การศึกษาเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของโปรตีนปลาน้ำจืด

นางสาวจุฬาลักษณ์ เพชรพลอย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-533-509-6

FROZEN STABILITY OF MUSCLE PROTEIN FROM FRESHWATER FISH

Julalak Phetploy

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Food Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2005

ISBN 974-533-509-6

การศึกษาเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของโปรตีนปลาน้ำจืด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.สุนันทา ทองทา)
กรรมการ

(อ. ดร.ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ)
กรรมการ

(รศ. ดร.เสาวณีย์ รัตนพานี)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

จุฬาลักษณ์ เพชรพลอย : การศึกษาเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของโปรตีนปลาน้ำจืด
(FROZEN STABILITY OF MUSCLE PROTEIN FROM FRESHWATER FISH)
อ. ที่ปรึกษา : ผศ. ดร.จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 77 หน้า. ISBN 974-533-509-6

ศึกษาการเก็บแช่เยือกแข็งสารละลายแอคโตไมโอซิน ซึ่งสกัดจากปลาเขตร้อน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล *(Oreochromis niloticus)* ปลายี่สกเทศ *(Labeo rohita)* ปลานวลจันทร์น้ำจืด *(Cirrhira microlepis)* และปลาทรายแดง *(Nemipterus spp.)* ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีน และศึกษาผลของสารปกป้องโปรตีน ได้แก่ สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส และทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ในระดับ ร้อยละ 6 และร้อยละ 8 ในเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบดเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase activity) ในสภาวะที่มีอิออนชนิดต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}), แคลเซียม-แมกนีเซียม (Ca^{2+}-Mg^{2+}) และอีดีทีเอ (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ลดลงตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ขณะที่กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแมกนีเซียม-อีจีทีเอ (Mg^{2+}-Ethyleneglycol bis(2-aminoethylether tetraacetic acid; EGTA) และปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในตัวอย่างจากปลาทรายแดงเพิ่มขึ้นในช่วง 10 วันแรกของการเก็บจากนั้นลดลง ($p<0.05$) แต่ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในปลาน้ำจืด 3 สายพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ($p>0.05$) และเมื่อศึกษาโดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE) ในสภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (β-mercaptoethanol; BME) พบว่าตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาน้ำจืด 3 สายพันธุ์ มีความเข้มแถบโปรตีนไมโอซินสายหลักและแอคตินลดลงในวันที่ 5 ของการเก็บ แต่ในตัวอย่างจากปลาทรายแดงพบการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนดังกล่าวในวันที่ 20 ของการเก็บ อย่างไรก็ตามเมื่อศึกษาในสภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอลไม่พบการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนไมโอซินและแอคตินในตัวอย่างจากปลานิลและปลายี่สกเทศ แต่พบในตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงในวันที่ 20 ของการเก็บ แสดงให้เห็นถึงการเกาะตัวกันของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในตัวอย่างจากปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ ขณะที่การเกาะตัวกันของโปรตีนในตัวอย่างจากปลาทรายแดงเป็นอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งพบว่าสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานิลและปลายี่สกเทศมีเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งสูงกว่าตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดง ($p<0.05$)

ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออนของปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีระดับการลดลงที่น้อยกว่าตัวอย่างควบคุม (ไม่เติมสารปกป้องโปรตีน) ($p<0.05$) ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดและพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) ซึ่งจากผลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพ พบว่าสารปกป้องโปรตีนทุกชนิดที่ศึกษามีประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) นอกจากนี้การเติมสารปกป้องโปรตีนยังช่วยลดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในเนื้อปลาตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ค่าแรง ณ จุดแตกหัก (Breaking force) ของตัวอย่างเจลควบคุมมีค่าสูงกว่าตัวอย่างเจลที่เติมสารปกป้องโปรตีนและลดลงตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ขณะที่ค่าระยะทางผิดรูป (Deformation) เริ่มต้น (เดือนที่ 0) ของทุกตัวอย่างไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่ที่ระยะการเก็บ 6 เดือน เจลจากเนื้อปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 และตัวอย่างเจลจากเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 มีค่าระยะทางผิดรูปสูงสุด ($p<0.05$) การบ่มเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดและปลานิลบดที่อุณหภูมิ 40 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหัก และค่าระยะทางผิดรูปสูงสุด ตามลำดับ ($p<0.05$) เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งทำงานได้ดีที่สภาวะดังกล่าว ขณะที่ค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปมีค่าต่ำสุดที่การบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ($p<0.05$) เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาโดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ที่พบความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซินสายหลักลดลง ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างเจลควบคุมที่ผ่านการเก็บแช่เยือกแข็งมีลักษณะโครงข่ายร่างแหลดลงอย่างชัดเจน ขณะที่ตัวอย่างเจลที่เติมสารปกป้องโปรตีนพบลักษณะโครงข่ายร่างแหลดลงเล็กน้อย ดังนั้นปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งได้ การเติมสารปกป้องโปรตีนโดยการเติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานิลบด และการเติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด สามารถช่วยรักษาโปรตีนกล้ามเนื้อปลาในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งได้นาน 6 เดือน

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ปีการศึกษา 2548 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

JULALAK PHETPLOY : FROZEN STABILITY OF MUSCLE PROTEIN FROM FRESHWATER FISH. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D. 77 PP. ISBN 974-533-509-6

FROZEN STORAGE/PHYSICOCHEMICAL PROPERTY/DENATURATION/ FISH MUSCLE/CRYOPROTECTANT

Physico-chemical changes of actomyosin solution (AM) from tilapia *(Oreochromis niloticus)*, rohu *(Labeo rohita)*, small scale mud carp *(Cirrhira microlepis)* and threadfin bream *(Nemipterus spp.)* during frozen storage at -20°C for 20 days were studied. In addition, cryoprotective effect of sucrose/sorbitol mixture, sucrose/trehalose mixture at a ratio 1:1 and trehalose alone at the level 6% and 8% on tilapia and small scale mud carp mince during storage at -20°C for up to 6 months were investigated. Protein solubility and ATPase activities (Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}-Mg^{2+} and EDTA-ATPase activities) of AM from all species decreased ($p<0.05$) with storage time, whereas Mg^{2+}-EGTA-ATPase activity and surface hydrophobicity increased throughout the storage ($p<0.05$). Total sulfhydryl content of AM from threadfin bream increased within 10 days and decreased afterward ($p<0.05$), while there were no changes in other species ($p>0.05$). Intensity of myosin heavy chain (MHC) and actin of tilapia, rohu and small scale mud carp AM on SDS-PAGE without β-mercaptoethanol (BME) decreased on day 5 of frozen storage but that of threadfin bream decreased on day 20. However, no marked changes of tilapia and rohu MHC and actin bands were observed on SDS-PAGE in the presence of BME.

A decrease in intensity was found in small scale mud carp and threadfin bream AM on day 20. Based on these results, aggregation of tilapia, rohu and small scale mud carp AM occurred via disulfide bonds during frozen storage, while threadfin bream AM aggregated via hydrophobic interaction. Among all species studied, tilapia and rohu AM exhibited comparable frozen stability and were higher than that of small scale mud carp and threadfin bream.

Protein solubility and Ca^{2+}-ATPase activity of tilapia and small scale mud carp minces added cryoprotectants decreased to a lesser extent than those of control (no cryoprotectant) ($p<0.05$). Total SH content and surface hydrophobicity of samples with cryoprotectants were also less than those of control throughout 6 months storage at -20°C. Based on physico-chemical parameters, all cryoprotectants exhibited similar effect ($p>0.05$). TGase activity of minces added cryoprotectants gradually decreased during frozen storage. Breaking force of the control was higher than those with added cryoprotectants and drastically decreased during storage ($p<0.05$). Deformation values of all samples were similar at month 0 ($p>0.05$). After 6 months storage, tilapia mince gel added 6%trehalose and small scale mud carp mince gel added 6% mixture of sucrose/trehalose showed the highest deformation ($p<0.05$). Small scale mud carp and tilapia mince gel pre-incubated at 40°C and 55°C for 60 min before heating at 90°C for 30 min showed the highest breaking force and deformation, respectively ($p<0.05$). This was likely due to the effect of endogenous TGase activity. Lowest textural properties were observed when pre-incubated at 65°C for 60 min in concomitant with a decrease of MHC intensity observed on SDS-PAGE, suggesting the proteolytic activity. Gel microstructure of the control was inferior to that of sample added cryoprotectants after stored at -20°C for 6 months. Therefore, tilapia and small scale

mud carp can be used as a raw material for frozen fish mince production. The addition of either 6% trehalose in tilapia or 6% mixture of sucrose/trehalose in small scale mud carp can stabilize frozen muscle protein during storage for up to 6 months.

School of Food Technology

Academic Year 2005

Student's Signature.....

Advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา ชี้แนะ ช่วยเหลือในการทำวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำในการเขียน และตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชษฐ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนันทา ทองทา และดร.ศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาแนะนำและให้ข้อคิดที่ดี

ขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือ 1 และ ศูนย์เครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ทุกท่านที่ให้บริการและอำนวยความสะดวกด้วยดีตลอดระยะเวลาการดำเนินงานวิจัย ขอบคุณ คุณจักรกฤษณ์ โชติคง สำหรับข้อคิด คำปรึกษา และกำลังใจที่ดี ตลอดระยะเวลาการศึกษาที่ผ่านมา ขอบคุณสำหรับกำลังใจจากเพื่อนๆ พี่ๆ และน้องๆ ผู้ร่วมเรียนบัณฑิตศึกษาทุกท่าน

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ให้การอบรมเลี้ยงดู ส่งเสริมการศึกษาเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และขอขอบคุณทุกกำลังใจจากบุคคลในครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่ง

จุฬาลักษณ์ เพชรพลอย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)……..ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)…….ค

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญภาพ.....ญ

บทที่

1. บทนำ.....1
   - 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1
   - 1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....3
   - 1.3 สมมติฐานการวิจัย.....3
   - 1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....3
   - 1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....4
   - 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....4
   - 1.7 รายการอ้างอิง.....4
2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....6
   - 2.1 โปรตีนกล้ามเนื้อปลา.....6
   - 2.2 การเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา.....9
   - 2.3 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็ง.....10
   - 2.4 สารป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็ง.....13
   - 2.5 ทรีฮาโลส.....15
   - 2.6 กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็ง.....19
   - 2.7 รายการอ้างอิง.....22
3. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของแอคโตไมโอซินจากปลาเขตร้อนบางสายพันธุ์ระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง.....26

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 บทคัดย่อ....26
3.2 บทนำ....27
3.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ....28
3.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์....32
3.4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้....32
3.4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส....32
3.4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด....35
3.4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก....35
3.4.5 การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส (SDS-PAGE)....36
3.5 สรุปผลการทดลอง....39
3.6 รายการอ้างอิง....40
4. ผลของสารปกป้องการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเนื้อปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง....42
4.1 บทคัดย่อ....42
4.2 บทนำ....43
4.3 วัสดุและวิธีการ....45
4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์....50
4.4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้....50
4.4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส....51
4.4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด....53
4.4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก....55
4.4.5 ผลกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส....57
4.4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น....57
4.4.7 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง....59
4.4.8 คุณสมบัติการเกิดเจลของเนื้อปลาบด....59
4.4.9 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลาบด....66

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4.10 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลเนื้อปลาบด.....69
4.5 สรุปผลการทดลอง.....72
4.6 รายการอ้างอิง.....72
5. สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....78
ประวัติผู้เขียน.....79

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 ภาพวาดโมเลกุลโปรตีนไมโอซิน....7

2.2 ภาพวาดโมเลกุลโปรตีนแอคติน....8

2.3 ภาพวาดโมเลกุลโทรโปไมโอซิน และโทรโปนิน C (TnC) , โทรโปนิน (TnI) และ โทรโปนิน T (TnT)....9

2.4 โครงสร้างโมเลกุลของทรีฮาโลส....16

2.5 การผลิตทรีฮาโลสด้วยการใช้เอนไซม์ MTSase และ MTHase....18

2.6 การผลิตทรีฮาโลสจากวัตถุดิบแป้งด้วยการใช้เอนไซม์ MTSase และ MTHase ร่วมกับการใช้เอนไซม์ α–amylase และ Isoamylase....18

2.7 แบบจำลองกลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนและกลไกของสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนตามข้อเสนอของ Matsumoto....20

2.8 แบบจำลองการถ่ายเทโปรตีนที่มีสภาพธรรมชาติ (N) และที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (D) จากน้ำไปยังสารละลายน้ำตาล และการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระในแต่ละขั้นตอน....21

2.9 โครงสร้างโมเลกุลของ L-lactoy-l-lactic acid ester....21

3.1 ความสามารถในการละลายของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน....34

3.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (A) ปลายี่สกเทศ (B) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (C) และปลานิล (D) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน....34

3.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน....35

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

3.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซินจาก ปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และ ปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน.....36

3.5 ผลการแยกชนิดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตไมโอซิน จากปลาทรายแดง (a) ปลายี่สกเทศ (b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (c) และ ปลานิล (d) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล(BME) ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยแถว S (lane S) แสดงโปรตีนมาตรฐาน.....38

3.6 ผลการแยกชนิดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตไมโอซิน จากปลาทรายแดง (a) ปลายี่สกเทศ (b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (c) และปลานิล(d) ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล(BME) ที่ระยะการเก็บ แช่เยือกแข็ง 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยแถว S (lane S) แสดงโปรตีนมาตรฐาน.....39

4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และปลา นวลจันทร์น้ำจืดบด (b) ในตัวอย่างควบคุม (c) และตัวอย่างที่เติม สารปกป้องโปรตีน ชนิดต่างๆ ได้แก่ สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและ ซอร์บิทอล ร้อยละ 6 (SS6), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครส และซอร์บิทอล ร้อยละ 8 (SS8), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครส และทรีฮาโลส ร้อยละ 6 (ST6), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและ ทรีฮาโลส ร้อยละ 8 (ST8), ทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 6 (T6) และ ทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 8 (T8) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน.....53

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และ ปลานวลจันทร์น้ำจืด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....54

4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และ ปลานวลจันทร์น้ำจืด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....55

4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด(a) และ ปลานวลจันทร์น้ำจืด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....56

4.5 ผลกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจาก ตัวอย่างเนื้อปลานิลบด(a) และ ปลานวลจันทร์น้ำจืด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็น ระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....58

4.6 ค่าแรง ณ จุดแตกหัก ของเจลเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส(a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....62

4.7 ค่าแรง ณ จุดแตกหัก ของเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจล อุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....63

4.8 ค่าระยะทางผิดรูปของเจลเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....64

4.9 ค่าระยะทางผิดรูปของเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจล อุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.10 ผลการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของเจลเนื้อปลานิลบดควบคุม (a) และเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุม(b) หลังการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน โดย S คือ โปรตีนมาตรฐาน, RM คือ เนื้อปลาบดที่ผ่านการสับผสมร่วมกับเกลือและพอลิฟอสเฟต, 40 คือเจลที่ผ่านการเซ็ทที่สภาวะ 40/90 องศาเซลเซียส, 55 คือ เจลที่ผ่านการเซ็ททีสภาวะ 55/90 องศาเซลเซียส, 65 คือ เจลที่ผ่านการเซ็ทที่สภาวะ 65/90 องศาเซลเซียส และ 90 คือ เจลที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส.....66

4.11 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส(a), 55/90 องศาเซลเซียส(b), 65/90 องศาเซลเซียส และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวอย่างต่างๆเช่นเดียวกับรูปที่ 4.1.....67

4.12 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c)และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1.....68

4.13 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างเจล โดย NT_C(0) และ NT_C(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบดควบคุม ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ NT_ST6(0) และ NT_ST6(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบด ที่เติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ NT_T6(0) และ NT_T6(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบด ที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ.....70

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ หน้า

4.14 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างเจล โดย SM_C(0) และ SM_C(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุม ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ SM_ST6(0) และ SM_ST6(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ SM_T6(0) และ SM_T6(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ.....71

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปริมาณการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดของประเทศไทยเพิ่มขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2539 จนถึงปี พ.ศ. 2543 โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาน้ำจืด ซึ่งจากข้อมูลในปี พ.ศ. 2546 พบว่าปลาน้ำจืดมีปริมาณการเพาะเลี้ยงทั้งสิ้นประมาณ 328,984 ตัน และพบว่าปลาดุก (Catfish) จัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีปริมาณการเพาะเลี้ยงสูงสุดถึง 101,606 ตัน ของปริมาณปลาน้ำจืดที่เพาะเลี้ยงทั้งหมด รองลงมาคือ ปลานิล (Tilapia)และปลาตะเพียน (Thai silver carp) โดยมีปริมาณการเพาะเลี้ยง 98,336 ตัน และ 49,066 ตัน ตามลำดับ (Fisheries Department of Thailand, 2005) จะเห็นว่าผลผลิตปลาน้ำจืดของไทยถึงแม้จะมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง แต่ความนิยมหรือตลาดการบริโภคปลาน้ำจืดของไทยยังไม่กว้างขวางนัก โดยทั่วไปปลาน้ำจืดมักมีการจำหน่ายในรูปของปลาสด ซึ่งไม่สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมในขั้นตอนของการเก็บรักษาวัตถุดิบปลามีผลทำให้เกิดการเน่าเสียได้ง่าย เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์และจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนอยู่กับผลิตภัณฑ์สดนั้นๆ และเนื่องจากการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยกระบวนการแช่เยือกแข็งจัดเป็นวิธีการหรือกระบวนการในการช่วยรักษาคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ดีที่สุด เพราะช่วยในการชะลอการทำงานของเอนไซม์ และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนอยู่กับผลิตภัณฑ์ (พิมลพรรณ, 2535) ดังนั้นการศึกษาถึงเสถียรภาพของโปรตีนปลาน้ำจืดต่อการแช่เยือกแข็ง จึงมีความสำคัญต่อการยืดอายุการเก็บรักษาปลาน้ำจืดและผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืดให้นานขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาในรูปของปลาน้ำจืดบด ทั้งนี้จะเป็นการช่วยเพิ่มความหลากหลายในการบริโภคปลาน้ำจืดของไทย เพิ่มมูลค่าและช่วยให้สามารถเก็บรักษาเนื้อปลาน้ำจืดไว้สำหรับการเตรียมเพื่อการบริโภคได้เป็นระยะเวลานาน รวมทั้งทางด้านอุตสาหกรรมจะช่วยให้ลดขั้นตอนสำหรับการเตรียมวัตถุดิบเนื้อปลาเพื่อการแปรรูปไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆลงได้ เช่น ลูกชิ้นปลา และไส้กรอกปลา เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษาถึงเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งปลาน้ำจืดบดดังกล่าว ยังช่วยให้สามารถรู้และเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ที่เปลี่ยนแปลงไปของโปรตีนปลาขณะแช่เยือกแข็งได้อีกด้วย มีการศึกษาเกี่ยวกับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Denaturation)ในสภาวะแช่เยือกแข็งอย่างกว้างขวาง ซึ่งสามารถแบ่งการศึกษาเป็นสองกลุ่ม คือ การศึกษาในระบบของกล้ามเนื้อสัตว์ซึ่งเป็นการเก็บตัวอย่างสัตว์น้ำไว้ในสภาพแช่เยือกแข็งแล้ว

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติต่างๆของโปรตีน และการศึกษาในระบบจำลองโดยใช้โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (Myofibrillar) มีนักวิจัยหลายคณะได้ศึกษาสาเหตุและกลไกของการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาพแช่เยือกแข็ง ผลการศึกษาส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่า การเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการแช่เยือกแข็งเป็นผลมาจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติและการจับตัวกันของโปรตีน (Aggregation) (Barroso, Careche, Barrios, and Borderias, 1998; Matsumoto, 1980; Shenouda, 1980; Suzuki, 1981) ซึ่งการป้องกันการสูญเสียดังกล่าวในขณะเก็บแช่เยือกแข็ง คือ การใช้สารเติมแต่งอาหาร (Food additive) ที่มีสมบัติป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนขณะแช่เยือกแข็ง (Cryoprotectant) เช่นในกรณีของซูริมิ (Surimi) จากปลาอลาสกาพอลแลก (Alaska pollack) แม้จะพบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่า จะสามารถชะลอการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้และมีผลให้สามารถเก็บซูริมิไว้ได้นานกว่า 12 เดือน (Park, Lanier and Green, 1988, Shaban, Ochiai, Watabe and Hashimoto, 1985) อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติการเก็บรักษาจะเก็บในห้องเย็นที่มีอุณหภูมิประมาณ -20 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุนี้การใช้สารเติมแต่งอาหารดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อกระบวนการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยการแช่เยือกแข็ง และได้รับความสนใจจากนักวิจัยหลายคณะในการศึกษาเพิ่มเติม ถึงสารชนิดอื่นที่สามารถแสดงคุณสมบัติของการเป็นสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็งเพิ่มมากขึ้น และมีการศึกษาอย่างกว้างขวางในปลาเขตหนาว ขณะที่ปลาเขตร้อน (Tropical fish) โดยเฉพาะอย่างยิ่งปลาน้ำจืด (Freshwater fish) กลับพบว่ามีการศึกษาค่อนข้างจำกัด ดังนั้นการศึกษาถึงเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของปลาน้ำจืดเขตร้อนจึงมีความสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ทั้งนี้เพื่อให้เกิดความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางด้านเคมี-กายภาพของโปรตีนปลาน้ำจืดเขตร้อนขณะเก็บแช่เยือกแข็ง รวมถึงมีความน่าสนใจในแง่ของการเพิ่มมูลค่า ยืดอายุการเก็บ และเพิ่มความหลากหลายของผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืด ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่มากภายในประเทศให้เป็นที่กว้างขวางมากขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาถึงเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของปลาน้ำจืดดังกล่าวจึงมีความสำคัญต่อการนำวัตถุดิบภายในประเทศไปใช้ให้เกิดประโยชน์ สำหรับสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนขณะแช่เยือกแข็งในระดับอุตสาหกรรมโดยส่วนใหญ่ยังคงจำกัดอยู่เฉพาะการใช้น้ำตาลซูโครส (Sucrose) และซอร์บิทอล (Sorbitol) อย่างไรก็ตามเนื่องจากสารทั้งสองชนิดมีผลให้ผลิตภัณฑ์มีรสหวาน ซึ่งเป็นคุณลักษณะที่ผู้บริโภคไม่ต้องการ ทำให้สารปกป้องแช่เยือกแข็งที่ใช้เพื่อป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน จากการแช่เยือกแข็งและเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็งชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะสารในกลุ่มของคาร์โบไฮเดรตที่ให้ความหวานต่ำได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น

ทรีฮาโลส (Trehalose) จัดเป็นสารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่ให้ความหวานต่ำชนิดหนึ่งที่น่าสนใจโดยมีความหวานเป็นร้อยละ 45 ของน้ำตาลซูโครส ทั้งนี้เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าทรีฮาโลสได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆ ได้แก่ ทางด้านการแพทย์และชีวภาพ โดยเป็นสารที่ช่วยป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ (Cell) หรือองค์ประกอบอื่นๆของสิ่งมีชีวิต (Organism) เช่น สเปิร์ม (Sperm) และ ไข่ (Egg) เป็นต้น และยังใช้เติมลงไปในสารทางการแพทย์ เช่น Antibody, Blood coagulation factor และวัคซีน ก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำแห้ง โดยทรีฮาโลสจะทำหน้าที่ช่วยรักษาคุณสมบัติของสาร ทำให้สามารถเก็บและรักษาให้คงคุณสมบัติเดิมได้เป็นเวลานาน นอกจากนี้ ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางยังพบว่าทรีฮาโลสสามารถช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำหรือความชื้นจากผิวหนังได้ (Skin moisture retention) ดังนั้นทรีฮาโลสจึงถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางชนิดที่ช่วยรักษาความชุ่มชื้นให้กับผิว (Shiosaka, 2005) ในอุตสาหกรรมอาหาร พบว่าทรีฮาโลสสามารถแสดงคุณสมบัติการเป็นสารช่วยปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูริมิขณะเก็บแช่เยือกแข็ง โดยยังคงรักษากลิ่นรส เนื้อสัมผัสและสีของผลิตภัณฑ์ไว้ได้ (Hunt, Park and Zoerb, 2002) ซึ่งผลจากการศึกษาดังกล่าวอาจเป็นการเพิ่มอีกทางเลือกหนึ่ง ในการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งอื่นๆในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาเสถียรภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิล ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาทรายแดง ในระบบจำลองระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2.2 เพื่อศึกษาผลการเติมสารปกป้องแช่เยือกแข็งต่อเสถียรภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1.3.1 คุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดแช่เยือกแข็งจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเก็บ

1.3.2 การเติมสารปกป้องแช่เยือกแข็งจะมีผลต่อเสถียรภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง

1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.4.1 ปลาน้ำจืดที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ ปลานิล (Nile tilapia; *Oreochromis niloticus*) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (Small scale mud carp; *Cirrhira microlepis*) และปลายี่สกเทศ (rohu; *Labeo rohita*)

1.4.2 สารปกป้องแช่เยือกแข็งที่ใช้ ได้แก่ น้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 6, น้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 8, น้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 6, น้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 8, ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 และทรีฮาโลส ร้อยละ 8

1.5 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ศึกษาเสถียรภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาต่อการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยศึกษาในระบบจำลองซึ่งใช้สารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซิน (Actomyosin) ที่สกัดจากปลาน้ำจืด 3 ชนิด และศึกษาผลการเติมสารปกป้องแช่เยือกแข็ง (cryoprotectant) ต่อเสถียรภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ได้แก่ ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (Protein solubility) กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase activity) ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก (Surface hydrophobicity) ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด (Total sulfhydryl group) และหน่วยย่อยโปรตีนจากการศึกษาด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel Electrophoresis; SDS-PAGE) และศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของปลาบดแช่เยือกแข็ง ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส (Transglutaminase activity) การเปลี่ยนแปลงของระดับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาค (Microstructure) ลักษณะเนื้อสัมผัส (Texture) และสีของเจล

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพ ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาน้ำจืดระหว่างการเก็บรักษาแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.6.2 ทราบผลของการใช้สารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนแช่เยือกแข็งชนิดและระดับที่เหมาะสมต่อเสถียรภาพของกล้ามเนื้อโปรตีนปลาน้ำจืดบดระหว่างเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.6.3 เป็นแนวทางในการแปรรูปและพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง เพื่อเพิ่มมูลค่าและความหลากหลายของผลิตภัณฑ์จากปลาน้ำจืดต่อไป

1.7 รายการอ้างอิง

พิมลพรรณ ฮั่นไพศาล. (2535). การปรับปรุงคุณภาพลูกชิ้นปลาแช่เยือกแข็ง.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Barroso, M., Careche, M., Barrios, L., and Borderias, J. (1998). Frozen hake fillets quality as related to texture and viscosity by mechanical methods. **J. Food Sci**. 63 : 793-796.

Fisheries Department of Thailand. (2005). Fisheries Production in quantity by Sub-Sectors, 1981-2000 [Online]. Available: http:// www.fisheries.go.th.

Hunt, A.L., Park, J.W., and Zoerb, H. (2002). Trehalose as functional cryoprotectant for fish Proteins. In 2002 annual meeting and Food Expo-Anaheim. Carifornia.

Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In J.R. Whitaker and M. Fujimaki (eds.). Chemical Deterioration of Proteins (pp. 95-123). Washington DC: American Chemical Society.

Park, J.W., Lanier, T.C., and Green, D.P. (1988). Cryoprotective effects of sugar, polyols and/or phosphates on Alaska Pollack surimi. **J. Food Sci**. 53 : 1-3.

Shaban, O., Ochiai, Y., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1985). Quality changes in Alaska Pollack meat paste (surimi) during frozen storage. **Bull Jpn. Soc. Sci. Fish**. 51: 1853-1858.

Shenouda, S.Y.K. (1980). Therories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res**. 26 : 275-311.

Shiosaka, M. (2005). Application of trehalose. [Online]. Available:http://www.fcs.co.th.

Suzuki, T. (1981). Fish and Krill Protein: Processing Technology. London: Appiled Science Publishers Ltd.

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

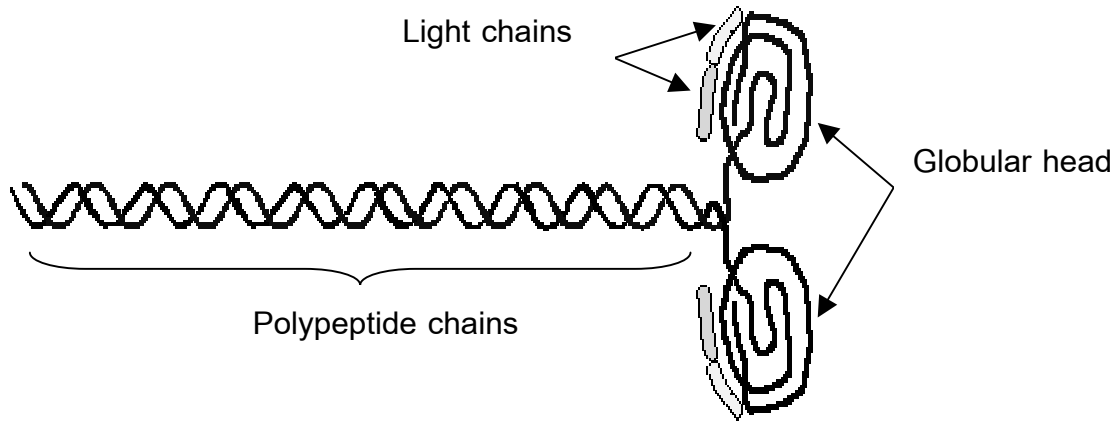
2.1 โปรตีนกล้ามเนื้อปลา

โปรตีนปลาสามารถแบ่งได้ 3 ชนิด เช่นเดียวกับโปรตีนของเนื้อสัตว์ชนิดอื่นๆ โดยแบ่งตามความสามารถในการละลาย ได้แก่

2.1.1 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (Sarcoplasmic proteins) หรือ ไมโอเจน (Myogen) เป็นโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาซึ่งมีความสามารถในการละลายได้ในน้ำหรือสารละลายเกลือเจือจางที่มีความเข้มข้นของอิออนต่ำกว่า 0.1 (Ionic strength) (Nakagawa, Watabe, and Hashimoto, 1988) สำหรับโปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไมโอโกลบิน (Myoglobin) เอนไซม์ (Enzyme) และโปรตีน อัลบูมิน (Albumin) ชนิดต่างๆ โดยทั่วไปพบว่าปริมาณของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกในปลาผิวน้ำ เช่น ปลาซาร์ดีน (Sardine) และปลาแมคเคอเรล (Mackerel) จะมีปริมาณสูงกว่าในปลาที่หากินตามหน้าดิน เช่น ปลา Plaice และ ปลา Snapper เป็นต้น โดยเฉพาะปริมาณของฮีโมโกลบิน (Hemoglobin) และ ไซโตโครมซี (Cytochrome C) สำหรับผลของโปรตีนซาร์โคพลาสมิกต่อคุณภาพของเจลที่เตรียมได้จากปลานั้นพบว่า โปรตีนดังกล่าวมีผลไปขัดขวางการสร้างโครงร่างตาข่ายสามมิติ (Gel network) ของโปรตีนไมโอซินในการเกิดเจล ทำให้เจลสามารถอุ้มน้ำได้น้อย (Water holding) ค่าความแข็ง (Hardness) และความยืดหยุ่น (Elasticity) ต่ำ ดังนั้นในกระบวนการการผลิตผลิตภัณฑ์จากปลาเพื่อให้ได้เจลที่มีคุณภาพดีนั้น จึงมีความจำเป็นในการล้างเนื้อปลาด้วยน้ำเพื่อกำจัดเลือด กลิ่นคาวปลา และที่สำคัญคือกำจัดโปรตีนซาร์โคพลาสมิกออกไป (Smith, 1991; Sikorski, and Kotakowska,1994)

2.1.2 โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (Myofibrillar protein) เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใย (Fibrous) ใช้ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ โปรตีนในกลุ่มนี้สามารถละลายได้ในสารละลายเกลือที่มีความเข้มข้นของอิออนประมาณ 0.45-0.60 ดังนั้นจึงสามารถแยกโปรตีนเหล่านี้ออกจากเนื้อปลาบดได้ โดยการล้างเนื้อปลาบดด้วยสารละลายเกลือที่มีความเป็นกลางและมีความเข้มข้นของอิออนอยู่ในช่วงดังกล่าว ซึ่งความสามารถในการละลายในสารละลายเกลือของโปรตีนชนิดนี้พบว่ามีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Suzuki, 1981) โปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ ไมโอซิน (Myosin) แอคติน (Actin) โทรโปไมโอซิน (Tropomyosin) และโทรโปนิน (Troponin) ชนิด C, I และ T

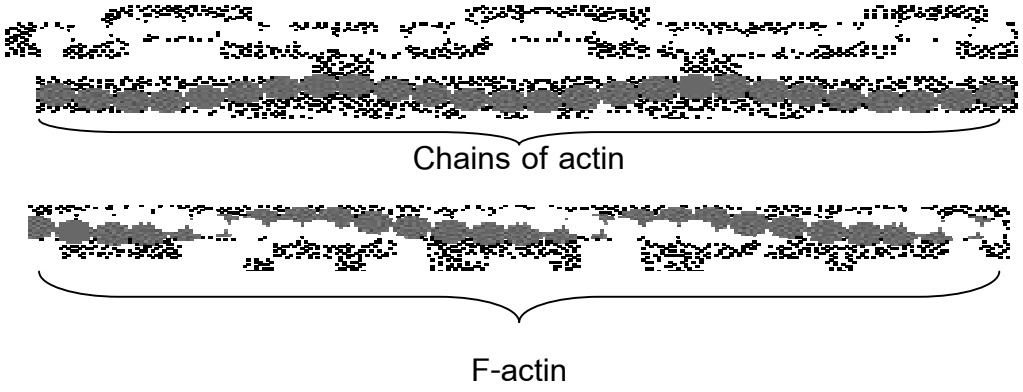
ไมโอซินเป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของโปรตีนในกลุ่มนี้ โดยโมเลกุลมีลักษณะเป็นสายยาวขนาดใหญ่ มวลโมเลกุลประมาณ 500,000 ดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 2 หน่วยย่อย (Subunit) คือ ไมโอซินสายหลัก (Myosin heavy chain; MHC) 2 สาย และไมโอซินสายเบา (Myosin light chain; MLC) 4 หน่วยย่อย (รูปที่ 2.1) ไมโอซินสายหลักแต่ละสายประกอบด้วยส่วนหัว ซึ่งมีรูปร่างเป็นก้อนกลม เรียกว่า Globular head และส่วนหาง ซึ่งส่วนหางของไมโอซินสายหลักแต่ละสายจะพันรอบซึ่งกันและกันเป็นเกลียวแอลฟาฮีลิกซ์ (α-helix) ซึ่งมีลักษณะเป็นแท่ง (Rod shape) และแต่ละสายของไมโอซินสายหลักมีขนาด 200,000 ดาลตัน ที่บริเวณส่วนหัวของไมโอซิน(Globular head) สามารถแสดงกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ของ ATP (Adenosine triphosphate) เกิดเป็น ADP (Adenosine diphosphate) และพลังงานซึ่งใช้ในการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ที่บริเวณส่วนหัวของไมโอซินยังมีความสามารถจับกับแอคติน (Actin binding site) ซึ่งมีความสำคัญขณะหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ สำหรับไมโอซินสายเบาจะมีขนาดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยแต่ละหน่วยมีขนาดอยู่ระหว่าง 16,500-27,500 ดาลตัน ในการเกิดเจลพบว่าไมโอซินมีบทบาทช่วยให้เกิดความเหนียวและเจลมีความสามารถในการอุ้มน้ำได้ดี โมเลกุลของไมโอซินมีหมู่ซัลไฮดริลที่เป็นอิสระและว่องไวต่อปฏิกิริยาเคมีจึงทำให้โมเลกุลไมโอซินเกิดการเปลี่ยนแปลงง่าย ถูกย่อยได้ง่ายด้วยทริปซิน และไคโมทริปซิน (Alais and Linden, 1991; Sikorski, and Kotakowska, 1994)



รูปที่ 2.1 ภาพวาดโมเลกุลโปรตีนไมโอซิน
แหล่งที่มา: Tamarkin (2004)

แอคติน เป็นโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่พบรองลงมาโดยมีปริมาณร้อยละ 20 ของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ (รูปที่ 2.2) หน่วยย่อยของแอคติน คือ จี-แอคติน (G-actin) ประกอบด้วย

กรดอะมิโนจำนวน 374-375 ตัว และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 42,000-48,000 ดาลตัน จี-แอคติน มีรูปร่างเป็นก้อนกลมและมีการจับตัวกันเป็นสายยาวเกิดเป็นเส้นใย เรียกว่า เอฟ-แอคติน (F-actin) สายยาวของเอฟ-แอคตินพันเรียงตัวเป็นเกลียวในลักษณะของแอลฟาฮีลิกซ์ และสามารถมีอันตรกิริยากับส่วนหัวของไมโอซิน (Alais and Linden, 1991; Sikorski and Kotakowska, 1994)



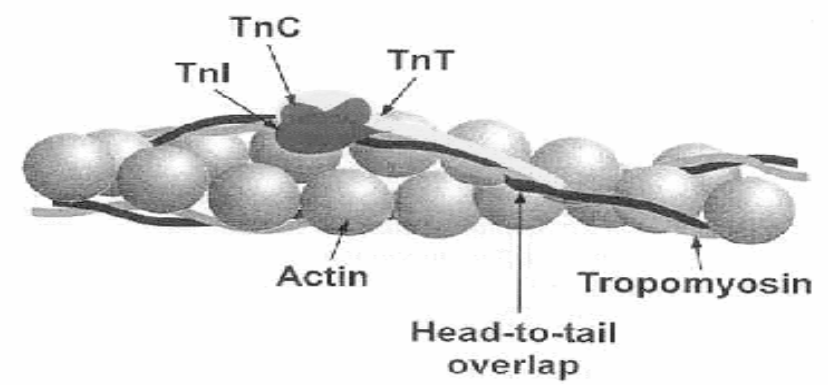
รูปที่ 2.2 ภาพวาดโมเลกุลโปรตีนแอคติน
<u>แหล่งที่มา:</u> Tamarkin (2004)

โทรโปไมโอซิน ประกอบด้วยสายพอลิเปปไทด์ 2 สาย (รูปที่ 2.3) ซึ่งพันกันเป็นเกลียวในลักษณะของแอลฟาฮีลิกซ์ พอลิเปปไทด์แต่ละสายมีขนาดประมาณ 35,000-37,000 ดาลตัน โทรโปไมโอซินจะวางตัวอยู่บนแนวร่องของแอคตินในฟิลาเมนต์เส้นบาง (Thin filament) โดย 1 หน่วยของโทรโปไมโอซินจะวางตามแนวของจี-แอคติน 7 โมเลกุล และโทรโปไมโอซินเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ยึดกับโทรโปนินที ซึ่งองค์ประกอบที่เกิดขึ้นเป็นปัจจัยทำให้เกิดการคลายตัว (Relaxing factor) ของกล้ามเนื้อ (Alais and Linden, 1991; Sikorski, and Kotakowska, 1994)

โทรโปนิน ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 ส่วน (รูปที่ 2.3) คือ หน่วยย่อย C ทำหน้าที่ในการจับ (bind) Ca^{2+} ขณะการยืดหดตัวของกล้ามเนื้อ มีขนาดโมเลกุลประมาณ 17,000-18,000 ดาลตัน หน่วยย่อย I มีบทบาทยับยั้งการจับตัวรวมกันระหว่างแอคตินกับไมโอซิน ซึ่งมีผลต่อการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอสของแอคโตไมโอซิน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 20,000-24,000 ดาลตัน และหน่วยย่อย T เป็นส่วนที่เชื่อมระหว่างโทรโปไมโอซินกับแอคติน มีขนาดโมเลกุลประมาณ 37,000-40,000 ดาลตัน (Alais and Linden, 1991; Sikorski and Kotakowska, 1994)

2.1.3 โปรตีนสโตรมา (Stroma protein) เป็นโปรตีนในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) เป็นเนื้อเยื่อที่ช่วยยึดระหว่างเซลล์หรือกลุ่มของเนื้อเยื่ออื่นๆให้มีโครงสร้างหรือรูปร่างที่มีความแข็งแรง โดยโปรตีนในกลุ่มนี้ไม่สามารถสกัดได้ด้วยน้ำ กรด ด่างเจือจางและสารละลายเกลือที่เป็นกลางที่มีความเข้มข้น 0.01-0.1 โมลาร์ ส่วนประกอบของโปรตีนชนิดนี้ ได้แก่

คอลลาเจน (Collagen) และอีลาสติน (Elastin) (Alais and Linden, 1991; Sikorski and Kotakowska, 1994)



รูปที่ 2.3 ภาพวาดโมเลกุลโปรตีนโทรโปไมโอซิน และโทรโปนิน C (TnC), โทรโปนิน I (TnI) และโทรโปนิน T (TnT)

แหล่งที่มา: Cohen (1975)

2.2 การเกิดเจลของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา (Gelation of fish muscle proteins)

การเกิดเจลเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญประการหนึ่งของโปรตีนปลา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีเนื้อสัมผัสหลากหลายชนิดที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค โครงสร้างของเจลโปรตีนเกิดจากโมเลกุลของโปรตีนจับกันด้วยพันธะชนิดต่างๆเป็นโครงร่างตาข่าย 3 มิติ ที่สามารถจับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ (Damodaran, 1996) การเกิดเจลของโปรตีนประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน โดยในขั้นตอนแรกจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงโครงร่างโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมักจะเป็นผลจากการได้รับความร้อน หรือเกิดจากโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติด้วยปัจจัยอื่น เมื่อโปรตีนสูญเสียสภาพธรรมชาติจะพบว่าความหนืดของระบบเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการคลายตัวของโมเลกุล ร่วมกับการจับตัวรวมกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนบางส่วนที่คลายตัวออกมา ต่อจากนั้นในขั้นตอนที่สองโปรตีนซึ่งสูญเสียสภาพธรรมชาติหรือโมเลกุลที่คลายตัวออกอย่างสมบูรณ์แล้วจะรวมตัวกันหรือจับกันอย่างช้าๆ (Aggregation) ในระหว่างการจับตัวเพื่อเกิดเป็นโครงร่างตาข่ายความหนืดของระบบจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และในระยะสุดท้ายระบบของเจลจะมีคุณสมบัติบางประการของของแข็งที่มีความยืดหยุ่น (Hermansson, 1978) อัตราการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนทั้งสองขั้นตอนจะต้องเกิดขึ้นในระดับที่เหมาะสม กล่าวคือ หากอัตราการสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นเร็วกว่าอัตราการจับตัวกันของโปรตีน โครงสร้างตาข่าย 3 มิติที่ได้จะไม่มีความสม่ำเสมอ เจลที่ได้จะมีความแข็งแรงและยืดหยุ่นต่ำ แต่ถ้าหากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเกิดขึ้นในอัตราที่ไม่สูงเจลที่ได้จะมีความยืดหยุ่นและแข็งแรง ทั้งนี้อัตราการเปลี่ยนแปลงที่เหมาะสมจะเป็นการเอื้ออำนวยให้โมเลกุลโปรตีนมีเวลาในการจัดเรียง

ตัวอย่างมีระเบียบ และยึดเหนี่ยวซึ่งกันและกันเกิดเป็นโครงสร้างตาข่ายสามมิติที่แข็งแรงมีความสมบูรณ์มากขึ้น หากการรวมตัวของโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติในขั้นตอนที่สองเกิดอย่างรวดเร็วจะมีผลทำให้โปรตีนจับตัวกันแบบสุ่มอย่างไม่เป็นระเบียบโครงสร้างของเจลที่ได้จะมีความสามารถในการอุ้มน้ำน้อย (Wong, 1989)

Sano, Ohno, Otsuka-Fuchino, Matsumoto and Tsuchiya (1994) ได้อธิบายไว้ว่าความร้อนมีผลให้โปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลาคาร์พ (Carp) เริ่มคลายตัวที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส และการคลายตัวของโปรตีนจะเกิดเพิ่มขึ้นตามลำดับ เมื่อระบบมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วง 30-50องศาเซลเซียส การคลายตัวดังกล่าวมีผลให้หมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) และหมู่ซัลฟไฮดริลของโมเลกุลโปรตีนเพิ่มขึ้น ทำให้เกิดอันตรกิริยา (Interaction) ระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำและพันธะไดซัลไฟด์ในช่วงอุณหภูมินี้ การรวมตัวของโปรตีนจะเกิดขึ้นสูงสุดระหว่างอุณหภูมิ 40-60 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิของระบบสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส โปรตีนไมโอซินจะแยกตัวออกจากโปรตีนแอคโตไมโอซิน ซึ่งสามารถจับตัวระหว่างกันและกันได้ โดยผลจากการจับตัวดังกล่าวจะก่อให้เกิดเจลโปรตีนที่ละลายน้ำได้ต่ำ และเมื่อนำเจลมาทำให้เย็น ความแข็งแรงของเจลจะเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากบทบาทของพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ความแข็งแรงของเจลยังเกี่ยวข้องกับพันธะ ε-(γ-glutamyl)-lysine ซึ่งเป็นพันธะโควาเลนท์ที่เกิดจากการเชื่อมโยงระหว่างกลุ่มแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxy amide) ของกรดอะมิโนกลูตามีน (Glutamine) และกลุ่มแอพซีลอน-อะมิโน (ε-amino) ของกรดอะมิโนไลซีน (Lysine)โดยการทำงานของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (Transglutaminase) ในขั้นตอนการบ่มซูริมิที่อุณหภูมิที่เหมาะสมก่อนนำไปทำให้สุก หรือการ “setting” อีกด้วย (Shimizu, Machida and Takenami, 1981; Tsumakasa and Shimizu, 1989; Hastings, Keay and Yong, 1990; Wan, Kimura and Satake, 1995)

2.3 การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็ง

การแช่เยือกแข็งเป็นวิธีถนอมรักษาคุณภาพของปลาที่ดีวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในเรือประมงและในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ การเก็บรักษาปลาสดที่มีไขมันต่ำโดยการแช่เยือกแข็งและการบรรจุอย่างเหมาะสมก่อนการเก็บรักษาในห้องเย็นที่อุณหภูมิระหว่าง -20 ถึง -30 องศาเซลเซียสนั้น สามารถเก็บไว้ได้นานกว่า 1 ปี โดยคุณภาพของปลาหลังการละลายผู้บริโภคยังคงยอมรับ อย่างไรก็ตามผลการประเมินคุณภาพทางเคมี ประสาทสัมผัส และกายภาพของปลาแช่เยือกแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งความน่ารับประทานของปลาลดลงตามอายุการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องมาจากการสูญเสียทางด้านกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสที่ดีของปลาสด นอกจากนี้การนำเนื้อปลาไปใช้ประโยชน์อื่นๆ เช่น เนื้อปลาบดแห่ง ลูกชิ้นปลา และไส้กรอกปลา เป็นต้น จะทำได้จำกัดเนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนปลา (Matsumoto, 1980) สำหรับการสูญเสียคุณภาพของซูริมิจากการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็ง เห็นได้จากการลดลงของค่าความเครียด

(Stress) และค่าความเค้น (True strain) ของเจลที่เตรียมได้ (Park, Lanier and Green, 1988)

การสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในการจัดเรียงตัวหรือโครงสร้างของโปรตีนในระดับทุติยภูมิ (Secondary) ตติยภูมิ (Tertiery) และจตุรภูมิ (Quarternary) (Cheftel, Cuq and Lorient, 1985) โดยสาเหตุสำคัญของการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนขณะแช่เยือกแข็ง คือ น้ำในเซลล์กล้ามเนื้อปลาถูกดึงออก (Withdraw)โดยการเปลี่ยนเป็นน้ำแข็งในระหว่างการแช่เยือกแข็ง เกลือและสารอินทรีย์อื่นๆที่ละลายน้ำถูกทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลของโปรตีนเกิดอันตรกิริยากัน (Protein-Protein interaction) (Schbring, 1999) สำหรับความสามารถในการเกิดเจลของโปรตีนนั้นจัดเป็นคุณสมบัติเชิงหน้าที่ที่สำคัญและมีผลต่อคุณสมบัติทางด้านลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีผลต่อลักษณะของเจลโปรตีน โดย Yean (1993) ได้รายงานว่าเวลาและอุณหภูมิในการจับ แปรรูป และเก็บรักษาปลา จัดเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อลักษณะและคุณภาพของเจลซูริมิ Ramirez, Martin-Polo and Bandman, (2000) รายงานผลของการแช่เยือกแข็งต่อเสถียรภาพของไมโอซินจากปลานิล โดยทำการเก็บไมโอซินดังกล่าวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่าการทำงานของเอนไซม์เอทีพีเอสลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น นอกจากนี้ความสามารถในการละลายของโปรตีน (Protein solubility) และปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลลดลงด้วย ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินจากการแช่เยือกแข็ง โดยเฉพาะที่บริเวณส่วนหัวของไมโอซิน (Globular head) ซึ่งเป็นส่วนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอส ดังนั้นเมื่อเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน กิจกรรมของเอนไซม์จึงลดลง สำหรับการลดลงของค่าการละลายของโปรตีนและปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลเป็นผลอันเนื่องมาจากโมเลกุลโปรตีนมีการจับตัวรวมกันเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากผลของการแช่เยือกแข็ง Yamanka และ Mackie (1971) ได้อธิบายว่าการทำงานของเอนไซม์เอทีพีเอสสามารถใช้เป็นดัชนีในการประเมินคุณภาพของปลาในระหว่างการเก็บรักษาแช่เยือกแข็งได้ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์เอทีพีเอสในปลาแช่เยือกแข็งจะสัมพันธ์กับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ในกล้ามเนื้อปลา (Arai, 1977) Benjakul, Visessanguan and Tueksuban (2003) ได้กล่าวว่าการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}-ATPase activity) เป็นการติดตามการสูญเสียสภาพธรรมชาติของไมโอซินส่วนหัว (Globular head) โดยการลดลงที่เกิดขึ้นจะแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างการจัดเรียงตัวของโมเลกุลที่บริเวณดังกล่าว ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณส่วนหัว
มีหมู่ซัลฟไฮดริลซึ่งมีบทบาทในการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ (Reactive sulfhydryl group) และการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินเกิดขึ้นเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟไฮดริลหรือปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนพันธะไดซัลไฟด์ (Disulfide interchange) (Benjakul, Seymour, Morissey and An, 1997)

การแช่เยือกแข็งมีผลทำให้โปรตีนเกิดการจับตัวกันเป็นก้อน (Aggregation) เกิดการเรียงตัวชิดกันของแอคโตไมโอซิน (Side to side) ซึ่งกลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนปลาขณะแช่เยือกแข็งเกิดจากการเชื่อมโยงระหว่างสายไมโอซิน (Cross linking) โดยพันธะโควาเลนต์ เช่น พันธะไดซัลไฟด์ และแรงอื่นๆ เช่น แรงดึงดูดไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) โดยแรงดึงดูดไฮโดรโฟบิกที่เกิดขึ้นจัดเป็นแรงดึงดูดที่เกิดขึ้นระหว่างกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้ว (Nonpolar amino acid) เนื่องจากการคลายตัวของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ นอกจากนี้การแช่เยือกแข็งยังมีผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อซึ่งทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเกิดการฉีกขาด โปรตีนเกิดการสูญเสียน้ำ (Dehydration) เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างการจัดเรียงตัว และสูญเสียสภาพธรรมชาติไปในที่สุด ทำให้โปรตีนไมโอไฟบริลลาร์สูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ต่างๆ เช่น ความสามารถในการละลาย ความสามารถในการอุ้มน้ำ (Water holding capacity) และความสามารถในการเกิดเจล (Gel forming ability) เป็นต้น (Sych, Lacruix, Adambounou and Castaigne, 1990)

Badii และ Howell (2002) พบว่าความสามารถในการละลายของโปรตีนในปลาคอด (Cod) และแฮดดอค (Haddock) แช่เยือกแข็งลดลงตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็งที่ -10 องศาเซลเซียส และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเกิดขึ้นด้วย ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเปิดตัวของโมเลกุลโปรตีนและการเข้าจับตัวรวมกันใหม่ระหว่างโมเลกุลโปรตีนตามลำดับ ซึ่ง Kato และ Nakai (1980) ได้อธิบายว่า การเพิ่มขึ้นของพื้นผิวไฮโดรโฟบิกแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างการจัดเรียงตัวของโมเลกุลโปรตีน โดยเป็นการเปิดตัวของกรดอะมิโนที่ไม่มีขั้วและไม่มีประจุ ทำให้สูญเสียความสามารถในการละลายและความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงพื้นผิวไฮโดรโฟบิกดังกล่าวจะสัมพันธ์กับระดับการเปิดตัว และการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน นอกจากนี้การศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของหมู่ซัลฟไฮดริลที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนก็สามารถใช้ในการติดตามการเปลี่ยนแปลง หรือการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็งได้ โดยการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลเป็นการแสดงให้เห็นถึงการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟไฮดริล การเกิดปฏิกิริยารีดักชั่นของพันธะไดซัลไฟด์ และปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนระหว่างหมู่ซัลฟไฮดริลและไดซัลไฟด์ (Thiol-Disulfide interchange) ของโปรตีน ซึ่งการเชื่อมต่อกันของโปรตีนด้วยพันธะไดซัลไฟด์เกิดขึ้นโดยการเกิดออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟไฮดริลที่ไลท์เมอโรไมโอซิน (Light meromyosin chain) เป็นผลทำให้ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีนลดลง (Benjakul et al., 2003)

ปลาแช่เยือกแข็งนอกจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติ หรือการตกตะกอนของโมเลกุลโปรตีนแล้ว ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงของไขมันโดยการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน การเปลี่ยนไตรเมทิลเอมีนออกไซด์เป็นฟอร์มาลดีไฮด์ และการทำปฏิกิริยาของฟอร์มาลดีไฮด์กับโปรตีน ก็เกิดขึ้นและมีผลต่อคุณภาพของปลาเช่นเดียวกัน (Saeed and Howell, 2002)

2.4 สารป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็ง (Cryoprotectant)

สารป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารแช่เยือกแข็งหรือไครโอโพรเทกแทนต์ คือ สารประกอบที่สามารถป้องกันการสูญเสียคุณภาพของอาหารระหว่างแช่เยือกแข็ง โดยการใช้สารชนิดนี้มีผลเพิ่มอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารแช่เยือกแข็ง สารดังกล่าวอาจพบได้ในอาหารตามธรรมชาติ หรือโดยการเติมในระหว่างการผลิต (MacDonald and Laneir, 1996)

มีสารหลายชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นสารปกป้องแช่เยือกแข็ง ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวควรมีลักษณะโครงสร้างที่ประกอบด้วยส่วนต่างๆ (Noguchi, 1974; Suzuki, 1981) ดังนี้

1. ในโมเลกุลจะต้องประกอบด้วยหมู่ต่อไปนี้ คือ -OH, -COOH หรือ $-OPO_3H_2$ 1 หมู่ และอาจประกอบด้วยหมู่เสริม (supplementary group) อื่นๆ อยู่ 1 หรือ 2 หมู่ เช่น หมู่ -OH, -COOH, $-NH_2$, -SH, $-SO_3H$ และ/หรือ $-OPO_3H$
2. หมู่ดังกล่าวจะต้องจัดเรียงตัวในทิศทางและตำแหน่งที่เหมาะสมต่อกันและกัน โดยหมู่ที่มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่หมู่หนึ่งอาจเชื่อมต่อกับโมเลกุลของโปรตีน และอีกหมู่หนึ่งหรือหลายหมู่อาจทำหน้าที่จับกับน้ำ
3. มีขนาดเล็ก ถึงแม้ในระยะต่อมาจะพบว่ามีสารบางชนิดที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ เช่น พอลิเด็กซ์โทรส (polydextrose) จะมีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ คุณลักษณะใน 2 ข้อแรก จัดเป็นคุณลักษณะที่สำคัญของสารเหล่านี้

นอกจากนี้แล้วควรมีคุณสมบัติอื่นๆ ได้แก่ ความสามารถในการระเหยต่ำ (Low volatility) ความสามารถในการซึมผ่านผนังเมมเบรนได้ดี มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดีโดยในแต่ละโมเลกุลมีความสามารถในการสร้างแรงยึดแบบไฮโดรเจนกับน้ำได้มาก และมีความสามารถในการนำไฟฟ้าได้ต่ำ สารที่มีคุณสมบัติข้างต้น ได้แก่ สารประเภทคาร์โบไฮเดรต พอลิออลหรือพอลิแอลกอฮอล์ (Polyalcohol) และกรดไฮดรอกซีโมโนคาร์บอกซิลิก (Hydroxy monocarboxylic acid)

ในปัจจุบันพบว่า มีสารหลายชนิดที่สามารถช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ คือ

1. น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

น้ำตาลซูโครสเป็นสารให้ความหวานที่มีราคาถูก และหาได้ง่าย ถูกนำมาใช้เป็นสารป้องกันการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน โดยในระยะแรกปริมาณการใช้สูงถึงร้อยละ 8 ซึ่งมีผลให้ซูริมิมีรสหวานมาก และยังมีผลให้ซูริมิมีสีคล้ำขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการปรับปริมาณการใช้ลงเหลือเพียงร้อยละ 4 ด้วยการใช้ซอร์บิทอล ร้อยละ 4 ทดแทน

2. ซอร์บิทอล (Sorbitol)

ซอร์บิทอลเป็นสารให้ความหวานที่พบในผลไม้หลายชนิด อย่างไรก็ตามซอร์บิทอลในทางการค้าได้จากการย่อยแป้งให้เป็นกลูโคส แล้วนำกลูโคสที่ได้ไปผ่านปฏิกิริยาไฮโดรจีเนชั่น

(Hydrogenation) ที่อุณหภูมิ 120-160 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดันของก๊าซไฮโดรเจนที่ระดับความดัน 70-140 atm โดยมีนิเกิลเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา และเนื่องจากซอร์บิทอลไม่มีคาร์บอนิลอยู่ในโมเลกุลจึงไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาสร้างสีน้ำตาลได้ ความหวานของซอร์บิทอลเป็นร้อยละ 60 ของน้ำตาลซูโครส ดังนั้นจึงถูกนำมาใช้ร่วมกับน้ำตาลซูโครสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 เพื่อช่วยลดความหวานและการเกิดสีคล้ำในซูริมิ นอกจากนี้ซอร์บิทอลยังหาได้ง่ายและเป็นสารเติมแต่งอาหารที่รับรองให้อยู่ในรายการของสารเติมแต่งอาหารที่มีความปลอดภัย (General Recognized As Safe : GRAS) อีกด้วย

3. พอลิเด็กซ์โทรส (Polydextrose)

พอลิเด็กซ์โทรสเป็นสารให้ความหวาน ซึ่งเตรียมได้จากกระบวนการควบแน่น (Condensation) ของกลูโคส กลูซิทอล (Glucitol) และกรดซิตริก ในอัตราส่วน 89:10:1 ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีโครงสร้างหลากหลาย และมีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไปเฉลี่ยประมาณ 150 และ 20,000 ดาลตัน Lanier และ Kahane (1986) ได้จดสิทธิบัตรการใช้พอลิเด็กส์โทรสเป็นสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ขณะเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็ง ซึ่งปริมาณการใช้ที่ได้แถลงไว้ได้แก่ ร้อยละ 5-15 หรือร้อยละ 8 หรือน้อยกว่าร้อยละ 8 สำหรับพอลิเด็กซ์โทรสนั้นพบว่าให้พลังงานเพียงร้อยละ 25 ของน้ำตาลซูโครสหรือให้พลังงานเพียง 1 แคลอรีต่อ 1 กรัม เท่านั้น และได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐให้ใช้ในอาหารซึ่งต้องการให้มีพลังงานต่ำได้ นอกจากนี้พอลิเด็กซ์โทรสอาจมีอยู่ในหลายรูปแบบ เช่น Litesse® ซึ่งเป็นรูปแบบดัดแปลงของพอลิเด็กซ์โทรส ไม่มีรสหวาน มีความขมน้อย มีความเป็นกรด และรสเฝื่อนน้อย Sultanbawa และ Li-Chan (1998) พบว่าการใช้ Litesse® ร่วมกับน้ำตาลหรือน้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (ซูโครส ซอร์บิทอล และแลกติทอล) สามารถให้ประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติ จากซูริมิปลาลิงคอดระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็งได้เพิ่มขึ้น

4. สารที่ได้จากการย่อยแป้ง (Starch hydrolysates)

ความสามารถในการเป็นสารปกป้องแช่เยือกแข็งของสารที่ได้จากการย่อยแป้ง ได้มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพดังกล่าวกับโปรตีนแอกโตไมโอซินจากปลาเทราท์ (Trout) แช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส โดย Park และคณะ (1988) พบว่าสารที่ได้จากการย่อยแป้ง 5 ชนิด ซึ่งมีค่าสมมูลเด็กซ์โทรส อยู่ในช่วง 10-36 (Dextrose equivalent, D.E.) ให้ผลต่อการเป็นสารปกป้องแช่เยือกแข็งได้ดีเช่นเดียวกับพอลิเด็กซ์โทรส

5. ไอโซมอลต์ (Isomalt)

ไอโซมอลต์ เป็นสารให้ความหวานที่ให้พลังงานต่ำขณะที่คุณสมบัติโดยทั่วไปคล้ายกับน้ำตาลซูโครส ไม่เกิดปฏิกิริยาสีน้ำตาลกับกรดอะมิโนในอาหาร ระดับความหวานของไอโซมอลต์

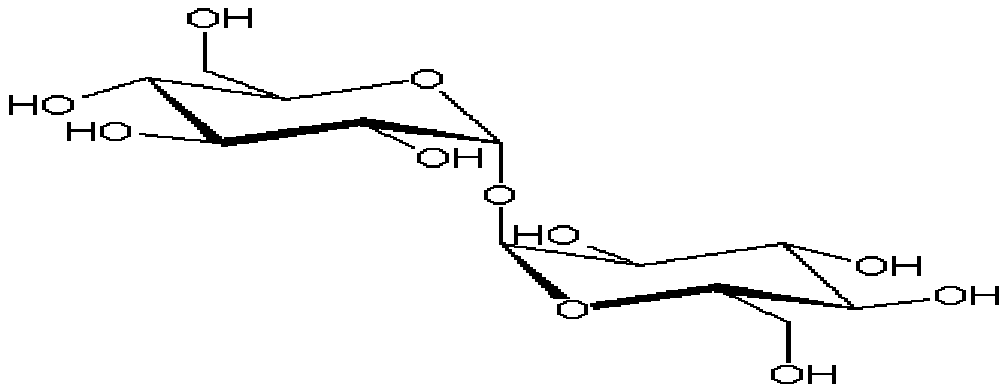
ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น อุณหภูมิ และสภาพของสาร (Form) ที่ใช้ ชื่อในทางการค้าของไอโซมอลต์ คือ Palatinit สำหรับในการผลิตไอโซมอลต์นั้นประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นไอโซมอลทูโลส (Isomaltulose) โดยผ่านกระบวนการทรานส์กลูโคสิเดชัน (Transglucosidation) ที่เร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ และขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) กับไอโซมอลทูโลสในสารละลายที่เป็นกลาง โดยมีไฮโดรเจน และเรนีย์นิเกิล (Raney nickel) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจนได้ผลิตภัณฑ์ 2 ชนิด คือ D-glucopyranosyl-1,6-D-sorbitol (GPS) และ D-glucopyranosyl-1,1-D-manitol (GPM) ในปริมาณที่เท่ากัน สำหรับความปลอดภัยของการใช้ The joint FAO WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) ได้มีมติให้ไม่ต้องกำหนดปริมาณไอโซมอลต์ที่จะบริโภคได้ในแต่ละวัน (Strater and Irwin, 1991)

6. แลกติทอล (Lactitol)

แลกติทอล เป็นสารให้ความหวานที่ไม่พบตามธรรมชาติ แต่ได้จากการผลิตโดยกระบวนการไฮโดรจีเนชั่น (Hydrogenation) ของแลกโตส แลกติทอลมีความหวานประมาณร้อยละ 30-40 ของน้ำตาลซูโครส สำหรับความปลอดภัยของการใช้แลกติทอล The Scientific Committee on Food ของประชาคมยุโรป และ JECFA ได้ให้การรับรองแลกติทอลตั้งแต่เดือนเมษายน ปี ค.ศ. 1983 โดยไม่ได้กำหนดปริมาณที่จะบริโภคได้ในแต่ละวัน

2.5 ทรีฮาโลส (Trehalose)

ทรีฮาโลสจัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) ซึ่งภายในโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล จับกันด้วยพันธะ α,α- 1,1 linkage (รูปที่ 2.4) มีโครงสร้างที่มีความเสถียรสูง เฉื่อยต่อการทำปฏิกิริยากับสารอื่น และจัดเป็นน้ำตาล non-reducing sugar สามารถพบได้ตามธรรมชาติทั้งในพืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ (Yeast) เชื้อรา (Fungi) แบคทีเรีย (Bacteria)และสาหร่าย (Algae) เป็นต้น โดยทรีฮาโลสจะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้กับสิ่งมีชีวิต และยังมีส่วนสำคัญในการรักษาเซลล์เมมเบรน (Membrane) โดยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ของทรีฮาโลสสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจน
กับฟอสโฟลิปิด (Phospholipid) ของเซลล์เมมเบรน ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแทนที่น้ำในขณะที่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตผ่านกระบวนการทำแห้งหรืออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง ทำให้เซลล์เมมเบรนสามารถคงรูปอยู่ได้และของเหลวหรือสารที่อยู่ภายในเซลล์ไม่รั่วออกมา



รูปที่ 2.4 โครงสร้างโมเลกุลของทรีฮาโลส
แหล่งที่มา: Hama (1999)

ถึงแม้ว่าการใช้ประโยชน์จากทรีฮาโลสจะเป็นที่รู้จักกันดีโดยทั่วไป แต่สำหรับการผลิตทรีฮาโลสในระดับอุตสาหกรรมแล้วนั้นยังไม่สามารถทำได้ จนกระทั่งเมื่อปี ค.ศ 1994 จึงได้มีการผลิตทรีฮาโลสขึ้นโดยวิธีการสกัดจากยีสต์ แต่เนื่องจากวิธีการสกัดดังกล่าวมีข้อจำกัดอยู่หลายประการทำให้ผลผลิตที่ได้มีปริมาณต่ำประกอบกับค่าใช้จ่ายที่สูง ในลำดับต่อมาจึงได้มีการพัฒนากระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้สำเร็จโดยใช้เอนไซม์จากเชื้อแบคทีเรียในดิน ที่มีชื่อว่า *Arthobacter sp.* ระบบเอนไซม์ที่ใช้ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด คือ malto-oligosyltrehalose synthase (MTSase) และ malto-oligosyltrehalose trehalohydrorolase (MTHase) (Maruta et al., 1995) ในกระบวนการผลิตนั้นขั้นแรกจะเป็นการทำงานของ MTSase ซึ่งเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนพันธะของกลูโคส (glucose residue) ในส่วน reducing end ของโมเลกุล malto-oligosaccharide จาก α-1,4 ไปเป็น α-1,1 ทำให้ได้ malto-oligosyltrehalose จากนั้นโมเลกุลของทรีฮาโลสจะถูกตัดออกจากสายโมเลกุลของ malto-oligosyltrehalose โดยการทำงานของ MTHase (รูปที่ 2.5) วิธีการผลิตดังกล่าวพบว่าสามารถให้ผลผลิตได้สูงถึง 80% เนื่องจากในปัจจุบันการผลิตทรีฮาโลสในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้วัตถุดิบจากแป้ง (Starch) ดังนั้นจึงต้องใช้เอนไซม์มากกว่า 2 ชนิด คือ เอนไซม์ α-amylase เพื่อช่วยในการย่อยแป้งให้เป็นของเหลว (liquefy) และเอนไซม์ isoamylase เพื่อตัดกิ่งก้านโมเลกุลของแป้ง (Debranch) ก่อน จากนั้นจึงตามด้วยการทำงานของเอนไซม์ MTSase และ MTHase ตามลำดับ (รูปที่ 2.6) ซึ่งวิธีการผลิตนี้พบว่าสามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้
มากกว่า 100 เท่าจากวิธีการผลิตเดิม และเนื่องจากต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตที่ต่ำลงนี้ ส่งผลให้ทรีฮาโลสได้รับความสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์กว้างขวางมากขึ้น ทั้งในอาหาร ยา และเครื่องสำอาง เป็นต้น

การใช้ประโยชน์จากทรีฮาโลสในด้านต่างๆ ได้แก่

1. ทางด้านการแพทย์และเภสัช (Pharmaceuticals) ใช้เป็นสารช่วยปกป้องเซลล์ สเปิร์ม หรือไข่ของสิ่งมีชีวิตต่างๆในการเก็บภายใต้สภาวะแช่เยือกแข็ง และเนื่องจากทรีฮาโลสมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นได้ต่ำ (Low hygroscopicity) จึงช่วยในการเก็บรักษายาต่างๆให้มีอายุการเก็บนานขึ้น

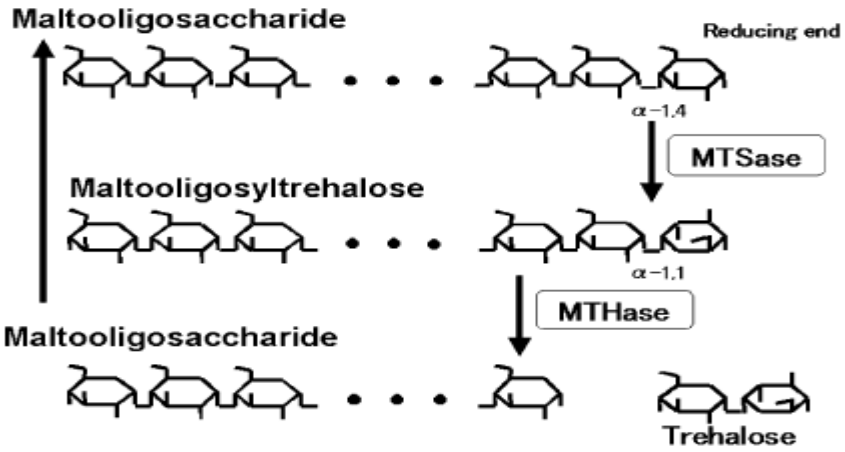
2. อุตสาหกรรมเครื่องสำอาง (Cosmetics) ใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ที่ช่วยรักษาความชุ่มชื้นให้กับผิว

3. อุตสาหกรรมอาหาร (Food) เนื่องจากทรีฮาโลสได้รับการรับรองจาก FDA ให้เป็นสารเติมแต่งอาหารที่มีความปลอดภัย (GRAS) สามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ และ ได้มีมติให้ไม่ต้องกำหนดปริมาณที่จะบริโภคต่อวันโดย JECFA ทำให้ทรีฮาโลสถูกนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารที่หลากหลายมากขึ้น ได้แก่

- ใช้เป็นสารให้ความหวานในผลิตภัณฑ์อาหารประเภทขนมหวานต่างๆ (Confectionery) เช่น ลูกกวาด ขนมปังกรอบ หรือช็อกโกแลต เป็นต้น ทั้งนี้เนื่องจากทรีฮาโลสมีความหวานเป็นร้อยละ 45 ของน้ำตาลซูโครส และมีคุณสมบัติการดูดความชื้นได้ต่ำ ซึ่งจะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนี้มีอายุการเก็บได้นานขึ้น (www.cargill.com, 2004)

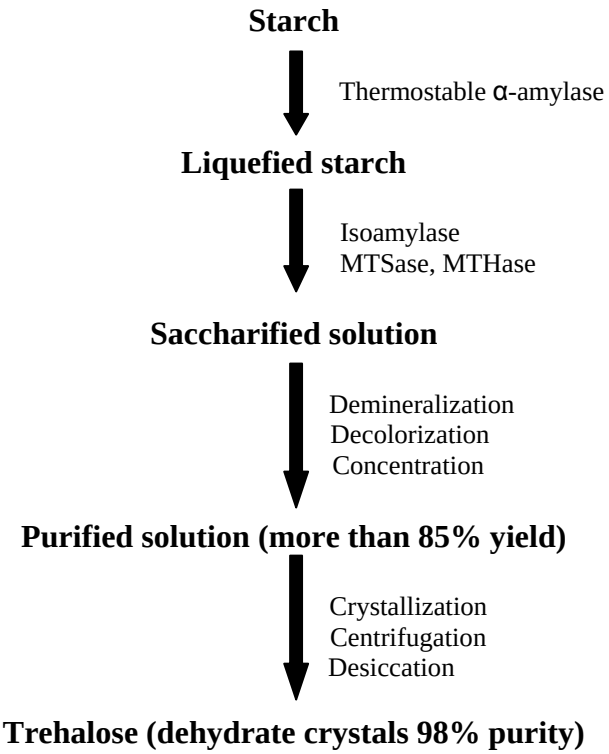
- ใช้เป็นส่วนประกอบในอาหารที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณสูง โดยจะช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสอันเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมันได้ (Oxidation reaction) โดยโมเลกุลของทรีฮาโลสสามารถเกิดอันตรกิริยากับคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ตำแหน่งพันธะคู่ทำให้โมเลกุลของกรดไขมันดังกล่าวมีความเสถียรและไม่สามารถเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้ และจากการที่ปฏิกิริยาดังกล่าวไม่เกิดขึ้น ดังนั้นสารประกอบที่มีผลทำให้อาหารมีกลิ่นรสที่เปลี่ยนไป เช่น 2, 4-decadienal ซึ่งเป็นสารประกอบที่ได้จากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดลิโนเลอิก (Linoleic acid) ก็จะไม่เกิดขึ้น อาหารจึงยังคงมีกลิ่นรสที่ดี และพบว่าการเติมปริมาณทรีฮาโลสมากขึ้นสามารถช่วยลดการเกิด hydroperoxide มากขึ้นด้วย (Higashiyama, 2002)

- ใช้เป็นสารช่วยปกป้องการแช่เยือกแข็งในผลิตภัณฑ์ซูริมิได้ โดยทรีฮาโลสช่วยในการปกป้องโปรตีนไม่ให้เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติจากการแช่เยือกแข็ง ทำให้ผลิตภัณฑ์ยังคงรักษาคุณภาพ ความแน่นเนื้อ ความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของเจลไว้ได้ นอกจากนี้การที่ทรีฮาโลส มีความหวานที่ต่ำกว่าน้ำตาลซูโครสถึงร้อยละ 45 ยังช่วยเพิ่มคุณภาพทางด้านรสชาติของผลิตภัณฑ์ให้มีการยอมรับจากผู้บริโภคมากขึ้น (Hunt, Park and Zoerb, 2002)



รูปที่ 2.5 การผลิตทรีฮาโลสด้วยการใช้เอนไซม์ MTSase และ MTHase

แหล่งที่มา: Higashiyama (2002)



รูปที่ 2.6 การผลิตทรีฮาโลสจากวัตถุดิบแป้งด้วยการใช้เอนไซม์ MTSase และ MTHase ร่วมกับเอนไซม์ α-amylase และ Isoamylase

แหล่งที่มา: Higashiyama (2002)

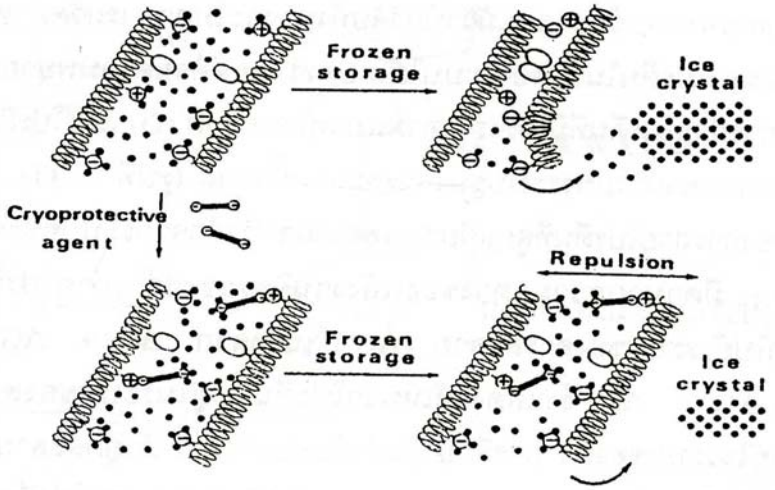
2.6 กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็ง

กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็งต่อการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนนั้น ยังไม่เป็นที่ทราบชัดเจน แต่ก็ได้มีผู้นำเสนอถึงกลไกดังกล่าวซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และกลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็งที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง

2.6.1 กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็งที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low molecular weight) Matsumoto (1980) ได้อธิบายกลไกการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซินโดยตัวถูกละลายที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำว่าเป็นเพราะสารเหล่านี้สามารถป้องกันการจับตัว (Aggregation) ของโมเลกุลไมโอซินโดยอันตรกิริยาที่เกิดขึ้นบริเวณส่วนหางของโมเลกุล อันเป็นผลจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในระหว่างการแช่เยือกแข็งซึ่งทำให้โมเลกุลของน้ำเคลื่อนที่ออกห่างจากพื้นผิวโมเลกุลโปรตีน โปรตีนที่สูญเสียน้ำออกจากบริเวณพื้นผิวของโมเลกุลจึงเคลื่อนที่เข้าใกล้กันจนสามารถเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันได้ (รูปที่ 2.7) แต่ในกรณีที่โปรตีนอยู่ในระบบที่มีสารซึ่งมีคุณสมบัติป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติ สารดังกล่าวจะเกิดอันตรกิริยากับโปรตีนโดยมีหมู่อิสระเหลือพอที่สร้างอันตรกิริยากับน้ำได้ด้วย ดังนั้นน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีนในระบบเช่นนี้จึงเกิดจากการสร้างอันตรกิริยากับโมเลกุลโปรตีนโดยตรงหรือกับตัวถูกละลายที่จับอยู่บนพื้นผิวโมเลกุลโปรตีน ดังนั้นเมื่อการแช่เยือกแข็งเกิดขึ้นแม้ว่าโมเลกุลโปรตีนจะสูญเสียน้ำออกจากบริเวณพื้นผิว แต่การสร้างอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีนจะไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากจะถูกขัดขวาง โดยโมเลกุลของสารที่จับอยู่บนบริเวณพื้นผิวโมเลกุลโปรตีนหรือจากน้ำที่ยังคงหลงเหลืออยู่บนพื้นผิวโมเลกุล (รูปที่ 2.7) อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของ Carpenter และ Crowe (1988) กลับพบว่าสารซึ่งสามารถจับกับโปรตีน เช่น ยูเรีย (Urea) หรือกัวนิดีนไฮโดรคลอไรด์ (Guanidine hydrochloride) มีผลเสริมการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ดังนั้นความสามารถป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนของสารชนิดต่างๆ จึงอาจจะไม่เป็นไปตามข้อเสนอของ Matsumoto (1980)

Arakawa และ Timasheff (1982) พบว่าการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเมื่ออยู่ในน้ำเกิดขึ้นได้ง่ายกว่าเมื่อโปรตีนอยู่ในสารละลายน้ำตาล แม้ว่านักวิจัยทั้งสองจะไม่สามารถวัดค่าพลังงานอิสระของการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในทั้งสองระบบได้โดยตรง แต่ใช้การวัดค่าผลต่างของพลังงานอิสระ (ΔG) ของการถ่ายเทโปรตีนที่สภาพธรรมชาติ (N) และโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติแล้ว (D) จากระบบของน้ำไปยังระบบของสารละลายน้ำตาลแทน (รูปที่ 2.8) พบว่า ผลต่างของพลังงานอิสระของการถ่ายเทโปรตีนที่สูญเสียสภาพธรรมชาติแล้วจากระบบของน้ำไปยังระบบของสารละลายน้ำตาล (ΔG_2) มีค่ามากกว่าผลต่างของพลังงานอิสระของการถ่ายเทโปรตีนที่มีสภาพตามธรรมชาติจากระบบของน้ำไปยังระบบของสารละลายน้ำตาล (ΔG_3) และ

เนื่องจาก $\Delta G_1+\Delta G_2 = \Delta G_3+\Delta G_4$ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า $\Delta G_4 > \Delta G_1$ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโปรตีนที่อยู่ในระบบของสารละลายน้ำตาลมีความคงตัวมากกว่าเมื่ออยู่ในระบบของน้ำ การศึกษาในลำดับต่อมาพบว่าตัวถูกละลายที่สามารถเพิ่มความคงตัวแก่โปรตีนจะไม่จับกับโมเลกุลของโปรตีน แต่จะอยู่ห่างจากโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งมีผลให้โปรตีนสามารถจับกับน้ำได้ง่ายขึ้นและมากขึ้น และถึงแม้ว่าในระหว่างการแช่เยือกแข็งโปรตีนจะยังคงสูญเสียน้ำออกจากบริเวณพื้นผิวของโมเลกุล แต่ก็ยังมีน้ำในปริมาณที่มากพอที่จะขัดขวางการจับตัวกันของโปรตีน ดังนั้นการแยกตัวออกห่างจากบริเวณพื้นผิวโมเลกุลโปรตีนของตัวถูกละลาย จึงได้รับการยอมรับว่าเป็นกลไกสำคัญของการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

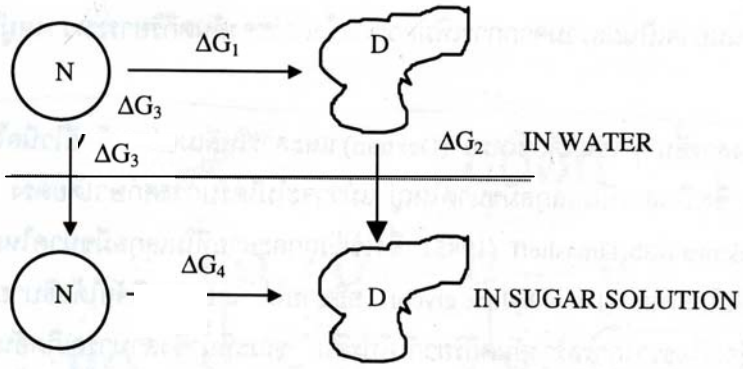


รูปที่ 2.7 แบบจำลองกลไกการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนและกลไกของสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนตามข้อเสนอของ Matsumoto

แหล่งที่มา: Matsumoto (1980)

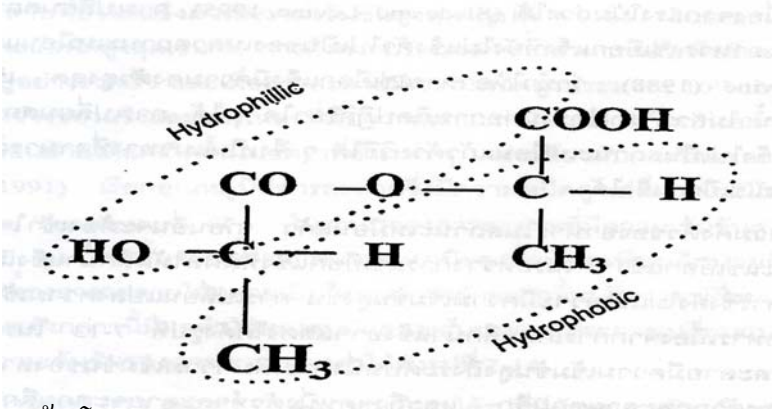
Lee และ Timasheff (1981) กล่าวว่าการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนโดยน้ำตาลเมื่ออยู่ในสารละลายจะมีผลเพิ่มแรงตึงผิว (Surface tension) และแรงยึดเกาะกันภายในโครงสร้างโมเลกุลของน้ำ ขณะที่โมเลกุลของน้ำตาลจะถูกกันออกห่างจากโมเลกุลโปรตีนและเนื่องจากปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นคุณสมบัติของน้ำตาลโดยทั่วไป Lee และ Timasheff (1981) จึงได้เสนอว่าความสามารถป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนของน้ำตาลเป็นผลมาจากการที่โมเลกุลถูกกันออกจากโมเลกุลโปรตีน (Exclude) และสำหรับการเพิ่มความคงตัวแก่โปรตีนโดยโซเดียมแลกเทต (Sodium lactate) ก็พบว่าเกิดขึ้นโดยกลไกที่คล้ายกัน อย่างไรก็ตามความสามารถเพิ่มแรงตึงผิวของน้ำโดยโซเดียมแลกเทตกลับลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นผลจากการรวมตัวของแลกเทตเป็น L-lactoy-l-lactic acid ester ที่มีโครงสร้างโมเลกุลดังรูปที่ 2.9 และเนื่องจากในโมเลกุลประกอบด้วยส่วนที่ชอบน้ำ (Hydrophilic) และไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) จึงทำให้สามารถลดแรงตึงผิวของน้ำได้ (MacDonald and Lanier, 1994; MacDonald, Lanier, Swaigood and

Hamann, 1996) Niwa, Chen and Kanoh (1990) และ Niwa, Kanoh, Osaka and Nakayama (1989) กล่าวว่าเมื่อโปรตีนอยู่ในระบบสารละลายน้ำตาล กลุ่มที่ไม่ชอบน้ำบริเวณพื้นผิวโมเลกุลโปรตีนมีแนวโน้มที่จะพับเข้าสู่ภายในโมเลกุล ซึ่งมีผลให้โครงสร้างโมเลกุลโปรตีนมีความคงตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับข้อเสนอของ Back, Oakenfull and Smith (1979) ที่ได้กล่าวว่าความสามารถเพิ่มความคงตัวให้แก่โปรตีน โดยน้ำตาลนั้นอาจเป็นผลร่วมจากการเพิ่มความแข็งแรงของอันตรกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำในโมเลกุลของโปรตีน



รูปที่ 2.8 แบบจำลองการถ่ายเทโปรตีนที่มีสภาพตามธรรมชาติ (N) และที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ (D) จากน้ำไปยังสารละลายน้ำตาลและการเปลี่ยนแปลงของพลังงานอิสระในแต่ละขั้นตอน

แหล่งที่มา: Arakawa และ Timasheff (1982)



รูปที่ 2.9 โครงสร้างโมเลกุลของ L-lactoy-l-lactic acid ester

แหล่งที่มา: MacDonald และคณะ (1996)

2.6.2 กลไกการทำงานของสารปกป้องแช่เยือกแข็งที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง (High molecular weight) เช่น สารพอลิเมอร์ของโพลีไวนิลไพโรลิดอน (Pyrrolidone) เด็กซ์เทรน (Dextran) และโพลีเอทธิลีนไกลคอล (Polyethylene glycol) เป็นผลจากการที่โมเลกุลมีขนาดใหญ่ ซึ่งจะกีดขวางการสร้างอันตรกิริยากับโปรตีน ขณะที่น้ำซึ่งสามารถเกิดอันตรกิริยากับโมเลกุลของโปรตีนได้ดีกว่าสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ จึงเป็นผลให้อนุภาคของสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ถูกกันออกห่างจากโมเลกุลโปรตีน (Arakawa and Timasheff, 1985) นอกจากนี้กลไกการทำงานของสารโมเลกุลใหญ่

ยังได้มีการเสนอว่าเป็นผลอันเนื่องมาจากความหนืดของสารละลายที่เพิ่มขึ้นจนกระทั่งมีค่าสูงพอที่จะทำให้ระบบของสารละลายดังกล่าวมีคุณลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว ที่เรียกว่า สถานะเหมือนแก้ว (Glassy state) อีกด้วย ซึ่งสถานะดังกล่าวเป็นสถานะที่โมเลกุลมีการจัดเรียงตัวอย่างไม่เป็นระเบียบหรือเป็นของเหลวที่อยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำ (Undercooled liquid) และมีความหนืดสูง (Slade and Levine, 1995) ซึ่งการที่ระบบมีความหนืดที่สูงมากจัดเป็นลักษณะเด่นที่สำคัญของสถานะเหมือนแก้ว ดังนั้นในสภาวะดังกล่าวจึงสามารถขัดขวางการแพร่กระจายของน้ำได้ และมีผลทำให้น้ำดังกล่าวไม่สามารถเข้าร่วมหรือสนับสนุนการเกิดปฏิกิริยาใดๆได้เนื่องจากน้ำถูกตรึงอยู่ในโครงสร้างคล้ายแก้วนั้น (Glass structure) ขณะเดียวกันก็จะควบคุมการโตของผลึกน้ำแข็งในระหว่างการเก็บรักษาด้วย เนื่องจากการเคลื่อนที่หรือการแพร่กระจายโมเลกุลของน้ำลดลง หรือเกิดขึ้นได้อย่างจำกัด ดังนั้นการเปลี่ยนสถานะทางกายภาพของสารละลายในอาหารแช่เยือกแข็งไปเป็นของเหลวสถานะเหมือนแก้ว จึงเป็นการทำให้อาหารแช่เยือกแข็งมีความคงตัวสูงสุด (Slade and Levine, 1988)

2.7 รายการอ้างอิง

Alais, C., and Linden, G. (1991). Meat and blood products. In Food Biochemistry (pp. 174-192). England: Ellis horwood limited.

Arai, K. (1977). Index of denaturation and its methods. In Fish Protein (pp. 75-90). Tokyo: KoseishaKoseikaku K.K.

Arakawa, T., and Timassheff, S.N. (1982). Stabilization of protein structure by sugars. **J. Biochem.** 21 : 6536-6551.

Back, J.F., Oakenfull, D., and Smith, M.B. (1979). Increased thermal stability of proteins in the presence of sugars and polyols. **J. Biochem.** 18 : 5191.

Badii, F., and Howell, N.K. (2002). Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. **Food Hydrocol.** 16 : 313-319.

Benjakul, S., Seymour, T.S. Morissey, M.T., and An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during ices storage. **J. Food Sci.** 62 : 729-733.

Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tueksuban, J. (2003). Changes in Physicochemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-motem storage in ice. **Food Chem.** 80 : 535-594.

Carpenter, J.F., and Crowe, J.H. (1988). The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. **Cryobiol.** 25 : 244-248.

Cheftel, J.C., Cuq, J.L., and Lorient, D. (1985). Amino acids, peptides, and proteins. In O.R. Fennema. (ed.). Food Chemistry. (3th ed., pp. 321-430). New York: Marcel Dekker, Inc.

Cohen, C. (1975). The protein switch of muscle contraction. **Sci Am.** 233 : 36-45.

Damodaran, S. (1996). Amino acids, peptides, and proteins. In O.R. Fennema. (ed.). Food Chemistry (3th ed., pp. 321-430). New York: Marcel Dekker, Inc.

Hama, K. (1999). Trehalose a multi-functional sugar, Dissertation at Hayashibara Trehalose Symposium in 1999 in Tokyo.

Hastings, R.J., Keay, J.N., and Yong, K.W. (1990). The properties of surimi and kamaboko gels from nine British species of fish. **Int. J. Food Sci. Technol.** 25 : 281-294.

Hermansson, A.M. (1978). Physico-chemical aspects of soy protein structure formation. **J. Text. Study.** 9 : 33-41.

Higashiyama, T. (2002). Novel functions and applications of trehalose. **Pure Appl. Chem.** 74 : 1263-1269.

Hunt, A.L., Park, J.W., and Zoerb, H. (2002). Trehalose as functional cryoprotectant for fish Proteins. In 2002 annual meeting and Food Expo-Anaheim. Carifornia.

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

Lanier, T.C. and Akahane, T. (1986). Method of retarding denaturation of meat products. U.S. Patent No. 4, 572, 838.

Lee, J.C. and Timassheff, S.N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. **J. Biol. Chem.** 256 : 7193-7201.

Levine, H. and Slade, L. (1988). Principle of cryostabilization techonogy from structure/property relationships of carbohydrate/water systems. **A review. Cryo-Lett.** 9 : 21-63.

MacDonald, G.A. and Lanier, T.C. (1994). Actomyosin solubilization to freeze-thaw and heat denaturation by lactate salts. **J. Food Sci.** 59 : 101-105.

MacDonald, G.A. and Lanier, T.C. (1997). Cryoprotectants for improving frozen food quality. In M.C. Erickson and Y.C. Hung (eds). Quality in Frozen Food (pp. 197-232). New York: Chapman and Hall.

MacDonald, G.A., Lanier, T.C., Swaigood, H.E., and Hamann, D.D. (1996). Mechanism for stabilization of fish actomyosin by sodium lactate. **J. Agric. Food Chem.** 44 : 106-112.

Matsumoto, J.J. 1980. Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In J.R. Whitaker and M. Fujimaki (ed.). Chemical Deterioration of Proteins (pp. 95-123). Washington DC: American Chemical Society.

Nakagawa, T., Watabe, S., and Hashimoto, K. (1988). Electrophoretic analysis of sarcoplasmic proteins from fish muscle on polyacrylamide gels. **Nippon Suisan Gakkaishi.** 54 : 993-998.

Niwa, E., Chen, E.S., and Kanoh, S. (1990). Fluorometry on the surface of surimi. **Nippon Suisan Gakkaishi.** 54 : 1371-1374.

Niwa, E., Kanoh, S., Osaka, Y., and Nakayama, T. (1989). Changes in surface hydrophobicity of fish actomyosin induced by urea. **Nippon Suisan Gakkaishi.** 55 : 143-146.

Park, J.W., Lanier, T.C., and Green, D.P. (1988). Cryoprotective effects of sugar, polyols and/or phosphates on Alaska pollack surimi. **J. Food Sci.** 53 : 1-3.

Ramirez, J.A., Martin-Polo. M.O., and Bandman, E. (2000). Fish myosin aggregation as affected by freezing and initial physical state. **J. Food Sci.** 65 : 556-560.

Saeed, S. and Howell, N.K. (2002). Effect of lipid oxidation and frozen storage on muscle proteins of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). **J. Sci. Food Agric.** 82 : 579-586.

Sano, T., Ohno, T., Otsuka-Fuchino, H., Matsumoto, J.J, and Tsuchiya, T. (1994). Carp natural actomyosin : thermal denaturation mechanism. **J. Food Sci.** 59 : 1002-1008.

Schubring, R. (1999). DSC studies on deep frozen fishery products. **Thermochemica Acta.** 337 : 89-95.

Shimizu, Y., Machida, R., and Takenami, S. (1981). Species variation in the gel-forming characteristics of fish meat paste. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 47 : 95-104.

Sikorski, Z.E. and Kotakowska, A. (1994). Change in frozen stored fish. In Z.E. Sikorski, B. Sun Pan, and F. Shahidi. (eds.). Seafood Protein. (pp. 99-112). New York: Chapman Hall.

Slade, L. and Levine, H. (1995). Water and the glass transition : dependence of the glass transition on the composition and chemical structure: special implications for flour functionality in cookie baking. **J. Food Eng.** 24 : 431-509.

Smith, D.M. (1991). Factors influencing heat-induced gelation of muscle proteins. In N. Parris and R. Barford (eds.). Interaction of Food Proteins (pp. 243-256). Washington DC: American Chemical Society.

Strater, P.J. and Irwin, W.E. (1991). Isomalt. In L.O Brien and R.C. Gelard (eds.). Alternative

Sweeteners (pp. 390). New York: Marcel Dekker, Inc.

Suzuki, T. (1981). Fish and Krill Protein : Processing Technology. London: Appiled Science Publishers Ltd.

Sych, J., Lacruix, C., Adambounou, L.T., and Castaigne, F. (1990). Cryoprotective effect of lactitol, palatinit and polydextrose on cod surimi proteins during frozen storage. **J. Food Sci.** 55 : 356-360.

Tamarkin, D.A. (2004). Miofibril Composition [Online]. Available: http://distance.stcc.edu.

Tsukamasa, Y. and Shimizu, Y. (1989). The gel-forming properties of the dorsal muscle from *Clupeliformes* and *Salmonoidei*. **Nippon Suisan Gakkaishi.** 55 : 529-534.

Wan J., Kimura, I., and Satake, M. (1995). Causes of inferior gel-forming ability of salmon surimi paste. **Fish. Sci.** 61 : 711-715.

Wong, D.W.S. (1989). Mechanism and Theory : Food Chemistry. New York: An AVI Book.

Yamanka, A. and Mackie, I.M. (1971). Changes in the activity of sarcoplasmic adenosine triphosphatase during iced-storage and frozen storage of cod. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 37 : 1105-1109.

Yean, Y.S. (1993). The quality of surimi made from threadfin bream stored in ice for different periods. **Int. Food Sci. Technol.** 28 : 343-346.

บทที่ 3
การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของแอคโตไมโอซินจากปลาเขตร้อนบางสายพันธุ์ระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง
PHYSICO-CHEMICAL CHANGES OF ACTOMYOSIN FROM SOME TROPICAL FISH DURING FROZEN STORAGE

3.1 บทคัดย่อ

การเก็บแช่เยือกแข็งสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาเขตร้อน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล (Tilapia*; Oreochromis niloticus*) ปลายี่สกเทศ (Rohu*; Labeo rohita*) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (Small scale mud carp*; Cirrhira microlepis*) และปลาทรายแดง (Threadfin bream; *Nemipterus spp.*) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของโปรตีน พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้และกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase activity) ในสภาวะที่มีอิออนชนิดต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แมกนีเซียม-แคลเซียม (Mg^{2+}-Ca^{2+}) และอีดีทีเอ (Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ลดลงตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ขณะที่กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแมกนีเซียม-อีจีทีเอ (Mg^{2+}-Ethyleneglycol bis(2-aminoethylether tetraaetic acid; EGTA) และปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในปลาน้ำจืด 3 สายพันธุ์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ ($p>0.05$) แต่ในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดงพบการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในช่วง 10 วันแรกของการเก็บ จากนั้นลดลง ($p<0.05$) และเมื่อศึกษาโดยวิธีทางอิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE) ในสภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (β-mercaptoethanol; BME) พบว่าสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์น้ำจืด มีความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซินสายหลัก (Myosin heavy chain; MHC) และแอคติน (Actin) ลดลงในวันที่ 5 ของการเก็บ แต่สารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดงพบการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนดังกล่าวในวันที่ 20 ของการเก็บ ขณะที่ในสภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล ไม่พบการลดลงของความเข้มแถบสีโปรตีนไมโอซินสายหลักและแอคตินในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานิลและปลายี่สกเทศ แต่พบการลดลงในตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงในวันที่ 20 ของการเก็บ ผลดังกล่าวแสดงถึงการเกาะตัวกัน

ของไมโอซินสายหลักและแอคตินด้วยพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างจากปลานิล ปลายี่สกเทศและปลานวลจันทร์น้ำจืด ในขณะที่การเกาะตัวกันของตัวอย่างจากปลาทรายแดงเกิดจากอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) สารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืด เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพในระดับสูงใกล้เคียงกับปลาทรายแดง ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างจากปลานิลและปลายี่สกเทศ แสดงให้เห็นว่าแอคโตไมโอซินจากปลานิลและปลายี่สกเทศ มีเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งสูงกว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดง

3.2 บทนำ

ปลาน้ำจืดเป็นสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจที่มีปริมาณการเพาะเลี้ยงสูง แต่มีมูลค่าค่อนข้างต่ำ จากข้อมูลในปี พ.ศ. 2546 พบว่าปริมาณการผลิตปลาทั่วโลกมีปริมาณ 39.8 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าทั้งสิ้น 53.8 พันล้านเหรียญสหรัฐ ในจำนวนนี้แบ่งเป็นปลาทะเล 15.9 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่า 26.5 พันล้านเหรียญสหรัฐ และเป็นปลาน้ำจืด 23.8 ล้านตัน คิดเป็นมูลค่าเพียง 27.2 พันล้านเหรียญสหรัฐ (FAO, 2005) แนวทางหนึ่งในการเพิ่มมูลค่าให้กับปลาน้ำจืดซึ่งจัดเป็นสัตว์น้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของไทย คือ การแปรรูปเพื่อยืดอายุการเก็บของเนื้อปลา การแช่เยือกแข็งสามารถรักษาคุณภาพของปลาวิธีหนึ่ง ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในเรือประมงและในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ดังนั้น การศึกษาถึงเสถียรภาพของโปรตีนปลาต่อการแช่เยือกแข็งจะช่วยให้สามารถพิจารณาถึงความเป็นไปได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งจากปลาน้ำจืดได้ โดยในการศึกษาเสถียรภาพของโปรตีนปลาต่อการแช่เยือกแข็ง แนวทางหนึ่งในการศึกษา คือ การศึกษาในระบบจำลองหรือระบบของสารละลายโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อของสัตว์ ซึ่งจะวิเคราะห์ถึงเสถียรภาพ จากคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไประหว่างการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ทั้งนี้เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพที่เกิดขึ้นจะบ่งบอกถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพของเนื้อปลาหรือผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลา ทั้งทางด้านรสชาติ เนื้อสัมผัส และคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional property) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการเกิดเจล (Gel forming ability) (Barroso, Careche, Barrios and Borderias, 1998; Mutsumoto, 1980; Shenouda, 1980; Suzuki, 1981) สำหรับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติที่สำคัญเมื่อโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ ได้แก่ ความสามารถในการละลายลดลง (Protein solubility) สูญเสียคุณสมบัติเชิงชีวเคมี (Biochemical properties) เช่น กิจกรรมของเอนไซม์เอทีพีเอส (ATPase activity) เกิดการเปิดตัว (Unfold) และการเพิ่มขึ้นของกลุ่มที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Reactive groups) เช่น หมู่ซัลฟไฮดริล และหมู่ไฮโดรโฟบิก เป็นต้น และเกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างหรือขนาดของโมเลกุล (Arai, 1977) สำหรับปลาน้ำจืดที่น่าสนใจและนำมาใช้ศึกษาถึงเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งเพื่อพิจารณาถึงความเป็นไปได้เบื้องต้นต่อการนำไปผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งนั้นได้แก่ ปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์น้ำจืด

เมื่อปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยมีปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาทั้ง 3 ชนิด เท่ากับ 98,3364,224 และ 620 ตัน ตามลำดับ จากปริมาณการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทั้งหมด 361,125 ตัน (Fishery Department of Thailand, 2005) ปลานิลจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ มีการส่งเสริมการเลี้ยงโดยทั่วไป หาซื้อเพื่อเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ง่าย อีกทั้งยังเป็นปลาที่มีเนื้อมากและเป็นปลาที่ตลาดผู้บริโภคมีความต้องการสูง ปริมาณการเพาะเลี้ยงสูง เนื่องจากสามารถเพาะเลี้ยงและแพร่ขยายพันธุ์ได้ง่ายทั่วทุกภูมิภาคของประเทศไทย รวมทั้งยังมีการส่งออกต่างประเทศในรูปของปลาแล่เนื้ออีกด้วย (กรมประมง, 2537) สำหรับปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลายี่สกเทศเป็นปลาที่มีก้างฝอยทำให้ตลาดการบริโภคยังไม่เป็นที่กว้างขวางมากนัก (สุวรรณ, อารยา และสุภวรรณ, 2543) ดังนั้นการแปรรูปเป็นเนื้อปลาบดสามารถกำจัดปัญหาก้างฝอยนี้ได้

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งของโปรตีนแอคโตไมโอซินจากปลาน้ำจืดในระบบจำลองโดยเปรียบเทียบกับสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง ซึ่งเป็นปลาทะเลและเป็นวัตถุดิบสำคัญในการผลิตซูริมิ

3.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 วัตถุดิบปลา

ปลาเขตร้อนที่ใช้ในการศึกษา 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล *(Oreochromis niloticus)*ปลายี่สกเทศ *(Labeo rohita)* ปลานวลจันทร์น้ำจืด *(Cirrhira microlepis)* และปลาทรายแดง *(Nemipterus spp.)* ปลานิลได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งมีขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 1 กิโลกรัม ปลายี่สกเทศและปลานวลจันทร์น้ำจืดซื้อจากฟาร์มเกษตรประมง อ. เมือง จ. นครราชสีมา ขนาดน้ำหนักตัวของปลาทั้ง 2 ชนิด ประมาณ 1 กิโลกรัม และสำหรับปลาทรายแดงเป็นปลาที่จับได้จากอ่าวไทยในเขตจังหวัดระยอง ขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 300 กรัม ขนส่งวัตถุดิบปลาทั้งหมดมายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จ. นครราชสีมา โดยบรรจุในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็ง ทำให้ปลาสลบโดยเก็บในห้องแช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการแล่ บด และสกัดโปรตีนแอคโตไมโอซินเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.3.2 การเตรียมสารละลายแอคโตไมโอซิน

สกัดแอคโตไมโอซินจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ ตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยการปั่นผสมเนื้อปลากับสารละลายบัฟเฟอร์เย็น ซึ่งประกอบด้วยโพแทสเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต เข้มข้น 0.04 โมลาร์ และโซเดียมไบคาร์บอเนต เข้มข้น 0.01 โมลาร์ (pH 7) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 10 เป็นเวลา 1 นาที โดยใช้ความเร็วต่ำสุด (low speed) ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Homogenizer) (Nissei AM-8, NSS Nihonseiki Kaisha Co., Ltd., Kyoto, Japan) ปั่นเหวี่ยงสารผสมที่ 5000x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส (Supernatant) และเติมน้ำกลั่น 3 เท่า และปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่

5000x g (Rotor F28/50, Sorvall RC 28S, Dupont Co., Newtown, CT) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ4 องศาเซลเซียส เก็บตะกอนนำมาละลายด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัดในช่วงแรกและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารละลายแอคโตไมโอซินที่สกัดได้ 25 มิลลิลิตรบรรจุในหลอดโพลีเอทธิลลีน (Polyethylene tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ศึกษาการเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมี-กายภาพระหว่างเก็บแช่เยือกแข็งที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน

3.3.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ตามวิธีของ Herrera and Mackie (2004) โดยการปั่นเหวี่ยงสารละลายตัวอย่างที่ 15000x g (Rotor F28/50, Sorvall RC 28S, Dupont Co., Newtown, CT) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใสและวิเคราะห์ความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, 1951) โดยคำนวณในหน่วยร้อยละของปริมาณโปรตีน ซึ่งคิดเทียบปริมาณโปรตีนในวันที่ 0 เป็นร้อยละ 100

3.3.4 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส

ติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส ตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีอิออนชนิดต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) แมกนีเซียม-แคลเซียม(Mg^{2+}-Ca^{2+}) แมกนีเซียม-อีจีทีเอ (Mg^{2+}-Ehyleneglycol bis(2-aminoethylether tetraacetic acid; EGTA) และอีดีทีเอ(Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) ซึ่งในสารละลายที่ทำปฏิกิริยาจะประกอบด้วยสารละลายต่างๆ ได้แก่

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมในสภาวะที่มีแคลเซียม ในสารละลายผสมประกอบด้วยตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซิน 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมในสภาวะที่มีแมกนีเซียม ในสารละลายผสมประกอบด้วยตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซิน 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เข้มข้น 0.001 โมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.06 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมในสภาวะที่มีแมกนีเซียม-แคลเซียม ในสารละลายผสมประกอบด้วยตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซิน1 มิลลิลิตร(ความเข้มข้น 1-3มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)

สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมในสภาวะที่มีแมกนีเซียม-อีจีทีเอ ในสารละลายผสมประกอบด้วยตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซิน 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2$) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ สารละลายอีจีทีเอ (EGTA) เข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมในสภาวะที่มีอีดีทีเอ ในสารละลายผสมประกอบด้วยตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซิน 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายอีดีทีเอ (EDTA) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.6 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์

นำสารละลายแต่ละสภาวะบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค เข้มข้นร้อยละ 15 (15%Trichoroacetic acid) จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 5000x g (Rotor PK 121R, ACCEL, Italy) เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฟอสเฟตตามวิธีของ MacDonald and Lanier (1994) โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเอลลอน (Elon reagent) และสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate) ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน รายงานกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในหน่วยไมโครโมล ของฟอสเฟตต่อปริมาณโปรตีนต่อนาที

3.3.5 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

วิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยใช้สารละลายกรด 1-อะนิลิโนแนฟธาลีน-8-ซัลโฟนิก (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid; ANS) เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ (RF-1501; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่นการกระตุ้น (Excitation) และการคายพลังงาน (Emission) เท่ากับ 374 และ 485 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณปริมาณพื้นผิวไฮโดร

โฟบิกจากค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (แกน X) กับค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescene intensity : แกน Y)

3.3.6 ปริมาณหมู่ซัลฟ์ไฮดริลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยเจือจางตัวอย่างสารละลายแอคโตไมโอซินด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยยูเรียเข้มข้น 8 โมลาร์ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 2 สารละลายเอทธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก เข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ และทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ (8M urea, 2% SDS, 10mM EDTA, 0.2% Tris-Cl; pH 7) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 จากนั้นทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5,5'-ไดไธโอบิส (2-กรดไนโตรเบนโซอิก) (5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid; DTNB) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร คำนวณปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด โดยใช้ค่าสัมประสิทธ์การดูดกลืนแสง (ε) เท่ากับ 13600 $M^{-1}cm^{-1}$

3.3.7 การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

เตรียมสารละลายตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธี SDS-PAGE โดยการเตรียมส่วนผสมระหว่างสารละลายแอคโตไมโอซินจากการเก็บแช่เยือกแข็งที่เวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน กับสารละลายทรีทเมนต์บัฟเฟอร์ (treatment buffer) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ซึ่งแบ่งเป็นสองชุด คือ สารละลายทรีทเมนต์บัฟเฟอร์ชนิดที่มีส่วนผสมของเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล และไม่มีส่วนผสมของเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (β-mercaptoethanol; BME) (Leammli, 1970) เก็บสารละลายตัวอย่างดังกล่าวที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE โดยในการแยกชนิดโปรตีนจะใช้ตัวอย่างสารละลายในปริมาตรที่เท่ากันทั้งหมด คือ 20 ไมโครลิตร เจลสแตคกิ้ง (stacking gel) มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ร้อยละ 4 ส่วนเจลที่แยกโปรตีน (separating gel) มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ ร้อยละ 10 (Acrylamide) ย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลายคูแมสซีบลู (0.125% Coomassie blue R-250) เข้มข้นร้อยละ 0.125 ล้างสีย้อมด้วยสารละลายผสมระหว่าง เมทธานอล ร้อยละ 25 (25% Methanol) และกรดอะซิติก ร้อยละ 10 (10% Acetic acid)

3.3.8 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลอง ที่จัดทรีทเมนต์แบบแฟกทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorail Experiments in Completely Randomize Design; CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1993; SAS Institute Inc., Carry, NC, USA)

3.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

3.4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

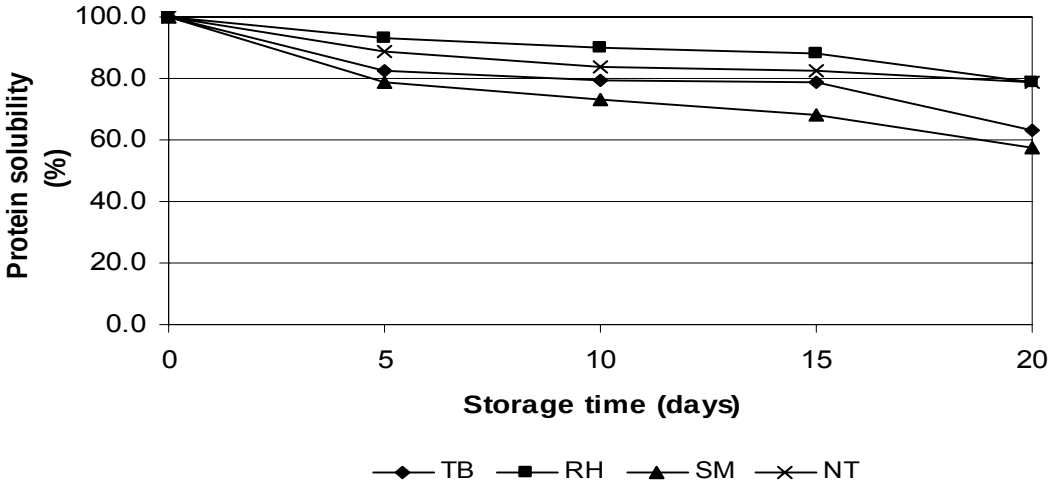
ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะการเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส ($p<0.05$) โดยในวันที่ 20 ของการเก็บ พบว่าปริมาณโปรตีนจากตัวอย่างปลาทรายแดง ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลานิล มีปริมาณลดลงจากเริ่มต้น (วันที่ 0) ร้อยละ 36.7, 21.6, 42.3 และ 21.4 ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) ผลการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองในปลากะพงขาว (Giant seaperch) ซึ่งลดลงร้อยละ 56.2 หลังการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน (ศิริพร, 2542) ปลาเรนโบว์เทราท์ (rainbow trout) ลดลงร้อยละ 58 หลังการเก็บแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ (Herrera and Mackie, 2004) Buttkus (1970) รายงานว่าการละลายของไมโอซินจากปลาเทราท์ (trout) ลดลงร้อยละ 37 หลังเก็บไว้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และการละลายของโปรตีนไมโอซินจากปลามิลค์ (milkfish) ลดลงร้อยละ 27 หลังเก็บไว้นาน 14 วัน ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส (Jiang, Hwang and Chen, 1988)โดยการลดลงของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ดังกล่าว เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีน อันเนื่องมาจากการแช่เยือกแข็ง กล่าวคือ น้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุลของโปรตีนมีการเปลี่ยนสถานะจากน้ำที่เป็นของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง โปรตีนสูญเสียน้ำที่อยู่ล้อมรอบโมเลกุล ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนไม่สามารถอยู่ในสภาพธรรมชาติได้ จึงเกิดการเปิดตัวหรือคลายตัว (Unfold) ของโมเลกุล ซึ่งการคลายตัวดังกล่าวมีผลทำให้หมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic region) และหมู่ซัลฟไฮดริลปรากฏขึ้นบริเวณพื้นผิวของโมเลกุล ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาระหว่างหมู่ไม่ชอบน้ำและพันธะไดซัลไฟด์ขึ้นระหว่างโมเลกุลโปรตีน (Aggregate) โดยผลจากการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนดังกล่าวก่อให้เกิดพอลิเมอร์ของโปรตีน ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพอื่นๆ รวมถึงคุณสมบัติการละลายด้วย (Sych, Lacruix, Adambounou and Castaigne, 1990) ดังนั้นการแช่เยือกแข็งจึงส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ลดลง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาทรายแดงไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และมีปริมาณต่ำกว่าสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานิลและปลายี่สกเทศ ($p<0.05$) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาทรายแดงเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติและการเกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนขนาดใหญ่ในระหว่างการแช่เยือกแข็งสูงกว่าปลานิลและปลายี่สกเทศ

3.4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส

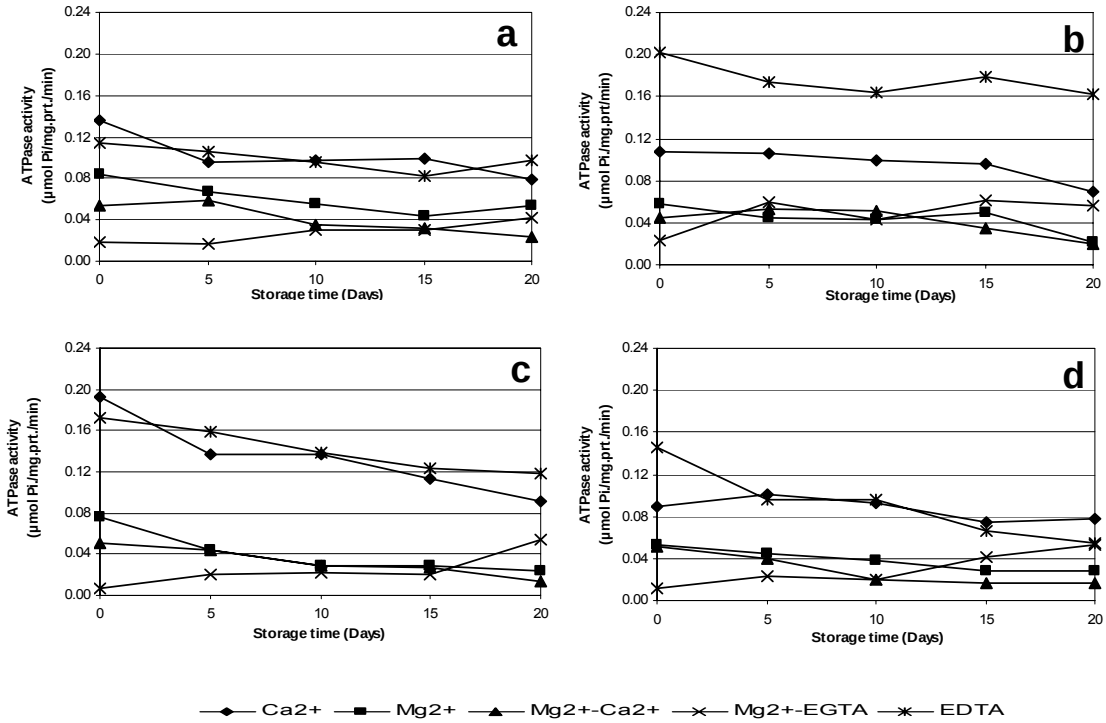
กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลซียมอิออนในวันที่ 20 ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (รูปที่ 3.2a) ปลายี่สกเทศ (รูปที่ 3.2b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด

(รูปที่ 3.2c) และปลานิล (รูปที่ 3.2d) ลดลงร้อยละ 42.2, 35.8, 52.5 และ 25.9 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับเริ่มต้น (วันที่ 0) ($p<0.05$) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในปลาปากคม (lizardfish) ปลาตาหวาน (bigeye snapper) ปลาจวด (croaker) ซึ่งพบการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออน ประมาณร้อยละ 72.1, 42.8 และ 51.7 ตามลำดับ หลังการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 24 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส (Benjakul, Visessanguan and Tueksuban, 2003a) และลดลงร้อยละ 25 ในปลากะพงขาวหลังการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นาน 4.5 เดือน (ศิริพร, 2542) โดยผลดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างไมโอซิน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่บริเวณส่วนหัวของโมเลกุล ซึ่งเป็นส่วนที่มีหมู่ซัลฟไฮดริลที่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยแคลเซียมอิออนในการเกิดกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส (Arai, 1977; Roura and Crupkin, 1995) เมื่อเปรียบเทียบในตัวอย่างปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืด มีกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในวันที่ 20 ของการเก็บแช่เยือกแข็งต่ำที่สุด ซึ่งแตกต่างจากตัวอย่างจากปลานิล ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาทรายแดง ($p<0.05$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเก็บแช่เยือกแข็งมีผลทำให้บริเวณส่วนหัวของโมเลกุลไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืดเกิดการเปลี่ยนแปลงสูงกว่าในปลาอีก 3 สายพันธุ์ที่ศึกษา

สำหรับกิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะที่มีแมกนีเซียมอิออนของสารละลายโปรตีนจากปลาทรายแดง ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลานิล ในวันที่ 20 มีค่าลดลงจากวันที่ 0 ($p<0.05$) ร้อยละ 34.6, 63.7, 68.8 และ 45.5 ตามลำดับ โดยตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลายี่สกเทศมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงมากกว่าตัวอย่างจากปลาทรายแดงและปลานิล ($p<0.05$) ผลการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวบ่งชี้ให้เห็นถึง การเปลี่ยนแปลงของหมู่ซัลฟไฮดริลที่บริเวณไลท์-เมอโรไมโอซิน (Light- meromyosin) ดังนั้นการเก็บแช่เยือกแข็งสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ มีผลทำให้บริเวณไลท์เมอโรไมโอซินเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูป (Conformation) โดยตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลายี่สกเทศเกิดการเปลี่ยนแปลงสูงกว่าในตัวอย่างจากปลาชนิดอื่น และสำหรับค่ากิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะที่มีทั้งแคลเซียมอิออนและแมกนีเซียมอิออนของตัวอย่างจากปลาทรายแดง ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลานิล ในวันที่ 20 ลดลงจากเริ่มต้น ($p<0.05$) ร้อยละ 55.1, 55.1, 74.3 และ 65.9 ตามลำดับ โดยการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งมีผลทำให้เกิดการเกาะตัวกันของไมโอซินและแอคติน (Actin-myosin complex) ส่งผลให้สูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) นอกจากนี้กิจกรรมเอนไซม์ในสภาวะที่มีแมกนีเซียม-อีจีทีเอ เพิ่มขึ้นในปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ แสดงให้เห็นถึง การแยกตัวของโทรโปนินและโทรโปไมโอซินออกจากโปรตีนเชิงซ้อนในระหว่างการเก็บตามที่ได้รายงานในปลามิลค์(milkfish)และปลาแปซิฟิกไวท์ติ้ง (Pacific whithing) (Seki and Narita, 1980; Jiang et al., 1988; Benjakul, Seymour, Morrissey and An, 1997)



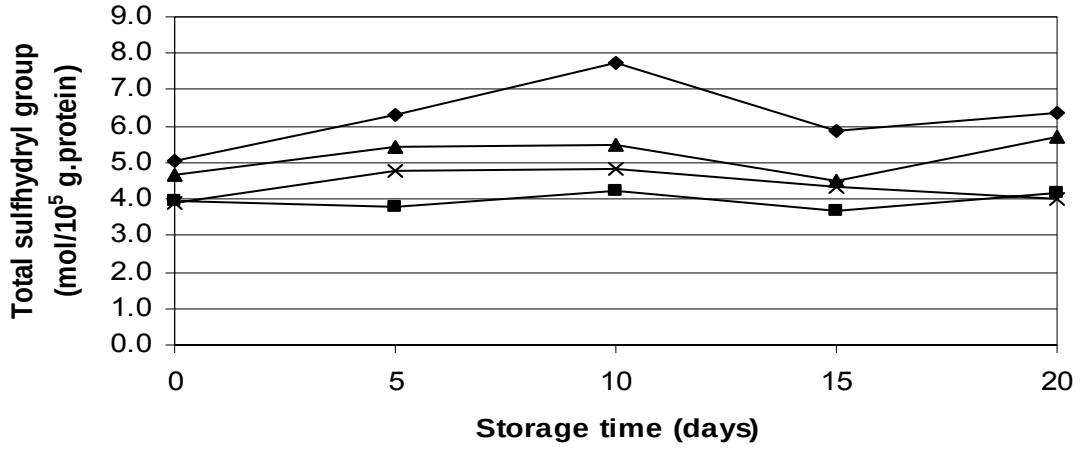
รูปที่ 3.1 ความสามารถในการละลายของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน



รูปที่ 3.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส ในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออน (Ca^{2+}), แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}), แมกนีซียมและแคลเซียมอิออน (Mg^{2+}-Ca^{2+}), แมกนีเซียมและอีจีทีเอ (Mg^{2+}-EGTA) และอีดีทีเอ (EDTA) ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (a) ปลายี่สกเทศ (b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (c) และปลานิล (d) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

3.4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด

จากการวิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลานิล ไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็งที่ -20 องศาเซลเซียส ($p>0.05$) (รูปที่ 3.3) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในปลากะพงขาว (ศิริพร, 2542) ซึ่งได้อธิบายว่าอาจเนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนหมู่ไดซัลไฟด์-ซัลฟไฮดริล (Disulfide-sulfhydryl interchange) ระหว่างโมเลกุลโปรตีน (Buttkus, 1970) ขณะที่ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดงค่าเพิ่มขึ้นในช่วง 10 วันแรกของการเก็บ จากนั้นมีค่าลดลง ($p<0.05$) (รูปที่ 3.3) โดยการเพิ่มขึ้นของปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลในช่วงแรกเป็นผลจากการเปิดตัวของโมเลกุลโปรตีนทำให้หมู่ซัลฟไฮดริลซึ่งอยู่ภายในเปิดตัวสู่ภายนอก จากนั้นหมู่ซัลฟไฮดริลที่ถูกเปิดตัวออกนี้จะเกิดอันตรกิริยาระหว่างกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ จึงมีผลทำให้ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดลดลงในช่วงหลัง และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในสารละลายแอคโตไมโอซินปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในตัวอย่างจากปลาทรายแดงมีปริมาณสูงกว่าตัวอย่างจากปลาน้ำจืดทั้ง 3 ชนิด ($p<0.05$)

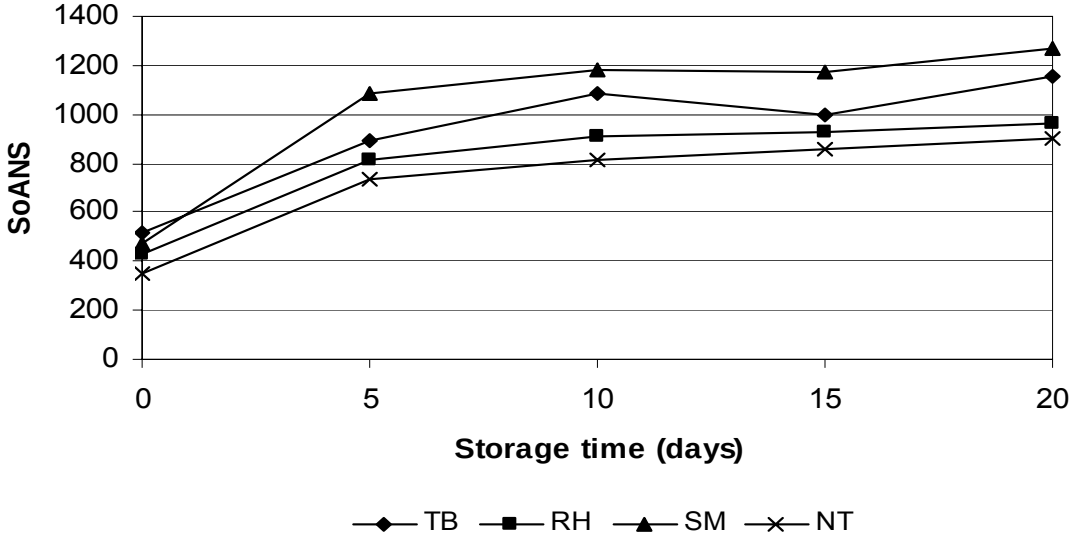


รูปที่ 3.3 การเปลี่ยนแปลง —◆— TB —■— RH —▲— SM —×— NT ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

3.4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของสารละลายแอคไมโอซินจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณเพิ่มขึ้น ($p<0.05$) ตลอดระยะการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ผลดังกล่าวเกิดขึ้นเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาปากคม (lizardfish) ปลาจวด (croaker) ปลาตาหวาน (bigeye snapper) ปลาคอด (cod) และปลากะพงขาว (ศิริพร, 2542; Ang and Hultin, 1989; Benjakul, Visessanguan, Thongkaew and Tanaka, 2003b) ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเป็นผลจาก การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนขณะแช่เยือกแข็ง โดยโมเลกุลโปรตีนเกิดการคลายตัวหรือเปิดตัวออกทำให้หมู่ไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic region) ที่อยู่ภายในโมเลกุลถูกเปิดตัวออก ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืดเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับตัวอย่างจากปลาทรายแดง ($p>0.05$) ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างจากปลานิลและปลายี่สกเทศ ($p<0.05$) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (รูปที่ 3.1) ซึ่งพบว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงต่ำกว่าปลานิลและปลายี่สกเทศเช่นเดียวกัน ($p<0.05$) ดังนั้นการเก็บแช่เยือกแข็งตัวอย่างสารละลายโปรตีนดังกล่าว จึงมีผลทำให้ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้นจากการเปิดตัวหรือคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนและมีผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ลดลง



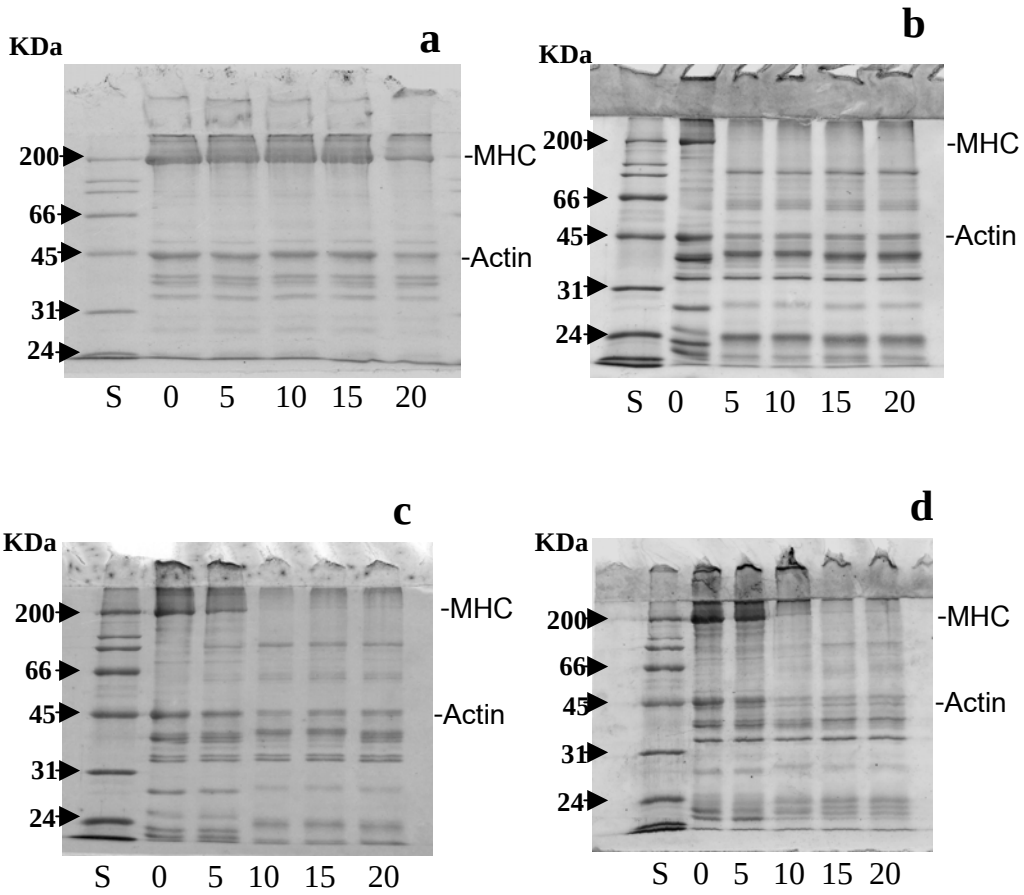
รูปที่ 3.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (TB) ปลายี่สกเทศ (RH) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (SM) และปลานิล (NT) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วัน

3.4.5 การแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส (SDS-PAGE)

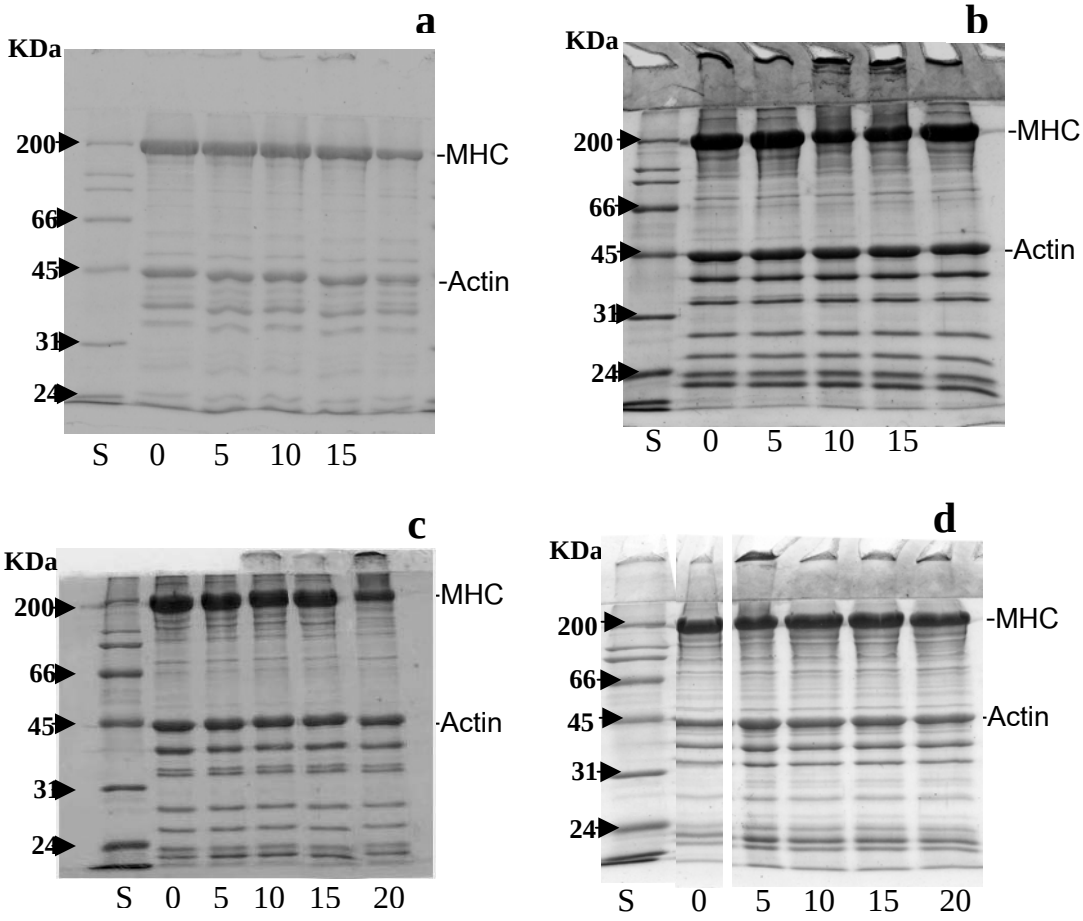
เมื่อวิเคราะห์ SDS-PAGE ในสภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (รูปที่ 3.5a-d) พบว่าสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดงมีความเข้มของแถบสีไมโอซินสายหลัก (MHC) และแอคติน (Actin) ลดลงในวันที่ 20 ของการเก็บ ขณะที่สารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ พบการลดลงในวันที่ 5 ของการเก็บ จากผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าใน

สารละลายแอคโตไมโอซินที่สกัดได้นอกจากจะมีแอคโตไมโอซินแล้ว ยังมีทั้งไมโอซินอิสระและแอคตินอิสระด้วย จึงทำให้สังเกตเห็นทั้งแถบไมโอซินสายหลักและแอคตินตั้งแต่เริ่มต้น (วันที่ 0) ความเข้มของแถบโปรตีนที่ลดลงเมื่อระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนานขึ้น แสดงให้เห็นว่าโปรตีนเกิดการจับตัวระหว่างโมเลกุล ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างไมโอซินกับแอคติน หรือระหว่างไมโอซินกับไมโอซิน หรือระหว่างแอคตินด้วยกันเอง จึงทำให้ความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซินกับแอคตินลดลง อย่างไรก็ตามโมเลกุลโปรตีนที่จับตัวมีขนาดใหญ่ขึ้นนี้จากปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ยังคงเป็นโปรตีนที่อยู่ในสภาพธรรมชาติและสามารถละลายได้ (Soluble aggregate) ดังจะเห็นจากปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ รวมทั้งค่ากิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออนของปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ยังคงมีค่าการละลายและค่ากิจกรรมอยู่ในระดับที่สูง

ความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซิน และแอคตินจากปลาทรายแดงยังคงลดลงในวันที่ 20 ของการเก็บ เมื่อวิเคราะห์ในสภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (รูปที่ 3.6a-d) ซึ่งแตกต่างจากปลานิลและปลายี่สกเทศที่ไม่พบการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนดังกล่าว แต่ตัวอย่างจากปลานวลจันทร์น้ำจืดเริ่มพบการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนในวันที่ 20 ของการเก็บจากผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างจากปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ พันธะไดซัลไฟด์ ทั้งนี้เนื่องจากพันธะดังกล่าวจะถูกทำลายด้วย BME ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนที่จับตัวระหว่างกันแยกออกจากกันและสามารถผ่านแผ่นเจลลงไปได้ จึงสังเกตเห็นแถบโปรตีนดังกล่าวในแผ่นเจล ส่วนการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นในตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดในวันที่ 20 ของการเก็บ อาจเกิดจากการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน และมีการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลอย่างแข็งแรงเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ เกิดการตกตะกอนและไม่สามารถถูกละลายออกมาได้ นอกจากนี้ปลาทรายแดงยังมีปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดสูงกว่าปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงแสดงให้เห็นว่าหมู่ซัลฟไฮดริลในโปรตีนจากปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ ถูกออกซิไดซ์เป็นพันธะไดซัลไฟด์ในการจับตัวกันของโมเลกุล แม้ในสภาวะที่มีและไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอลความเข้มแถบโปรตีนไมโอซินและแอคตินของปลาทรายแดงยังคงไม่เปลี่ยนแปลงที่ระยะการเก็บ 0 ถึง 15 วัน ดังนั้นในการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกจึงมีบทบาทสำคัญ เนื่องจากอันตรกิริยาดังกล่าวถูกทำลายด้วยโซเดียมโดดิซิลซัลเฟต (SDS) ส่งผลให้โมเลกุลโปรตีนที่เกาะตัวกันแยกออกจากกันและสามารถผ่านแผ่นเจลลงมาและสังเกตเห็นแถบโปรตีนดังกล่าวในแผ่นเจล และการลดลงของความเข้มแถบโปรตีนในวันที่ 20 ของการเก็บ เกิดขึ้นเช่นเดียวกันกับการลดลงในปลานวลจันทร์น้ำจืด ดังนั้นความเข้มของแถบโปรตีนดังกล่าวจึงลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ ซึ่งพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงมีปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ลดลงมากที่สุดในวันที่ 20 ของการเก็บ(Herrera and Mackie, 2004; Badii and Howell, 2002)



รูปที่ 3.5 รูปแบบโปรตีนจาก SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (a) ปลายี่สกเทศ (b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (c) และปลานิล (d) ภายใต้สภาวะที่ไม่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME) ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยแถว S (lane S) แสดงโปรตีนมาตรฐาน



รูปที่ 3.6 ผลการแยกชนิดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลาทรายแดง (a) ปลายี่สกเทศ (b) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (c) และปลานิล (d) ภายใต้สภาวะที่มีเบต้า-เมอแคปโตเอทธานอล (BME)ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง 0, 5, 10, 15 และ 20 วัน โดยแถว S (lane S) แสดงโปรตีนมาตรฐาน

3.5 สรุปผลการทดลอง

การแช่เยือกแข็งสารละลายแอคโตไมโอซินจากปลานิล ปลายี่สกเทศ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาทรายแดง มีผลทำให้โครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนจากปลาทั้ง 4 สายพันธุ์เปลี่ยนแปลง เกิดการคลายตัวหรือเปิดตัวของพื้นผิวไฮโดรโฟบิกภายในโมเลกุล และเกิดอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลโปรตีน โดยพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างจากปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์น้ำจืด ขณะที่อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก จัดเป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างจากปลาทรายแดง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่างๆเหล่านี้ล้วนแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียความสมบูรณ์ของโมเลกุล อันเนื่องมาจากผลของการแช่เยือกแข็ง ซึ่งจากผลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพในตัวอย่างปลาทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่าตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงมีการเปลี่ยนแปลง

เกิดขึ้นสูงกว่าตัวอย่างจากปลานิลและปลายี่สกเทศ จึงอาจกล่าวได้ว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลาทรายแดงมีเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งต่ำกว่าปลานิลและปลายี่สกเทศ

3.6 รายการอ้างอิง

กองเศรษฐกิจการประมง กรมประมง. (2537). สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ปี 2535 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ.

ศิริพร เรียบร้อย. (2542). การเปลี่ยนแปลงเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* ระหว่างการเก็บในน้ำแข็งและการแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุวรรณ วิรัชกุล, อารยา เชาว์เรืองฤทธิ์ และศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ. (2543). ผลของการเก็บรักษาโดยการแช่เยือกแข็งของเนื้อปลานิลบดไม่ล้างน้ำต่อคุณภาพของซูริมิ. **ว. วิจัย มข.** 5 : 56-65.

Ang, J.F. and Hultin, H.O. (1989). Denaturation of cod myosin during freezing after modification with formaldehyde. **J. Food Sci.** 54 : 814-818.

Arai, K. (1977). Index of denaturation and its methods. In Fish Protein (pp. 75-90). Tokyo: KoseishaKoseikaku K.K.

Badii, F. and Howell, N.K. (2002). Changes in the texture and structure of cod and haddock fillets during frozen storage. **Food Hydrocol.** 16 : 313-319.

Barroso, M., Careche, M., Barrios, L., and Borderias, J. (1998). Frozen hake fillets quality as related to texture and viscosity by mechanical methods. **J. Food Sci.** 63 : 793-796.

Benjakul, S., Seymour, T.A., Morrissey, M.T., and An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. **J. Food Sci.** 62 : 729-733.

Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tueksuban, J. (2003a). Changes in physicochemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. **Food Chem.** 80 : 535-594.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C., and Tanaka, M. (2003b). Comparative study on physicochemical changes of muscle proteins from some tropical fish during frozen storage. **Food Res. Int.** 36 : 787-795.

Buttkus, H. (1970). Accelerated denaturation of myosin in frozen solution. **J. Food Sci.** 35 : 558-562.

FAO. (2005). Summary tables on capture: aquiculture and trade. [Online]. Available: http:// www. Fao.Org.

Fisheries Department of Thailand. (2005). Fisheries Production in quantity by Sub-Sectors, 1981-2000 [Online]. Available: http:// www.fisheries.go.th.

Herrera J.R. and I.M. Mackie. (2004). Cryoprotection of frozen stored actomyosin of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by some sugars and polyols. **Food Chem.** 84 : 91-97.

Jiang S.T., Hwang D.C., and C.S. Chen. (1988). Denaturation and changes in SH group of actomyosin from milkfish (*Chanos chanos*) during storage at -20°C. **J. Agric. Food Chem.** 36 : 433-437.

Lowry, Q. H., Rosebrough, N. J., Farr, L. A., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193 : 265-275.

MacDonald, G.A. and Lanier, T.C. (1994). Actomyosin solubilization to freeze-thaw and heat denaturation by lactate salts. **J. Food Sci.** 59 : 101-105.

Matsumoto, J.J. (1980). Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In J.R. Whitaker and M. Fujimaki (eds.). Chemical Deterioration of Proteins (pp. 95-123). Washington DC: American Chemical Society.

Roura, S. I. and Crupkin, M. (1995). Biochemical and functional properties of myofibrils from pre and post-spawned hake *(Merluccius hubbsi Marini)* stored on ice. **J. Food Sci.** 60 : 269-272.

SAS. (1993). SAS system for windows, release 6.12, Tso40; SAS Institute: Cary, NC.

Seki, N. and Narita, N. (1980). Changes in ATPase activities and other properties of carp myofibrillar protein during ice storage. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 46 : 207-213.

Shenouda, S.Y.K. (1980). Theories of protein denaturation during frozen storage of fish flesh. **Adv. Food Res.** 26 : 275-311.

Suzuki, T. (1981). Fish and Krill Protein: Processing Technology. London: Appiled Science Publishers Ltd.

Sych J., Lacruix C., Adambounou L. T., and F. Castaigne. (1990). Cryoprotective effects of lacitol, palatinit and polydextrose on cod surimi proteins during frozen storage. **J. Food Sci.** 55 : 356-360.

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

บทที่ 4
ผลของสารปกป้องการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี-กายภาพของเนื้อปลาน้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง
EFFECT OF CRYOPROTECTANTS ON PHYSICO-CHEMICAL CHANGES OF FROZEN FRESHWATER FISH MINCES

4.1 บทคัดย่อ

การเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีน พบว่า การเติมสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล อัตราส่วน 1:1 ในระดับ ร้อยละ 6 หรือ ร้อยละ 8 สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส อัตราส่วน 1:1 ในระดับ ร้อยละ 6 หรือ ร้อยละ 8 และทรีฮาโลส เพียงอย่างเดียว ในระดับ ร้อยละ 6 หรือ ร้อยละ 8 ให้ผลป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็งได้ใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) ซึ่งพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในช่วง 1-2 เดือนแรกของการเก็บ ($p<0.05$) หลังจากนั้นค่อนข้างที่ ($p>0.05$) ขณะที่เนื้อปลาบดที่ไม่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนพบการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) โดยการเติมสารปกป้องโปรตีนช่วยลดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพ ได้แก่ ค่าการละลายของโปรตีน กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ค่าความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งยังช่วยลดการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาด้วย การเติมสารปกป้องโปรตีนมีผลทำให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหัก (Breaking force) ต่ำกว่าตัวอย่างที่ไม่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน ($p<0.05$) โดยเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน เจลเนื้อปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 และเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 มีระยะทางผิดรูป (Deformation) สูงสุด ($p<0.05$) ส่วนค่าความเหลืองของเจลสูงขึ้นตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) การเติมสารปกป้องโปรตีนส่งผลให้เจลมีค่าความเหลืองที่ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ($p<0.05$) สภาวะการเซ็ทเจลมีผลต่อค่าแรง ณ จุดแตกหักและระยะทางผิดรูปของเจล ($p<0.05$) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 40 และ 55 องศาเซลเซียส ส่งผลให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักและระยะทางผิดรูปสูงสุด เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสซึ่งทำงานได้ดีที่สภาวะดังกล่าว ส่วนการเซ็ทเจลที่ 65

องศาเซลเซียส ส่งผลให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปต่ำสุด ($p<0.05$) เนื่องจากบทบาทของเอนไซม์โปรติเอส ซึ่งสอดคล้องกับการลดลงของแถบโปรตีนไมโอซินสายหลักเมื่อวิเคราะห์ด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิส (SDS-PAGE) ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลตัวอย่างควบคุมที่เก็บแช่เยือกแข็งมีลักษณะโครงข่ายร่างแหลดลงอย่างชัดแจน ขณะที่ตัวอย่างเจลที่เติมสารปกป้องโปรตีนพบลักษณะโครงข่ายร่างแหลดลงเล็กน้อย

4.2 บทนำ

เนื้อปลาบด เป็นวัตถุดิบสำหรับแปรรูปผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น ลูกชิ้นปลา และไส้กรอกปลา โดยปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการทำเนื้อปลาบด คือ ปลาทะเล เช่น ปลาทรายแดง ปลาทรายขาว ปลาจวด ปลาตาโต-ตาหวาน ปลาเห็ดโคลน ปลาดาบเงิน ปลาดาบลาว ปลาปากคม ปลาไหลทะเล และปลาเลย เป็นต้น (ผ่องเพ็ญ, 2535; วรรณวิบูลย์, 2533) ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้ความสะดวกในการนำมาประกอบอาหาร และนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มมูลค่า ซึ่งตรงกับความต้องการของผู้บริโภคที่มีเวลาในการเตรียมอาหารน้อยลง ประกอบกับประชากรของโลกที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นตลาดเนื้อปลาบดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาบดจึงจะยังคงมีการขยายตัวอย่างต่อเนื่องต่อไปในอนาคต แต่เนื่องจากปัจจุบันศักยภาพการผลิตสัตว์น้ำในน่านน้ำไทยลดลง รวมทั้งปัญหาการร่วมทำประมงนอกน่านน้ำไทยยังคงมีอยู่ตลอดเวลา จึงอาจเป็นไปได้ว่าในอนาคต การผลิตเนื้อปลาบดและผลิตภัณฑ์จากเนื้อปลาบดของไทยจะประสบกับปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบ (สุวรรณ, อารยา และศุภวรรณ, 2543) ซึ่งแนวทางหนึ่งในการจะแก้ปัญหาการขาดแคลนวัตถุดิบในการผลิตเนื้อปลาบดของประเทศในอนาคต คือการหาแหล่งวัตถุดิบใหม่ทดแทน โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบปลาน้ำจืด เนื่องจากเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่มากภายในประเทศ และการส่งเสริมการใช้วัตถุดิบภายในประเทศดังกล่าวจะช่วยทำให้เป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรได้อีกทางหนึ่ง รวมทั้งเป็นการเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์จากวัตถุดิบปลาน้ำจืดซึ่งเป็นผลผลิตทางการประมงของไทยให้กว้างขวางมากขึ้น จากการศึกษาถึงเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งสารละลายแอคโตไมโอซินในบทที่ 3 พบว่าปลาน้ำจืดมีเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งได้ไม่ด้อยไปกว่าปลาทะเล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปลาน้ำจืดมีศักยภาพต่อการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเป็นเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งได้ ปลานิลนอกจากจะเป็นปลาน้ำจืดที่มีปริมาณการเพาะเลี้ยงสูงและผู้บริโภคมีความต้องการสูงแล้ว จากผลการศึกษาในบทที่ 3 ยังพบว่าปลานิลมีเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งได้ดีอีกด้วย สำหรับปลานวลจันทร์น้ำจืดเป็นปลาน้ำจืดที่มีก้างฝอย ซึ่งจัดเป็นข้อจำกัดในการบริโภค ดังนั้นการแปรรูปเป็นเนื้อปลาบดจะสามารถกำจัดปัญหาก้างฝอยออกไปได้ โดยปริมาณการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดทั้ง 2 ชนิด ในประเทศไทย เมื่อปี พ.ศ. 2546 มีปริมาณ เท่ากับ 98,336 และ 620 ตัน สำหรับปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืด ตามลำดับ (Department of Fishery, 2005) การแช่เยือกแข็งจัดเป็นวิธียืดอายุ

การเก็บรักษาการเก็บรักษาสัตว์น้ำและผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำที่ดีวิธีหนึ่ง เนื่องจากสามารถป้องกันการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์และสามารถชะลอปฏิกิริยาชีวเคมีที่ไม่ต้องการได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็งไว้ระยะเวลาหนึ่งจะพบว่า ผลิตภัณฑ์ยังคงเสื่อมคุณภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสูญเสียลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นผลอันเนื่องมาจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็ง (Shenouda, 1980) ดังนั้นเพื่อยับยั้งการเสื่อมคุณภาพของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็งดังกล่าว นักวิจัยหลายคณะได้ศึกษาความสามารถของสารชนิดต่างๆ ต่อการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง (MacDonald and Lanier, 1994) สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล อัตราส่วน 1:1 ร้อยละ 8 สามารถป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในซูริมิและในระบบของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ได้ (Lee, 1984; Yoon and Lee, 1990) แต่เนื่องจากมีผลให้ซูริมิมีรสหวานซึ่งเป็นข้อจำกัดต่อการยอมรับของผู้บริโภค โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแถบยุโรปและอเมริกา ทำให้มีการวิจัยเพื่อค้นหาสารชนิดใหม่ที่สามารถยับยั้งการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็งได้โดยมีความหวานและให้พลังงานต่ำลง เช่น พอลิเด็กส์โทรส (Polydextrose®), แลคติทอล (Lactitol) และพาลาตินิต (Palatinit®) เป็นต้น (Auh et al., 1999; Cavajal, MacDonald and Lanier, 1999; Miura, Takayanagi and Nishimura, 1992; Park, Lanier and Green, 1988; Sultanbawa and Li-Chan, 1998, 2001; Sych, Lacruix, Adambounou and Castaigne, 1990; Sych, Lacroix and Carrier, 1991)

ทรีฮาโลส (Trehalose) จัดเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) ซึ่งโมเลกุลประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 2 โมเลกุล ต่อเชื่อมกันด้วยพันธะแอลฟา,แอลฟา-หนึ่ง, หนึ่ง กลูโคสิดิก (α,α-1,1 Glucosidic bond) มีความเสถียรสูง เฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยากับสารอื่น และจัดเป็นน้ำตาลนอนรีดิวซิ่ง (non-reducing) สามารถพบได้ตามธรรมชาติทั้งในพืช แมลง สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertebrates) และสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ได้แก่ ยีสต์ (Yeast) รา (Fungi) แบคทีเรีย (Bacteria) และสาหร่าย (Algae) เป็นต้น โดยทรีฮาโลสจะทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมพลังงานให้กับสิ่งมีชีวิต และยังมีส่วนสำคัญในการรักษาเซลล์เมมเบรน (Membrane) โดยหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group) ของทรีฮาโลสสามารถเกิดพันธะไฮโดรเจนกับฟอสโฟลิปิดของเซลล์เมมเบรน ซึ่งปฏิกิริยานี้เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแทนที่น้ำ ในขณะที่เซลล์ของสิ่งมีชีวิตผ่านกระบวนการทำแห้งหรืออยู่ในสภาวะแห้งแล้ง ทำให้เซลล์เมมเบรนสามารถคงรูปอยู่ได้ นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอางยังพบว่าทรีฮาโลสสามารถช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำหรือความชื้นจากผิวหนังได้ (Hu, Xia, Chen and Cai, 2004; Shiosaka, 2005) และในอุตสาหกรรมอาหารพบว่าทรีฮาโลสสามารถแสดงคุณสมบัติการเป็นสารช่วยปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในผลิตภัณฑ์ซูริมิ โดยยังคงรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไว้ได้(Ren, Zhuang, Laio and Mu, 2001; Hunt, Park and Zoerb, 2002)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนจากเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบดแช่เยือกแข็ง และศึกษาผลของการเติมสารปกป้องโปรตีน ได้แก่ สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล อัตราส่วน 1:1 สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส อัตรส่วน 1:1 และทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ต่อเสถียรภาพการแช่เยือกแข็งเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบด

4.3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

4.3.1 วัตถุดิบ

4.3.1.1 ปลา

ใช้ปลาน้ำจืด 2 ชนิด คือ ปลานิล (Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*) ขนาดประมาณ 0.5-1 กิโลกรัมต่อตัว จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ลำเลียงปลาด้วยการบรรจุปลาในถังพลาสติก มายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นำปลาเก็บในถังซึ่งบรรจุด้วยน้ำแข็งและเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาบดทันที ส่วนปลานวลจันทร์น้ำจืด (Small scale mud carp, *Cirrhira microlepis*) ขนาดประมาณ 1 กิโลกรัมต่อตัว ซื้อจากตลาดย่าโม อ. เมือง จ. นครราชสีมา ลำเลียงปลาโดยแช่ในน้ำแข็งบรรจุในถุงพลาสติก มายังห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาบดทันที

4.3.1.2 สารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทรายมิตรผล) ซอร์บิทอล (NEOSORB® จากบริษัท ROQUETTE, Lestrem Cedex, France) และทรีฮาโลส (Treha™ จากบริษัท HAYASHIBARA Co. Ltd., Okayama, Japan)

4.3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็ง

ตัดหัวปลา ควักไส้ ล้างน้ำสะอาด แล้วนำเข้าเครื่องแยกเนื้อ (Meat-bone separator) บดเนื้อปลา (Biro 8-22, Biro Manufacturing, Marblehead, Ohio, USA) ผ่านรูตะแกรงขนาด 1.5 มิลลิเมตร จากนั้นนำเนื้อปลาบดมาผสมกับสารพอลิฟอสเฟต ร้อยละ 0.2 และสารปกป้องการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ได้แก่ (1)ส่วนผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสกับซอร์บิทอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 6 (2)ส่วนผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสกับซอร์บิทอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 8 (3)ส่วนผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสกับทรีฮาโลสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 6 (4) ส่วนผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสกับ ทรีฮาโลสในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 8 (5)ทรีฮาโลสร้อยละ 6 และ (6)ทรีฮาโลส ร้อยละ 8 ด้วยเครื่องบดผสม (SEIT 1878 MASCHINEN, HEINRICH WEDEL GmbH, Hohentengen, Germany) ที่ระดับความเร็วต่ำ (low speed) เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วยระดับความเร็วสูง เป็นเวลา 3 นาที สำหรับตัวอย่างควบคุมจะไม่มีการเติมสารใดๆ ในทุกขั้นตอน

ของการเตรียมจะมีการควบคุมอุณหภูมิของเนื้อปลาบดด้วยการหล่อเย็นด้วยน้ำแข็งบด และหล่อเย็นเครื่องบดผสมด้วยน้ำแข็งบดก่อนการบดผสมตัวอย่างต่อไปทุกครั้ง นำตัวอย่างเนื้อปลาบดบรรจุในถุงพลาสติกโพลีเอทธิลีน (Polyethylene bag) ถุงละ 650 กรัม ด้วยระบบสุญญากาศ (Vacuum pack) กดรีดถุงตัวอย่างเนื้อปลาบดให้มีความหนาสม่ำเสมอกันทุกถุง และจัดวางบนถาดอะลูมิเนียม 4 ถุง/ถาด เรียงถาดวางซ้อนกันก่อนนำเข้าแช่เยือกแข็ง (Air-blast freezer) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นบรรจุตัวอย่างใส่กล่องโฟมและเก็บรักษาในห้องแช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งที่ระยะการเก็บ0, 1, 2, 4 และ 6 เดือน มาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีกายภาพ

4.3.3 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

ทำละลายตัวอย่างปลาบดในน้ำอุณหภูมิประมาณ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชั่งเนื้อปลาบดและเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 โดยการใช้แท่งแก้วคนร่วมกับการใช้แท่งแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) เป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15000x g (Rotor F28/50, Sorvall RC 28S, Dupont Co., Newtown, CT) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, 1951) และวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด และปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

4.3.4 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออน

ติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส ในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออนในสารละลายที่ทำปฏิกิริยาประกอบด้วยสารละลายโปรตีนซึ่งได้จากการละลายโปรตีนจากเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ (0, 1, 2, 4 และ 6 เดือน) 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 1-3 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) เข้มข้น 0.5 โมลาร์ สารละลายทริส-มาลีเอต (Tris-maleate) เข้มข้น 0.02 โมลาร์ (pH 7) และสารละลายอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (ATP) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นำสารละลายบ่มที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที และหยุดปฏิกิริยาด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติค เข้มข้นร้อยละ 15 (15%Trichoroacetic acid) จากนั้นปั่นเหวี่ยงสารละลายที่ 5000x g (Rotor PK 121R, ACCEL, Italy) เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตตามวิธีของ MacDonald and Lanier (1994) โดยทำปฏิกิริยากับสารละลายเอลลอน (Elon reagent) และสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (Ammonium molybdate) ที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร คำนวณปริมาณฟอสเฟตจากกราฟมาตรฐาน โดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0, 25, 50, 75, 125, 175

และ 250 µl รายงานกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในหน่วยไมโครโมลของฟอสเฟตต่อปริมาณโปรตีนต่อนาที

4.3.5 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด

วิเคราะห์ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด ตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยเจือจางตัวอย่างสารละลายโปรตีนซึ่งได้จากการละลายโปรตีนจากเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ (0, 1, 2, 4 และ 6 เดือน) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วย ยูเรีย เข้มข้น 8 โมลาร์ โซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 2 สารละลายเอทธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก เข้มข้น10 มิลลิโมลาร์ และทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ ที่ค่าพีเอช 7 (8M urea, 2% SDS, 10mM EDTA, 0.2% Tris-Cl, pH 7) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 จากนั้นทำปฏิกิริยากับสารละลาย 5,5'-ไดไธโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid; DTNB) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร คำนวณปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด โดยใช้ค่าสัมประสิทธ์การดูดกลืนแสง (ε) เท่ากับ 13600 $M^{-1}cm^{-1}$ (Ellman, 1959)

4.3.6 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

วิเคราะห์ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในตัวอย่าง ตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2002) โดยใช้สารละลายกรด 1-อะนิลิโนแนฟธาลีน-8-ซัลโฟนิก (1-Anilinonaphthalene-8-sulfonic acid; ANS) เข้มข้น 8 มิลลิโมลาร์ ทำปฏิกิริยากับสารละลายโปรตีนซึ่งได้จากการละลายโปรตีนจากเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ (0, 1, 2, 4 และ 6 เดือน) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ (RF-1501; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่นการกระตุ้น (Excitation) และการคายพลังงาน (Emission) เท่ากับ 374 และ 485 นาโนเมตร ตามลำดับ คำนวณปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกจากค่าความชันของกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (%w/v : แกน X) กับค่าความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescene intensity : แกน Y) (Kato and Nakai, 1980)

4.3.7 กิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส

สกัดเอนไซม์จากตัวอย่างเนื้อปลาบดด้วยการปั่นผสม (Homogenize) เนื้อปลาบดกับสารละลายบัฟเฟอร์เย็น ซึ่งประกอบด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ สารละลายกรดเอทธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ สารละลายไดไธโอ ทรีอิทอล เข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ และสารละลายทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7 (10 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 10 mM Tris-Cl, pH7) ในอัตราส่วนเนื้อต่อบัฟเฟอร์ 1 ต่อ 4 ที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที ด้วยเครื่องโฮโมจีไนซ์เซอร์

(Ystral Scientific, T25 Eastleigh, Hampshire, England) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 16000x g (Rotor F28/50, Sorvall RC 28S, Dupont Co., Newtown, CT) เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายส่วนใส ซึ่งถือว่าเป็นเอนไซม์สกัด (Crude enzyme) วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry et al., 1951) และกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ตามวิธีของ Takagi, Saito, Kikuchi and Inada (1986) โดยใช้สารสกัดเอนไซม์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นไดเมทธิลเลทเคซีน (N,N'-dimethylated casein) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โมโนแดนซิลคาดาเวอรีน (Monodansylcadaverine) เข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ สารละลายไดไธโอทรีอิทอล (Dithiothreitol) เข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 (1 mg/ml DMC, 15 μM MDC, 3 mM DTT, 5 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl; pH7.5) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายเอทธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ วัดค่าการเรืองแสง ที่ความยาวคลื่นการกระตุ้น (Excitation) และการคายพลังงาน (Emission) เท่ากับ 350 และ 480 นาโนเมตร ตามลำดับ ด้วยเครื่องสเปคโตรฟลูออโรมิเตอร์ (RF-1501; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) เตรียมสารละลายควบคุม (blank) โดยหยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายเอทธิลลีนไดอะมีนเตตระอะซิติก เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ก่อนการเติมสารละลายเอนไซม์สกัด สำหรับค่าแฟกเตอร์ (Enhancement Factor; EF) ที่ใช้ในการคำนวณกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวในปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืด เท่ากับ 1.25 และ 1.15 ตามลำดับ รายงานกิจกรรมเอนไซม์ในหน่วยนาโนโมลของโมโนแดนซิลคาดาเวอรีนต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที (nM MDC/mg. protein/min)

4.3.8 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในตัวอย่างเนื้อปลาบด โดยปั่นผสม (homogenize) เนื้อปลาบดกับน้ำกลั่นเย็น ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Nissei AM-8, NSS Nihonseiki Kaisha Co., Ltd., Kyoto, Japan) ที่ระดับความเร็วต่ำ (low speed) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดพีเอช

4.3.9 ปริมาณความชื้น

วิเคราะห์หาปริมาณความชื้นในตัวอย่างเนื้อปลาบดตลอดระยะเวลาการเก็บตามวิธี AOAC (1994) โดยอบตัวอย่างที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 ชั่วโมง

4.3.10 การเตรียมเจล

นำเนื้อปลาบดมาสับผสมกับเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ปรับความชื้นของส่วนผสมเป็นร้อยละ 80 โดยการเติมน้ำแข็ง และเติมสารพอลิฟอสเฟต ร้อยละ 0.2 ในตัวอย่างควบคุมเพื่อให้เจลมีปริมาณฟอสเฟตเท่ากับตัวอย่างอื่น สับผสมด้วยเครื่องสับผสม

(UM5, Stephan Machinery Co., Columbus, Ohio, USA) ที่ระดับความเร็วต่ำ (Low speed) เป็นเวลา 4 นาที ตามด้วยระดับความเร็วสูง (High speed) ร่วมกับการใช้ระบบสุญญากาศ เป็นเวลา 2 นาที ควบคุมอุณหภูมิระหว่างสับผสมไม่ให้สูงเกิน 15 องศาเซลเซียส บรรจุเพสปลาบด (mince paste) ในถุงพลาสติกจากนั้นไล่อากาศโดยใช้เครื่องปิดผนึกสุญญากาศ นำเนื้อปลาบดดังกล่าวมาบรรจุในไส้พลาสติก (Plastic casing) ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร โดยใช้เครื่องบรรจุแบบมือ (Stuffer) บ่มตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40, 55 และ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นนำไปให้ความร้อนต่อที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นอกจากนี้เตรียมตัวอย่างเจลที่ไม่บ่มโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำผสมน้ำแข็ง เป็นเวลา 20 นาที นำตัวอย่างเก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าสีและลักษณะเนื้อสัมผัสของเจล

4.3.11 การวัดสีของเจล

ตัดตัวอย่างเจลให้มีความสูง 3 เซนติเมตร วัดสีด้วยเครื่องวัดค่าสี Minolta Chroma Meter CR-300 (Minolta Camera Co Ltd, Osaka, Japan) โดยใช้ระบบอ่านค่าเป็น *L*, a*, b** (ASTM, 1987)

4.3.12 การวัดความแข็งแรงของเจล

วัดค่าความแข็งแรงของเจลด้วยเครื่อง Texture Analyzer (Stable Micro System, Surrey, England) โดยวัดค่าแรง ณ จุดแตกหัก (Breaking foce; g) และระยะทางผิดรูป (deformation; mm) ณ จุดแตกหักโดยใช้หัววัดสแตนเลสทรงกลม (Spherical stainless probe; p0.5s) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตรที่มีอัตราการเคลื่อนที่ของหัววัด 1 มิลลิเมตรต่อวินาที และกำหนดระยะทางในการกด เท่ากับ 20 มิลลิเมตร

4.3.13 การแยกชนิดโปรตีนด้วยวิธี อิเล็กโทรโฟริซิส (SDS-PAGE)

ละลายโปรตีนเจลเนื้อปลาบดด้วยการสับให้เป็นชิ้นละเอียด นำไปปั่นผสม (Homogenize) กับสารละลายโซเดียมโดดีซิลซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 5 (5% SDS) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 ด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (Nissei AM-8, NSS Nihonseiki Kaisha Co., Ltd., Kyoto, Japan) ที่ระดับความเร็วต่ำ (low speed) เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หากยังสังเกตเห็นตะกอนชิ้นเจลเหลืออยู่ แสดงว่ายังละลายไม่ดีพอ นำไปปั่นผสมอีกครั้งจนกระทั่งไม่พบตะกอนโปรตีน นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000xg (Eppendorf AG 22331, Hamburg, Germany) เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใส นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นโปรตีน และใช้เป็นตัวอย่างในการแยกชนิดโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีนเท่ากันทุกตัวอย่าง คือ 20 ไมโครกรัม และเตรียมเจลในส่วนสแตคกิ้งให้มีความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์ ร้อยละ 4

(4% stacking gel) และส่วนแยกโปรตีนมีความเข้มข้นของพอลิอะคริลาไมด์ ร้อยละ 10 (10% separating gel) ย้อมสีแผ่นเจลด้วยสารละลายคูแมสซีบลู เข้มข้นร้อยละ 0.125 (0.125% Coomassie blue R-250) ล้างสีย้อมด้วยสารละลายผสมระหว่างเมทธานอล ร้อยละ 25 (25% Methanol) และกรดอะซิติก ร้อยละ 10 (10% Acetic acid)

4.3.14 ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจล (Microstructure)

ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลจากตัวอย่างเนื้อปลาบด โดยตัดตัวอย่างเจลเป็นชิ้นสี่เหลี่ยมขนาด 3x3x3 มิลลิเมตร นำชิ้นตัวอย่างแช่ในสารละลายกลูทาราลดีไฮด์เข้มข้นร้อยละ 3 (3% glutaraldehyde) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ดึงน้ำออกจากชิ้นตัวอย่างด้วยการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์ที่ระดับความเข้มข้นจากระดับความเข้มข้นต่ำไปสูง ได้แก่ ร้อยละ 10, 20, 30, 50, 70 และ 100 ตามลำดับ ใช้เวลาในการแช่ที่แต่ละระดับความเข้มข้น 15 นาที แล้วทำแห้งชิ้นตัวอย่างด้วยเครื่องทำแห้งที่จุดวิกฤต (Critical point drying) ก่อนนำไปติดบนฐานรองชิ้นตัวอย่าง (stub) ฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (Ion sputter) 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที ศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดโดยใช้กำลังส่องขยายที่ 1000 เท่า (JSM-6400 Scanning Electron Microscope, JEOL, Tokyo, Japan)

4.3.15 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลอง ที่จัดทรีทเมนต์แบบแฟกทอเรียลในการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (Factorial Experiments in RCBD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1993; SAS Institute Inc., Carry, NC, USA)

4.4 ผลการทดลองและการวิจารณ์

4.4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้

การเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดจากปลาน้ำจืดทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ลดลง ($p<0.05$) (รูปที่ 4.1) โดยพบว่าค่าการละลายของโปรตีนในตัวอย่างควบคุมเริ่มลดลงในเดือนที่ 1 ของการเก็บ ($p<0.05$) และลดลง แตกต่างจากตัวอย่างเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) สำหรับค่าการละลายของโปรตีนในตัวอย่างเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนชนิดต่างๆพบการลดลงในช่วง 1-2 เดือนแรกของการเก็บ ($p<0.05$) หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ ($p>0.05$) และเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน พบว่าค่าการละลายของโปรตีนในตัวอย่างเนื้อปลานิลบดควบคุมลดลงจากเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ร้อยละ 43.3 ซึ่งสูงกว่า ($p<0.05$) (รูปที่ 4.1a) ตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน ซึ่งมีค่าการละลายของโปรตีนลดลงใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 22-31 ($p>0.05$) เช่นเดียวกันในตัวอย่างเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุมพบว่าค่าการละลายของ

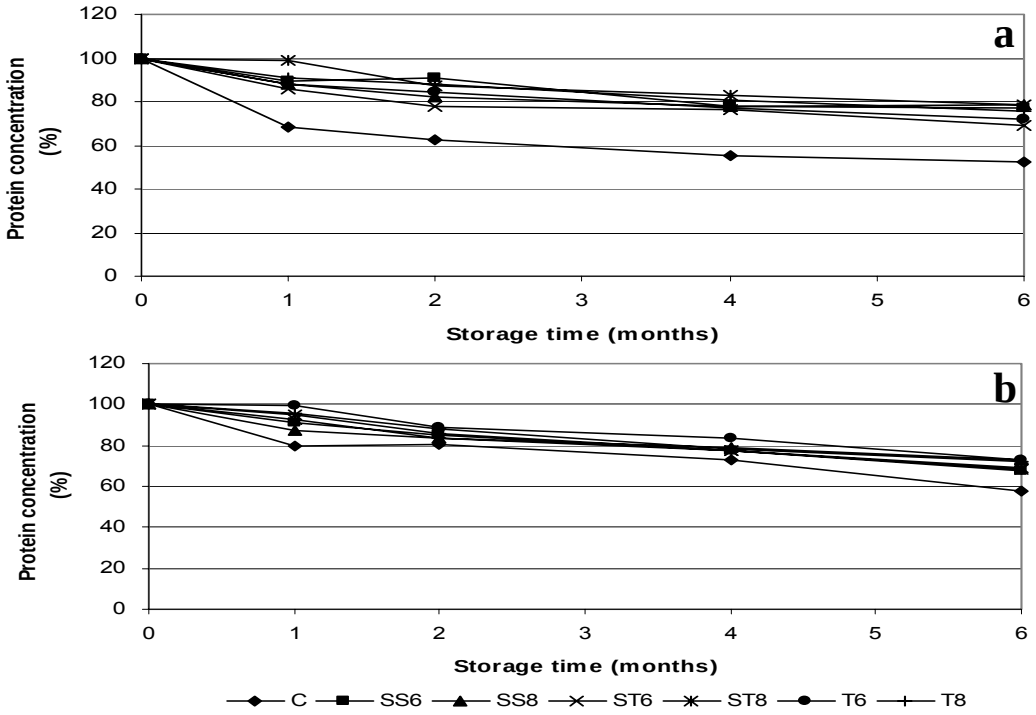
โปรตีน ในเดือนที่ 6 ของการเก็บแช่เยือกแข็งลดลงร้อยละ 42.6 ซึ่งสูงกว่า ($p<0.05$) (รูปที่ 4.1b) ตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนซึ่งลดลงใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 27-33 ($p>0.05$) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในผลิตภัณฑ์ซูริมิจากปลานิล (Tilapia; *Sarotherodon nilotica*) ซึ่งพบว่าการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ตัวอย่างควบคุมมีค่าการละลายของโปรตีนลดลงร้อยละ 44.8 ($p<0.05$) ซึ่งลดลงสูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน ($p<0.05$) ได้แก่ น้ำตาลทรีฮาโลสร้อยละ 8 โซเดียมแลกเตตร้อยละ 8 และน้ำตาลซูโครสร่วมกับซอร์บิทอล อัตราส่วน 1 ต่อ 1 ร้อยละ 8 ซึ่งมีค่าการละลายของโปรตีนลดลงร้อยละ 24.4, 29.6 และ 24.7 ตามลำดับ (Zhou, Benjakul, Pan, Gong and Liu, 2005) การลดลงของค่าการละลายของโปรตีนแสดงให้เห็นถึงการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง โดยโมเลกุลโปรตีนเกิดการสูญเสียน้ำจากการที่น้ำเกิดเป็นผลึกน้ำแข็ง ทำให้ความเข้มข้นของอิออนในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Ionic strength) โมเลกุลโปรตีนมีการเปิดตัวหรือคลายตัวออก และเกิดการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกและพันธะไดซัลไฟด์ ทำให้สภาพธรรมชาติของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นความสามารถในการละลายได้ของโปรตีนจึงลดลง (Auh, Lee, Kim, Yoon and Park, 1999; Benjakul and Bauer, 2000; Jiang, Hwang and Chen, 1988; Lim and Haard, 1984) ซึ่งค่าการละลายของโปรตีนไมโอไฟบริลลาร์ลดลงหลังจากการแช่เยือกแข็งนั้นเกิดขึ้นเนื่องจากการจับตัวกันของโปรตีนไมโอซินและโปรตีนแอคโตไมโอซินเป็นสำคัญ และจากผลการทดลองพบว่า ในตัวอย่างควบคุมมีค่าการละลายลดลงสูงสุดแสดงให้เห็นว่าโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างควบคุม เกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติสูงกว่าในตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน ทั้งนี้เนื่องจาก สารปกป้องโปรตีนดังกล่าวมีบทบาทในการป้องกันการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนโดยการจับกับโมเลกุลของน้ำที่ล้อมรอบโมเลกุลโปรตีนไว้ ดังนั้นเมื่อเกิดการแช่เยือกแข็งถึงแม้โมเลกุลโปรตีนจะสูญเสียน้ำออกจากพื้นผิวโมเลกุล แต่ก็ยังคงมีน้ำในปริมาณที่เพียงพอต่อการขัดขวางการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีน (Matsumoto, 1980) จึงทำให้ตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนมีค่าการละลายสูงกว่าตัวอย่างควบคุม และเมื่อศึกษาผลของสารปกป้องโปรตีนแต่ละชนิดพบว่าให้ผลต่อค่าการละลายของโปรตีนไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าสารแต่ละชนิด มีประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในเนื้อปลาบดได้ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาโดย Sych, 1990, 1991); Sultanbawa and Li-Chan (1998); Auh และคณะ (1999)

4.4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส

กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในสภาวะที่มีแคลเซียมอิออนลดลง ($p<0.05$) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดจากปลาน้ำจืดทั้ง 2 ชนิด เป็นระยะเวลา 6 เดือน (รูปที่ 4.2) โดยกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในตัวอย่างควบคุมจากปลานิล (รูปที่ 4.2a) และปลานวลจันทร์น้ำจืด (รูปที่ 4.2b)

ลดลงจากเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ร้อยละ 33.4 และ 37.1 ตามลำดับ ซึ่งมีระดับการลดลงมากกว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีน ($p<0.05$) และสารปกป้องโปรตีนชนิดต่างๆสามารถชะลอการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง โดยตัวอย่างเนื้อปลานิลบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนชนิดต่างๆมีกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสในเดือนที่ 6 ของการเก็บลดลงจากเริ่มต้นใกล้เคียงกัน คือประมาณร้อยละ 20-22 ($p>0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดมีค่าการลดลงใกล้เคียงกัน คือ ร้อยละ 24-27 ($p>0.05$) และการลดลงของกิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวในตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมเกิดขึ้นตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) ขณะที่ในตัวอย่างเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนลดลงในช่วง 1-2 เดือนแรกของการเก็บ ($p<0.05$) หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ ($p>0.05$) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันในตัวอย่างเนื้อปลาบดจากปลาทั้ง 2 ชนิด ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในผลิตภัณฑ์ซูริมิจากปลาแมกเคอเรลแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส โดย Osako, Hossain, Kuwahara and Nozaki (2005) พบว่าชนิดของสารปกป้องโปรตีน ได้แก่ น้ำตาลทรีฮาโลส น้ำตาลกลูโคส และสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล ในระดับร้อยละ 2.5-10 มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Zhou, Benjakul, Pan, Gong and Liu (2005) พบว่าตัวอย่างควบคุมของผลิตภัณฑ์ซูริมิจากปลานิลแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส มีค่ากิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสสูงกว่าในตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน ประเภทน้ำตาลทรีฮาโลส สารประกอบโซเดียมแลกเทต และสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล นอกจากนี้การเก็บเนื้อปลาคอดแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลลดค่ากิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสลงร้อยละ 50 หลังการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 15 วัน (Ramirez, Martin-Polo and Bandman, 2000) ขณะที่ Chan, Grill, Thompson and Singer (1995) รายงานว่าการเก็บซูริมิจากปลาเฮอริง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ส่งผลให้กิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวลดลงอย่างต่อเนื่องตามอายุการเก็บรักษา และเมื่อเก็บนานกว่า 10 สัปดาห์ ระดับกิจกรรมของเอนไซม์นี้มีค่าลดลงประมาณ 100 เท่า Suzuki (1976) Hatano (1968) และ Nambudiri and Gopakumar (1992) ได้กล่าวว่า การลดลงของกิจกรรมเอนไซม์นี้ในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งเกิดจากปฏิกิริยา ออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟไฮดริลที่บริเวณส่วนหัวของโมเลกุลไมโอซิน เกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์จากผลการทดลองพบว่า ตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสสูงกว่าเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีน แสดงให้เห็นว่าโปรตีนไมโอซินในตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลสูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน จึงมีผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์มากกว่าและสอดคล้องกับปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ ซึ่งพบการละลายของโปรตีนในตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมลดลงในระดับที่สูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน (รูปที่ 4.1) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการเติมสารปกป้องโปรตีนสามารถชะลอการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการเก็บแช่เยือกแข็งได้ โดยสารปกป้อง

โปรตีนแต่ละชนิด แสดงประสิทธิภาพในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนได้ใกล้เคียงกัน โดยมีส่วนช่วยในการจับกับน้ำของโมเลกุลโปรตีน ช่วยลดการสูญเสียน้ำจากการเกิดผลึกน้ำแข็งและการละลาย ทำให้โมเลกุลโปรตีนยังคงมีน้ำเพียงพอต่อการคงสภาพหรือรักษาสภาพธรรมชาติของโมเลกุลไว้ได้

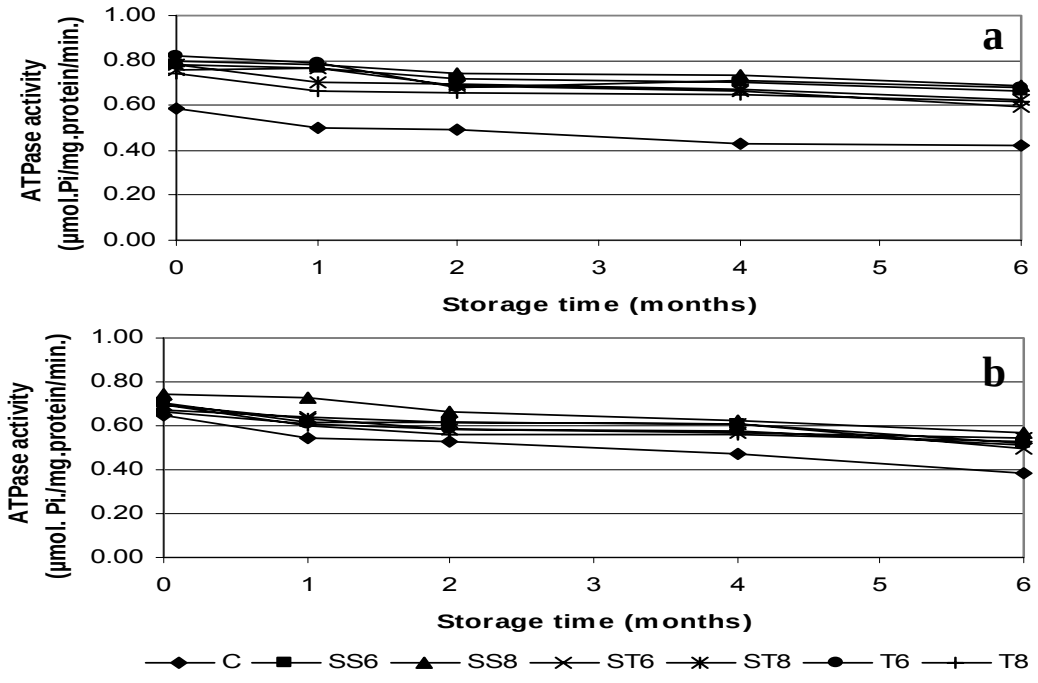


รูปที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้จากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และปลานวลจันทร์น้ำจืดบด (b) ในตัวอย่างควบคุม (C) และตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล ร้อยละ 6 (SS6), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล ร้อยละ 8 (SS8), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 (ST6), สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 8 (ST8), ทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 6 (T6) และทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 8 (T8) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน

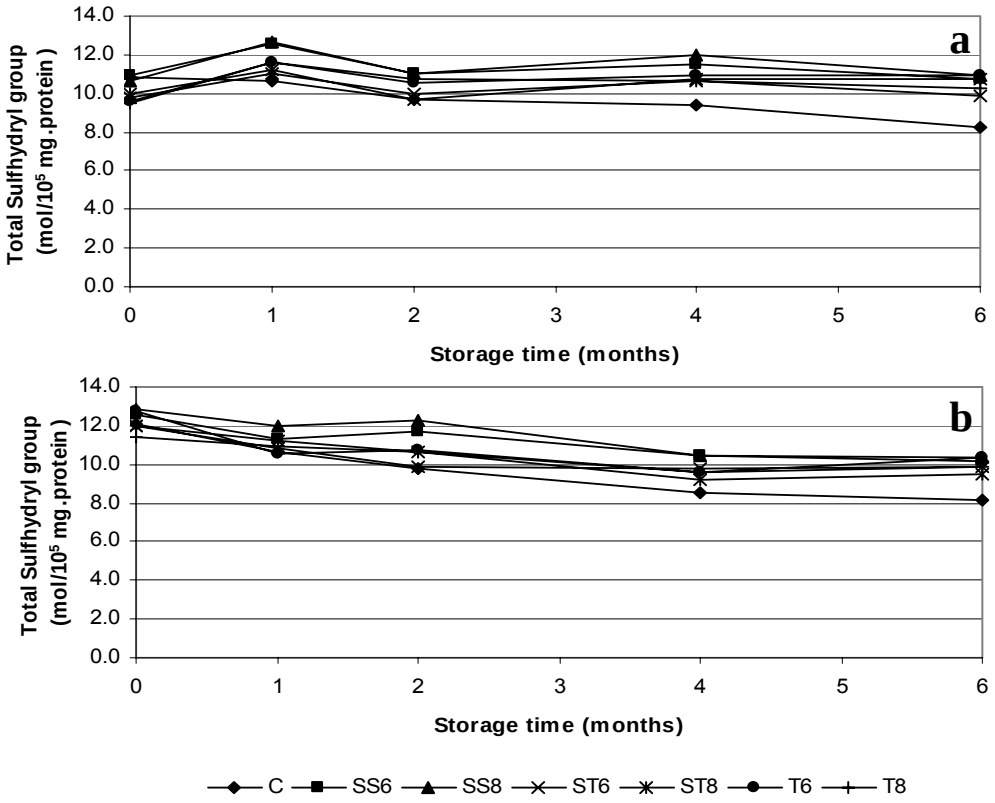
4.4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมด

ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในตัวอย่างปลานิลบดควบคุมลดลงตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) (รูปที่ 4.3a) ขณะที่ตัวอย่างปลานิลบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีปริมาณคงที่ ($p>0.05$) และเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 6 เดือน ตัวอย่างควบคุมมีปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดลดลงจากเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ร้อยละ 27.3 ซึ่งลดลงในระดับที่สูงกว่า ($p<0.05$)

ตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน สำหรับตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุมพบว่าปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในเดือนที่ 6 ลดลงจากเริ่มต้น ร้อยละ 38.2 ซึ่งสูงกว่า ($p<0.05$) (รูปที่ 4.3b) ตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารปกป้องโปรตีน ซึ่งมีปริมาณหมู่ดังกล่าวลดลงใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 20-32 ($p>0.05$)จากผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในปลากะพงขาว ปลาปากคม และปลานิล ซึ่งพบการลดลงของปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ศิริพร, 2542; Zhou et al., 2005) โดยการลดลงของปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในโปรตีนจากตัวอย่างที่เก็บแช่เยือกแข็ง แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงรูป(conformation) ของโมเลกุลโปรตีน โดยการเปิดตัวหรือคลายตัว ซึ่งส่งผลให้หมู่ซัลฟไฮดริลที่ถูกเปิดออกสู่ภายนอกนั้นเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นระหว่างกันเกิดเป็นพันธะไดซัลไฟด์ขึ้น ดังนั้นปริมาณหมู่ดังกล่าวจึงมีปริมาณลดลง (Wong, 1989) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดในตัวอย่างจากปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดที่เติมสารปกป้องโปรตีนลดต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากบทบาทของสารปกป้องโปรตีนซึ่งมีผลต่อการขัดขวางการเข้าจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของโปรตีน จึงช่วยชะลอการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลด้วยพันธะไดซัลไฟด์ สอดคล้องกับผลปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ (รูปที่ 4.1) และผลกิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอส (รูปที่ 4.2) ซึ่งพบการลดลงในตัวอย่างเนื้อปลาบดที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนในระดับที่ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม



รูปที่ 4.2 กิจกรรมเอนไซม์เอทีพีเอสจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และปลานวลจันทร์น้ำจืดบด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1



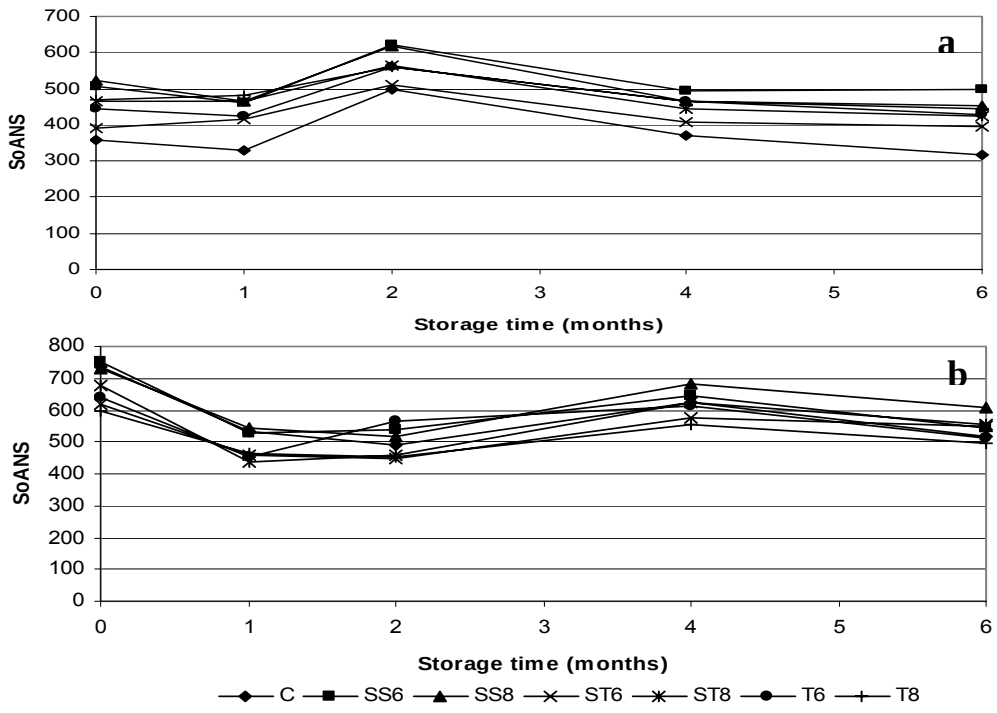
รูปที่ 4.3 ปริมาณหมู่ซัลฟไฮดริลทั้งหมดจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และปลานวลจันทร์น้ำจืดบด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1

4.4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก

การเก็บแช่เยือกแข็งตัวอย่างเนื้อปลานิลบด มีผลทำให้ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกเพิ่มขึ้น ในช่วง 2 เดือนแรก ($p<0.05$) หลังจากนั้นจึงลดลง (รูปที่ 4.4) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นผลจากการที่โมเลกุลโปรตีนเปิดตัวหรือคลายตัว ส่งผลให้กรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้วที่อยู่ภายในโมเลกุลเปิดออกสู่ภายนอก ดังนั้นจึงพบปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกสูงขึ้นในช่วงแรกของการเก็บ จากนั้น การจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนโดยหมู่ไม่ชอบน้ำที่ถูกเปิดตัวออกดังกล่าวจะเกิดขึ้น ส่งผลให้พบการลดลงของปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในช่วงหลัง (Ang and Hultin, 1989) และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกจะพบว่า ตัวอย่างเนื้อปลานิลบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีปริมาณพื้นผิวดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างควบคุม โดยสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล ร้อยละ 6 และ ร้อยละ 8 มีปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกสูงสุด ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามการเติมสารปกป้องโปรตีนในเนื้อปลานิลบดจะช่วยชะลอการเปิดตัวและจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีน กล่าวคือ เนื้อปลานิลบดควบคุมมีการเปิดตัวในช่วง 2 เดือนแรกของการเก็บสูงถึงร้อยละ 39 ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเริ่มต้น ขณะที่เนื้อปลานิลบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีการเปิดตัวใกล้เคียงกัน

ประมาณร้อยละ 20-26 ($p>0.05$) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราว์ที่พบว่าปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนได้แก่ พอลิเด็กส์โทรส แลกติทอล กลูโคสไซรัป และสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสและซอร์บิทอล ร้อยละ 8 สูงกว่าตัวอย่างควบคุม แต่พบว่าการเปิดตัวของพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในตัวอย่างควบคุมเพิ่มสูงขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น หลังจากเก็บแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 สัปดาห์ (Herrera and Mackie, 2004)

การเก็บแช่เยือกแข็งมีผลต่อปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิก ($p<0.05$) ของโปรตีนจากเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดโดยปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกในทุกตัวอย่างลดลง ($p<0.05$) โดยการลดลงที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลจากการที่เริ่มต้นโมเลกุลโปรตีนมีการเปิดตัวหรือคลายตัวอยู่แล้ว จากนั้นการจับตัวกันระหว่างหมู่ที่ถูกเปิดตัวออก ของโมเลกุลโปรตีนด้วยพันธะไฮโดรโฟบิกจะเกิดขึ้น ส่งผลให้โมเลกุลที่จับตัวกันนั้นไม่สามารถถูกละลายออกมาจากเนื้อปลาบดได้ ดังนั้นจึงพบปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกลดลง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบผลการเติมสารปกป้องโปรตีนแต่ละชนิดพบว่าทุกตัวอย่างมีปริมาณพื้นผิวดังกล่าวสูงใกล้เคียงกัน และไม่แตกต่างกับตัวอย่างควบคุม ($p>0.05$) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าการเติมสารปกป้องโปรตีนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกของโมเลกุลโปรตีนในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งตัวอย่างเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด



รูปที่ 4.4 ปริมาณพื้นผิวไฮโดรโฟบิกจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และปลานวลจันทร์น้ำจืดบด (b) เมื่อเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1

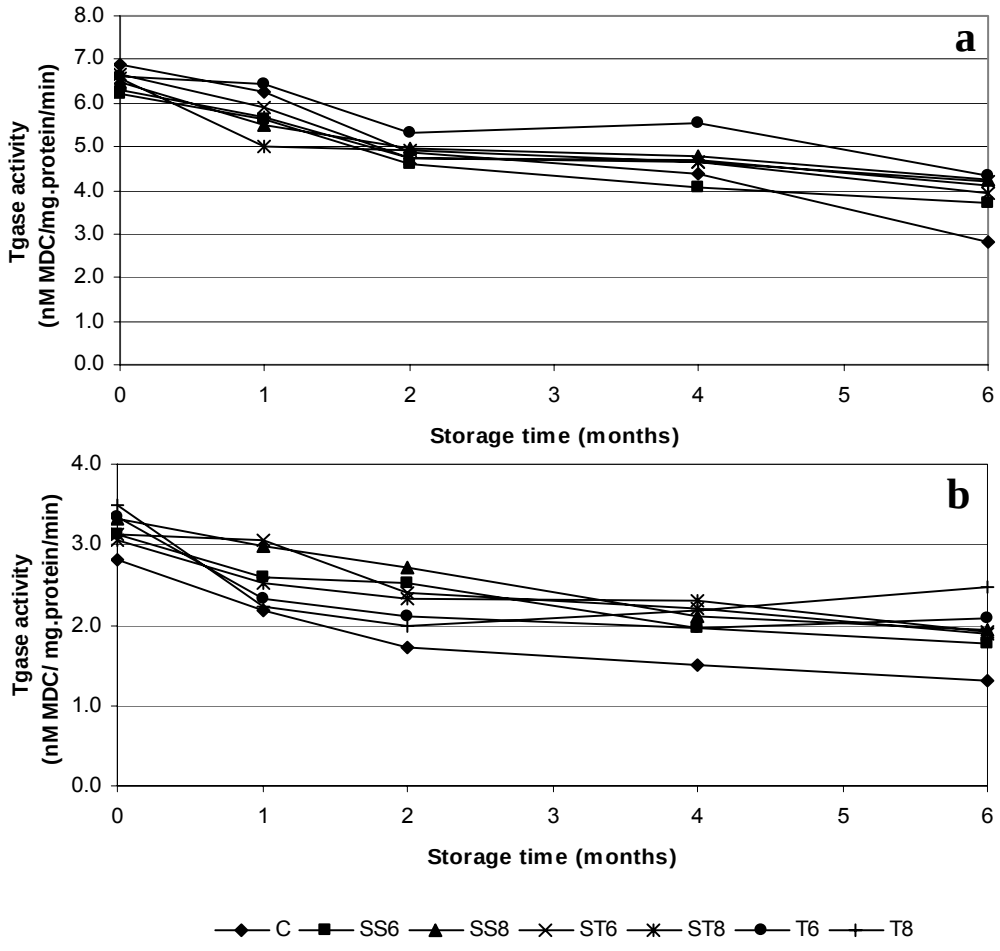
4.4.5 ผลกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส

กิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสลดลงเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน ($p<0.05$)(รูปที่ 4.5) โดยกิจกรรมเอนไซม์ในตัวอย่างปลานิลบดควบคุมหลังการเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลา 6 เดือน ลดลงจากเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ร้อยละ 57.1 ($p<0.05$) ซึ่งสูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนซึ่งมีการลดลงในเดือนที่ 6 ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณร้อยละ 35-41 ($p>0.05$) โดยการลดลงในตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนจะพบในช่วง 1-2 เดือนแรกของการเก็บ ($p<0.05$) หลังจากนั้นค่อนข้างคงที่ ($p>0.05$) ในขณะที่กิจกรรมของเอนไซม์ดังกล่าวในตัวอย่างควบคุมลดลงตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) เช่นเดียวกันในตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนพบการลดลงในช่วง 2 เดือนแรกของการเก็บ ($p<0.05$) จากนั้นคงที่ ($p>0.05$) และเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน กิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสในตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุมลดลงจากเริ่มต้น ร้อยละ 53.7 ($p<0.05$) และตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีกิจกรรมเอนไซม์ลดลงใกล้เคียงกันประมาณร้อยละ 35-44 ($p>0.05$) จากผลกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสที่ลดลง แสดงให้เห็นว่าการเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดมีผลทำให้เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสที่มีอยู่ในกล้ามเนื้อโปรตีนปลาตามธรรมชาติสูญเสียกิจกรรม ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเก็บแช่เยือกแข็งมีผลทำให้หมู่ซัลฟไฮดริลของเอนไซม์ ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ไวหรือจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยา (active site) กับสารตั้งต้น (substrate) เปลี่ยนแปลงไป จึงมีผลให้กิจกรรมเอนไซม์ดังกล่าวลดลง การเติมสารปกป้องโปรตีนนอกจากจะช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อแล้ว ยังอาจกล่าวได้ว่าสามารถช่วยป้องกันการสูญเสียกิจกรรมเอนไซม์ที่มีอยู่ในเนื้อปลาตามธรรมชาติได้อีกด้วย เช่น เอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อคุณสมบัติเชิงหน้าที่การเกิดเจล ของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพเจลที่ดี โดยเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสทำหน้าที่เร่งการย้ายหมู่เอซิล เกิดเป็นพันธะเชื่อมโยงระหว่างแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxy amide) ของกรดอะมิโนกลูตามีน (Glutamine) กับหมู่เอมีนของไลซีน (Lysine) เกิดเป็นไอโซเปปไทด์หรือพันธะแกมมา-กลูตามิล ไลซีน (γ-glutamyl lysine crosslink) (Greenberg, Birckbichler and Rice, 1991)

4.4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณความชื้น

การเติมสารปกป้องโปรตีน มีผลต่อปริมาณความชื้นของตัวอย่างเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) โดยสามารถแบ่งตัวอย่างเนื้อปลาบดได้เป็น 3 กลุ่ม ตามปริมาณความชื้นในตัวอย่าง คือ ตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนร้อยละ 6 และตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนร้อยละ 8 ซึ่งปริมาณความชื้นเริ่มต้น ประมาณร้อยละ 78-79, 75-76 และ 73-74 ตามลำดับ ตัวอย่างปลานิลควบคุมมีปริมาณความชื้นสูงกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลานานขึ้น

ปริมาณความชื้นในตัวอย่างควบคุมจากปลาทั้ง 2 ชนิด ลดลง ($p<0.05$) ในขณะที่ตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีปริมาณความชื้นค่อนข้างคงที่ ($p>0.05$) โดยปริมาณความชื้นในตัวอย่างควบคุมจากปลาทั้ง 2 ชนิด ลดลงจากเริ่มต้น อย่างชัดเจนในช่วง 1 เดือนแรกของการเก็บ คือ ประมาณร้อยละ 3 ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการเปลี่ยนแปลงความชื้นในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำที่สูญเสียเพิ่มขึ้นตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง (Mishara and Srikar, 1989) การเกิดผลึกน้ำแข็งทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อถูกทำลาย และเกิดการรั่วของออร์แกแนลทำให้น้ำถูกปล่อยออกจากกล้ามเนื้อพร้อมๆกับการสูญเสียความชื้นไป อันเป็นสาเหตุให้โมเลกุลโปรตีนเกิดการสูญเสียสภาพธรรมชาติ จากผลการทดลองสารปกป้องโปรตีนดังกล่าวมีผลชะลอการเปลี่ยนแปลงอันอาจเกิดขึ้นจากการแช่เยือกแข็งนี้ได้ โดยสารปกป้องโปรตีนมีบทบาทช่วยในการจับกับโมเลกุลของน้ำรอบโมเลกุลโปรตีนไว้ ดังนั้นจึงช่วยลดการสูญเสียน้ำของโมเลกุลโปรตีนระหว่างการแช่เยือกแข็งได้



รูปที่ 4.5 ผลกิจกรรมเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสจากตัวอย่างเนื้อปลานิลบด (a) และเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด (b) เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1

4.4.7 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง

ค่าพีเอชในตัวอย่างควบคุมจากปลาทั้ง 2 ชนิด ลดลงมากกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน ($p<0.05$) และพบว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีค่าพีเอชใกล้เคียงกันตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง เป็นระยะเวลา 6 เดือน ($p>0.05$) Han-Ching and Leinot (1993) ได้อธิบายว่าค่าพีเอชที่ไม่เปลี่ยนแปลงนั้น เป็นผลอันเนื่องมาจากบทบาทของสารปกป้องโปรตีนร่วมกับสารประกอบฟอสเฟตที่เติมในตัวอย่างเนื้อปลาบด ซึ่งสารปกป้องโปรตีนมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการอุ้มน้ำของโมเลกุลโปรตีนกล้ามเนื้อ และสารประกอบฟอสเฟตจะมีบทบาทในการต้านการเปลี่ยนแปลงของพีเอชหรือทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ในกล้ามเนื้อ ทำให้ช่วยรักษาความเป็นกลางหรือค่าพีเอชในกล้ามเนื้อปลาบดไว้ได้ ดังนั้นตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่มีสารประกอบใดๆช่วยในการจับน้ำหรืออุ้มน้ำและไม่มีสารประกอบฟอสเฟตช่วยรักษาสภาพความเป็นกลาง ส่งผลให้โมเลกุลของน้ำเกิดเป็นผลึกน้ำแข็งในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง มีผลให้ความเข้มข้นของเกลือหรืออิออนชนิดต่างๆในกล้ามเนื้อปลาเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในเนื้อปลาบดควบคุมจึงลดลงสูงกว่าเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีน

4.4.8 คุณสมบัติการเกิดเจลของเนื้อปลาบด

การเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลาบดที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 6 เดือน และการเติมสารปกป้องโปรตีน มีผลต่อคุณสมบัติการเกิดเจลของเนื้อปลาบด ($p<0.05$) (รูปที่ 4.6, 4.7) โดยพบว่าการเติมสารปกป้องโปรตีนในตัวอย่างเนื้อปลาบดมีผลทำให้เจลที่ได้มีค่าแรง ณ จุดแตกหัก (Breaking force) ต่ำกว่าเจลจากเนื้อปลาบดควบคุมตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมสารปกป้องโปรตีน ปริมาณร้อยละ 8 ในตัวอย่างเนื้อปลาบด มีผลให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักต่ำกว่าการเติมในปริมาณร้อยละ 6 ($p<0.05$) ซึ่งจากผลดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ในแต่ละตัวอย่างมีปริมาณเนื้อปลาบดที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ปริมาณของเนื้อปลาบดในตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีน ร้อยละ 6 และเติมสารปกป้องโปรตีนร้อยละ 8 คิดเป็น ร้อยละ 86, 66-68 และ 60-62 ตามลำดับ ดังนั้นการที่เจลมีปริมาณเนื้อปลาต่ำ จึงอาจทำให้สัดส่วนของปริมาณโปรตีนอันเป็นส่วนประกอบหลักในการเกิดโครงสร้างร่างแหของเจลมีปริมาณต่ำด้วย ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ค่าความแข็งของเจลตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีค่าต่ำกว่าเจลตัวอย่างควบคุม

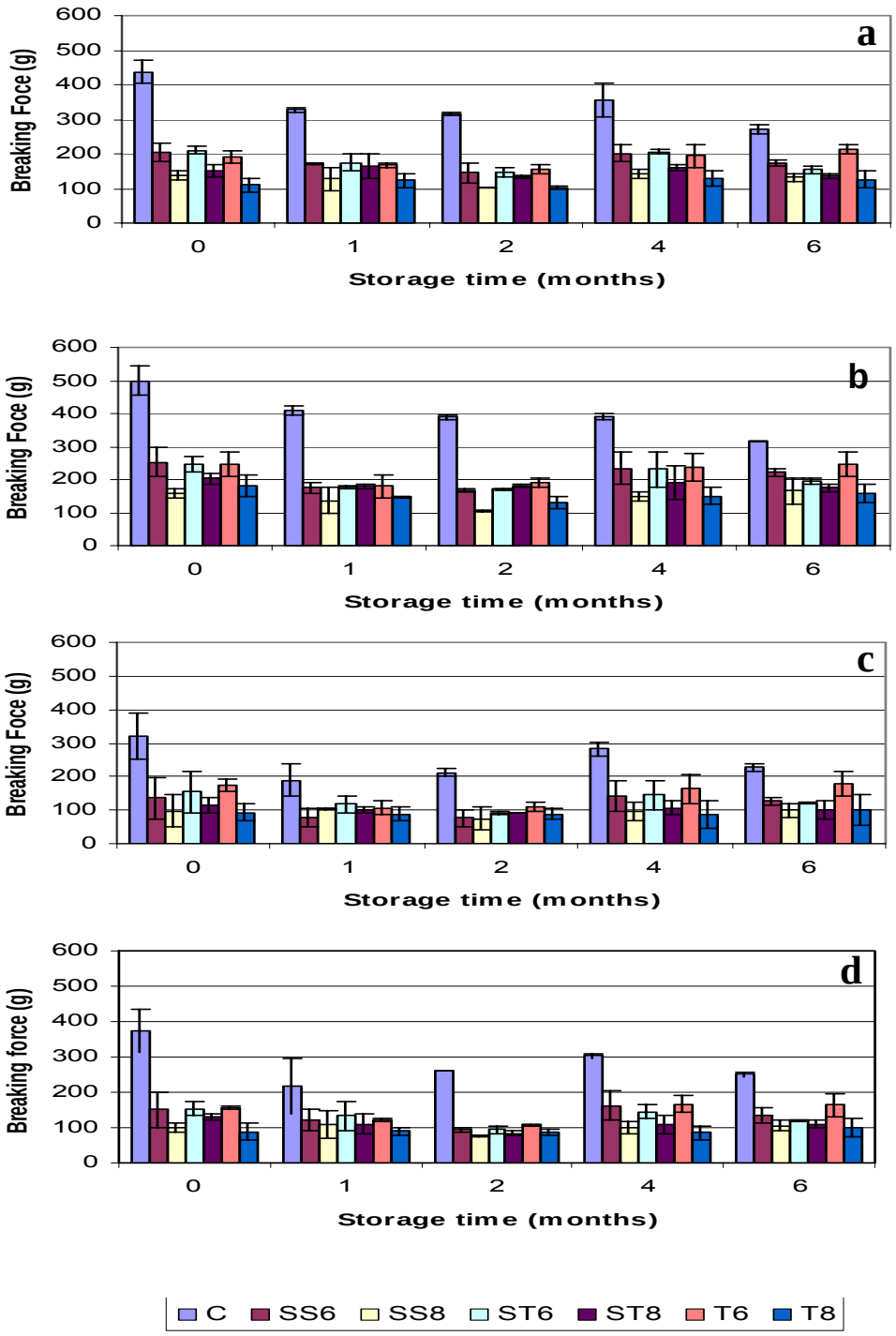
เมื่อพิจารณาผลของค่าระยะทางผิดรูป (Deformation) ในตัวอย่างเจลซึ่งบ่งชี้ถึงความยืดหยุ่นของเจลจะพบว่าระยะเวลาการเก็บแช่เยือกแข็งมีผลทำให้ระยะทางผิดรูปของเจลลดลง ($p<0.05$) (รูปที่ 4.8, 4.9) และเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน พบว่าเจลเนื้อปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ให้ค่าระยะทางผิดรูปของเจลสูงสุดในทุกสภาวะการเซ็ทเจล ($p<0.05$) เช่นเดียวกันเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6

มีค่าระยะทางผิดรูปสูงสุดที่ทุกสภาวะการเซ็ทเจล ($p<0.05$) ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการเติมโซเดียมเคซีเนต (Sodium caseinate) และแคลเซียมเคซีเนต (Calcium caseinate) ปริมาณร้อยละ 8 ในเนื้อปลาบดจากปลาคอด (Cod; *Gadus morhua*) ปลาแฮดดอก (Haddock; *Gadus aeglefinus*) และแซลมอน (Salmon; *Salmo salar*) โดย Anese และ Gormley (1996) พบว่าเจลที่ได้จากเนื้อปลาบดดังกล่าวแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส ตัวอย่างควบคุมจะมีค่าแรง ณ จุดแตกหักสูงกว่าเจลจากตัวอย่างที่เติมสารประกอบดังกล่าว นอกจากนี้การศึกษาโดย Osako และคณะ (2005) พบว่าเจลซูริมิจากปลาแมกเคอเรล (Horse mackerel; *Trachurus japonicus*) ที่เติมสารปกป้องโปรตีนชนิดต่างๆ (ได้แก่ ทรีฮาโลส, กลูโคส และสารผสมระหว่างซูโครสและซอร์บิทอล) ให้เจลที่มีค่าแรง ณ จุดแตกหักเริ่มต้นต่ำกว่าตัวอย่างเจลควบคุม (ไม่เติมสารปกป้องโปรตีน) โดยมีค่าระยะทางผิดรูปไม่แตกต่างกัน ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกันเมื่อเติมสารปกป้องโปรตีนในระดับต่างๆ (ร้อยละ 5, 7.5 และ 10) อย่างไรก็ตามจะพบว่าค่าแรง ณ จุดแตกหักของเจลซูริมิจากตัวอย่างควบคุมดังกล่าวจะลดลงประมาณร้อยละ 50 เมื่อระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 1 เดือน ขณะที่เจลซูริมิจากตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนให้ค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปค่อนข้างคงที่ตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 5 เดือน

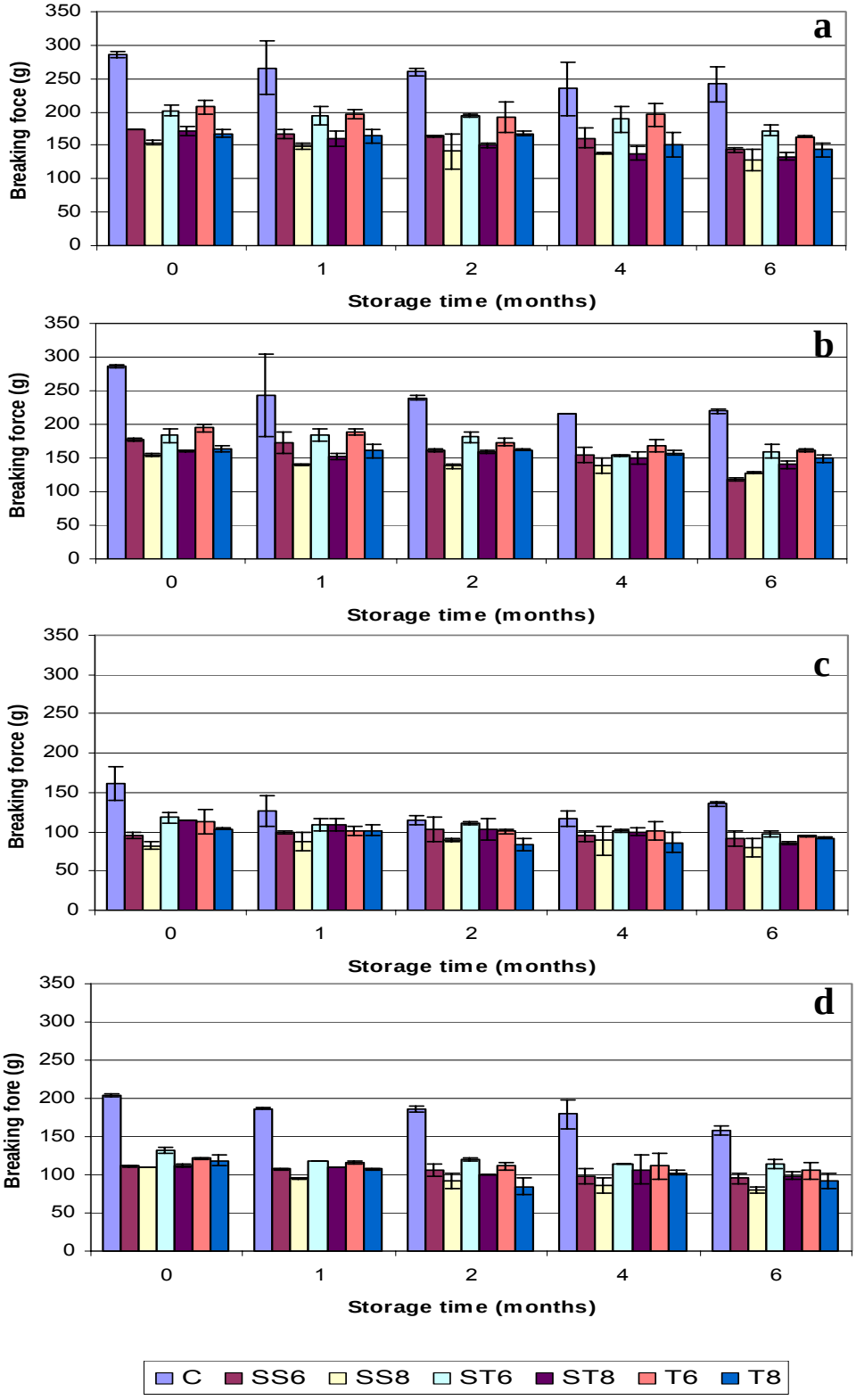
จากการศึกษาสภาวะการเซ็ทเจลพบว่า สภาวะการเซ็ทเจลที่ต่างกันมีผลต่อค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปของเจล($p<0.05$) โดยสภาวะการเซ็ทเจลด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 55 องศาเซลเซียส ให้เจลที่มีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปสูงสุดสำหรับผลในตัวอย่างปลานวลจันทร์น้ำจืดและปลานิล ตามลำดับ ($p<0.05$) และการบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส มีผลให้เจลมีค่าดังกล่าวต่ำสุด ซึ่งจะพบเช่นเดียวกันในปลาทั้ง 2 ชนิด จากผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าการให้ความร้อนที่ 40 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เอนไซม์ทรานส-กลูตามิเนสทำงานได้ดี ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่ช่วยทำให้การเชื่อมต่อกันของโมเลกุลโปรตีนระหว่างกลุ่มแกมมา-คาร์บอกซีเอไมด์ (γ-carboxyamide) ของกรดอะมิโนกลูตามีน (glutamine) และกลุ่มแอพซิลอน-อะมิโน (ε-amino) ของกรดอะมิโนไลซีน (lysine) เกิดเป็นพันธะโควาเลนต์แกมมา-แอพซิลอน-กลูตามิลไลซีน(ε-(γ-glutamyl)-lysine) เกิดขึ้นซึ่งเป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญต่อเนื้อสัมผัสของซูริมิเจล (Kamath, Lanier, Foegeding and Hamann, 1992) ส่วนที่สภาวะการให้ความร้อนที่ 90องศาเซลเซียส โดยไม่บ่ม เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปลดลง เนื่องจากสภาวะดังกล่าวเป็นการให้ความร้อนโดยตรงโดยปราศจากการเซ็ทตัวก่อให้เกิดการคลายตัวของโมเลกุลโปรตีนอย่างรวดเร็ว ทำให้โปรตีนมีแนวโน้มรวมตัวกันอย่างรวดเร็ว โครงข่ายที่ได้ไม่มีความต่อเนื่อง และมีความสามารถอุ้มน้ำได้น้อย ดังนั้นจึงส่งผลให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปต่ำ (Kinoshita, Toyohara and Shimizu, 1990) ส่วนสภาวะการบ่มที่ 65องศาเซลเซียส ส่งผลให้เจลมีค่าแรง ณ จุดแตกหักต่ำสุดเนื่องจากเป็นช่วงที่เอนไซม์โปรติเอสมี

กิจกรรมสูง เอนไซม์ดังกล่าวสามารถย่อยโปรตีนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของเจล โดยจะมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับผลการแยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟริซิส (รูปที่ 4.10) ซึ่งจะพบการลดลงของความเข้มแถบสีโปรตีนไมโอซินสายหลักของเจลที่เตรียมในสภาวะการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เลือนจางกว่าเจลที่เตรียมจากสภาวะอื่นๆ ดังนั้นสภาวะดังกล่าวจึงมีผลให้เจลที่ได้มีค่าแรง ณ จุดแตกหักและระยะทางผิดรูปต่ำสุด เนื่องจากโปรตีนอันเป็นโครงสร้างหลักของเจลถูกย่อยโดยเอนไซม์โปรตีเอส นอกจากนี้ Lanier (1986) ได้กล่าวว่าการเซ็ทเจลโดยการให้ความร้อน 2 ครั้ง จะมีผลให้ทั้งค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปของเจลเพิ่มขึ้น โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำครั้งแรกเพื่อให้เกิดการสร้างร่างแหโปรตีนอย่างมีระเบียบก่อนนำไปให้ความร้อนครั้งที่ 2 ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เพื่อทำให้โปรตีนที่เกิดเจลอย่างสมบูรณ์แล้วตกตะกอน ซึ่งการเตรียมในลักษณะนี้การคลายตัวของโปรตีนจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆทำให้ปฏิกิริยาการสร้างสะพานเชื่อมระหว่างโปรตีนที่คลายตัวออกเกิดขึ้นอย่างมีระเบียบ โครงสร้างของเจลจึงมีความต่อเนื่อง (Foegeding, Allen and Dayton, 1986; Park, 1995) จากผลการทดลองนี้พบว่าที่สภาวะการให้ความร้อนต่ำครั้งแรกที่อุณหภูมิ 40 และ 55 ตามด้วยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูง 90 องศาเซลเซียส จึงเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเซ็ทเจลของเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดและเนื้อปลานิลบด ตามลำดับ

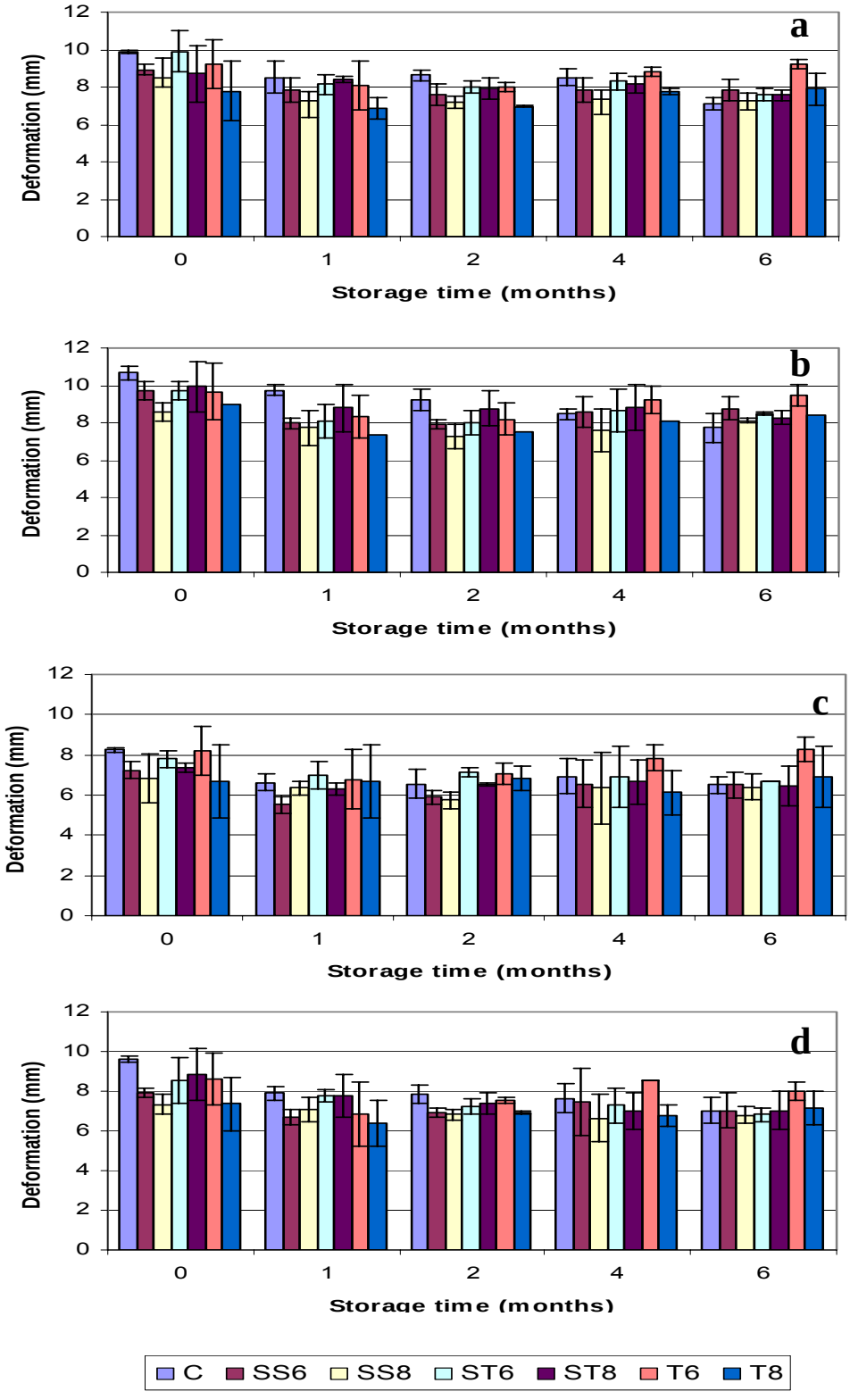
เจลเนื้อปลานิลบดควบคุมบ่มที่ 55 องศาเซลเซียส มีค่าแรง ณ จุดแตกหักเริ่มต้น (เดือนที่ 0) เท่ากับ 498 กรัม และค่าระยะทางผิดรูป เท่ากับ 10.7 มิลลิเมตร และเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน ค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปของเจลลดลงจากค่าเริ่มต้นประมาณร้อยละ 36 และ 27 ตามลำดับ ($p<0.05$) และพบว่าในเดือนที่ 6 ของการเก็บ เจลเนื้อปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 มีค่าระยะทางผิดรูปสูงสุด ($p<0.05$) และเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุมบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส มีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปเริ่มต้น เท่ากับ 286 กรัม และ 10.4 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน มีค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปลดลงจากเริ่มต้น ร้อยละ 22 และ 26 ตามลำดับ และพบว่าตัวอย่างเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ให้เจลมีค่าระยะทางผิดรูปสูงสุด($p<0.05$) ดังนั้นการเติมทรีฮาโลส ร้อยละ6 ในเนื้อปลานิลบดและการเติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด สามารถชะลอการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็งได้โดยช่วยชะลอการลดลงของค่าระยะทางผิดรูปของเจลในระหว่างการเก็บแช่เยือกแข็ง การลดลงของค่าแรง ณ จุดแตกหักและค่าระยะทางผิดรูปของเจลเมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนานขึ้นแสดงให้เห็นว่า โปรตีนมีการสูญเสียสภาพธรรมชาติเกิดขึ้นเนื่องจากผลการแช่เยือกแข็ง จึงมีผลทำให้ลักษณะทางด้านเนื้อสัมผัสของเจลมีคุณภาพต่ำลง ดังนั้นเจลจึงมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นลดลง (Lian, Lee and Hufnagel, 2000; Tejada et al., 1996)



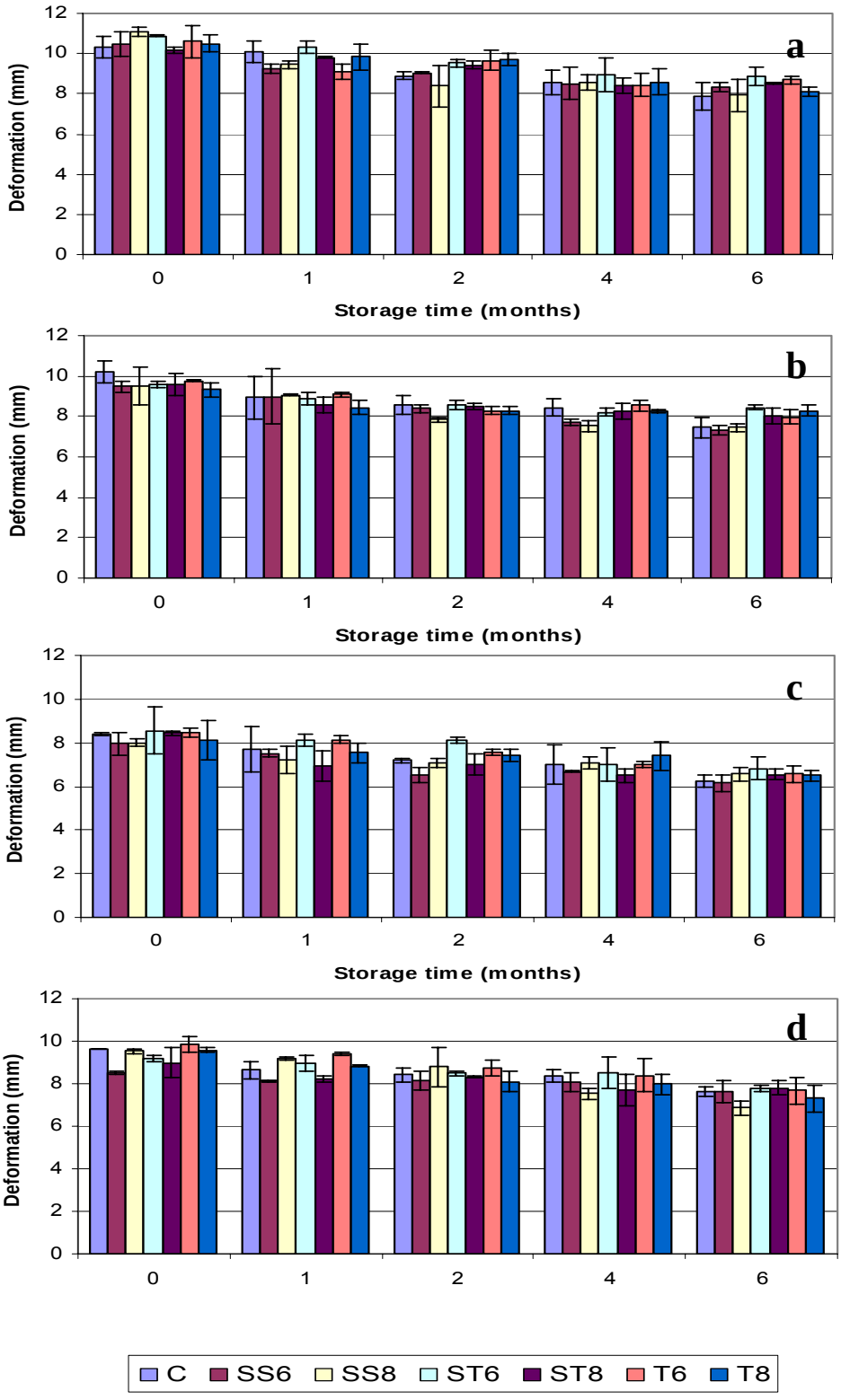
รูปที่ 4.6 ค่าแรง ณ จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1



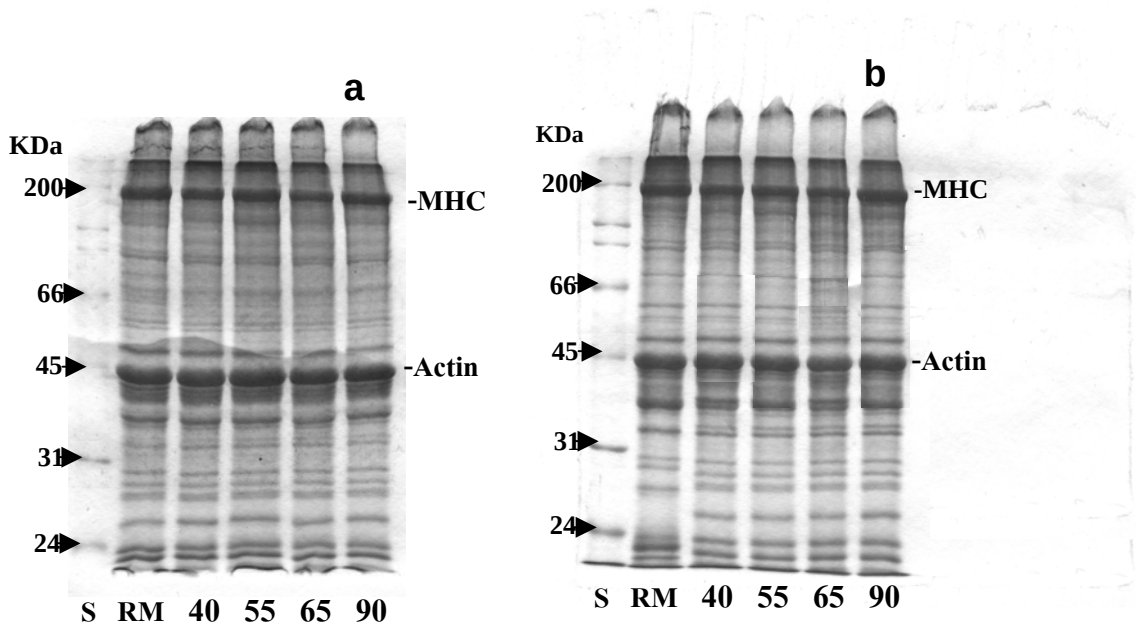
รูปที่ 4.7 ค่าแรง ณ จุดแตกหัก ของเจลจากเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.8 ค่าระยะทางผิดรูปของเจลจากเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.9 ค่าระยะทางผิดรูปของเจลจากเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจล อุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1

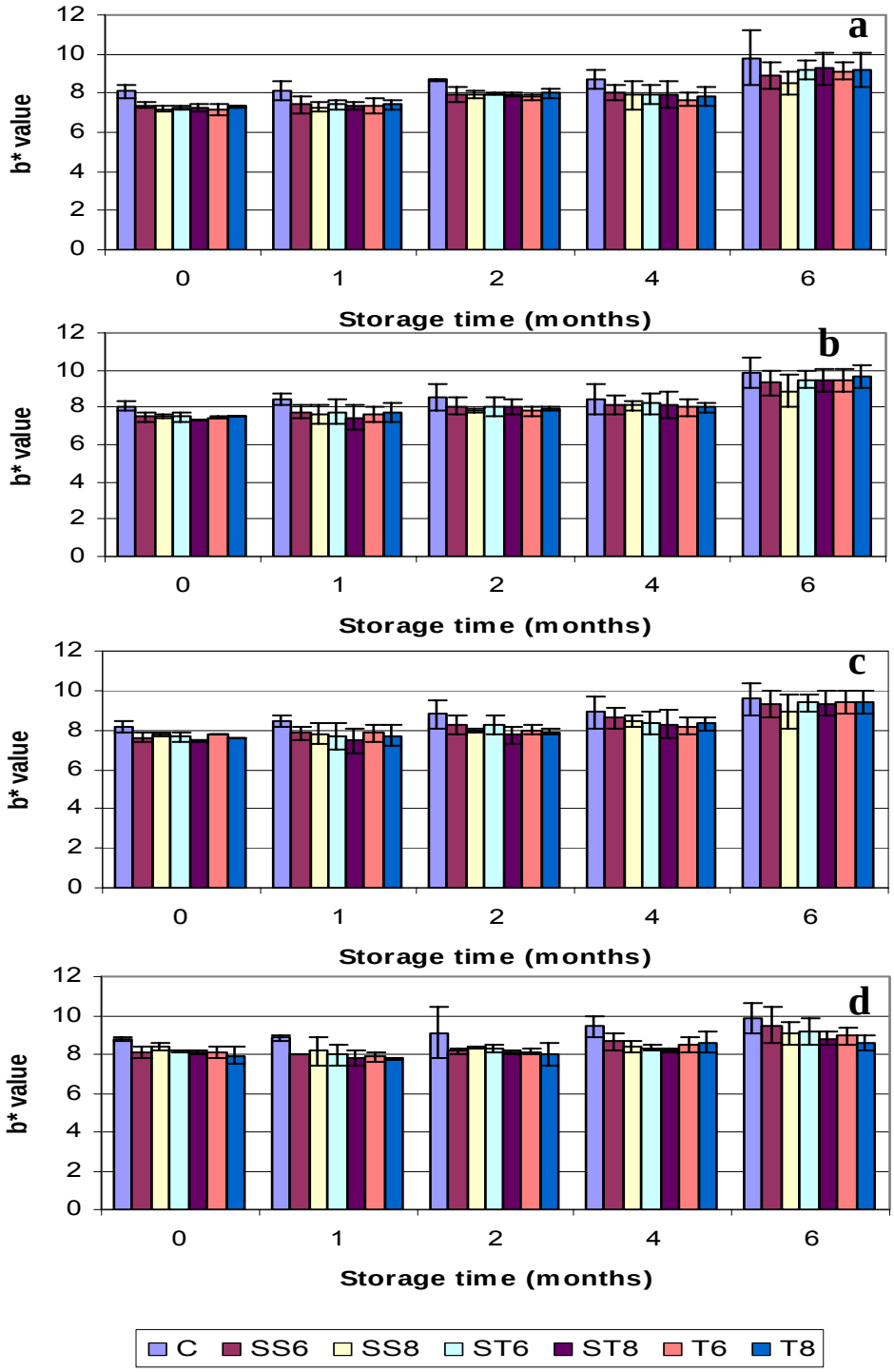


รูปที่ 4.10 ผลการแยกโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ของเจลเนื้อปลานิลบดควบคุม (a) และเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุม (b) หลังการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็ง ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน โดย S คือ โปรตีนมาตรฐาน, RM คือ เนื้อปลาบดที่ผ่านการสับผสมร่วมกับเกลือและพอลิฟอสเฟต, 40 คือเจลที่ผ่านการเซ็ทที่สภาวะ 40/90 องศาเซลเซียส, 55 คือ เจลที่ผ่านการเซ็ทที่สภาวะ 55/90 องศาเซลเซียส, 65 คือ เจลที่ผ่านการเซ็ทที่สภาวะ 65/90 องศาเซลเซียส และ90 คือ เจลที่ผ่านการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส

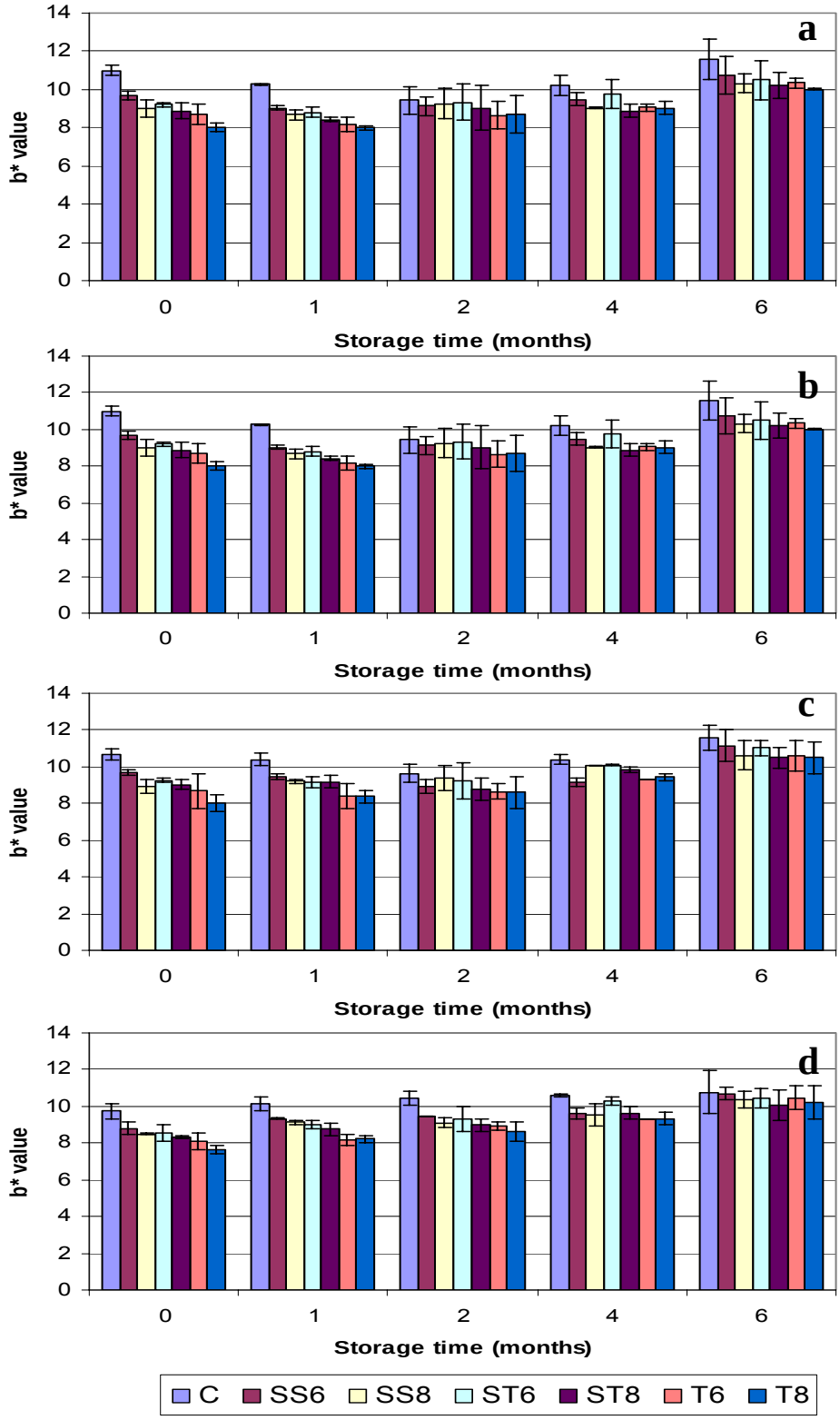
4.4.9 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลาบด

การเก็บแช่เยือกแข็งเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบด มีผลทำให้ค่าความเหลืองของเจลเพิ่มสูงขึ้นตามระยะการเก็บแช่เยือกแข็ง ($p<0.05$) (รูปที่ 4.11, 4.12) สภาวะการเซ็ทเจลไม่มีผลต่อค่าความเหลือง ($p>0.05$) และพบว่าเจลเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุมมีค่าความเหลืองสูงกว่าเจลเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนทุกชนิด ตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็งและทุกสภาวะการเซ็ทเจล ($p<0.05$) นอกจากนี้สารปกป้องโปรตีนแต่ละชนิดมีผลให้ค่าความเหลืองของเจลใกล้เคียงกันตลอดระยะการเก็บแช่เยือกแข็งและทุกสภาวะการเซ็ทเจล ($p>0.05$) ดังนั้นค่าความเหลืองของเจลจึงอาจเป็นผลจากการเกิดสีเหลืองในเนื้อปลาบดระหว่างการเก็บ โดยเนื้อปลาบดจะมีส่วนประกอบของเลือดและไมโอโกลบินอยู่ด้วย ซึ่งเมื่อไมโอโกลบินเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจะได้เป็นสารประกอบเมทไมโอโกลบินทำให้เนื้อปลาบดมีสีเหลืองเกิดขึ้น (Auh et al., 1999) ซึ่งจากผลการทดลองจะพบว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนมีความเหลืองต่ำกว่าตัวอย่างควบคุม แสดงให้เห็นว่าการเติมสารปกป้องโปรตีนสามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไมโอโกลบินในตัวอย่างเนื้อปลาบดลงได้ จากการช่วยลดการสูญเสียน้ำอันจะมีผลเพิ่มความเข้มข้น

ของอิออน ซึ่งมีส่วนในการเร่งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไมโอโกลบินเป็นเมทไมโอโกลบิน ดังนั้นตัวอย่างเนื้อปลาบดควบคุมจึงมีค่าความเหลืองสูงกว่าเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนทุกชนิด



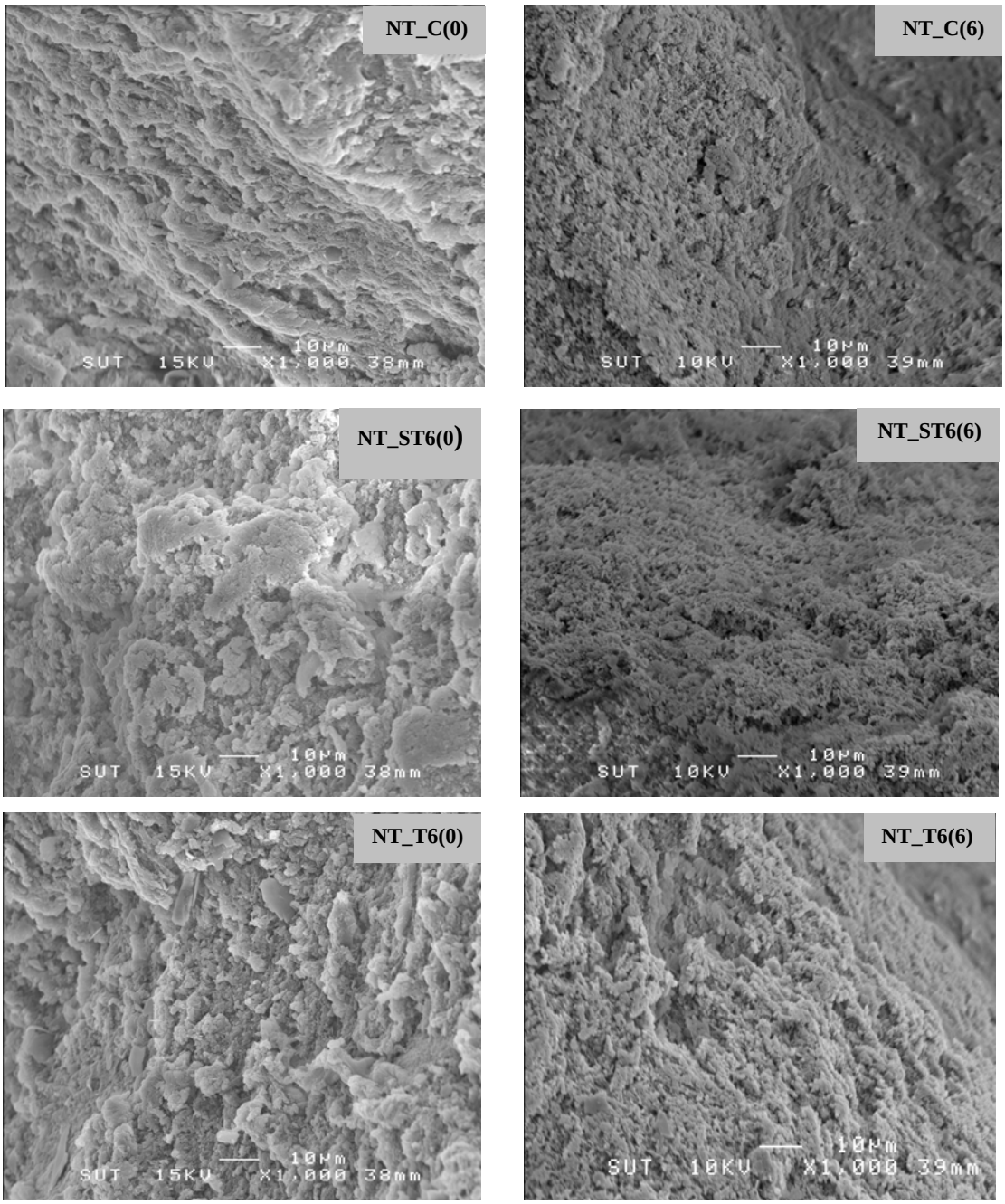
รูปที่ 4.11 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลานิลบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซียส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1



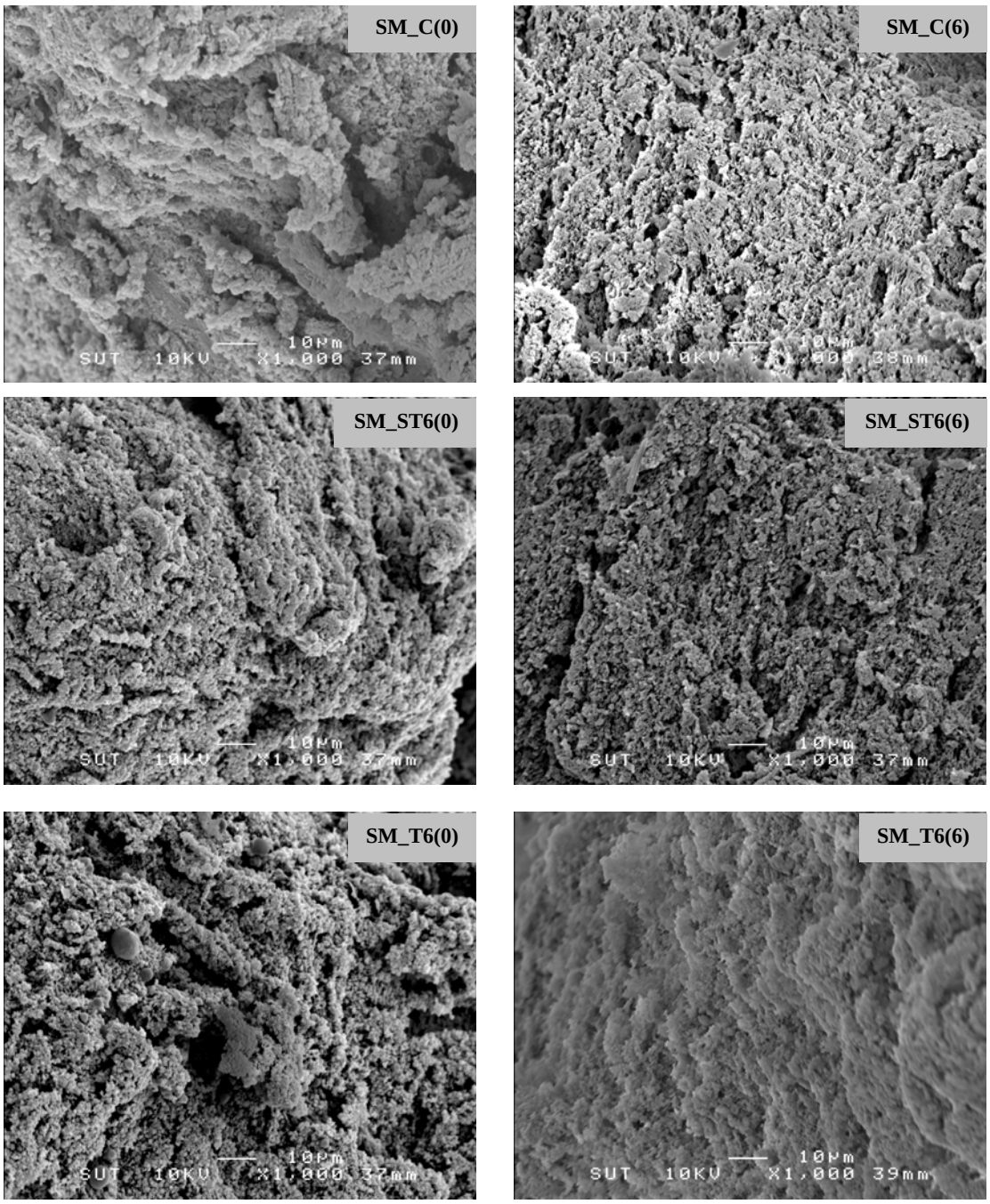
รูปที่ 4.12 ค่าความเหลืองของเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่สภาวะการเซ็ทเจลอุณหภูมิ 40/90 องศาเซลเซยส (a), 55/90 องศาเซลเซียส (b), 65/90 องศาเซลเซียส (c) และ 90 องศาเซลเซียส (d) สำหรับตัวย่อต่างๆเหมือนกับรูปที่ 4.1

4.4.10 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลเนื้อปลาบด

เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลจากตัวอย่างเนื้อปลาบดเริ่มต้น (เดือนที่ 0) และเนื้อปลาบดที่ผ่านการเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 6 เดือน (รูปที่ 4.13 และรูปที่ 4.14) พบว่าลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจลจากตัวอย่างเนื้อปลาบดเริ่มต้น จะเห็นโครงสร้างของเจลมีลักษณะของการเกาะตัวกันของโมเลกุลโปรตีนเป็นก้อนขนาดใหญ่อย่างชัดเจน แต่เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน พบว่าลักษณะการเกาะตัวกันของโมเลกุลโปรตีนลดลง ทั้งนี้อาจเกิดจากการจับรวมตัวของโปรตีนระหว่างการเก็บรักษาในสภาวะแช่เยือกแข็ง และไม่สามารถละลายในขณะสับผสมด้วยเกลือเพื่อเกิดเป็นโครงข่ายของเจลที่มีความไม่สม่ำเสมอได้ แต่จะมีลักษณะเป็นก้อนกลมเล็กๆกระจายอยู่ในโครงสร้างเจล จึงเสมือนว่ามีลักษณะของพื้นผิวเรียบขึ้น ซึ่งลักษณะโครงสร้างดังกล่าวมีความสามารถจับน้ำไว้ได้น้อย ดังนั้นจึงทำให้เจลมีคุณภาพต่ำลง (Benjakul, Visessanguan, Thongkaew and Tanaka, 2005) ซึ่งในตัวอย่างควบคุมเริ่มต้นและผ่านการเก็บแช่เยือกแข็ง จะพบลักษณะโครงสร้างของเจลมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนกว่าตัวอย่างที่เติมสารปกป้องโปรตีนทุกตัวอย่างทั้งปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดบด Gordon and Barbut (1990) ได้กล่าวว่าโครงสร้างร่างแหของเจลโปรตีนจะมีลักษณะเป็นเส้นสายเล็กๆมากมายประสานเชื่อมต่อกันและกัน มีลักษณะปรากฏเป็นรูพรุนขนาดเล็กและใหญ่จำนวนมาก ซึ่งจากรายงานของ Lee and Timasheff (1981) กล่าวว่ารูพรุนที่เกิดขึ้นในโครงสร้างร่างแหของเจล คือตำแหน่งของน้ำอิสระที่อยู่ในเนื้อปลาที่ถูกสับผสม เมื่อทำการสับผสมเนื้อปลาบดซูริมิและส่วนผสมต่างๆจนได้ที่แล้ว และนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำครั้งแรกจะทำให้เกิดโครงสร้างร่างแหหรือโปรตีนแมททริกส์เกิดขึ้น หลังจากนั้นการให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงจะมีผลให้โปรตีนในโครงสร้างร่างแหของเจลเกิดการรวมตัวกันตกตะกอน ดังนั้นจึงเห็นโครงสร้างร่างแหของเจลมีความแน่นและไม่มีรูพรุน ซึ่งจากผลการทดลองไม่พบลักษณะที่เป็นรูพรุนในโครงสร้างของเจล ทั้งนี้อาจเป็นผลอันเนื่องมาจากเป็นลักษณะโครงสร้างร่างแหของเจลที่เตรียมจากสภาวะการให้ความร้อนเพียงขั้นตอนเดียวที่ 90 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ซึ่งเป็นสภาวะการให้ความร้อนที่มีผลทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน โดยที่การเกิดโครงสร้างร่างแหจากการเชื่อมต่อกันระหว่างโปรตีนเกิดขึ้นได้น้อยเนื่องจากเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนสไม่สามารถมีกิจกรรมได้ที่ระดับอุณหภูมิดังกล่าวดังนั้นลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของเจล จึงไม่พบลักษณะของรูพรุนเกิดขึ้น และทำให้เห็นลักษณะโครงสร้างของเจลที่เตรียมจากตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีนไม่แตกต่างกันมากนักหรือสังเกตได้ไม่ชัดเจน อย่างไรตามพบว่าการเก็บตัวอย่างเนื้อปลาบดในสภาวะแช่เยือกแข็งมีผลทำให้เจลมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นลดลง จากการเกิดโครงสร้างร่างแหของเจลที่ลดลงเนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากผลการแช่เยือกแข็ง โดยเจลจากตัวอย่างควบคุมพบการลดลงมากกว่าเจล จากตัวอย่างที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน



รูปที่ 4.13 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างเจล โดย NT_C(0) และ NT_C(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบดควบคุม ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ NT_ST6(0) และ NT_ST6(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบดที่เติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ NT_T6(0) และ NT_T6(6) คือ เจลเนื้อปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 เดือน และ 6 เดือน ตามลำดับ



รูปที่ 4.14 ลักษณะโครงสร้างทางจุลภาคของตัวอย่างเจล โดย SM_C(0) และ SM_C(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดควบคุม ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 และ 6 เดือน ตามลำดับ SM_ST6(0) และ SM_ST6(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่เติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 และ 6 เดือน ตามลำดับ SM_T6(0) และ SM_T6(6) คือ เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ที่ระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 0 และ 6 เดือน ตามลำดับ

4.5 สรุปผลการทดลอง

การเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มีผลทำให้คุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดเปลี่ยนแปลง ($p<0.05$) โดยเนื้อปลาบดที่ไม่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นสูงกว่าเนื้อปลาบดที่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน ($p<0.05$) ดังนั้นการเติมสารปกป้องโปรตีนจึงสามารถช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็งได้ ซึ่งการเติมสารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสร่วมกับซอร์บิทอล ในอัตราส่วน 1:1 ร้อยละ 6 หรือ 8 สารผสมระหว่างน้ำตาลซูโครสร่วมกับ ทรีฮาโลส ในอัตราส่วน 1:1 ร้อยละ 6 หรือ 8 และทรีฮาโลสเพียงอย่างเดียว ร้อยละ 6 หรือ 8 ให้ผลในการป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนจากการแช่เยือกแข็งได้ใกล้เคียงกัน ($p>0.05$) และสารปกป้องโปรตีนทุกชนิดสามารถป้องกันการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส ซึ่งมีอยู่ในกล้ามเนื้อปลาโดยธรรมชาติได้อีกด้วย รวมถึงช่วยลดการเกิดสีเหลืองในเนื้อปลาบดจากการช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไมโอโกลบินในเนื้อปลาบด

เจลเนื้อปลาบดที่ไม่มีการเติมสารปกป้องโปรตีน ให้เจลที่มีความแข็งสูงกว่าเนื้อปลาบดที่เติมสารปกป้องโปรตีนทุกชนิด ($p<0.05$) แต่มีความยืดหยุ่นของเจลเริ่มต้น (เดือนที่ 0) ใกล้เคียงกัน นอกจากนี้เมื่อเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน พบว่าเนื้อเจลปลานิลบดที่เติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 และเจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบดที่เติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ให้ค่าระยะทางของเจลสูงสุด ($p<0.05$) ดังนั้นปลานิลและปลานวลจันทร์น้ำจืดสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งได้โดยสามารถเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นานอย่างน้อย 6 เดือน และการเติมสารปกป้องโปรตีนสามารถยืดอายุการเก็บเนื้อปลาบดจากปลาทั้ง 2 ชนิดได้นานกว่า 6 เดือน โดยยังคงรักษาคุณสมบัติการเกิดเจล ซึ่งการเติมทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานิลบด และการเติมสารผสมซูโครส/ทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด ให้เจลมีคุณภาพสูงสุด จากการมีความยืดหยุ่นสูงสุด เมื่อระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน และสภาวะการเซ็ทเจลมีผลต่อคุณภาพของเจลอย่างมีนัยสำคัญ โดยสภาวะการบ่มที่ 40 และ 55 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ตามด้วยการให้ความร้อนที่ 90 องศาเซลเซียส ให้เจลเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด และเจลเนื้อปลานิลบดมีคุณภาพสูงสุด ตามลำดับ ($p<0.05$)

4.6 รายการอ้างอิง

ผ่องเพ็ญ รัตตกูล. (2530). บทบาทของอาหารสำเร็จรูป. ในเอกสารประกอบการบรรยายในการสัมมนา เรื่อง เทคโนโลยีพัฒนาสินค้าส่งออกอุตสาหกรรมเกษตรและประมง. กรุงเทพฯ : กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์.

วรรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร. (2533). ซูริมิ ผลิตภัณฑ์ที่น่าจับตามอง. **อุตสาหกรรมเกษตร**. 1 : 20-26.

ศิริพร เรียบร้อย. (2542). การเปลี่ยนแปลงเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลากะพงขาว *(Lates calcarifer)* ระหว่างการเก็บในน้ำแข็งและการแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท เทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ประมง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุวรรณ วิรัชกุล อารยา เชาว์เรืองฤทธิ์ และศุภวรรณ ถาวรชินสมบัติ. (2543). ผลของการเก็บรักษาโดยการแช่แข็งของเนื้อปลานิลบดไม่ล้างน้ำต่อคุณภาพของซูริมิ. **วารสารวิจัย มข.** 5 : 56-65.

Anese, M., and Gormley, R. (1996). Effects of Dairy Ingredients on some chemical, physico-chemical and Functional Properties of Minced Fish during Freezing and Frozen storage. **Lebensm.-Wiss. U.-Technol**. 29 : 151-157.

Ang, J.F., and Hultin, H.O. (1989). Denaturation of cod myosin during freezing after modification with formaldehyde. **J. Food Sci.** 54 : 814-818.

AOAC. (1994). Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Virginia.

ASTM. (1987). Indexes of whiteness and yellowness of near-white, opaque materials, E313; and identification of instrumental methods of color or color-difference measurement of material, E805. In Standard on Color and Appearance Measurement. New York : American society of testing materials.

Auh, J.H., Lee, H.G., Kim, J.W., Yoon, H.S., and Park, K.H. (1999). Highly concentrated branched oligosaccharides as cryoprotectant for surimi. **J. Food Sci.** 64 : 418-422.

Benjakul, S., and Bauer, F. (2000). Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. **J. Sci Food Agric.** 80 : 1143-1150.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Thongkaew, C. and Tanaka, M. (2005). Effect of frozen storage on chemical and gel-forming properties of fish commonly used for surimi production in Thailand. **Food Hydrocol**. 19 : 197-207.

Cavajal, P.A., MacDonald, G.A. and Lanier, T.C. (1999). Cryostabilization mechanism of fish muscle proteins by maltodextrins. **Cryobiol**. 38 : 16-26.

Chan, J.K., Grill, T.A., Thompson, J.W. and Singer, D.S. (1995). Herring surimi during low temperature setting, physicochemical and textural properties. **J. Food Sci**. 60 : 1248-1259.

Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. **Biochem. Biophys**. **Acta**. 82 : 70-77.

Fisheries Department of Thailand. (2005). Fisheries Production in quantity by Sub-Sectors, 1981-2000 [Online]. Available: http:// www.fisheries.go.th.

Foegeding, E.A., Allen, C.E. and Dayton, W.R. (1986). Effect of heating rate on thermally formed myosin, fibrinogen and albumin gels. **J. Food Sci**. 51 : 104-108.

Gordon, A., and Barbut, S. (1990). Cold stage scanning electron microscopy study of meat batters. **J. Food Sci.** 55 : 1196-1198.

Greenberg, C.S., Birckbichler, P.J. and Rice, R.H. (1991). Transglutaminase multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissue. **J. FASEB.** 5 : 3071-3077.

Han-Ching, L., and Leinot, A. (1993). Surimi composition and technology : Present status and nutritional. **Int. J. Food Sci and Nutr**. 44 : 55-63.

Hatano, S. (1968). Effects of freezing and storage on the enzyme activities. **Int. J. Refigeration.** 43 : 14-20.

Herrera, J.R., and Mackie, I.M. (2004). Cryoprotection of frozen-stored actomyosin of farmed rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) by some sugars and polyols. **Food Chem.** 84 : 91-97.

Hu, Z.L., Xia, Y.X., Chen, G.P., and Cai, S.X. (2004). The manufacture and application of trehalose. **China Biotechnol.** 4 : 44-48.

Hunt, A.L., Park, J.W., and Zoerb, H. (2002). Trehalose as functional cryoprotectant for fish Proteins. In 2002 annual meeting and Food Expo-Anaheim. Carifornia.

Jiang, S.T., Hwang, D.C. and Chen, C.S. (1988). Effect of storage temperatures on the formation of disulfides and denaturation of milkfish actomyosin *(Chanos chanos)*. **J. Food Sci.** 53 : 1333-1335.

Kamath, G.G., Lanier, T.C., Foegeding, E.A., and Hamann, D.D. (1992). Non-disulfide covalent cross-linking of myosin heavy chain in “setting” of Alaska pollack and Atlantic croaker surimi. **J. Food Biochem.** 16 : 151-172.

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

Kinoshita, M., Toyohara, H. and Shimizu, Y. (1990). Diverse distribution of four distinct type of modori (gel degradation) inducing proteinase among fish species. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 56 : 1485-1492.

Lanier, T.C. (1986). Functional properties of surimi. **Food Technol**. 40 : 107-114.

Lee, C. (1984). Surimi process technology. **Food Technol**. 38 : 69-80.

Lee, J.C., and Timasheff, S.N. (1981). The stabilization of proteins by sucrose. **J. Biol Chem.** 256 : 7193-7201.

Leelapongwattana, K., Benjakul, S., Visessaguan, W., and Howell, N.K. (2005). Physicochemical and biochemical changes during frozen storage of minced flesh of lizardfish *(Saurida micropectoalis)*. **Food Chem**. 90 : 141-150.

Lian, P.Z., Lee, C.M. and Hufnagel, L. (2000). Physicochemical properties of frozen red hake *(Urophysic chuss)* mince as affected by cryoprotective ingredients. **J. Food Sci.** 65 : 1117-1123.

Lim, H.K., and Haard, N.F. (1984). Protein insolubilization in frozen Greeland halibut *(Reinhardtius hippoglossides)*. **J. Food Biochem**. 8 : 163-187.

Lowry, Q.H., Rosebrough, N.J., Farr, L.A., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol Chem.** 193 : 265-275.

MacDonald, Q.A., and Lanier, T.C. (1991). Carbohydrates as cryoprotectants for meats and surimi. **Food Technol**. 45 : 150-159.

MacDonald, Q.A., and Lanier, T.C. (1994). Actomyosin solubilization to freeze-thaw and heat denaturation by lactate salts. **J. Food Sci.** 59 : 101-105.

Matsumoto, J.J. 1980. Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. In J.R. Whitaker and M. Fujimaki (ed.). Chemical Deterioration of Proteins (pp. 95-124). Washington DC: American Chemical Society.

Miura, M., Takayanagi, T., and Nishimura, A. (1992). Cryoprotective effects of hydrogenated linear oligosaccharides on walleys pollack surimi proteins during frozen storage. **Nippon Suisan Gakkaishi**. 58 : 1163-1169.

Nambudiri, D.D., and Gopakumar, K. (1992). ATPase and lactate dehydrogenase activities in frozen stored fish muscle as indices of cold storage deterioration. **J. Food Sci.** 52 : 72-76.

Osako, K., Hossain, A.M., Kuwahara, K., and Nozaki, Y. (2005). Effect of trehalose on the gel-forming ability, state of water and myofibril denaturation of horse mackerel Trachurus japonicus surimi during frozen storage. **Fish. Sci**. 71 : 367-373.

Park, J.W. (1995). Effects of salt, surimi and/or starch content on fracture properties of gel at various test temperatures. **J. Aqua. Food Prod. Technol**. 4 : 75-84.

Park, J.W., Lanier, T.C., and Green, D.P. (1988). Cryoprotective effects of sugar, polyols and/or phosphates on Alaska pollack surimi. **J. Food Sci**. 53 : 1-3.

Ramirez, J.A., Martin-Polo, M.O., and Bandman, E. (2000). Fish myosin aggregation as affected by freezing and initial physical state. **J. Food Sci.** 65 : 556-560.

Ren, X.Q., Zhuang, G., Liao, J.S., and Mu, X. (2001). Production, research situation and development of trehalose. **Zhengzhou Institute of Technol.** 22 : 82-92.

Shenouda, S.Y.K. (1980). Protein denaturation in frozen fish. **Adv. Food Res.** 26 : 275-311.

Shiosaka, M. (2005). Application of Trehalose. [Online]. Available : http://www.fcs.co.th.

Sultanbawa, Y., and Li-Chan, E.C.Y. (1998). Cryoprotective effects of sugar and polyol blends in Ling Cod surimi during frozen storage. **Food Res. Int**. 31 : 87-98.

Sultanbawa, Y., and Li-Chan, E.C.Y. (2001). Structural changes in natural actomyosin and surimi from ling cod *(ophiodon elongatus)* during frozen storage in the absence or presence of cryoprotectants. **J. Agric Food Chem**. 49 : 4716-4725.

Sych, J., Lacroix, C., and Carrier, M. (1991). Determination of optimal level of lactitol for surimi. **J. Food Sci.** 56 : 285-290.

Sych, J., Lacruix, C., Adambounou, L.T., and Castaigne. (1990). Cryoprotective effects of lactitol, palatinit and polydextrose on cod surimi proteins during frozen storage. **J. Food Sci.** 55 : 356-360.

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

Tejada, M., Careche, M., Torrejon, P., Del Mazo, M.L., Solas, M.T., Garcia, M.L., and Barba, C. (1996). Protein extracts and aggregates forming in minced cod *(Gadus morhua)* during frozen storage. **J. Agric Food Chem**. 44 : 3308-3314.

Wong, D.W.S. (1989). Mechanism and theory : Food Chemistry. New York: An AVI Book.

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

Yoon, K.S. and Lee, C.M. (1990). Cryoprotectant effects in surimi and surimi/mince-based extruded products. **J. Food Sci.** 55 : 1210-1216.

Zhou, A., Benjakul, S., Pan, K., Gong, J. and Liu, X. (2005). Cryoprotective effects of trehalose and sodium lactate on tilapia *(Sarotherodon nilotica)* surimi during frozen storage. **Food Chem.** : inpress. DOI : 10.1016/j.foodchem.2005.02.013.

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

การเก็บแช่เยือกแข็ง มีผลทำให้คุณสมบัติเชิงเคมี-กายภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อปลาเปลี่ยนแปลง โดยโมเลกุลโปรตีนเกิดการคลายตัวหรือเปิดตัวของหมู่ซัลฟไฮดริลและพื้นผิวไฮโดรโฟบิกภายในโมเลกุล จากนั้นอันตรกิริยาระหว่างโมเลกุลจะเกิดขึ้น ซึ่งพันธะไดซัลไฟด์เป็นพันธะที่มีบทบาทสำคัญในการจับตัวกันของโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างเนื้อปลาน้ำจืดทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล ปลายี่สกเทศ และปลานวลจันทร์น้ำจืด ขณะที่อันตรกิริยาไฮโดรโฟบิกมีบทบาทสำคัญในการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนในตัวอย่างจากปลาทรายแดง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่างๆเหล่านี้ล้วนแสดงให้เห็นถึง การสูญเสียโครงร่างและการสูญเสียสภาพธรรมชาติอันเนื่องมา จากผลของการแช่เยือกแข็ง ซึ่งส่งผลต่อการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีน โดยเฉพาะอย่างยิ่งความสามารถในการเกิดเจล จากการศึกษาเสถียรภาพต่อการแช่เยือกแข็งโปรตีนปลาน้ำจืด พบว่าโปรตีนปลาน้ำจืดมีความคงตัวต่อการเก็บในสภาวะแช่เยือกแข็งที่ดีไม่ด้อยกว่าปลาทะเล เช่น ปลาทรายแดง ดังนั้นจึงสามารถใช้ปลาน้ำจืด เช่น ปลานิล และปลานวลจันทร์น้ำจืด เป็นวัตถุดิบในการผลิตเนื้อปลาบดแช่เยือกแข็งได้ โดยสามารถเก็บแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 6 เดือน และการเติมสารปกป้องโปรตีนสามารถยืดอายุการเก็บเนื้อปลาบดจากปลาทั้ง 2 ชนิด ได้นานกว่า 6 เดือน โดยยังคงรักษาคุณสมบัติการเกิดเจล ซึ่งการเติมทรีฮาโลสร้อยละ 6 ในเนื้อปลานิลบด และการเติมสารผสมระหว่างซูโครสและทรีฮาโลส ร้อยละ 6 ในเนื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดบด ให้เจลมีคุณภาพสูงสุด เมื่อระยะการเก็บแช่เยือกแข็งนาน 6 เดือน อย่างไรก็ตามย่อมขึ้นอยู่กับการยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้การเติมสารปกป้องโปรตีนเพื่อยืดอายุการเก็บเนื้อปลาบดดังกล่าวยังอาจสามารถใช้ในระดับที่ต่ำกว่าร้อยละ 6 ได้ ทั้งนี้จำเป็นจะต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อเป็นประโยชน์ต่อการนำไปปรับปรุงและพัฒนาสำหรับการใช้ในอนาคต

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจุฬาลักษณ์ เพชรพลอย เกิดเมื่อวันที่ 29 เมษายน 2522 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนอาเวมารีอา อุบลราชธานี ในปี พ.ศ. 2536 และระดับมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนอัสสัมชัญ อุบลราชธานี ในปี พ.ศ. 2540 จากนั้นได้เข้าศึกษาในระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาเมื่อปี 2544 ภายหลังสำเร็จการศึกษาได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปี 2545