข้นของ CaCl_2 0, 10, 30, 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ บ่มตัวอย่างที่ 25 และ 40 °C เป็นเวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ สุ่มตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลามาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ (0.2 M Tris-HCl (pH 6.8), 8 M urea, 2 % SDS and 10 mM EDTA) ปริมาตร 1.5 มล. จากนั้นเติมสารละลาย 0.1% DTNB ปริมาตร 0.2 มล. และบ่มที่ 40 °C เป็นเวลา 15 นาที อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 412 นาโนเมตร คำนวณปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมดโดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์ molar extinction ของมัยโอซินเท่ากับ $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Ellman, 1959) และของแอคตินเท่ากับ $12508 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ เติร์มเบงค์โดยไม่เติมโปรตีนในตัวอย่าง

1.6 กิจกรรม Ca-ATPase (Ca-ATPase activity)

ติดตามกิจกรรม Ca-ATPase ของมัยโอซินตามวิธีของ MacDonald et al. (1994) โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย มัยโอซิน 1.5 มก. Tris-maleate, pH 7.0 เข้มข้น 17 มิลลิโมลาร์ ที่ความเข้มข้นของ CaCl_2 ในช่วง 0-200 มิลลิโมลาร์ บ่มตัวอย่างที่ 25 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม ATP เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.67 มิลลิโมลาร์ และบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 5 นำตัวอย่าง

ไปปั่นเหวี่ยงที่ $3,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตโดยใช้สารมาตรฐาน KH_2PO_4 และคำนวณกิจกรรม Ca-ATPase ในหน่วย ไมโครโมลของฟอสเฟต/มก. โปรตีน/นาที ที่ $25^\circ C$

1.7 การวัด Circular dichroism (CD)

ศึกษาผลของ $CaCl_2$ ต่อโครงสร้างระดับทุติยภูมิของมัยโอซินและแอคตินโดยการวัด CD ละลายมัยโอซินและแอคตินในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ใน Tris-HCl (0.6 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.0) แทนการละลายใน Tris-maleate เนื่องจากบัฟเฟอร์ Tris-maleate ดูดกลืนแสงในช่วง UV ได้สูง รบกวนการวัดในช่วง UV เตรียมสารละลายมัยโอซินและแอคตินที่ความเข้มข้น 0.25 มก./มล. ที่ความเข้มข้น $CaCl_2$ ต่างๆ (0-100 มิลลิโมลาร์) และบ่มตัวอย่างที่ 25 หรือ $40^\circ C$ เป็นเวลา 4 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ วัดค่าการดูดกลืนแสงในช่วง far UV (ความยาวคลื่น 195-280 นาโนเมตร) ด้วยเครื่อง JASCO PS-150J spectropolarimeter (Jasco spectroscopic Co, Ltd., Tokyo, Japan) ซึ่งต่อเข้ากับอ่างน้ำ ไซลิทรีนเพื่อควบคุมอุณหภูมิที่ 25 หรือ $40^\circ C$ นอกจากนี้ติดตามการเปลี่ยนแปลง CD spectra ของตัวอย่างที่ $4^\circ C$ ตั้งค่าความแม่นยำของเครื่องด้วยสาร (1S)-(+)-10-camphorsulfonic acid (CSA) ใช้คิวเวตขนาด 0.02 ซม. คำนวณค่า Molar mean ellipticity $[\theta]$ และปริมาณแอลฟาฮีลิกซ์ โดยใช้ค่า Molar mean ellipticity $[\theta]$ ที่ 222 นาโนเมตรตามวิธีของ Ogawa et al. (1993)

นอกจากนี้ศึกษาผลของแคลเซียมต่อกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนส และการเปลี่ยน conformation ของแอคโตมัยโอซิน โดยใช้ปลานิลแทนปลาทรายแดง เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่มีกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสสูง (Worratao and Yongsawatdigul, 2003) และเป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณสมบัติในการเกิดเจลที่ดี การศึกษาในส่วนนี้ไม่ได้เสนอไว้ในแผนการทดลองในตอนต้น แต่ข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์เพื่อเปรียบเทียบผลของแคลเซียมต่อโปรตีนกล้ามเนื้อจากปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืดว่าแตกต่างกันหรือไม่อย่างไร โดยทำการศึกษาในลักษณะเดียวกับข้างต้นแต่ละลายแอคโตมัยโอซินที่ความเข้มข้นเกลือ NaCl 0.4 โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นเกลือที่แอคโตมัยโอซินปลานิลสามารถละลายได้สูงสุด

2. การศึกษากิจกรรมทรานสกลูตามิเนสจากน้ำล้างปลาทรายแดง

2.1 การเตรียมน้ำล้างปลาทรายแดง

บดผสมปลาทรายแดงกับน้ำเย็นในสัดส่วน 1 ต่อ 3 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $5,000 \times g$ ที่ $4^\circ C$ เป็นเวลา 15 นาที ส่วนใสที่ได้เทียบเท่ากับน้ำล้างครั้งที่ 1 จากกระบวนการผลิตซูริมิ นำตะกอนที่ได้ไป

ล้างน้ำและปั่นเหวี่ยงในทำนองเดียวกัน สารละลายส่วนใสที่ได้คือน้ำล้างครั้งที่ 2 ส่วนการล้างครั้งที่ 3 ใช้สารละลาย NaCl เข้มข้น 0.5% เพื่อเลียนแบบกระบวนการผลิตซูริมิ สารละลายส่วนใสที่ได้หลังจากการปั่นเหวี่ยงคือน้ำล้างครั้งที่ 3

2.2 การวิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูทามิเนส

นำน้ำล้างในขั้นต่าง ๆ ที่เตรียมจาก 2.1 ไปปั่นเหวี่ยงที่ $35,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ได้ซึ่งเป็น crude เอนไซม์ ไปวิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูทามิเนส ตามวิธีของ Tagaki et al. (1986) ซึ่งประกอบด้วยสารละลาย dimethylated casein (DMC) เข้มข้น 1 มก./มล. สารละลาย monodansyl cadaverine (MDC) เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สารละลาย CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สารละลาย dithiothreitol (DTT) เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl buffer pH 7.5 เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ โดยมีปริมาณ crude เอนไซม์ 100 ไมโครลิตร นำส่วนผสมดังกล่าวไปบ่มที่ 40°C เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย EDTA เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 400 ไมโครลิตร วัดค่า fluorescence intensity ที่ค่าความยาวคลื่น excitation และ emission 350 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ กำหนดให้กิจกรรม 1 ยูนิตหมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเชื่อมโยง ปริมาณ MDC 1 นาโนโมลเข้ากับ DMC ต่อนาที ค่า enhancing factor ที่ใช้ในการคำนวณคือ 1.17

2.3 สภาพที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส

ศึกษาผลของอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งกิจกรรมของทรานสกลูทามิเนส โดยศึกษาผลของอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25, 30, 37, 40, 45 และ 50°C ที่ค่าพีเอช 7.5 ส่วนผลของพีเอชต่อกิจกรรมของเอนไซม์นั้นศึกษาที่ 40°C โดยในช่วงพีเอช 6-6.5 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris acetate ที่พีเอช 7 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris maleate ที่พีเอช 7.5-9.0 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้นของสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งหมดในปฏิกิริยา คือ 70 มิลลิโมลาร์ นอกจากนี้ศึกษาผลของแคลเซียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1 และ 5 มิลลิโมลาร์ และ DTT ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 0 ถึง 10 มิลลิโมลาร์

2.4 ความเสถียรของทรานสกลูทามิเนสต่ออุณหภูมิ

บ่มตัวอย่างน้ำล้างครั้งที่ 1, 2, และ 3 ที่อุณหภูมิ 4, 25, 30 และ 40°C สุ่มตัวอย่างมาวัดกิจกรรมในแต่ละช่วงเวลา โดยทำตัวอย่างให้เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ $8,000 \times g$ ที่ 4°C เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry (1951) และกิจกรรมทรานสกลูทามิเนส

ในสารละลายส่วนใสที่สภาวะเหมาะสมจาก 2.3 คำนวณค่ากิจกรรมสัมพัทธ์ที่เหลือ (Relative activity) ในรูปร้อยละเทียบกับกิจกรรมของตัวอย่างที่ไม่ได้ปั๊ม

2.5 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

แยกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE ตามวิธีของ Laemmli (1970) โดยใช้ treatment buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol) ผสมกับสารละลายโปรตีนในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยกคือ 30 ไมโครกรัม ความเข้มข้นของอะคริลามายด์ (acrylamide) คือ 10%(W/V) แยกโปรตีนโดยใช้ค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 120 โวลต์ ย้อมสีโปรตีนด้วยสารละลาย Coomassie brilliant blue R-250 เข้มข้น 120 โวลต์ กำจัดสีย้อมด้วยสารผสมเอทานอลและกรดอะซิติกในสัดส่วน 25 และ 10% ตามลำดับ

2.6 การตรวจกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสโดยเทคนิคอีเลกโตรโฟรีซิส (TGase activity staining)

วิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูตามิเนสโดยเทคนิคอีเลกโตรโฟรีซิสโดยดัดแปรจากวิธีของ Lorand et al. (1979) โปรตีนมาตรฐานที่ทราบมวลโมเลกุลคือ bovine serum albumin (BSA), chicken egg albumin, α -lactalbumin และ carbonic anhydrase ตัวอย่างโปรตีนที่ใช้คือ น้ำล้างครั้งที่ 1 แยกโปรตีนโดยใช้ native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) ที่ระดับความเข้มข้นของอะคริลามายด์ 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 % แยกโปรตีนที่ค่าความต่างศักย์ 100 โวลต์ จากนั้นนำเจลไปทำปฏิกิริยาในสารตั้งต้น (2 mM MDC, 5 mg/ml DMC, 5 mM CaCl_2 , 5 mM DTT and 50 mM Tris-HCl pH 7.5) ที่ 40 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเขย่าตลอดเวลา จากนั้นหยุดปฏิกิริยาการเชื่อมโยงโดยแช่ในสารละลายกรดไทรคลอโรอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 2 ชั่วโมง กำจัดสาร MDC อิสระ (free MDC) โดยแช่ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 7.5% ตรวจสอบการเชื่อมโยงของ MDC ภายใตแสง ultraviolet (UV) นอกจากนี้ย้อมสีโปรตีนด้วย Coomassie brilliant blue ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น เพื่อประมาณค่ามวลโมเลกุลโดยใช้ Ferguson plot

2.7 การเชื่อมข้ามโปรตีนโดยทรานสกลูตามิเนสจากน้ำล้าง

ทดสอบความสามารถในการเชื่อมข้ามโปรตีนเคซีน และ อัลบูมินจากวัว (Bovine serum albumin) โดยเตรียมสารผสมซึ่งประกอบด้วย สารละลายโปรตีนเข้มข้น 5 มก./มล. CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ DTT เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl pH 7.5 เข้มข้น 100 มิลลิโม-

ลาร์ และเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากน้ำล้าง 1.85 ยูนิต/มก. โปรตีนของสารตั้งต้น โดยบ่มสารตั้งต้น โปรตีนที่ 50 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ก่อนนำมาทำปฏิกิริยา บ่มสารผสมทั้งหมดที่ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที และที่ 25 °ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลาย SDS เข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงสารละลายผสมที่ 10,000 ×g เป็นเวลา 10 นาที วิเคราะห์การเชื่อมข้ามโปรตีนโดย SDS-PAGE ที่ความเข้มข้นอะคริลาไมด์ 7.5% ตัวอย่างควบคุมคือตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม

3. คุณสมบัติของทรานสกลูตามิเนสจากปลาทรายแดง

3.1 การทำบริสุทธิ์บางส่วน (Partial purification) ของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส

สกัด crude เอนไซม์ โดยปั่นผสมเนื้อเยื่อ (ตับหรือกล้ามเนื้อ) กับสารสกัดบัฟเฟอร์ (10 mM NaCl, 2mM EDTA, 2mM DTT, 10 μ M N-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, TLCK) ในอัตราส่วน เนื้อต่อบัฟเฟอร์ 1:3 สำหรับตับ และ 1:2 สำหรับกล้ามเนื้อ จากนั้นนำส่วนผสมไปปั่นเหวี่ยงที่ 20000×g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที (Sorvall RC 28S, Dupont Co., Newtown, CT, USA) นำสารละลายส่วนใสกรองผ่านผ้าขาวบาง และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 45000×g ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง สารละลายส่วนใสที่ได้คือ crude เอนไซม์ ซึ่งนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป วิเคราะห์โปรตีนในการทดลองส่วนนี้ตามวิธีของBradford (1976) โดยใช้สารละลาย BSA เป็นสารมาตรฐาน

ขั้นตอนที่ 1 ใช้ DEAE-Sephacel คอลัมน์ขนาด 2.5x27 ซม. ในสารละลายบัฟเฟอร์ A ซึ่งประกอบด้วย Tris-Cl, pH8.0 เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, DTT เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์, EDTA เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และ TLCK เข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ หลังจากบรรจุ crude เอนไซม์เข้าคอลัมน์ ทำการล้างคอลัมน์เพื่อกำจัดโปรตีนที่ไม่จับอยู่กับ DEAE-Sephacel ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ A จำนวน 3 bed volumes จากนั้นชะโปรตีน (elute) ออกด้วยสารละลาย NaCl ในบัฟเฟอร์ A ในช่วงความเข้มข้น 0-1 โมลาร์ เก็บ fraction ละ 7 มล. วัดปริมาณโปรตีนด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูตามิเนสในแต่ละ fraction เก็บรวบรวม (pool) หลอดที่แสดงกิจกรรม เพื่อให้เข้มข้นโดยอัลตราฟิลเทชันที่แผ่นเยื่อกรองมีขนาด molecular weight cut-off 30000 ดาลตัน (Vivaspin concentrator; Vivascience AG, Hannover, Germany) ก่อนนำไปทำบริสุทธิ์ต่อไป

ขั้นตอนที่ 2 ใช้ Sephacryl S-200 HR คอลัมน์ขนาด (1.5x80 ซม.) ในสารละลายบัฟเฟอร์ A บรรจุตัวอย่างที่ทำให้เข้มข้นจากขั้นตอน DEAE-Sephacel ปรับอัตราไหลที่ 0.5 ม.ล./นาที เก็บ fraction ละ 5 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร วิเคราะห์กิจกรรมทรานสกลูตามิเนสในแต่ละ fraction เก็บรวบรวม (pool) หลอดที่แสดงกิจกรรม เพื่อให้เข้มข้นโดยอัลตราฟิลเทชันที่แผ่นเยื่อ

กรองมีขนาด molecular weight cut-off 30000 ดาลตัน (Vivaspin concentrator; Vivascience AG, Hannover, Germany) ก่อนนำไปทำปฏิกิริยาต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 ใช้ Ca hydroxyapatite (ขนาด 5 มิลลิเมตร) ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ซึ่งมี DTT และ EDTA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิโมลาร์ เปลี่ยนบัฟเฟอร์ของตัวอย่างเข้มข้นจากขั้นตอนที่ 2 ให้อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์โดยใช้ diafiltration กำจัด unbound protein ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ข้างต้น ชะ (elute) โปรตีนโดยเพิ่มความเข้มข้นของฟอสเฟตจาก 10 ถึง 400 มิลลิโมลาร์ในเชิงเส้นตรง (gradient) ที่อัตราการไหล 0.5 ม.ล./นาที เก็บ fraction ละ 5 มล. เพื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงและกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสดังกล่าวข้างต้น รวบรวม fraction ที่มีกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสและเปลี่ยนให้อยู่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.2 ซึ่งมี DTT และ EDTA เข้มข้นอย่างละ 1 มิลลิโมลาร์ เพื่อนำไปศึกษาคุณลักษณะทางชีวเคมีต่อไป

3.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีของทรานสกลูตามิเนส

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาที่ 4, 20, 30, 40, 50, และ 60 °ซ โดยบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 10 นาที สารละลายผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5, CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และ DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์

ศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการเร่งปฏิกิริยาโดยใช้บัฟเฟอร์ sodium acetate เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ในช่วงพีเอช 6-7 สารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ ในช่วงพีเอช 7.5-9.0 สารละลายบัฟเฟอร์ glycine เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ในช่วงพีเอช 10-11 โดยในปฏิกิริยาประกอบด้วย CaCl_2 5 มิลลิโมลาร์ และ DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ศึกษาผลของ CaCl_2 ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้น 0-5 มิลลิโมลาร์ สารละลายผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และ DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ศึกษาผลของ DTT ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิโมลาร์ สารละลายผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 และ CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ ติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ศึกษาผลของ NaCl ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ ในช่วงความเข้มข้น 0-1.2 โมลาร์ สารละลายผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5, CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ศึกษาผลของธาตุโควาเลนต์ SrCl_2 , MgCl_2 , BaCl_2 , MnCl_2 , CuCl_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ในสถานะที่ไม่มี CaCl_2 โดยสารผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-Cl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5, DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ศึกษาผลของสารยับยั้งทรานสกลูตามิเนส คือ EDTA, iodoacetic acid (IAA), N-ethylmaleimide (NEM), และ PMSF คำนวณค่ากิจกรรมสัมพันธ์เทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้เติมสารยับยั้ง สารละลายผสมประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5, CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, DTT เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ และติดตามปฏิกิริยาที่ 37 °ซ

ตรวจสอบกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยใช้เทคนิค activity staining ตามรายละเอียดในข้อ 2.6

3.4 การเชื่อมข้ามมัยโอซินโดยทรานสกลูตามิเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้

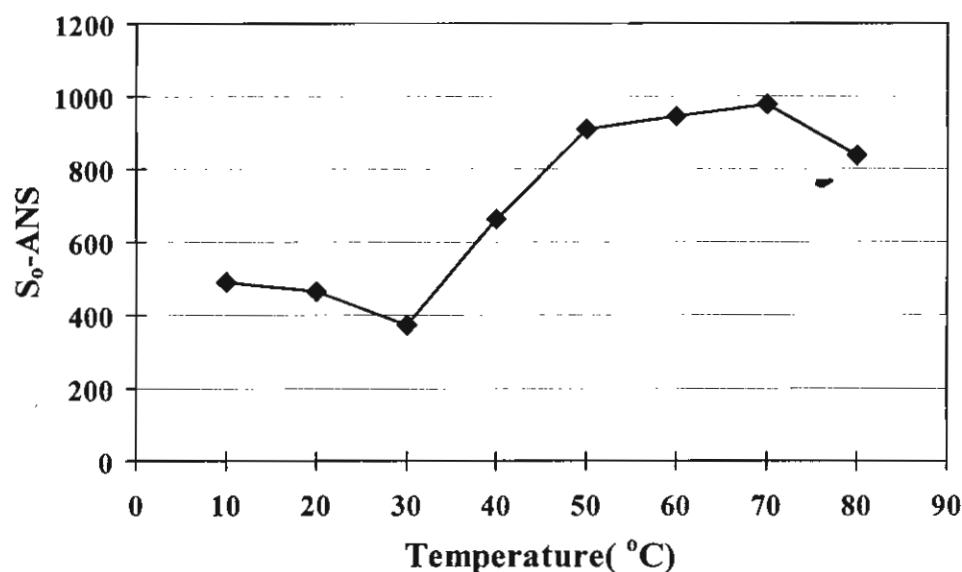
ทดสอบความสามารถในการเชื่อมข้ามมัยโอซินปลาทูแดงของทรานสกลูตามิเนสที่ทำบริสุทธิ์ได้ โดยใช้เอนไซม์ 1.09-1.23 ยูนิต/มก.มัยโอซิน ในระบบที่ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ Tris-HCl เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5, CaCl_2 เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์, DTT เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ บ่มตัวอย่างที่ 30 °ซ เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ระดับการเชื่อมข้าม โดยผสมตัวอย่างกับ สารละลาย SDS เข้มข้น 10% ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นเหวี่ยงที่ 5000×g เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลาย ส่วนใสผสมกับ treatment buffer (125 mM Tris-HCl, pH 8.8, 2mM EDTA, 20 % BME, 2 % SDS, 10 % glycerol) ในสัดส่วน 1:1 จากนั้นนำไปแยกโปรตีนตามวิธี Huff-Lonergan et al., (1996) โดยใช้ ความเข้มข้นอะคริลไมด์ 6%

ผลการทดลอง

1. การเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงและผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอคตินจากปลาทรายแดง

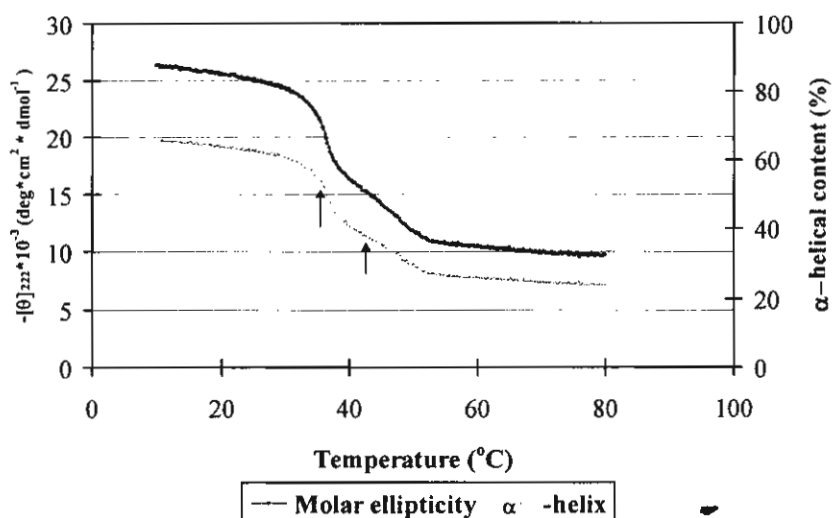
1.1 การเปลี่ยนแปลง conformation ของแอคโตมัยโอซินจากปลาทรายแดง

ค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (S_0 ANS) ของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 30°C และสูงสุดที่ 70°C (รูปที่ 1) เนื่องจาก S_0 ANS บ่งชี้ถึงการเปิดตัวของโปรตีน ทำให้กรดอะมิโนไฮโดรโฟบิกซึ่งโดยปกติขุดตัวอยู่ในโครงสร้าง ออกมาสัมผัสกับสภาพแวดล้อมที่มีน้ำเป็นตัวทำละลาย ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของค่า S_0 ANS จึงเป็นการบ่งชี้ว่าแอคโตมัยโอซินของปลาทรายแดงเริ่มเปิดตัวออกที่อุณหภูมิสูงกว่า 30°C มีรายงานการเปิดตัวของแอคโตมัยโอซินจากปลาในในช่วงอุณหภูมิ $30-50^{\circ}\text{C}$ (Sano et al., 1994) ในขณะที่ปลาในแถบน้ำเย็นเช่นปลา Pacific whiting เกิดการเปิดตัวออกที่ 20°C (Yongsawatdigul and Park 1999) ส่วน S_0 ANS ของมัยโอซินจากกระต่ายและไก่ซึ่งเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ 44°C (Wicker et al., 1986) จะเห็นได้ว่าแอคโตมัยโอซินของปลาทรายแดงเปิดตัวออกที่อุณหภูมิก่อนข้างสูงกว่าปลาที่อาศัยในแถบน้ำเย็น และการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในช่วงอุณหภูมิใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม



รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินปลาทรายแดงที่ได้รับความร้อนในอัตรา $1^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$

ปริมาณแอลฟาฮีลิกซ์ของแอกโตมัยโอซินลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นกว่า 30 °ซ (รูปที่ 2) ซึ่งแสดงว่าแอกโตมัยโอซินของปลาทรายแดงเริ่มเปลี่ยนแปลง conformation เมื่อได้รับความร้อนสูงกว่า 30 °ซ ปริมาณแอลฟาฮีลิกซ์ของแอกโตมัยโอซินที่ 4 °ซ คิดเป็นร้อยละ 66 และลดลงเหลือประมาณร้อยละ 24.2 ที่ 80 °ซ นอกจากนี้ยังพบการเปลี่ยนแปลงความชัน (slope) ที่ต่างกันที่ 2 อุณหภูมิ โดยความชันแรกเกิดขึ้นที่ 36.1 °ซ และความชันอีกค่าหนึ่งเกิดขึ้นที่ 47.9 °ซ ทั้งนี้เกิดจากการคลายเกลียวของมัยโอซินส่วนแท่ง (rod) (Ogawa et al., 1995) Burke et al. (1973) รายงานว่าการเปิดตัวของมัยโอซินจากกระต่ายเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าความชัน 2 ช่วงเช่นกัน คือที่ 44 และ 55 °ซ ส่วนในมัยโอซินจากปลา Alaska pollock เกิดขึ้นที่ 28.2 และ 41.3 °ซ (Togashi et al., 2002) ปลา Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) มีถิ่นอาศัยที่อุณหภูมิ 2-5 °C (Togashi et al., 2002) ดังนั้นการเปิดตัวออกของแอกโตมัยโอซินจากปลาชนิดนี้จึงเกิดขึ้นที่อุณหภูมิต่ำกว่าในปลาทรายแดง

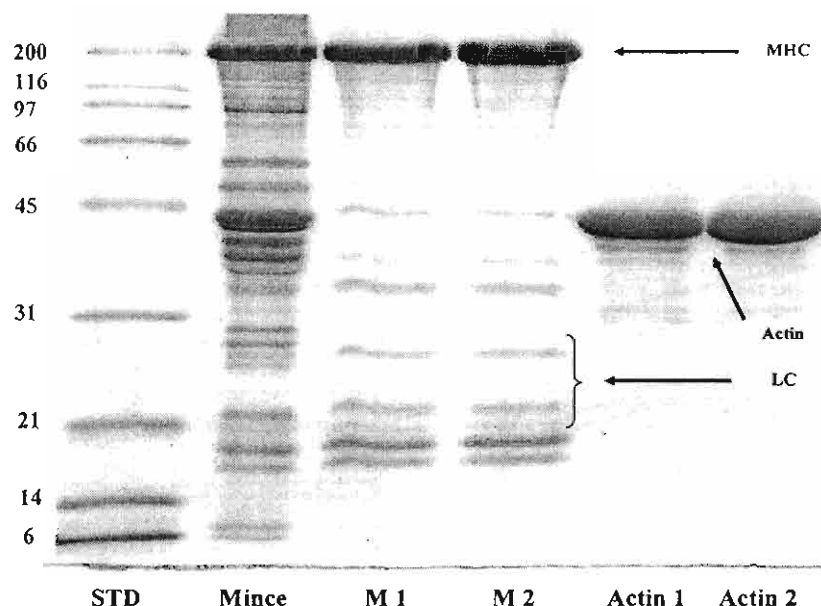


รูปที่ 2 การเปลี่ยนแปลงค่า molar ellipticity และปริมาณแอลฟาฮีลิกซ์ของแอกโตมัยโอซินปลาทรายแดงซึ่งได้รับอัตราการให้ความร้อน 1 °ซ/นาที

1.2 ผลของ Ca^{2+} ต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอกตินเมื่อปั๊มที่อุณหภูมิเซตติง

จากผลข้างต้นแสดงว่าแอกโตมัยโอซินจากปลาทรายแดงมีความเสถียรค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตาม Yongsawatdigul et al. (2002) พบการเกิดเซตติงในซูริมิปลาทรายแดง โดยเฉพาะเมื่อมีการเติม Ca^{2+} ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่า แอกโตมัยโอซินอาจเปิดตัวออกแม้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า thermal denaturation ใน

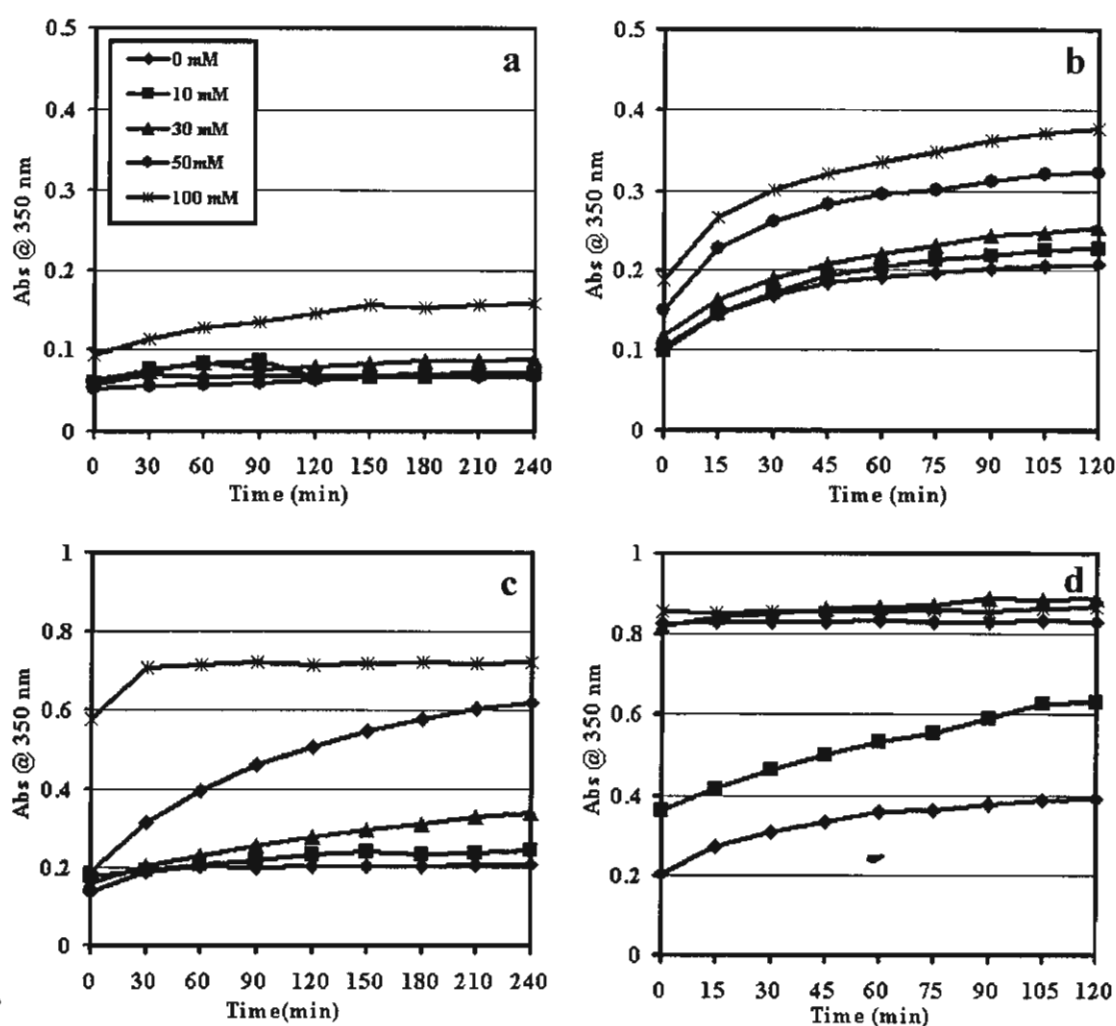
สถานะที่มี Ca^{2+} ดังนั้นจึงศึกษาผลของ Ca^{2+} ต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอกตินที่อุณหภูมิเซตที่ 25 และ 40 °ซ มัยโอซินและแอกตินที่ทำบริสุทธิ์ได้แสดงดังรูปที่ 3



รูปที่ 3 มัยโอซินและแอกตินที่สกัดจากปลาทรายแดง Std = standard molecular weight, M=myosin, หมายเลข 1 และ 2 = replication

เมื่อบ่มมัยโอซินที่ 25 °ซ ที่ความเข้มข้น CaCl_2 ในระดับ 10-50 มิลลิโมลาร์ ค่าความขุ่นเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วงเวลา 4 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่มี CaCl_2 (รูปที่ 4a) แต่ในตัวอย่างที่มี CaCl_2 เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ค่าความขุ่นเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการบ่ม เนื่องจากการเพิ่มค่าความขุ่นแสดงถึงการเกาะตัว (aggregate) ของโปรตีน (Gill et al., 1992) ดังนั้นมัยโอซินเกิดการเกาะตัวรวมกันได้เล็กน้อยที่ 25 °ซ ที่ระดับความเข้มข้นของ CaCl_2 10-50 มิลลิโมลาร์ แต่เมื่อเพิ่มค่าความเข้มข้นของ CaCl_2 เป็น 100 มิลลิโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้มัยโอซินเกิดการเกาะตัวมากขึ้น ระดับการเกาะตัวค่อนข้างต่ำที่ 25 °ซ ในสถานะที่ไม่มี CaCl_2 สอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น เนื่องจากมัยโอซินยังไม่สูญเสียสภาพธรรมชาติ ระดับการเปิดตัวออกและการเกาะตัวจึงมีน้อย เมื่อพิจารณาที่ 40 °ซ จะเห็นว่ามีการเกาะตัวสูงกว่าที่ 25 °ซ (รูปที่ 4b) ทั้งนี้เนื่องจากที่ 40 °ซ เป็นอุณหภูมิที่สูงกว่า denaturation temperature เป็นที่น่าสังเกตว่า CaCl_2 มีผลเพิ่มการเกาะตัวของมัยโอซินที่ 40 °ซ แอคตินบ่มที่ 25 °ซ มีความขุ่นมากขึ้นเมื่อเติม CaCl_2 ในระดับ 50 และ 100 มิลลิโมลาร์ (รูปที่

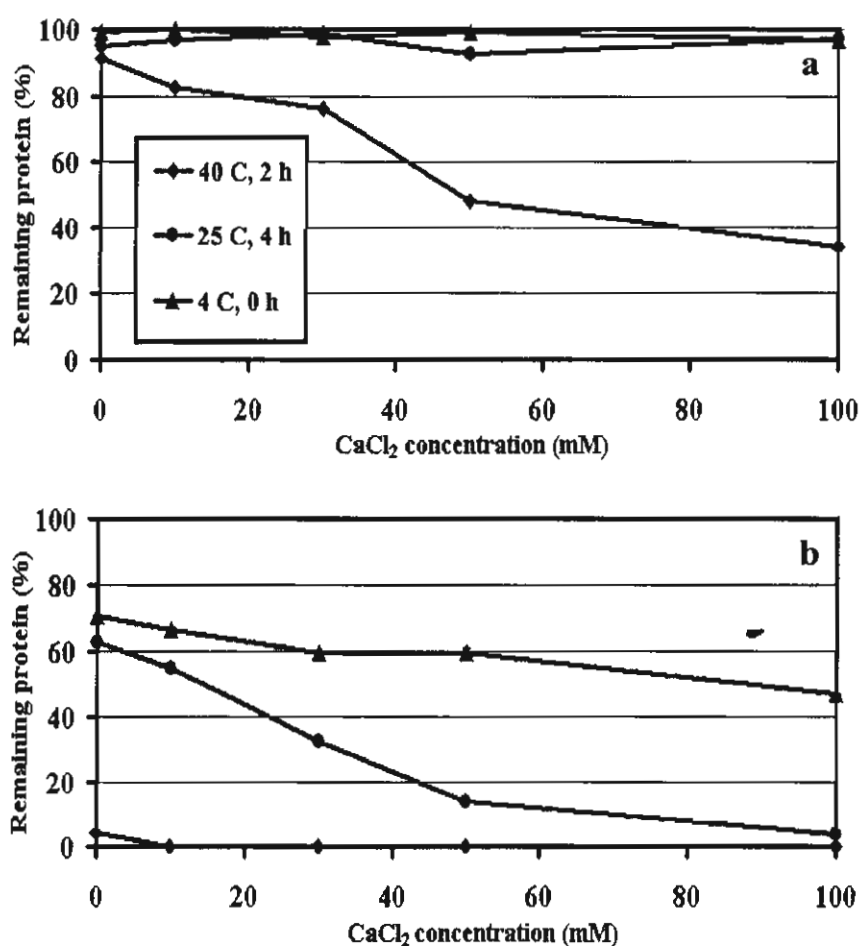
4c) การเกาะตัวของแอคตินบ่มที่ 40 °ซ เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อเติม CaCl_2 เพียง 10 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตาม การเพิ่ม CaCl_2 จาก 30 เป็น 100 มิลลิโมลาร์ ไม่ทำให้ค่าความขุ่นเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4d) จะเห็นได้ว่าแอคตินมีระดับการเกาะตัวสูงกว่ามัยโอซิน ดังจะเห็นได้จากการดูดกลืนแสงที่มากกว่าแม้ว่าปริมาณโปรตีนของแอคตินจะต่ำกว่าก็ตาม



รูปที่ 4 ผลของแคลเซียมต่อความขุ่นของมัยโอซิน บ่มที่ 25 (a) และ 40 °ซ (b) และแอคตินบ่มที่ 25 (c) และ 40 °ซ (d)

เมื่อพิจารณาค่าการละลายของโปรตีนหลังจากบ่มที่ 25 หรือ 40 °ซ ในสถานะที่มี CaCl_2 ในระดับต่างๆ พบว่า ปริมาณโปรตีนหลังจากบ่มที่ 25 °ซ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงไม่แตกต่างจากตัวอย่าง

ควบคุมที่ 4 °ซ (รูปที่ 5a) แสดงให้เห็นว่ามัยโอซินบ่มที่ 25 °ซ ไม่ได้เหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะตัวจนเป็นกลุ่มก้อนที่สามารถตกตะกอนได้เมื่อปั่นเหวี่ยง ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของค่าความขุ่น ดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ส่วนที่ 40 °ซ พบว่ามัยโอซินเกิดการเกาะตัวเป็นก้อน โดยเฉพาะเมื่อเติม CaCl_2 ในระดับ 10-100 มิลลิโมลาร์ จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่า CaCl_2 สามารถเหนี่ยวนำให้มัยโอซินเกิดการเกาะตัวที่ 25 °ซ ที่ระดับ 100 มิลลิโมลาร์ โดยการเกาะตัวนั้นเกิดเป็น soluble aggregate ส่วนที่ 40 °ซ การเกาะตัวของมัยโอซินเกิดมากขึ้นเนื่องจาก อุณหภูมินี้สูงกว่าอุณหภูมิที่มัยโอซินเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ (denaturation temperature, T_d) คือประมาณ 35 °ซ การเพิ่ม CaCl_2 ที่สภาวะการบ่ม 40 °ซ ในระดับความเข้มข้น 10-100 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้มัยโอซินเกิดการเกาะ



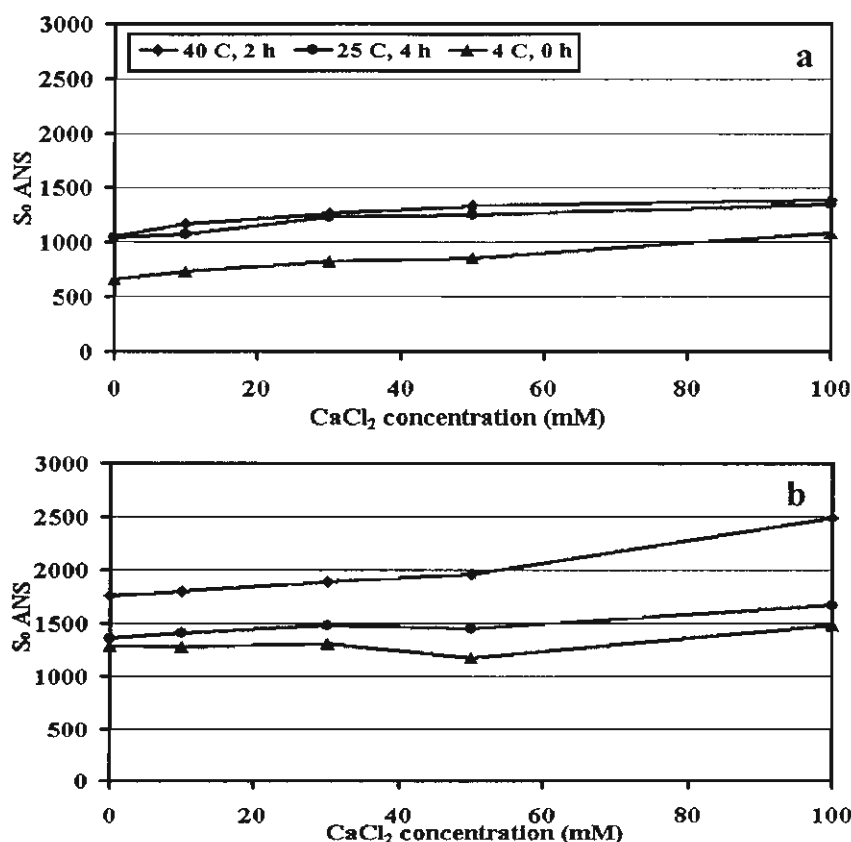
รูปที่ 5 ปริมาณโปรตีนที่คงเหลือหลังจากบ่มมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่สภาวะเซตตั้ง

ตัวมากขึ้น การเกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ในกรณีนี้ไม่ได้เกิดขึ้นจากเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส เนื่องจากขั้นตอนในการสกัดมัยโอซินมีการล้างและตกตะกอนหลายครั้ง ทำให้สามารถกำจัดทรานสกลูตามิเนสออกได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามัยโอซินบ่มที่ 25 หรือ 40 °ซ ไม่เกิดการเชื่อมโยงของพันธะ E-(γ -glutamyl)lysine ดังนั้นการเกาะตัวที่ตรวจพบนั้นน่าจะเกิดจากพันธะ noncovalent เป็นสำคัญ

แอคตินเกาะตัวรวมกันเป็นกลุ่มก้อนซึ่งตกตะกอนหลังจากปั่นเหวี่ยง แม้ในสภาวะที่ไม่ได้รับความร้อน (4 °ซ) และไม่มี CaCl_2 (รูปที่ 5b) ระดับการเกาะตัวสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น และการเติม CaCl_2 ส่งผลต่อการเกาะตัวของแอคตินเช่นเดียวกับมัยโอซิน แอคตินเกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนทั้งหมดเมื่อบ่มที่ 40 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 5b) ดังนั้น CaCl_2 ไม่เพียงแต่เหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะตัวของมัยโอซิน แต่ยังเหนี่ยวนำให้เกิดการเกาะตัวของแอคตินอีกด้วย

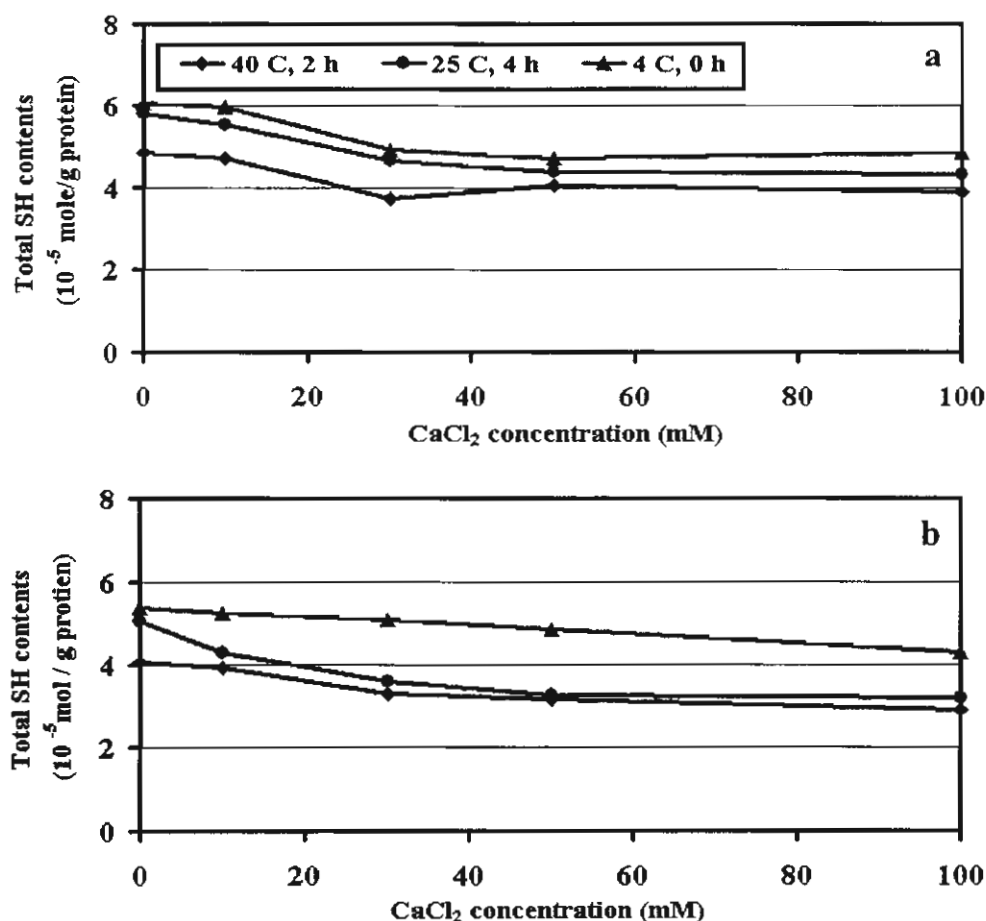
ค่า S_0 ANS ของมัยโอซินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CaCl_2 ทั้งตัวอย่างบ่มที่ 25 และ 40 °ซ (รูปที่ 6a) ซึ่งแสดงว่า Ca^{2+} ส่งเสริมให้มัยโอซินเปิดตัวออกมากขึ้น การเปิดตัวของมัยโอซินที่ 25 °ซ ถูกเหนี่ยวนำโดย Ca^{2+} เป็นสำคัญ ในขณะที่การเปิดตัวของมัยโอซินที่ 40 °ซ เกิดขึ้นจากปัจจัยของอุณหภูมิที่สูงกว่า Td และระดับ Ca^{2+} ระดับการเปิดตัวที่มากกว่านี้อาจส่งผลให้มัยโอซินเกิดการจับตัวรวมกันด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interactions) เกิดเป็นกลุ่มก้อนโปรตีนขนาดใหญ่ที่ตกตะกอนหลังจากปั่นเหวี่ยง ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า CaCl_2 เหนี่ยวนำให้เกิดการจับตัวกันของมัยโอซินด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ซึ่งแรงกระทำดังกล่าวอาจมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเจลในช่วงเซตติง

S_0 ANS ของแอคตินเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CaCl_2 และมีค่าสูงกว่าของมัยโอซินในทุกอุณหภูมิที่ศึกษา (4 25 และ 40 °ซ) (รูปที่ 6b) ทั้งนี้เนื่องจากแอคตินที่ได้จากการสกัดอยู่ในรูป inactivated actin เนื่องจากมีการเติม EGTA ในระหว่างการสกัด (Turoverov et al., 1999) ซึ่งแอคตินในรูปดังกล่าวจะเปิดตัวและเข้าจับกับ probe ที่มีความเป็นไฮโดรโฟบิกได้ง่าย (Lehrer 1972) การเปิดตัวดังกล่าวทำให้เกิดการจับตัวรวมกันระหว่างแอคตินด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ด้วยเหตุผลดังกล่าว แอคตินจึงเกิดการเกาะตัวเป็นก้อนได้มากกว่ามัยโอซิน



รูปที่ 6 ผลของแคลเซียมต่อค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีนมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่ความเข้มข้นแคลเซียมระดับต่างๆ

ปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมด (Total SH groups) ของมัยโอซินและแอคตินคือ ประมาณ 6×10^{-5} และ 5×10^{-5} โมล/ก.โปรตีน (รูปที่ 7a,b) ซึ่งเมื่อบ่มที่ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมดลดลงเหลือ 4.8×10^{-5} โมล/ก.โปรตีน อันเป็นผลเนื่องมาจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากความร้อน ปริมาณกลุ่มซัลไฟไฮดริลทั้งหมดของตัวอย่างที่เติม CaCl_2 ลดลงมากกว่าในตัวอย่างที่ไม่มี CaCl_2 (รูปที่ 7a) โดยเฉพาะในตัวอย่างที่บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง



รูปที่ 7 ผลของแคลเซียมต่อค่ากลุ่มซัลฟไฮดริลทั้งหมดของโปรตีนมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) ที่ความเข้มข้นแคลเซียมระดับต่างๆ

ผลของแคลเซียมต่อปริมาณกลุ่มซัลฟไฮดริลทั้งหมดของแอคตินมีลักษณะเดียวกับมัยโอซิน (รูปที่ 7b) ผลดังกล่าวแสดงว่า Ca^{2+} เหนี่ยวนำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ทั้งในมัยโอซินและแอคตินเมื่อ บ่มที่ 40 °ซ การเปิดตัวของโครงสร้างมัยโอซินและแอคตินที่ถูกเหนี่ยวนำโดย CaCl_2 ส่งผลให้กลุ่มซัลฟไฮดริลอิสระ (free SH groups) เปิดตัวสู่ภายนอกมากขึ้น ซึ่งมีโอกาสแลกเปลี่ยนซึ่งกันและกันเกิดพันธะไดซัลไฟด์ที่เรียกว่า disulfide interchanges มีรายงานผลของ CaCl_2 ในลักษณะเดียวกันนี้ใน α -crystallin (Valle et al., 2002) จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า นอกจากพันธะโควาเลนต์ ϵ -(γ -glutamyl) lysyl แล้ว แคลเซียมมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของพันธะไดซัลไฟด์และแรงกระทำไฮโดรโฟบิกโดยเฉพาะเมื่อบ่มที่ 40 °ซ ส่วนการบ่มที่ 25 °ซ เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง

conformation เช่นกัน แต่เกิดขึ้นในระดับที่น้อยกว่าที่ 40 °ซ การเพิ่มขึ้นของค่าเจลซูรีมิปลาทรายแดง เมื่อเติม CaCl_2 ในระดับร้อยละ 0.1 (≈ 10 มิลลิโมลาร์) และบ่มที่ 25 °ซ (Yongsawatdigul et al., 2002) แสดงให้เห็นว่า แคลเซียมมีผลต่อโครงสร้างของโปรตีนที่ 25 °ซ เช่นกัน

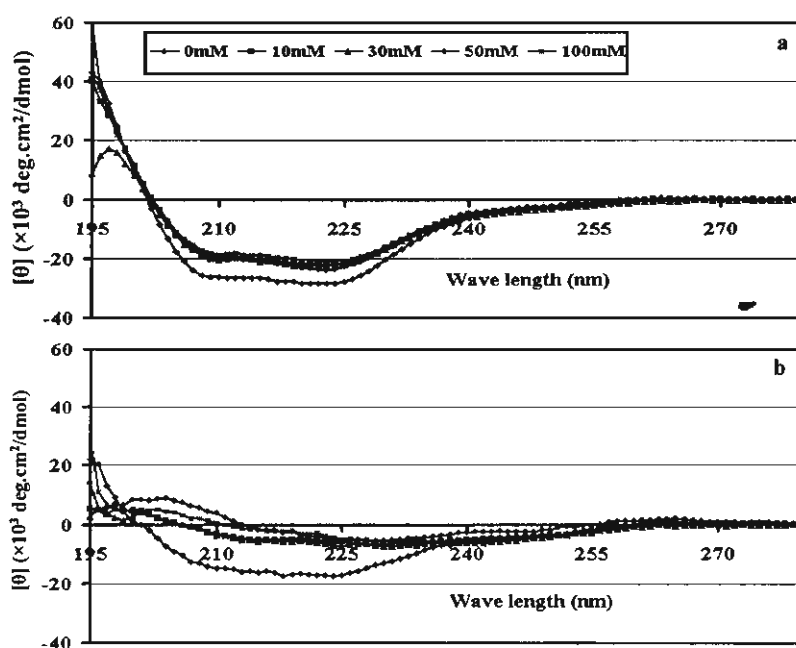
การเพิ่ม CaCl_2 ในระดับที่สูงกว่า 50 มิลลิโมลาร์ มีผลลดกิจกรรม Ca-ATPase (ตารางที่ 1) เนื่องจากโครงสร้างบริเวณ globular head ของมัยโอซินเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่เร่งกิจกรรม Ca-ATPase ดังนั้นระดับ CaCl_2 ที่สูงจึงมีผลต่อ conformation ของ globular head ในขณะที่การเปลี่ยนแปลง conformation ที่ความเข้มข้นของ CaCl_2 น้อยกว่า 50 มิลลิโมลาร์ อาจเกิดขึ้นที่บริเวณส่วน rod การเปลี่ยน conformation ของมัยโอซินเนื่องจาก Ca^{2+} อาจเกิดจากแรงกระทำทางประจุไฟฟ้า (electrostatic interactions) ที่พีเอช 7 นั้นมัยโอซินมีประจุรวมเป็นลบเนื่องจาก pI ของมัยโอซินมีค่าประมาณ 4.8-6.2 (Stefansson and Hultin, 1994) การจับกันระหว่าง Ca^{2+} และประจุลบบนโครงสร้างของมัยโอซินทำให้มัยโอซินเปิดตัวออกและสูญเสีย conformation การสูญเสีย conformation ด้วยสาเหตุนี้มีรายงานใน β -lactoglobulin (Simons et al., 2002) และเมื่อพิจารณาค่าประจุลบบนโครงสร้างของมัยโอซินพบว่าส่วน rod มีค่าประจุไฟฟ้าสุทธิ (Z) ประมาณ -34 ถึง -52 ในขณะที่ส่วน globular head มีค่าประจุสุทธิ 6 ถึง 16 ดังนั้นการเข้าจับของ Ca^{2+} จึงน่าจะเกิดบริเวณ rod

ตารางที่ 1 ผลของ CaCl_2 ต่อกิจกรรม Ca-ATPase ของมัยโอซินจากปลาทรายแดง

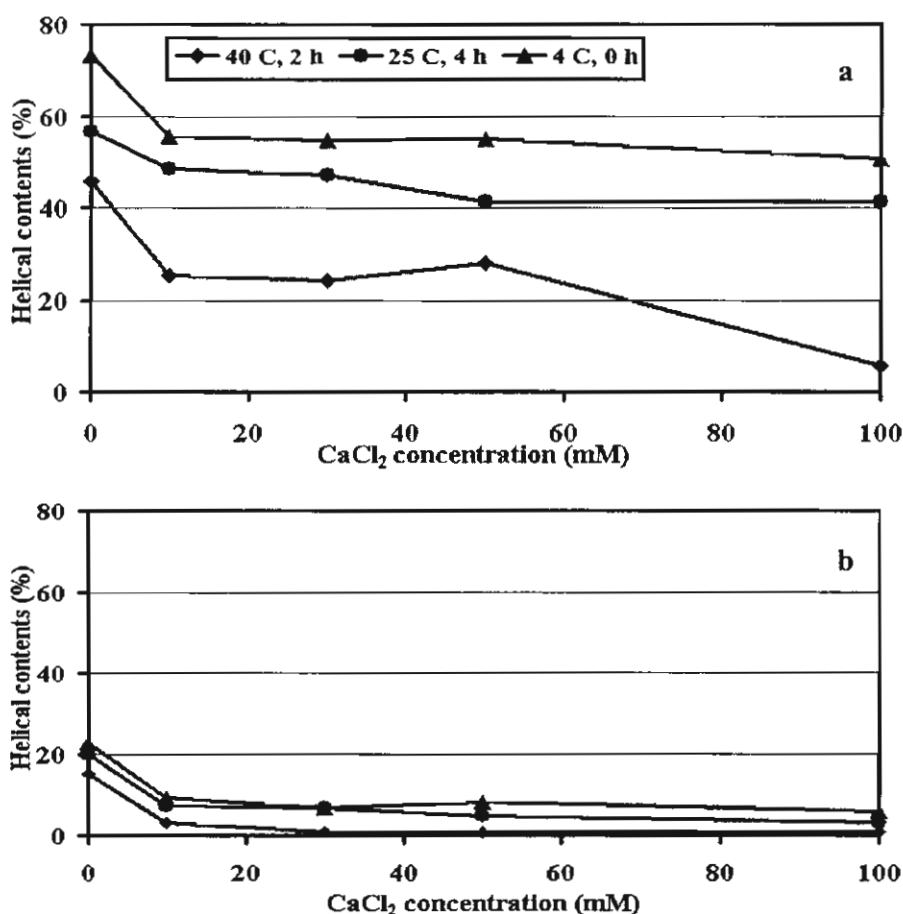
CaCl ₂ concentration (mM)	Ca-ATPase activity (μ mole Pi/mg protein/min)
0	0
3.3	0.274 $\pm$ 0.025
10	0.297 $\pm$ 0.013
30	0.313 $\pm$ 0.023
50	0.299 $\pm$ 0.010
100	0.229 $\pm$ 0.011
150	0.185 $\pm$ 0.020
200	0.106 $\pm$ 0.019

อาจกล่าวได้ว่าบริเวณ rod ของมัยโอซินถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation โดย CaCl_2 ได้ง่ายกว่าส่วน globular head ซึ่งสอดคล้องกับผลในตารางที่ 1 ที่ความเข้มข้นของ CaCl_2 ในระดับ 10-50 มิลลิโมลาร์ นั้นไม่มีผลกระทบต่อ conformation ของส่วน globular head และต่อค่ากิจกรรม Ca-ATPase

จาก CD spectra จะเห็นได้ว่าโครงสร้างหลักในระดับทุติยภูมิของมัยโอซินคือ โครงสร้างแอลฟาฮีลิกซ์ (รูปที่ 8a) นอกจากนี้ยังพบว่า CaCl_2 ส่งเสริมการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิของทั้งมัยโอซินและแอคตินแม้ที่ 4 °ซ ก็ตาม ดังจะเห็นได้ว่าเมื่อไม่มี CaCl_2 ปริมาณฮีลิกซ์คิดเป็นร้อยละ 71.2 ในขณะที่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ CaCl_2 เป็น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาณฮีลิกซ์ลดลงเหลือร้อยละ 51.4 (รูปที่ 9a) การเติม CaCl_2 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างฮีลิกซ์ของมัยโอซินที่ 40 °ซ มากกว่าที่ 25 °ซ ทั้งนี้เนื่องจากที่อุณหภูมิสูงมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเปิดตัวเนื่องจากความร้อนด้วย Ogawa et al (1995) ได้รายงานว่าการสูญเสียโครงสร้างฮีลิกซ์เป็นเงื่อนไขจำเป็นต่อการเกิดเซทติง ดังนั้นการเติม CaCl_2 มีผลให้เกิดการเปิดตัวของมัยโอซิน และเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างฮีลิกซ์มากขึ้น กอปรกับเพิ่มพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ซึ่งจะนำไปสู่แรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างสายมัยโอซิน และเกิดพันธะไดซัลไฟด์มากขึ้น



รูปที่ 8 CD spectra ของมัยโอซิน (a) และ แอคติน (b) บ่มที่ 4 °ซ ที่ความเข้มข้น CaCl_2 ต่างๆ



รูปที่ 9 ผลของ CaCl_2 ต่อปริมาณโครงสร้างอีลิกซ์ของมัยโอซิน (a) และแอคติน (b) บ่มที่สภาวะเซตติง

โครงสร้างของแอคตินมีปริมาณอีลิกซ์ต่ำกว่ามัยโอซินคือประมาณร้อยละ 28.73 ที่ 4 °ซ (รูปที่ 9b) Nagy et al. (1972) รายงานว่าโครงสร้างแอลฟาอีลิกซ์ในแอคตินมีอยู่ประมาณร้อยละ 30 ปริมาณโครงสร้างอีลิกซ์ลดลงเมื่อบ่มที่ 25 °ซ ที่ CaCl_2 10 มิลลิโมลาร์ การเพิ่มระดับแคลเซียมไม่มีผลลดโครงสร้างอีลิกซ์ลงไปมากกว่านี้ การลดลงของโครงสร้างอีลิกซ์เกิดขึ้นที่ 40 °ซ เช่นเดียวกับในมัยโอซิน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าแคลเซียมเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างระดับทุติยภูมิของแอคติน

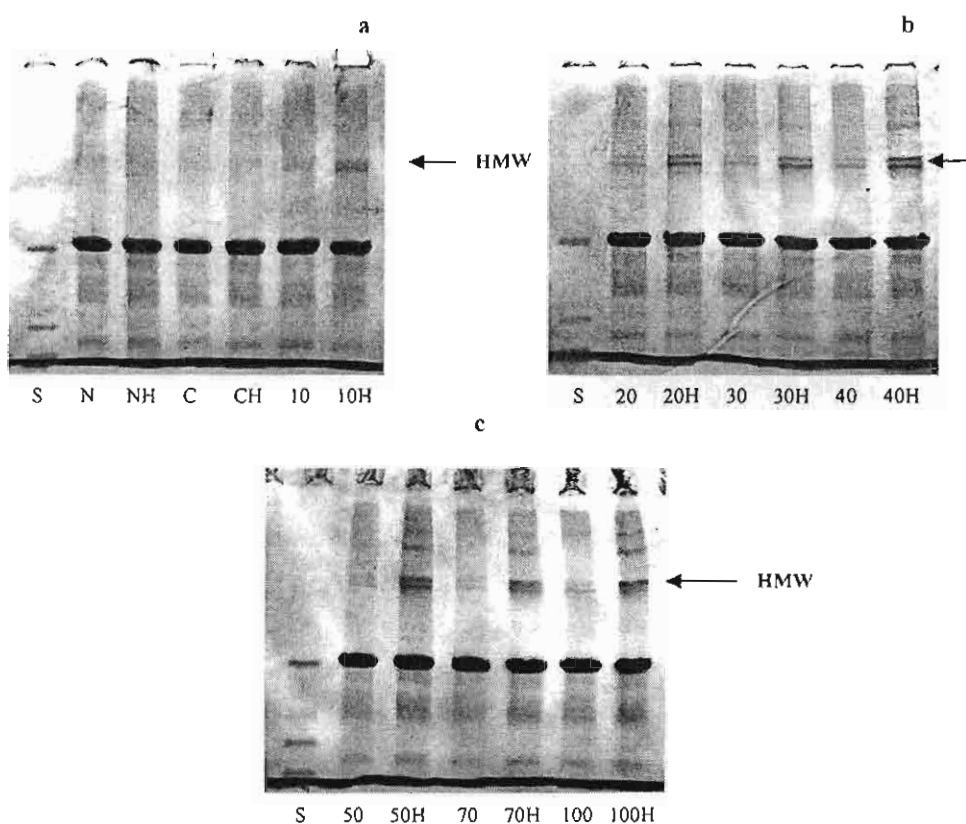
2. ผลของแคลเซียมต่อการเชื่อมข้ามและเกาะตัวของแอคโตมัยโอซิน

จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าแคลเซียมมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง conformation ของมัยโอซินและแอคติน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดเซตติง เพื่อศึกษา

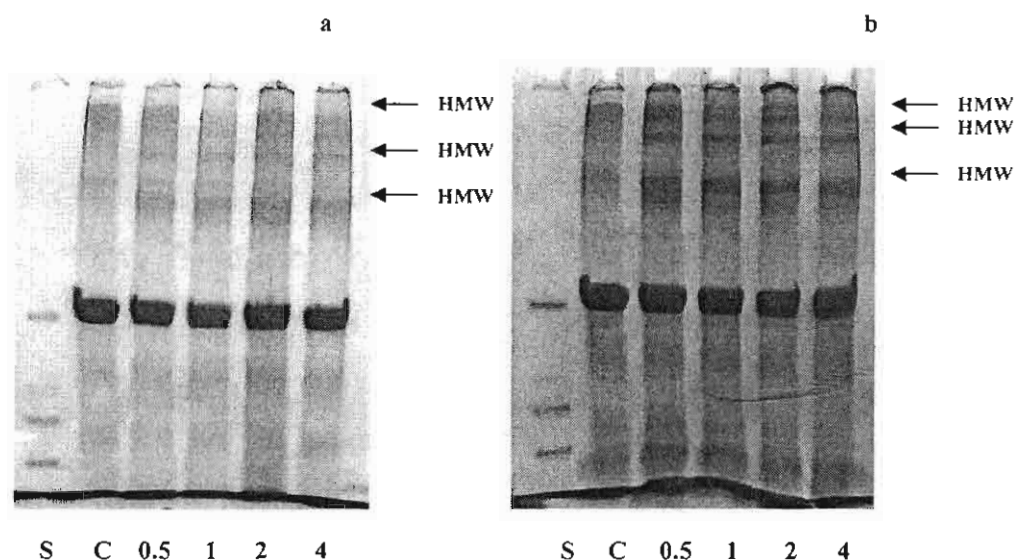
ประเด็นการเกาะตัวของแอคโตมัยโอซินซึ่งเหนียวนาโดยทรานสกลูตามิเนส จึงได้ศึกษาในปลานิล ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณสมบัติในการเกิดเจลที่ดี

2.1 ผลของแคลเซียมต่อองค์ประกอบโปรตีนจากการวิเคราะห์โดย SDS-PAGE

การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมเหนียวนาให้เกิดเชื่อมโยงโมเลกุลขนาดใหญ่ (high molecular weight, HMW) ของแอคโตมัยโอซินจากปลานิลเมื่อบ่มที่ 40 °ซ (รูปที่ 10) โปรตีนโมเลกุลขนาดใหญ่นี้ไม่สามารถถูกแยกให้เป็นหน่วยเล็กได้ด้วยสารละลาย sodium dodecyl sulfate (SDS) และ β -mercaptoethanol (BME) แสดงว่าการเกาะตัวเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ได้เกิดจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิก และ/หรือ พันธะไดซัลไฟด์ แต่อาจเกิดจากพันธะไอโซเปปไทด์ซึ่งเป็นผลจากกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสที่ยังคงยึดอยู่กับแอคโตมัยโอซิน และเนื่องจากเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่ต้องการแคลเซียมไอออนเพื่อเร่งปฏิกิริยา ดังนั้นการเพิ่มแคลเซียมไอออนจึงส่งผลให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาดีขึ้น เกิดเป็นโมเลกุลขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มแคลเซียม ยังมีผลเพิ่มโปรตีนที่ขนาดโมเลกุลใหญ่ (HMW) แม้ในตัวอย่างที่ไม่ได้ให้ความร้อน โดยเฉพาะที่ระดับแคลเซียมเข้มข้น 70 และ 100 มิลลิโมลาร์ โปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม (รูปที่ 11) ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าวอาจมีผลเนื่องจากกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสที่ไม่ได้ถูกกำจัดออกโดยสมบูรณ์ในช่วงของการสกัดแอคโตมัยโอซิน ผลดังกล่าวนี้แตกต่างจากระบบมัยโอซินและแอคตินที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ทั้งนี้เนื่องจากการเตรียมมัยโอซินและแอคตินมีการล้าง ละลาย และตกตะกอนโปรตีนหลายขั้นตอน ทำให้ทรานสกลูตามิเนสถูกกำจัดออกไปได้ ผลที่ได้จากแอคโตมัยโอซินนี้น่าจะเป็นตัวแทนของปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นในซูริมิ

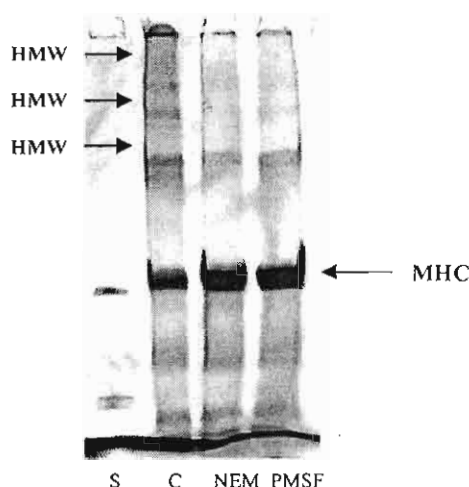


รูปที่ 10 SDS-PAGE ของสารละลายแอกโตมัยซินปลาไนในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 10 มิลลิ - โมลลาร์ (a), 20-40 มิลลิโมลลาร์ (b), 50-100 มิลลิโมลลาร์ (c) S = standard molecular weight, N = negative control (+EGTA), C = control (ไม่ได้เติมแคลเซียม), 10-100 = ความเข้มข้นของ แคลเซียมในหน่วยมิลลิโมลลาร์และไม่มีการบ่ม, 10H-100H = ตัวอย่างซึ่งมีแคลเซียมและบ่มที่ 40 °ซ 30 นาที



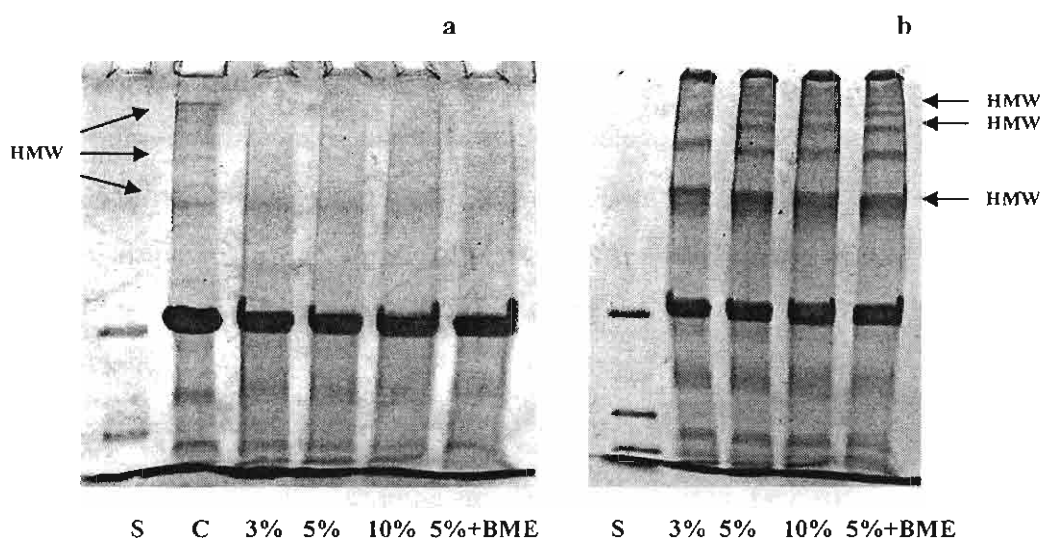
รูปที่ 11 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมายซินปลาในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียมไอออน 70 มิลลิโมลาร์ (a), 100 มิลลิโมลาร์ (b) S = standard molecular weight, C = control, 0.5-4 = เวลาในการบ่มที่ 40 °ซ ในหน่วยชั่วโมง

เพื่อพิสูจน์ว่าโปรตีนที่มีโมเลกุลใหญ่ขึ้น เกิดจากกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนสในกล้ามเนื้อปลา จึงได้ทดลองบ่มแอคโตมายซินกับสารยับยั้งทรานสกลูตามิเนสคือ phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์และ N-ethylmaleimide (NEM) เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และพบว่าตัวอย่างที่เติมสารยับยั้งนั้น แถบความเข้มของโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลใหญ่ลดลง (รูปที่ 12) ซึ่งแสดงว่าโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลขนาดใหญ่เกิดจากกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสในเนื้อปลา



รูปที่ 12 SDS-PAGE ของสารละลายแอกโตมัยซินปลานิลในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.4 โมลาร์และอิมิดาโซลบัฟเฟอร์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ บ่มที่ความเข้มข้นแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ (C) และมีสารยับยั้งทรานสกลูตามิเนส, NEM และ PMSF โดยบ่มที่ 40 °ซ 2 ชั่วโมง S = standard molecular weight

นอกจากพันธะโควาเลนต์ที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยทรานสกลูตามิเนสแล้ว ยังพบว่าแรงกระทำไฮโดรโฟบิกมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพอลิเมอร์ของแอกโตมัยโอซิน โดยแคลเซียมมีผลเพิ่มแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างแอกโตมัยโอซิน เมื่อบ่มแอกโตมัยโอซินโดยไม่มีแคลเซียมที่ 40 °ซ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารละลายแอกโตมัยโอซินสามารถละลายใน treatment buffer ได้ และสังเกตพบพอลิเมอร์ของแอกโตมัยโอซิน (HMW) เล็กน้อย (รูปที่ 13a) แต่เมื่อนำตัวอย่างดังกล่าวละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และสารละลาย SDS+BME พบว่า HMW หายไป ซึ่งบ่งชี้ว่า HMW ในตัวอย่างที่ไม่มีแคลเซียมอาจเกิดจากการรวมตัวด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก แต่เมื่อบ่มสารละลายแอกโตมัยโอซินที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปรากฏว่าสารละลายแอกโตมัยโอซินไม่สามารถละลายใน treatment buffer และไม่สามารถ load ลงเจลได้ (รูปที่ 13b) เมื่อนำสารละลายแอกโตมัยโอซินดังกล่าวมาละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และสารละลาย SDS และ BME ปรากฏว่าสามารถแยกองค์ประกอบของแอกโตมัยโอซินได้ (รูปที่ 13b) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ เหนือกว่าทำให้เกิด soluble aggregate ซึ่งเกาะกันด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกเป็นสำคัญ



รูปที่ 13 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินบ่มที่ 40 °ซ 2 ชั่วโมง ในสถานะที่ไม่เติมแคลเซียม (a) และ แคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์และละลายในสารละลาย SDS เข้มข้น 3-10% และ SDS เข้มข้น 5%+BME เข้มข้น 2%, S = standard molecular weight, C = ตัวอย่างที่ไม่ได้ละลายใน SDS

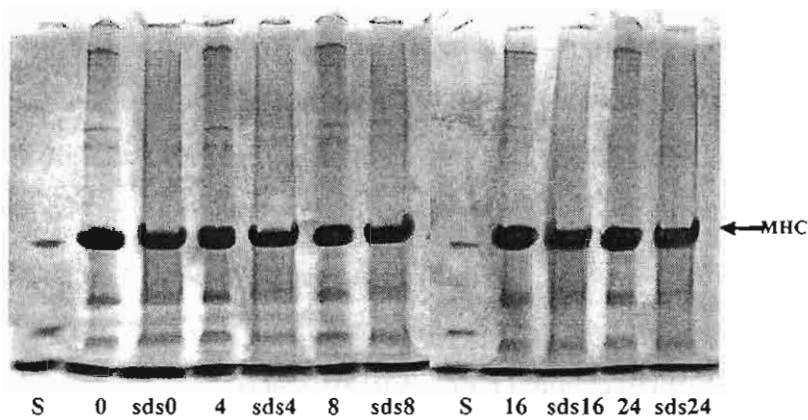
นอกจากนี้พันธะไดซัลไฟด์ไม่ใช่พันธะหลักใน soluble aggregate เนื่องจากรูปแบบของโปรตีนไม่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างที่ละลายในสารละลาย SDS และที่ละลายใน SDS+BME (รูปที่ 13b) HMW ที่ปรากฏในสถานะที่มีแคลเซียมคือพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่ไดซัลไฟด์ ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดขึ้นเนื่องจากกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนส แต่ HMW ที่เกิดขึ้นในสถานะที่ไม่มีแคลเซียมนั้นเกิดจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิกเป็นสำคัญ ดังนั้นการบ่มเนื้อปลาโดยไม่เติมแคลเซียมที่ 40 °ซ ทำให้ได้ค่าแรงที่สูงกว่าตัวอย่างที่ไม่ได้บ่ม เนื่องจากแรงกระทำไฮโดรโฟบิกที่เพิ่มขึ้น แต่การบ่มในสถานะที่มีแคลเซียมจะยังทำให้ค่าแรงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเกิด HMW ซึ่งเป็นการเชื่อมโยงโดยพันธะโควาเลนต์ที่ไม่ใช่ไดซัลไฟด์ (non-disulfide covalent bond)

การบ่มแอคโตมัยโอซินปลาบิลที่ 40 °ซ ในสถานะที่มีแคลเซียมจะเหนี่ยวนำให้เกิด soluble aggregate และ HMW โดย soluble aggregate นั้นเป็นการเกาะตัวกันของแอคโตมัยโอซินด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ส่วน HMW เกิดจากกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนส การบ่มแอคโตมัยโอซินที่ 40 °ซ ในสถานะที่ไม่มีแคลเซียม เหนี่ยวนำให้เกิด HMW เช่นกัน แต่พันธะหลักที่เกิดขึ้นคือแรงกระทำ

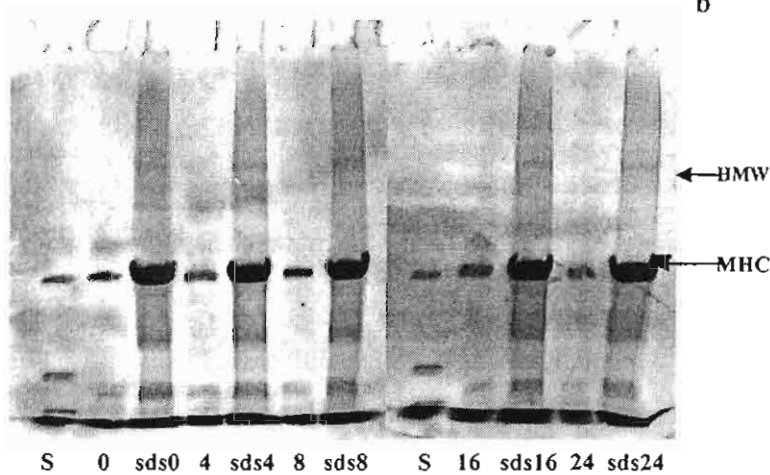
ไฮโครโฟบิก ปริมาณแคลเซียมที่จำกัดในตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียมอาจไม่สามารถกระตุ้นกิจกรรมของทรานสกลูตามินสให้เกิดพันธะโควาเลนต์ได้

การเติมแคลเซียมนอกจากจะมีผลต่อการเกิด soluble aggregate ของแอคโตมัยโอซินที่ 40 °ซ แล้ว ยังมีผลต่อการเกิด soluble aggregate ที่ 4 °ซ ด้วย ในสถานะที่ไม่มีแคลเซียม องค์ประกอบของแอคโตมัยโอซินที่ไม่ได้เติม SDS (0-24, รูปที่ 14a) และที่เติม SDS (sds0-24, รูปที่ 14a) มีลักษณะคล้ายกัน แสดงว่าไม่เกิด soluble aggregate แต่ที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ตัวอย่างที่ไม่ได้

a



b



รูปที่ 14 SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตมัยโอซินที่ไม่มีแคลเซียม (a) และแคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ (b) บ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 0-24 ชั่วโมง 0-24 = ตัวอย่างบ่มเป็นเวลาที่ต่างๆและผสมกับ treatment buffer, sds0-sds24 =ตัวอย่างที่ละลาย SDS เข้มข้น 5% ก่อนผสม treatment buffer, S = standard molecular weight

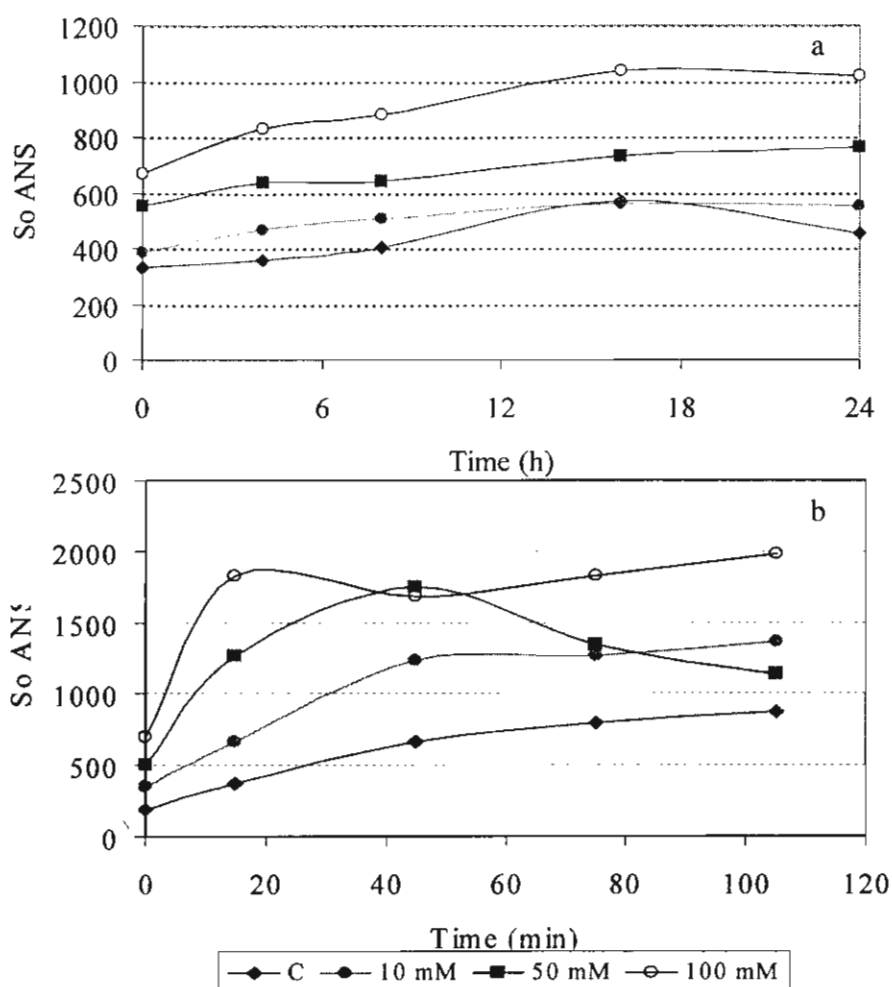
ละลายด้วย SDS พบมัยโอซินสายหลักเพียงเล็กน้อย (0-24, รูปที่ 14b) และเมื่อนำไปละลายด้วย SDS พบมัยโอซินสายหลักกลับคืนมา (sds0-24, รูปที่ 14b) ซึ่งแสดงว่าแอกโตมัยโอซินเกิด soluble aggregate ขึ้นในสภาวะที่แคลเซียมเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ โดยพันธะที่ทำให้เกิด soluble aggregate คือพันธะไฮโดรโฟบิก เนื่องจากถูกทำลายด้วยสารละลาย SDS

2.2 ผลของแคลเซียมต่อการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอกโตมัยโอซิน

จากผล SDS-PAGE ได้บ่งชี้ว่านอกจากแคลเซียมจะมีผลต่อการเกิดพันธะโควาเลนต์โดยทรานสกลูตามิเนสแล้ว แคลเซียมยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกทั้งที่ 4 และ 40 °ซ ซึ่งแรงกระทำดังกล่าวทำให้เกิด soluble aggregate ของแอกโตมัยโอซิน แม้ว่าจะเป็นปฏิกิริยาชนิดที่ตาม เพื่อพิสูจน์ว่าแคลเซียมมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก จึงวิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอกโตมัยโอซิน และพบว่าในตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่มีแคลเซียม ค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาในการบ่มที่ 4 และ 40 °ซ เพิ่มขึ้น (รูปที่ 15a,b) โดยค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอกโตมัยโอซินบ่มที่ 40 °ซ เพิ่มขึ้นในอัตราที่สูงกว่าที่ 4 °ซ การเพิ่มขึ้นของค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเป็นการบ่งชี้ถึงการเปิดตัวออก (unfold) ของโปรตีน การเปิดตัวออกของโปรตีนที่ 40 °ซ มีมากกว่าที่ 4 °ซ เนื่องจากอุณหภูมิที่แอกโตมัยโอซินในปลาสูญเสียสภาพธรรมชาติ(denature) คือที่ 30-40 °ซ (Lanier, 2000) การเพิ่มปริมาณแคลเซียมมีผลให้การเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอกโตมัยโอซินเพิ่มขึ้นทั้งที่ 4 และ 40 °ซ ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของมัยโอซินที่กล่าวมาแล้วข้างต้น (รูปที่ 6) ดังนั้นแคลเซียมจึงมีผลเหนี่ยวนำให้แอกโตมัยโอซินเปิดตัวออกมากขึ้นทั้งที่ 4 และ 40 °ซ เมื่อแอกโตมัยโอซินเปิดตัวออก จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนด้วยแรงกระทำไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) ทำให้เกิด soluble aggregate ของแอกโตมัยโอซิน

2.3 ผลของแคลเซียมต่อโครงสร้างทุติยภูมิของแอกโตมัยโอซิน

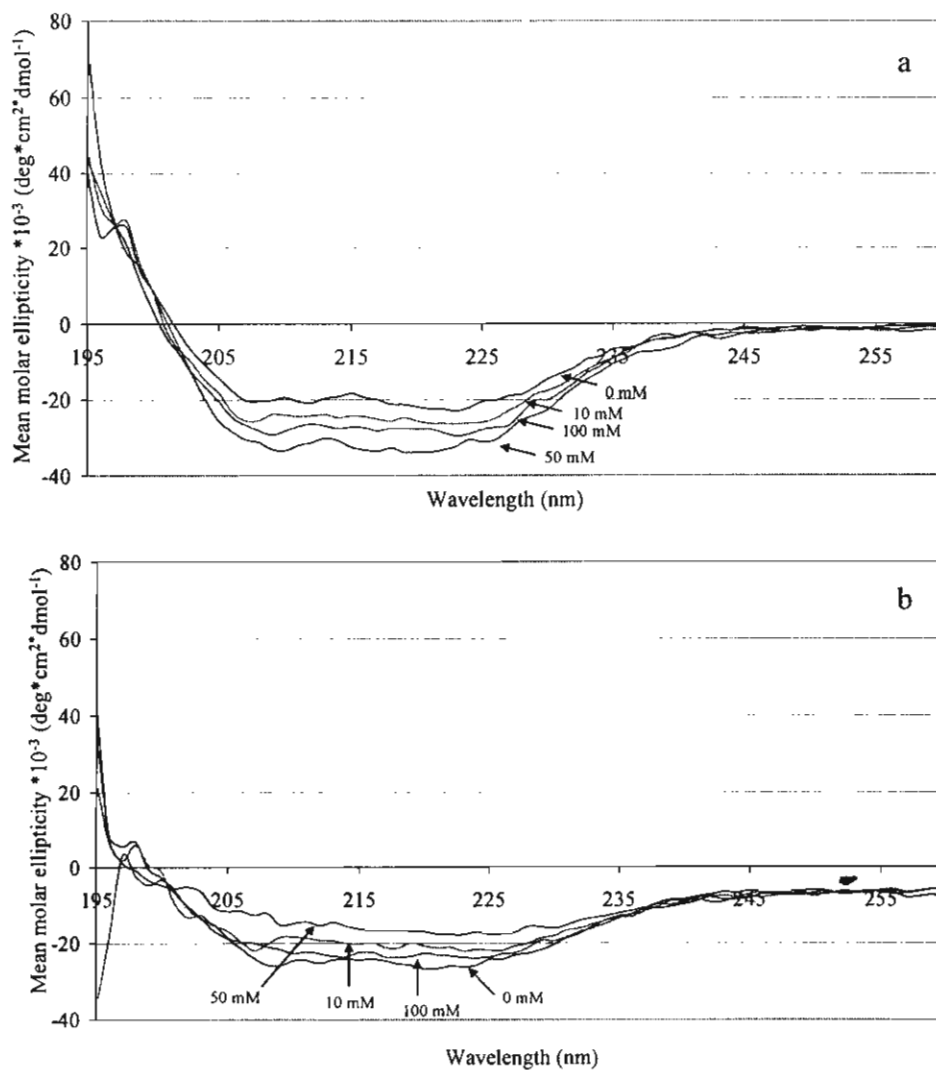
ที่ 4 °ซ แคลเซียมมีผลช่วยเสถียรโครงสร้างทุติยภูมิของแอกโตมัยโอซินปลานิล (รูปที่ 16a) เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โครงสร้างอีลิคซ์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับเริ่มต้นที่ทุกระดับความเข้มข้นของแคลเซียม (ไม่ได้แสดง) ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ซึ่งเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเช่นกันเมื่อบ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 15a) แต่เมื่อให้ความร้อนที่ 40 °ซ 30 นาที เกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิของแอกโตมัยโอซินอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 16b) ซึ่งเกิดขึ้นจากความร้อน แคลเซียมมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียโครงสร้างในระดับทุติยภูมิมากขึ้น โดยเกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิมากที่สุดที่ระดับแคลเซียม 50 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 16b) โครงสร้าง



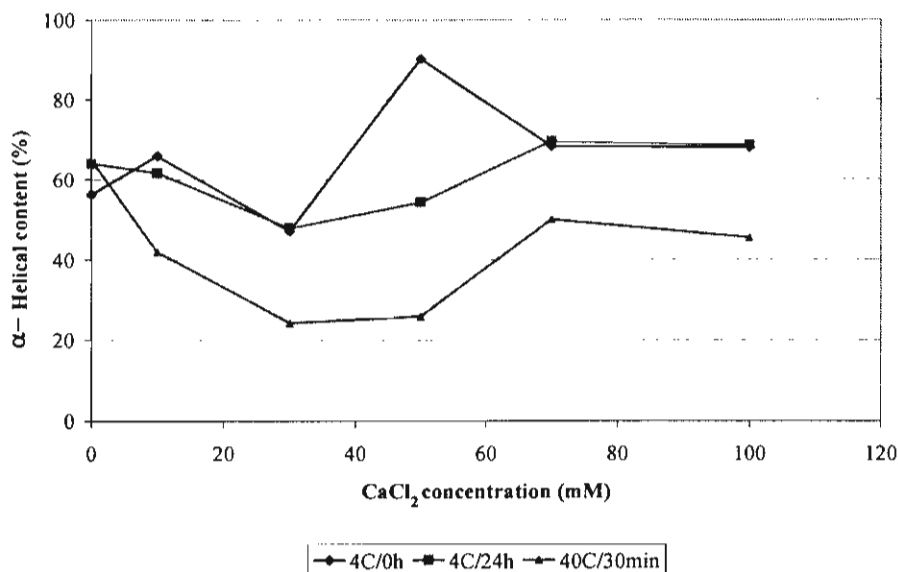
รูปที่ 15 การเปลี่ยนแปลงค่าพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียมต่างๆ และบ่มที่ 4 °ซ (a) และ 40 °ซ (b) เป็นระยะเวลาต่างๆ

ฮีลิกซ์ลดลงตามระดับแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 17) การสูญเสียโครงสร้างในระดับทุติยภูมิที่ 40 °ซ สอดคล้องกับการเพิ่มปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโปรตีน การบ่มแอคโตมัยโอซินที่ 40 °ซ ทำให้โปรตีนเปิดตัวออก เกิดการสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิ โครงสร้างฮีลิกซ์ลดลง การเพิ่มแคลเซียมมีผลทำให้ระดับการเปิดตัวออกของโปรตีนมากขึ้น และสูญเสียโครงสร้างทุติยภูมิมากขึ้นด้วย การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลให้ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้น ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิก ระหว่างแอคโตมัยโอซินเพิ่มขึ้นด้วย ดังนั้นการเกิดเซตดังที่ 40 °ซ นั้นเป็นผลมาจากกิจกรรมทรานสกลูตามิเนสซึ่งถูกกระตุ้นเมื่อมีปริมาณแคลเซียมที่เหมาะสม ทำให้เกิดพันธะ ϵ -(γ -glutamyl)lysine นอกจากนี้แคลเซียมยังมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง

หุติขภูมิของแอคโคมัยไอซินที่ 40 °ซ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างดังกล่าวเป็นการส่งเสริมแรงกระทำไฮโดรโฟบิกระหว่างสายแอคโคมัยไอซิน



รูปที่ 16 CD spectra ของแอคโคมัยไอซินที่แคลเซียมระดับต่างๆ ที่ 4 °ซ (a) และบ่มที่ 40 °ซ เป็นเวลา 30 นาที (b)



รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างอีลิคซ์ของแอคโตมัยโอซินที่ระดับแคลเซียมและสถานะการบ่มต่างๆ

2.4 ผลของแคลเซียมต่อคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของแอคโตมัยโอซิน

เมื่อให้ความร้อนแก่สารละลายแอคโตมัยโอซินที่ 90 °ซ 15 นาที ปรากฏว่าตัวอย่างที่ไม่ได้เติมแคลเซียมและที่เติมแคลเซียม 10-30 มิลลิโมลาร์ไม่เกิดเจล (รูปที่ 18a,b) สามารถวัดลักษณะเนื้อสัมผัสได้ที่ระดับแคลเซียม 40-100 มิลลิโมลาร์ การบ่มตัวอย่างที่ไม่มีแคลเซียมที่ 4 °ซ 12 ชั่วโมง เหนียวน่าให้เกิดเจล การเพิ่มปริมาณแคลเซียมทำให้ได้เจลที่ได้มีค่าแรงและระยะทาง ณ จุดแตกหักเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าแคลเซียมเหนียวน่าให้เกิดการเซตตัวของสารละลายแอคโตมัยโอซิน แม้กระทั่งที่ 4 °ซ ซึ่งจากการศึกษาข้างต้น พันธะที่เหนียวน่าให้เกิดเจลในสภาวะการบ่มนี้คือแรงกระทำไฮโดรโฟบิก เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าโปรตีนจากปลาในแถบร้อนไม่เกิดการเซตตัวที่อุณหภูมิต่ำ เนื่องจากโครงสร้างของมัยโอซินมีความเสถียรสูง อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ แสดงให้เห็นว่าโปรตีนกล้ามเนื้อจากปลาแถบร้อนเช่นปลานิล สามารถเกิดเซตตัวได้เมื่อมีปริมาณแคลเซียมเพียงพอ (> 10 มิลลิโมลาร์) ที่จะเหนียวน่าให้โปรตีนเปิดตัวออก และเกิดแรงกระทำไฮโดรโฟบิกได้

ปริมาณแคลเซียมมีผลเพิ่มคุณสมบัติทางเนื้อสัมผัสของเจลแอคโตมัยโอซินอย่างเด่นชัดเมื่อบ่มที่ 40 °ซ 30 นาที (รูปที่ 18b) ที่ระดับแคลเซียม 100 มิลลิโมลาร์ เจลแอคโตมัยโอซินมีค่าแรงสูงสุด ($p < 0.05$) การเพิ่มระดับแคลเซียมส่งผลให้เกิดการเร่งกิจกรรมของทรานสกลูตามิเนส ทำให้เกิดการเชื่อมข้ามสายแอคโตมัยโอซินด้วยพันธะไอโซเปปไทด์ ϵ -(γ -glutamyl) lysine จึงทำให้ได้เจลที่มีความ