ชื่อวิทยานิพนธ์	การจำแนกคุณลักษณะของโปรตีนกล้ามเนื้อและอันตรกิริยาระหว่างโปรตีนไมโอไฟบริลกับไมโอโกลบินของปลาเนื้อดำที่ใช้ผลิตซูริมิ
ผู้เขียน	นายมนัส ชัยจันทร์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา	2549

บทคัดย่อ

จากการศึกษาและจำแนกองค์ประกอบของกล้ามเนื้อปลาเนื้อดำซึ่งประกอบด้วยปลาซาร์ดีนและปลาแมกเคอเรล พบว่ามีปริมาณโปรตีนและปริมาณไขมันแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อดำมีปริมาณไขมันและไมโอโกลบินสูงกว่ากล้ามเนื้อขาวสำหรับปลาทั้งสองชนิด และเนื้อปลาซาร์ดีนมีองค์ประกอบทั้งสองสูงกว่าเนื้อปลาแมกเคอเรล โปรตีนที่ละลายในด่างและสโตรมาในกล้ามเนื้อดำของปลาทั้ง 2 ชนิดมีปริมาณสูงกว่าในกล้ามเนื้อขาว กล้ามเนื้อปลาแมกเคอเรลประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในปริมาณสูงกว่ากล้ามเนื้อปลาซาร์ดีน การล้างเนื้อปลาซาร์ดีนและเนื้อปลาแมกเคอเรลด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.2 และ 0.5 ตามลำดับ สามารถสกัดไมโอโกลบินได้สูงสุดโดยเฉพาะสำหรับการล้างในครั้งแรก การล้างเนื้อปลาด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ให้เจลซูริมิซึ่งมีค่าแรงเจาะทะลุสูงกว่าเนื้อปลาที่ไม่ได้ผ่านการล้างและล้างด้วยน้ำกลั่น (P<0.05) โดยทั่วไปซูริมิจากปลาซาร์ดีนมีความสามารถในการเกิดเจลและให้เจลที่มีความขาวสูงกว่าซูริมิจากปลาแมกเคอเรล กระบวนการใช้ด่างมีผลต่อความขาวและสมบัติเจลของซูริมิจากปลาซาร์ดีนและปลาแมกเคอเรลแตกต่างกัน การล้างด้วยน้ำกลั่นร่วมกับกระบวนการใช้ด่างสามารถปรับปรุงความขาวของเจลซูริมิจากปลาซาร์ดีนได้เพิ่มขึ้น เนื่องจากสามารถลดปริมาณไมโอโกลบินในกล้ามเนื้อได้มากกว่าวิธีการล้างแบบดั้งเดิม อย่างไรก็ตามเจลซูริมิจากปลาแมกเคอเรลที่ล้างด้วยน้ำกลั่นให้ความขาวสูงสุด กระบวนการใช้ด่างส่งผลให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยสังเกตจากกิจกรรมเอนไซม์ Ca^{2+}-ATPase ที่ลดลงและมีการเพิ่มขึ้นของค่าไฮโดรโฟบิซิตีบริเวณพื้นผิว

เมื่อเก็บรักษาเนื้อปลาซาร์ดีนและปลาแมกเคอเรลในน้ำแข็งเป็นเวลาเพิ่มขึ้น ปริมาณรงควัตถุทั้งหมดที่สกัดได้และปริมาณเหล็กที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนฮีมลดลง (P<0.05) แต่ปริมาณเหล็กที่ไม่ได้เป็นองค์ประกอบในโปรตีนฮีมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การดูดกลืนแสงในช่วง

แสงสีน้ำเงินของไมโอโกลบิน (Soret band; 350-450 nm) ลดลงตลอดการเก็บรักษา ซึ่งบ่งชี้ถึงการสูญเสียโครงสร้างของโปรตีนฮีมโดยสอดคล้องกับการลดลงของค่าดัชนีสีแดงของกล้ามเนื้อปลา ปฏิกริยาออกซิเดชันของไมโอโกลบินเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงความยาวคลื่นในการดูดกลืนแสงสูงสุดไปด้านแสงสีน้ำเงินของไมโอโกลบิน (Blue shift) ในปลาทั้ง 2 ชนิด และการเพิ่มขึ้นของปริมาณเมทไมโอโกลบินสัมพันธ์กับการเกิดสีคล้ำของเนื้อปลา นอกจากนี้การเสื่อมเสียของไขมันเนื่องจากปฏิกริยาออกซิเดชันและการย่อยสลายเกิดขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง (15 วัน) การเกิดเพอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นในช่วง 6 วันแรกของการเก็บรักษาและลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วนค่า TBARS เพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (P<0.05) นอกจากนี้ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง EPA (C20:5(n-3)) และ DHA (C22:6(n-3)) ลดลงระหว่างการเก็บรักษา ส่วนปริมาณกรดไขมันอิสระเพิ่มขึ้นระหว่างการเก็บรักษาโดยสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณไตรกลีเซอร์ไรด์และฟอสโฟลิปิด (P<0.05)

จากการสกัดและทำบริสุทธิ์ไมโอโกลบินจากกล้ามเนื้อดำของปลาซาร์ดีนพบว่าไมโอโกลบินที่แยกได้มีน้ำหนักโมเลกุล 15.3 กิโลดาลตัน อุณหภูมิสูงสุดที่ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของอนุพันธ์ไมโอโกลบินแต่ละชนิดมีค่าแตกต่างกัน กล่าวคือ ดีออกซีไมโอโกลบินมีอุณหภูมิที่ทำให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติที่ 74.5°ซ ส่วนออกซีไมโอโกลบินมีอุณหภูมิที่ก่อให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติที่ 64.5 และ 78.4°ซ ในขณะที่เมทไมโอโกลบินมีอุณหภูมิที่ก่อให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติที่ 59.0 และ 76.0°ซ ดีออกซีไมโอโกลบินและออกซีไมโอโกลบินสามารถดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 739 630 575 500 และ 405 นาโนเมตร ในขณะที่เมทไมโอโกลบินไม่สามารถดูดกลืนแสงที่ 575 นาโนเมตร อนุพันธ์ไมโอโกลบินทั้งหมดสามารถดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีน้ำเงิน (soret band) ได้สูงสุดที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร การเกิดออกซิเดชันของไมโอโกลบินเพิ่มมากขึ้นในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างรุนแรง ซึ่งส่งผลให้เกิดเมทไมโอโกลบินเพิ่มขึ้น เกิดการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนต์ของทริปโตเฟนและการลดลงของการดูดกลืนแสงในช่วงแสงสีน้ำเงินของไมโอโกลบิน นอกจากนี้เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°ซ และระยะเวลาเพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดการออกซิเดชันและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอโกลบินเพิ่มมากขึ้น

การเพิ่มความแรงอิออน อุณหภูมิและระยะเวลาของระบบจำลองส่งผลให้ ไมโอโกลบินที่สกัดจากปลาทูน่าเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนไมโอไฟบริลที่สกัดจากปลาบลูฟิชมากขึ้น (P<0.05) การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนไมโอไฟบริลระหว่างการแช่เยือกแข็งและการเติมแอลดีไฮด์โดยเฉพาะอย่างยิ่งชนิดไม่อิ่มตัวลงในระบบสามารถส่งเสริมการจับตัวกันระหว่างไมโอโกลบินกับโปรตีนไมโอไฟบริล โดยทั่วไปเมื่ออันตรกิริยาเกิดเพิ่มขึ้น ปริมาณไมโอโกลบินที่จับกับโปรตีนไม

โอไฟบริลและการเกิดเมทไมโอโกลบินเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับความขาวและกิจกรรมเอนไซม์ Ca^{2+}-ATPase ของโปรตีนไมโอไฟบริลที่ลดลง จากการพิจารณารูปแบบโปรตีนโดยอาศัยเทคนิค SDS-PAGE พบว่าอันตรกิริยาระหว่างไมโอโกลบินกับโปรตีนไมโอไฟบริลจากกล้ามเนื้อปลาเกิดจากพันธะโควาเลนท์ทั้งชนิดที่เป็นพันธะไดซัลไฟด์และชนิดที่ไม่ใช่พันธะไดซัลไฟด์ ส่งผลให้เกิดแถบโปรตีนขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 206 กิโลดาลตัล และ ไมโอซินเป็นโปรตีนหลักในกลุ่มโปรตีนไมโอไฟ บริลที่เกิดอันตรกิริยากับไมโอโกลบิน

Thesis Titl

Characterization of Muscle Proteins and Interaction between Myofibrillar Proteins and Myoglobin of Dark-Fleshed Fish Used for Surimi Production

Author Mr. Manat Chaijan

Major Program Food Technology

Academic Year 2006

ABSTRACT

The muscles of dark-fleshed fish species including sardine (*Sardinella gibbosa*) and mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) were characterized. Different fish species showed the different protein compositions and lipid content, depending upon muscle type. Lipid and myoglobin contents were higher in dark muscle than in ordinary muscle of both species and higher contents of both constituents were found in sardine muscle than mackerel muscle. Alkali-soluble protein and stroma contents were greater in dark muscle than in ordinary muscle. Mackerel muscle comprised a higher content of non-protein nitrogenous compounds than sardine muscle. The highest removal of myoglobin from sardine and from mackerel muscle was achieved when the mince was washed with 0.2% NaCl and 0.5% NaCl, respectively, particularly with the first washing cycle. The breaking force of directly heated and kamaboko gels from both sardine and mackerel mince washed with NaCl solution was higher than that of unwashed mince and water washed mince ($P<0.05$). In general, sardine surimi showed the superior gel-forming ability and whiteness to mackerel muscle. Alkaline solubilizing process affected the whiteness and gel properties of sardine and mackerel surimi differently. The highest whiteness was found in the gel of sardine surimi produced by alkaline process with prewashing but the highest whiteness was obtained in the gel of mackerel surimi washed with distilled water. However, alkaline solubilizing process induced the denaturation of muscle proteins as evidenced by the decrease in Ca^{2+}-ATPase

activity with the changes in the surface hydrophobicity. As a consequence, surimi prepared by alkaline solubilizing process showed the gel with lower breaking force and deformation than that conventionally prepared by water or NaCl washing (P<0.05).

With increasing iced storage time, the total extractable pigment and heme iron contents of sardine and mackerel muscles decreased (P<0.05), while the non-heme iron content tended to increase. The soret band of myoglobin decreased with the concomitant decrease in redness index (a^*/b^* ratio) when the storage time increased, suggesting the destruction of the heme protein. A blue shift of myoglobin observed in both species coincided with a slight increase in metmyoglobin content and was associated with the darkening of meats caused by the oxidation of myoglobin. Lipid deterioration, lipolysis and lipid oxidation, also occurred throughout the iced storage of 15 days. A progressive peroxide formation was observed up to 6 days of iced storage, followed by a continuous decrease from then for 9 days (P<0.05). The increase in thiobarbituric reactive substances (TBARS) was noticeable throughout the iced storage (P<0.05). Marked decreases in unsaturated fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (EPA; C20:5(n-3)) and docosahexaenoic acid (DHA; C22:6(n-3)), were observed as the storage time increased. A gradual increase in free fatty acid formation, with decreases in triglyceride and phospholipid contents, was also found during iced storage (P<0.05).

Myoglobin from the dark muscle of sardine (*Sardinella gibbosa*) with the molecular weight of 15.3 kDa was isolated and characterized. The different myoglobin derivatives exhibited varying thermal unfolding characteristics. Deoxymyoglobin showed a single distinct endothermic peak at 74.5°C, whereas two transition temperatures were noticeable for oxymyoglobin (64.5°C and 78.4°C) and metmyoglobin (59.0°C and 76.0°C). The spectrum of deoxymyoglobin and oxymyoglobin had absorption bands at 739, 630, 575, 500 and 405 nm, while the disappearance of the peak at 575 nm was found in the spectrum of metmyoglobin. The soret peak of all derivatives was noticeable at 405 nm. The autoxidation of myoglobin became greater at very acidic or alkaline conditions as evidenced by the formation of metmyoglobin, the changes in tryptophan fluorescence intensity as well as the disappearance of soret absorption. The higher temperature, particularly above 40°C, and the longer incubation time induced the higher metmyoglobin formation as well as the conformational changes.

The interaction between myoglobin and natural actomyosin (NAM) in the bluefish NAM-tuna myoglobin model system was pronounced at higher ionic strength, higher temperature and longer incubation times (P<0.05). The binding of NAM to myoglobin was greater in the presence of aldehyde especially unsaturated aldehyde (P<0.05). The changes in myofibrillar proteins during frozen storage also enhanced the adduction of myoglobin to NAM. When the interaction proceeded, the increases in the relative content of bound myoglobin and metmyoglobin formation with concurrent decreases in whiteness and Ca^{2+}-ATPase activity were generally observed (P<0.05). SDS-PAGE patterns of protein samples suggested that myoglobin-NAM interactions likely occurred via both disulfide and non-disulfide bonds and resulted in the formation of high-molecular-weight aggregates (>206 kDa). Among myofibrillar proteins, myosin was mainly involved in the interaction with myoglobin.