



รายงานการวิจัย

ดัชนีเคมีเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับคุณภาพความสดของวัตถุดิบสำหรับ
ซูริมิปลาเขตร้อน

(Chemical parameters for traceability of raw material freshness of
tropical surimi)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-54-12-25



รายงานการวิจัย

ดัชนีเคมีเพื่อการตรวจสอบย้อนกลับคุณภาพความสดของวัตถุดิบสำหรับ
ซูริมิปลาเขตร้อน

(Chemical parameters for traceability of raw material freshness of
tropical surimi)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2554-2555

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เครื่องมือและห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์ 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ และบริษัท อันคامنซูริมิ อินดัสทรีส์ จังหวัดสมุทรสาคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลา ขอขอบคุณ อ. ดร. บุรทิน ขำภีรัฐ สาขาวิชาศึกษาทั่วไป สำนักวิชาเทคโนโลยีสังคม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) ขอขอบคุณคณะผู้ช่วยวิจัย และนักศึกษابัณฑิตในโครงการ ที่อุทิศตน และมุ่งมั่นในการทำวิจัยด้วยความอดุสาหะ



บทคัดย่อ

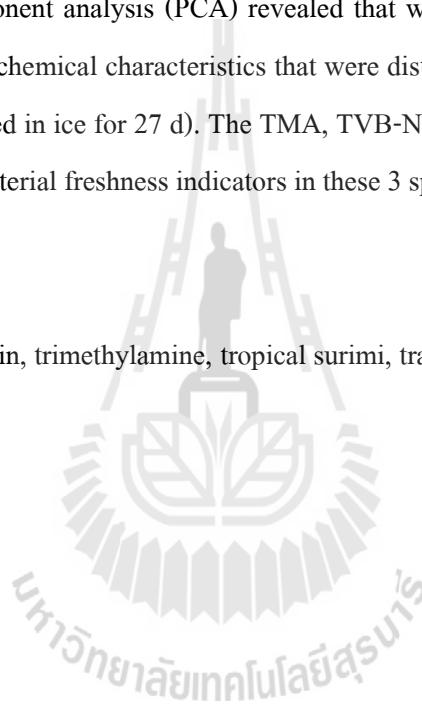
ศึกษาการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของปลาเขตร้อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมิ ได้แก่ ปลาทรายแดง (Threadfin bream, *Nemipterus* spp.; TB) ปลาปากคม (Lizardfish, *Saurida* spp.; LZ) และปลาหนวดถาญี (Goatfish, *Upeneus* spp.; GF) โดยเก็บรักษาปลาทั้งสามชนิดในน้ำแข็งเป็นเวลา 7-27 วัน จากการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N) ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine, TMA) ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine, Hx) และไบ-โอจีนิกเอมีนทั้งหมด (Total biogenic amine, BA) ของเนื้อปลาเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในขณะที่ปริมาณโปรตีนของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาปลาในน้ำแข็งการวิเคราะห์ผลด้วยวิธีวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA) พบว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 7-12 วัน มีลักษณะทางเคมีแตกต่างอย่างชัดเจนจากตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาที่เน่าเสีย (เก็บรักษาในน้ำแข็ง 27 วัน) ค่าไตรเมทิลเอมีน สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด และไฮโปแซนทีนที่วิเคราะห์จากตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิของปลาเขตร้อนทั้งสามชนิดได้



Abstract

Changes in chemical parameters of tropical fish used for surimi production, namely, threadfin bream (TB, *Nemipterus* spp.), lizardfish (LZ, *Saurida* spp.) and goatfish (GF, *Upeneus* spp.), during ice storage and their respective washed mince were investigated. Total volatile base nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA), hypoxanthine (Hx) and total biogenic amine (BA) content of mince increased with storage time. Crude protein of fish and their respective washed mince reduced as storage time of fish was prolonged. Principal component analysis (PCA) revealed that washed mince produced from fish stored in ice for 7-12 d showed chemical characteristics that were distinct from those of washed mince prepared from spoiled fish (stored in ice for 27 d). The TMA, TVB-N and Hx content of washed mince appeared to be sufficient raw material freshness indicators in these 3 species.

Keywords: freshness, hypoxanthin, trimethylamine, tropical surimi, traceability



สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อไทย	ii
บทคัดย่ออังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ขอบเขตงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์	3
การทบทวนเอกสาร	4
ซูริมิ (Surimi)	4
องค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา	8
การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา	9
คุณภาพความสดของปลา	9
วิธีดำเนินการวิจัย	20
วัสดุและสารเคมี	20
การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาลดล้างน้ำ	20
การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี	21
วิเคราะห์ผลทางสถิติ	24
ผลการวิจัย	25
การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี	25
การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมี	26

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก	32
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	37
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	37
บรรณานุกรม	38
ภาคผนวก	44



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สรุปการเปลี่ยนแปลงการย่อยสลาย (autolysis) ในตัวปลาระหว่างเก็บแช่เย็น	10
2.2	สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่ผลิตขึ้นจากการเจริญ และกิจกรรมของจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) หรือเก็บในน้ำแข็ง หรือเก็บที่อุณหภูมิปกติ	11
4.1	การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ และสมบัติทางเคมีของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาบด ล้างน้ำที่ผลิตจากปลาปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดถาฮิ (GF) ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง	27
4.2	ค่า loading factor ของแต่ละองค์ประกอบดัชนีชี้วัดคุณภาพ	34



สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	แผนภาพแสดงการผลิตซูริมิ และผลิตภัณฑ์ซูริมิ	5
2.2	แนวโน้มการผลิตซูริมิของโลกในช่วงปี 2548-2555, *ค่าประมาณ	6
2.3	แนวโน้มการผลิตซูริมิจากปลาในเขตร้อน ในช่วงปี 2548-2555, *ค่าประมาณ	7
2.4	ตลาดผลิตผลิตภัณฑ์ซูริมิโลกประมาณ 2,000,000 เมตริกตัน ในปี 2553	7
2.5	ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาและคะแนนที่ได้จากการประเมินด้วยคุณภาพทางประสาทสัมผัส	11
2.6	การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในกล้ามเนื้อปลา	12
2.7	ตัวอย่างโครงสร้างของไบโอจินิกเอมีน	17
4.1	การเปลี่ยนแปลงปริมาณไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine, Hx) ของปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดถายี่ (GF) ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 27 วัน; (a) เนื้อปลา และ (b) เนื้อปลาคัดล้างน้ำ	30
4.2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine, TMA); (a) เนื้อปลา และ (b) เนื้อปลาคัดล้างน้ำและปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N); (c) เนื้อปลา และ (d) เนื้อปลาคัดล้างน้ำของปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดถายี่ (GF) ระหว่างการเก็บในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 27 วัน	33
4.3	การวิเคราะห์ผลของการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) ของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาคัดล้างน้ำของปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดถายี่ (GF) ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งที่ 7-27วัน โดย TM7-TM27 (TB mince), TW7-TW27 (TB washed mince), LM7-LM27 (LZ mince), LW7-LW27 (washed mince LZ), GM7-GM27 (GF mince), GW7-GW27 (GF washed mince); (a) PC1 และ PC2; (b) PC1 และ PC3	36

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

การผลิตซุริมิจากปลาเขตร้อนมีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจากในอดีต ประมาณ 500,000 เมตริกตัน (Guenneugues and Ianelli, 2014) ปลาเขตร้อนที่ใช้ในการผลิตซุริมิ ได้แก่ ปลาทรายแดง (threadfin bream, *Nemipterus* spp.; TB) ปลาปากคม (lizardfish, *Saurida* spp.; LZ) และปลาหนวดถาบี (goatfish, *Upeneus* spp.; GF) ปริมาณการจับปลาทั้ง 3 ชนิด คือ 775,431 เมตริกตัน (FAO, 2013) ความสดของปลาเป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพของซุริมิ สำหรับปลาเขตนาวและอบอุ้น เช่น ปลา Alaska pollock และปลา Pacific whiting จะนำมาแปรรูปเป็นซุริมิหลังการจับเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามปลาเขตร้อนจะมีวิธีการจัดการที่แตกต่างกัน โดยปลาหลังการจับจะถูกเก็บแช่เย็นด้วยน้ำแข็งในปริมาณที่จำกัด และนำมาผลิตซุริมิภายใน 7-14 วัน (Guenneugues and Ianelli, 2014) การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และจุลินทรีย์เกิดขึ้นตลอดระยะเวลาหลังการจับ และในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะมีผลต่อคุณภาพของซุริมิ ถึงแม้ว่าจะมีการจับปลาเขตร้อนเหล่านี้ ในปริมาณมาก แต่ยังไม่มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีซึ่งมีความสัมพันธ์กับคุณภาพความสดของปลาทั้ง 3 ชนิดนี้ในระหว่างการเก็บรักษา

นิวคลีโอไทด์ที่เกิดจากการปฏิกิริยาการย่อยสลาย เช่น อะดีโนซีนไดฟอสเฟต (adenosine diphosphate, ADP) อะดีโนซีน โมโนฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) อิโนซีน โมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate, IMP) อิโนซีน (inosine, Ino), และไฮโปแซนทีน (hypoxanthin, Hx) ถูกใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลา (Ryder, 1985) ไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N) และไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amine) เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมเสียจากจุลินทรีย์ (Ocaño-Higuera et al., 2009) มีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี และคุณภาพความสดของปลาระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งของปลาหลายชนิด เช่น ปลาตาเดียว (flounder, *Psettoodes erumei*) (Massa et al., 2005) ปลากระพงขาว (sea bass, *Dicentrarchus labrax*) (Özogulet al., 2006) meagre (*Argyrosomus regius*) filets (Hernández et al., 2009), red mullet (*Mullus barbatus*) และ goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) (Özyurt et al., 2009) และ wild common sole (*Solea solea*) (Özoğul et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาคุณภาพความสดของปลาทะเลเขตร้อนอินเดีย ได้แก่ silver jewfish, Bombay duck, ปลาทูน่าตาโต

(bigeye tuna) ปลาจะละเม็ด (Chinese pomfret) และปลาดาบ (ribbon) (Reza et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาในเขตร้อนที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมิ โดยเฉพาะปลาทรายแดง ปลาดาบคม และปลาหนวดฤาษี ซึ่งเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

ในกระบวนการผลิตซูริมิ เนื้อปลา (mince) จะผ่านกระบวนการล้างเพื่อกำจัดซาร์โคพลาสมิกโปรตีน ซึ่งไตรเมทิลเอมีน ไบโอจีนิกเอมีน ไฮโปแซนทีน และสารประกอบอื่นๆ ที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมักใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ความสดของเนื้อปลาจะถูกล้างไปด้วย คุณภาพของซูริมิ เช่น ความสามารถในการเกิดเจลจะขึ้นอยู่กับคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต (Yongsawatdigul and Park, 2002) ส่วนคุณภาพทางด้านเนื้อสัมผัสของซูริมิสามารถปรับปรุงได้โดยการเติม ไข่ขาวผึ่งซึ่งเป็นสารยับยั้งกิจกรรมของโปรตีนเอส และเหนียวในการเกิดเจล การใช้สมบัติในการเกิดเจลเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอในการประเมินคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิ ในทางปฏิบัติอาจมีการใช้วัตถุดิบที่มีคุณภาพความสดต่ำมาผลิตซูริมิ ซึ่งไม่เป็นไปตามหลักการผลิตที่ดี (Good manufacturing practice) ดังนั้นการค้นหาดัชนีที่บ่งชี้คุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตซูริมิโดยวิเคราะห์จากตัวอย่างซูริมิ (เนื้อปลาบดล้างน้ำ) จึงเป็นเรื่องท้าทาย และเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อมิให้ผู้ผลิตฉวยโอกาสจากกระบวนการผลิตโดยนำปลาที่มีคุณภาพความสดต่ำมาใช้ในการผลิต ดังนั้นการค้นหาดัชนีบ่งชี้เพื่อใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบในการผลิตซูริมิ จึงมีความสำคัญในการควบคุมคุณภาพของซูริมิ

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพความสด และสมบัติทางเคมีของปลาทรายแดง ปลาหนวดฤาษี และปลาดาบคม ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ และในตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากตัวอย่างปลาเหล่านั้น
2. วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางเคมีเพื่อใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิ

ขอบเขตงานวิจัย

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างปลาดาบคม (lizardfish, *Saurida* spp.; LZ) ปลาทรายแดง (threadfin bream, *Nemipterus* spp.; TB) และ ปลาหนวดฤาษี (goatfish, *Upeneus* spp.; GF) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน โดยสุ่มวิเคราะห์ตัวอย่างในวันที่ 7, 12, 17 และ 27 วัน หลังการจับปลา จากนั้นเตรียมเนื้อปลาบดล้างน้ำ จากตัวอย่างปลาทั้ง 3 ชนิด และวิเคราะห์หองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อ

ปลาบดล้างน้ำ วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบทางเคมี และระยะเวลาการเก็บของวัตถุดิบ และตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำ เพื่อระบุดัชนีคุณภาพที่เหมาะสมที่สามารถใช้เป็นดัชนีตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบในการผลิตซูริมิ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ทราบดัชนีความสดเพื่อตรวจสอบย้อนกลับคุณภาพของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิ พร้อมทั้งทราบการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของปลา และองค์ประกอบทางเคมีของซูริมิที่ผลิตจากวัตถุดิบที่เก็บรักษาในน้ำแข็งที่ระยะเวลาต่างๆ เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของซูริมิ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือ ผู้ประกอบการผลิตซูริมิ ผู้แปรรูปซูริมิเป็นผลิตภัณฑ์ งบประมาณ สลอบันวิจัย และสถานศึกษาที่ค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับการผลิตซูริมิ และการแปรรูปซูริมิ



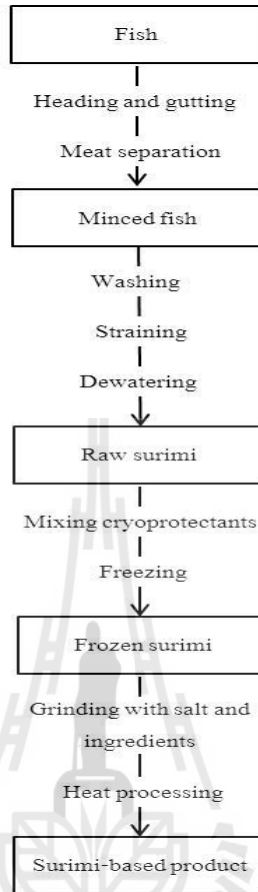
บทที่ 2

การทบทวนเอกสาร

2.1 ซูริมิ (Surimi)

ซูริมิ คือ ผลิตภัณฑ์เนื้อปลาสดที่ผ่านการล้างน้ำ เพื่อขจัดไขมัน และองค์ประกอบที่ละลายน้ำได้ เช่น โปรตีนที่ละลายน้ำได้ เม็ดสี เอนไซม์ และสิ่งเจือปนอื่นๆ ซึ่งจะช่วยปรับปรุงความสามารถในการเกิดเจลทำให้เนื้อปลามีความขาวขึ้น และยังช่วยกำจัดกลิ่นที่ไม่ดีได้ จากนั้นกำจัดน้ำบางส่วนออก ผลิตภัณฑ์ที่ได้จะนำไปแปรรูปทันทีหรือผสมสารป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เช่น น้ำตาล ฟอสเฟต แล้วเก็บไว้ในรูปผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งเพื่อแปรรูปต่อไป ทั้งนี้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา โดยการแช่แข็งให้นานขึ้น องค์ประกอบทางเคมีของซูริมิต่างจากเนื้อปลา และเนื้อปลาสด โดยมีลักษณะที่สำคัญ คือ มีสีขาว ไม่มีกลิ่นคาว และมีความสามารถเกิดเจลที่ดี ซูริมิเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์จากซูริมิ (surimi based products) ต่างๆ เช่น ปูอัด ลูกชิ้น เนื้อกึ่งเทียม เป็นต้น ในการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์แปรรูปจากซูริมิต้องนำซูริมิมาสับผสมกับเกลือในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อละลายโปรตีนมายโอไฟบริลลาร์ และเติมส่วนผสมอื่นๆ จากนั้นขึ้นรูปด้วยการใช้เครื่องเอ็กทรูด (extruder) การทำให้เกิดลักษณะเส้นใย (fiberized) หรือขึ้นรูปด้วยการใช้เบ้าประกอบ (composite-molded) ตามด้วยการให้ความร้อนเพื่อเหนียวทำให้เกิดเจล (Okada, 1992) แผนภาพแสดงการผลิตซูริมิ และผลิตภัณฑ์ซูริมิ แสดงดังรูปที่ 2.1

ปัจจุบันการผลิตซูริมิได้ขยายการผลิตไปยังหลายประเทศ เช่น สหรัฐอเมริกา เกาหลีใต้ ไทย สาธารณรัฐประชาชนจีน เวียดนาม และอินเดีย เป็นต้น ในช่วงปี พ.ศ. 2554-2555 กำลังการผลิตซูริมิเฉลี่ยของโลกประมาณ 800,000 เมตริกตัน โดยประมาณ 500,000 เมตริกตัน หรือ ร้อยละ 60 เป็นซูริมิที่ผลิตจากปลาในเขตร้อน (Tropical fish) (รูปที่ 2.2) (Guenneugues and Ianelli, 2014) ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นผู้ผลิตซูริมิจากปลาเขตร้อนหลัก (~200,000 MT) รองลงมาคือ เวียดนาม (~140,000 MT) ไทย (~90,000 MT) และอินเดีย (~60,000 MT) ตามลำดับ (รูปที่ 2.3) (Guenneugues and Ianelli, 2014) ปลาที่นิยมใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตซูริมิในแถบแปซิฟิกตอนเหนือ ได้แก่ ปลา Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) ปลา Pacific whiting (*Merluccius productus*) ปลา Southern blue whiting (*Micromesistius australis*) ปลา hoki (*Macruronus novaezealandiae*), ปลา Northern blue whiting (*Micromesistius poutassou*) และปลาเขตร้อน ได้แก่ ปลาทรายแดง (threadfin bream, *Nemipterus* spp.; TB) ปลาปากคม (lizardfish, *Saurida* spp.; LZ) และ ปลาหนวดถ้ำ (goatfish, *Upeneus* spp.; GF), ปลาตาหวาน (bigeye snapper, *Priacanthus* spp), ปลาจวด croaker (*Pennahia* and *Johnius* spp) ปลากระพง (Sea bream, *Evynnis* spp), และปลาดาบ (ribbon, *Trichiurus* spp) (Guenneugues and Ianelli, 2014)

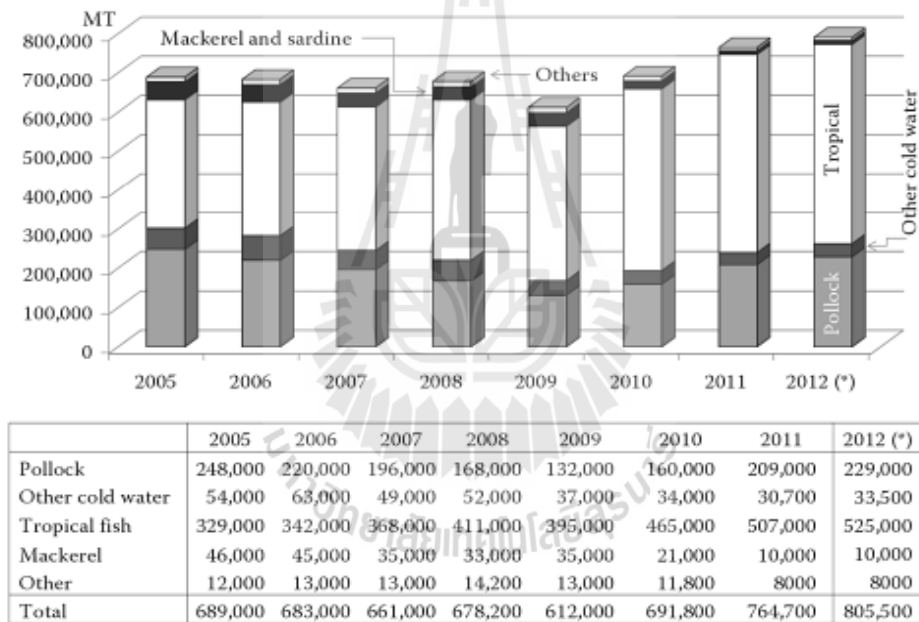


รูปที่ 2.1 แผนภาพแสดงการผลิตซูริมิ และผลิตภัณฑ์ซูริมิ
ที่มา: Okada (1992)

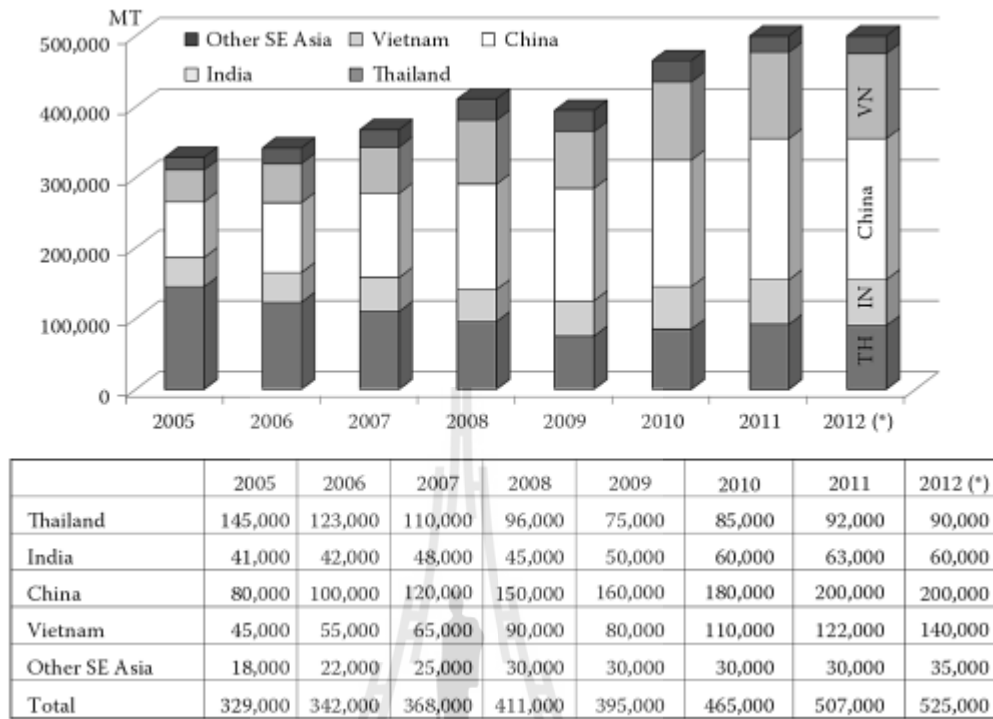
ในปี พ.ศ. 2553 ตลาดผลิตผลิตภัณฑ์ซูริมิโลกเฉลี่ยประมาณ 2,000,000 เมตริกตัน ซึ่งผลิตมาจากซูริมิประมาณ 750,000 เมตริกตัน ตลาดผลิตภัณฑ์ซูริมิมีอัตราการเติบโตโดยเฉลี่ยร้อยละ 2-3 ต่อปี โดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้ซูริมิประมาณ 80,000 เมตริกตัน เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ซูริมิประมาณ 160,000 เมตริกตัน (รูปที่ 2.4) ซึ่งร้อยละ 50 ของผลิตภัณฑ์ซูริมิผลิตมาจากประเทศไทย รองลงมา คือ ประเทศมาเลเซีย สิงคโปร์ และไต้หวัน ตามลำดับ

จากข้อมูลทางสถิติจะเห็นได้ว่าประเทศไทยเป็นประเทศผู้ผลิตซูริมิ และผลิตภัณฑ์ซูริมิที่สำคัญในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในปี พ.ศ. 2554-2555 ประเทศไทยมีโรงงานอุตสาหกรรมผลิตซูริมิ ทั้งหมด 15 โรงงาน โดยปลาที่นิยมใช้ในการผลิตซูริมิ คือ ปลาทูหางแดง ปลาปากคม ปลาดาวหวาน

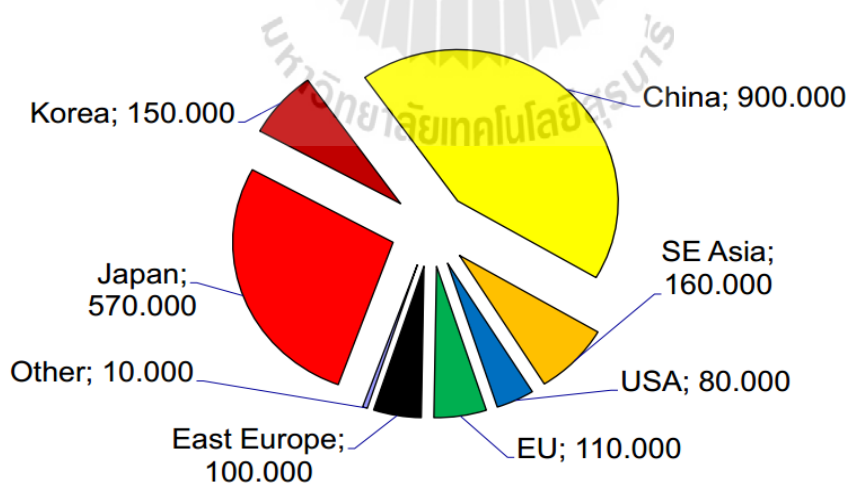
และปลาหนวดดาชิ ประมาณร้อยละ 90 ของวัตถุดิบทั้งหมด ประเทศไทยมีโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์ ซูริมิ อีก 9 โรงงาน ซึ่งโรงงานส่วนใหญ่ตั้งอยู่ในพื้นที่จังหวัดสมุทรสาคร (Techanitisawad, 2012) ผลิตภัณฑ์ ซูริมิในประเทศแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ ปูอัด/ลูกชิ้นปลาชุกูวะ/ลูกชิ้นปลาคามาโบโกะ, ทอดมันปลา/ลูกชิ้นปลา และปลาเส้น ซึ่งกำลังการผลิตอยู่ที่ 70,000, 18,000 และ 4,400 เมตริกตัน ตามลำดับ (Techanitisawad, 2012) ประเทศไทยส่งออกผลิตภัณฑ์ซูริมิประมาณ 47,000 เมตริกตัน ที่เหลือบริโภคภายในประเทศ ตลาดซูริมิหลักของไทย คือ ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งประเทศไทยมีการส่งออกซูริมิไปญี่ปุ่นในปีหนึ่งๆ เป็นมูลค่ากว่าหนึ่งหมื่นล้านบาท หรือมากกว่า 70% ของการส่งออกซูริมิทั้งหมด รองลงมา คือ เกาหลีใต้ (9%) และรัสเซีย (7%) โดยในปี พ.ศ. 2555 ไทยมีการส่งออกซูริมิไปญี่ปุ่นประมาณ 13,220 ตัน คิดเป็นมูลค่ากว่า 12,140 ล้านบาท (ณาตยา, 2556)



รูปที่ 2.2 แนวโน้มการผลิตซูริมิของโลกในช่วงปี พ.ศ. 2548-2555, *ค่าประมาณ
ที่มา : Guennegues and Ianelli (2014)



รูปที่ 2.3 แนวโน้มการผลิตสุริมิจากปลาในเขตร้อน ในช่วงปี พ.ศ. 2548-2555, *ค่าประมาณ
ที่มา : Guennegues and Ianelli (2014)



รูปที่ 2.4 ตลาดผลิตผลิตภัณฑ์สุริมิโลกประมาณ 2,000,000 เมตริกตัน ในปี พ.ศ. 2553
ที่มา : Guennegues and Ianelli (2014)

2.2 องค์ประกอบที่สำคัญของโปรตีนกล้ามเนื้อปลา

โปรตีนกล้ามเนื้อปลาสามารถแบ่งตามสมบัติในการละลายได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ มัยโอไฟบริลลาร์ (โปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ) โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (โปรตีนที่ละลายในน้ำ) และโปรตีนสโตรมา (โปรตีนที่ไม่ละลาย)

2.2.1 โปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์

โปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์ (myofibrillar protein) เป็นโปรตีนที่พบมากที่สุดในกลุ่มเนื้อปลาประมาณร้อยละ 66-77 ของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อปลา ซึ่งโปรตีนกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยมัยโอซิน แอกทิน โทรโปนิน และโทรโปมัยโอซิน เป็นต้น (Mackie, 1994) โดยมีมัยโอซินเป็นโปรตีนหลัก ประมาณร้อยละ 45 ของโปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 480 กิโลดาลตัน โปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์ให้ลักษณะโครงสร้างเป็นเส้นใยของกล้ามเนื้อ สามารถสกัดด้วยสารละลายเกลือซึ่งมีความเข้มข้นของไอออน (ionic strength) มากกว่า 0.15 โดยทั่วไปอยู่ในช่วง 0.3-0.7 และโปรตีนนี้เป็นโปรตีนหลักที่ทำให้เกิดโครงสร้างของเจลซูริมิเมื่อผ่านการให้ความร้อน (Hall and Ahmad, 1997)

2.2.2 โปรตีนซาร์โคพลาสมิก

โปรตีนซาร์โคพลาสมิก (sarcoplasmic protein) เป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างตติยภูมิก่อนกลม (globular protein) โปรตีนชนิดนี้ละลายน้ำ และสารละลายเกลือที่ความเข้มข้นต่ำๆ (0.1 โมลาร์) โปรตีนซาร์โคพลาสมิกพบในกล้ามเนื้อปลาประมาณร้อยละ 20-40 ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Okada, 1999) โปรตีนในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วยมัยโอโกลบิน ฮีโมโกลบิน ไซโตโครม และเอนไซม์ต่างๆ เป็นต้น ที่พบมากที่สุดคือมัยโอโกลบิน ซึ่งอยู่ในส่วนของกล้ามเนื้อแดง โปรตีนชนิดนี้ไม่สามารถเกิดเจล และจะขัดขวางการเกิดเจลของโปรตีนในเนื้อปลา (Hall and Ahmad, 1997)

2.2.3 โปรตีนสโตรมา

โปรตีนสโตรมา (stroma protein) เป็นโปรตีนเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน มีอยู่ประมาณร้อยละ 3-5 ของโปรตีนทั้งหมด (Suzuki, 1981) โปรตีนในกลุ่มนี้ ได้แก่ คอลลาเจน อิลาสติน และเรติคิวลิน เป็นต้น องค์ประกอบส่วนใหญ่คือ คอลลาเจน ซึ่งมีลักษณะเป็นสายโปรตีนยาว ประกอบด้วยพอลิเปปไทด์ 3 สาย พันอยู่รอบซึ่งกันและกันเป็นเกลียวคองตัวด้วยพันธะไฮโดรเจนและมีพันธะไขว้เชื่อมระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน โปรตีนสโตรมาไม่ละลายในน้ำ สารละลายกรด หรือเบส และสารละลายเกลือ เข้มข้น 0.01-0.1 โมลาร์ (Lawrie and Ledward, 2006) โปรตีนเหล่านี้สามารถละลายได้บ้างในสารละลายเข้มข้นของกรดและเบส ในกระบวนการผลิตซูริมิโปรตีนนี้จะยังคงยึดติดอยู่กับโปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์ แต่จะถูกกำจัดออกในขั้นตอนของการทำบริสุทธิ์ (refining process)

2.3 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาในระหว่างการเก็บรักษา

ปลาเป็นอาหารที่เน่าเสียได้ง่ายซึ่งการเน่าเสียเกิดจากการสลายตัวของโปรตีนด้วยเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzymes) กิจกรรมของจุลินทรีย์ และปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันทำให้เกิดกลิ่นเหม็นหืน ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาปลาอย่างรวดเร็วหลังจากจับปลา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของปลาหลังการจับ และหลังจากปลาตาย ขึ้นกับความเข้มข้นของสารประกอบตั้งต้น และผลิตภัณฑ์จากกระบวนการเมแทบอลิซึม เอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวปลา (endogenous enzymes) การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และสภาวะการเก็บรักษา ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการย่อยสลาย (autolysis) ในตัวปลาระหว่างเก็บแช่เย็นแสดงดังตารางที่ 2.1 เมื่อปลาเกิดการเน่าเสียปลาเริ่มสูญเสียกลิ่นรสที่แสดงถึงความสด (fresh fish flavor) เช่น รสหวาน (sweet) รสชาติคล้ายสาหร่าย (seaweed) หลังจากนั้นกลิ่นเหม็นเน่า และรสที่ผิดปกติก็จะเกิดขึ้น ทำให้ปลาไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังแสดงในตารางที่ 2.2

การเน่าเสียของปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ แสดงดังรูปที่ 2.5

ระยะที่ 1 (phase 1): ปลามีความสดมาก เนื้อปลามีรสหวาน อร่อย และมีรสชาติคล้ายโลหะ (metallic) เล็กน้อย ซึ่งระยะนี้จะอยู่ในช่วง 1-2 วันหลังจากปลาตาย

ระยะที่ 2 (phase 2): เนื้อปลาเริ่มสูญเสียความสด และรสหวาน มีกลิ่นรสปกติ ยังไม่มีกลิ่นเหม็นเน่าเกิดขึ้น และเนื้อปลายังอยู่ในเกณฑ์ที่ผู้บริโภคยอมรับได้

ระยะที่ 3 (phase 3): สามารถสังเกตเห็นลักษณะการเน่าเสีย กลิ่นเหม็นเน่า กลิ่นรสที่ผิดปกติ และสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ต่างๆ จะถูกสร้างขึ้น เช่น ไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) เป็นต้น สำหรับปลาที่มีไขมันมากจะเริ่มมีกลิ่นหืนเกิดขึ้น ลักษณะเนื้อสัมผัสของปลาและ และมีน้ำเยิ้ม

ระยะที่ 4 (phase 4): ปลาเกิดการเน่าเสียอย่างรุนแรง และไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.4 คุณภาพความสดของปลา

ดัชนีคุณภาพทางเคมี (chemical indicators) เพื่อใช้แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพในเนื้อปลามีดังนี้

2.4.1 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์

ปริมาณการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของปลาสดได้ (Botta, 1995; Ocaño-Higuera et al., 2009) ภายหลังจากปลาตายจะเกิดการสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ เริ่มต้นจากการเปลี่ยนอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ไปเป็นอะดีโนซีนไดฟอสเฟต (adenosine diphosphate, ADP) และอะดีโนซีนโมโน

ฟอสเฟต (adenosine monophosphate, AMP) โดยการกำจัดกลุ่มฟอสเฟต จากนั้นเกิดการกำจัดหมู่แอมโมเนีย (deamination) เกิดเป็นสารอินโนซีนโมโนฟอสเฟต (inosine monophosphate, IMP)

ตารางที่ 2.1 สรุปการเปลี่ยนแปลงการย่อยสลาย (autolysis) ในตัวปลาระหว่างเก็บแช่เย็น

เอนไซม์	สารตั้งต้น	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น	การป้องกัน/การยับยั้ง
เอนไซม์ที่ย่อยสลายไกลโคเจน	glycogen	การเกิดกรดแลคติก, pH ลดลง, โปรตีนกล้ามเนื้อสูญเสียคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ, ถ้าเกิดการเกร็งตัวของกล้ามเนื้อที่อุณหภูมิสูงทำให้ปลาฮ้ำปากค้ำง	ปลาควรผ่านระยะการเกร็งตัว (rigor mortis) ที่อุณหภูมิใกล้ 0 องศาเซลเซียสหลีกเลี่ยงความเครียดของปลาก่อนระยะการเกร็งตัว
เอนไซม์ย่อยสลายสารประกอบนิวคลีโอไทด์	ATP ADP AMP IMP	สูญเสียกลิ่นรสความสดของปลา, การผลิตรสขมของไฮโปแซนทีน (ในระยะสุดท้าย)	เหมือนด้านบน การจัดการที่ไม่ดีหลังจับปลาจะเร่งการสลายของนิวคลีโอไทด์
คาร์เทปซิน (cathepsin)	proteins, peptides	เนื้อนุ่มและ	การจัดการที่ไม่ดีระหว่างการเก็บรักษา
ไคโมทริปซิน, ทริปซิน, คาร์บอกซิเพปติเดส	proteins, peptides	การย่อยสลายในทางเดินอาหาร (ท้องแตก) ในปลาที่หากินในผิวน้ำ (Pelagic fish)	เกิดเพิ่มขึ้นระหว่างการแช่แข็ง-ทำลายหรือเก็บปลาแช่เย็นเป็นเวลานาน
คาลเพน (calpain)	myofibrillar proteins	เนื้อนุ่มเหนียวจากการลอกคราบในสัตว์มีเปลือก	กำจัดแคลเซียมซึ่งเป็นสารกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์
คอลลาจีเนส (collagenases)	connective tissue	เนื้อปลาแลเป็นร่อง เนื้อนุ่มและ	การสลายของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเกี่ยวข้องกับระยะเวลา และอุณหภูมิในการเก็บรักษาปลา
ทีเอ็มเอ โอ ดีเมทิลเลส (TMAO demethylase)	TMAO	เหนียวนำการเกิดฟอร์มาลดีไฮด์ในปลากลุ่ม gadoid แช่แข็ง	เก็บปลาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ -30 องศาเซลเซียส การปฏิบัติทางกายภาพที่ไม่ดี และการแช่แข็ง-ทำลายจะไปเร่งการสลาย TMAO

หมายเหตุ TMAO= trimethylamine oxide, ATP = adenosine triphosphate, ADP = adenosine diphosphate,

AMP = adenosine monophosphate, IMP = inosine monophosphate

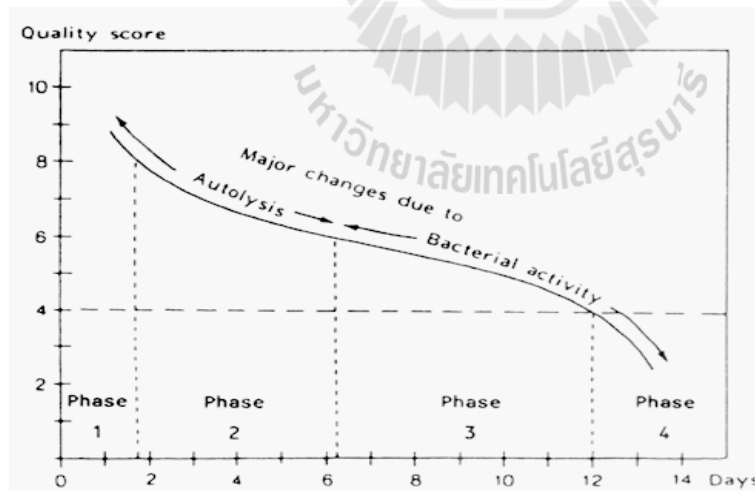
ที่มา: www.fao.org/

ตารางที่ 2.2 สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติที่เกิดขึ้นจากการเจริญ และกิจกรรมของ จุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษาภายใต้ สภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic condition) หรือ เก็บในน้ำแข็ง หรือเก็บที่อุณหภูมิปกติ

จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย	สารประกอบที่ก่อให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติ
<i>Shewanella putrefaciens</i>	TMA, H ₂ S, CH ₃ SH, (CH ₃) ₂ S, Hx
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	TMA, Hx
<i>Pseudomonas spp.</i>	ketones, aldehydes, esters, non-H ₂ S sulfides
<i>Vibrionaceae</i>	TMA, H ₂ S
<i>Anaerobic spoilers</i>	NH ₃ , acetic, butyric and propionic acid

หมายเหตุ TMA= trimethylamine, H₂S=hydrogen sulfide, CH₃SH=methylmercaptan, (CH₃)₂S=dimethylsulphide, Hx = hypoxanthine, NH₃=ammonia

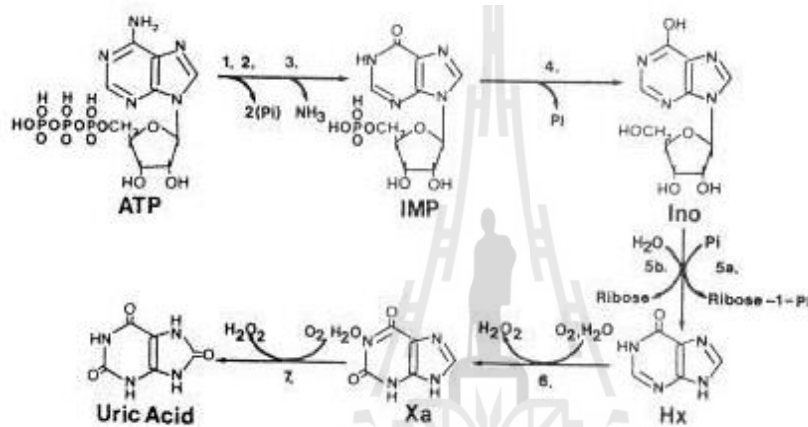
ที่มา: Fraser and Sumar (1998)



รูปที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อปลาและคะแนนที่ได้จากการ ประเมินด้วยคุณภาพทางประสาทสัมผัส

ที่มา: Huss (1976)

ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ ATP เป็น IMP เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ภายใน 3-5 วัน โดยเอนไซม์ในตับเป็นสำคัญ จากนั้นเอนไซม์จากจุลินทรีย์จะเปลี่ยน IMP ให้กลายเป็นอิโนซีน (inosine, Ino) และไฮโปแซนทีน (hypoxanthine, Hx) แซนทีน (xanthine) และ กรดยูริก (uric acid) แต่ในขั้นตอนการเปลี่ยนจาก IMP ไปเป็นไฮโปแซนทีนมักจะเกิดได้ช้า IMP จัดเป็นสารที่ส่งเสริมสร้อย แต่ในขณะที่ Ino และ Hx มีบทบาทสำคัญทำให้เกิดโรค การเสื่อมสลายของ IMP บ่งชี้คุณภาพความสดที่ลดลง การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์สามารถแสดงได้ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การสลายตัวของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ในกล้ามเนื้อปลา

หมายเหตุ ATP = adenosine triphosphate, IMP = inosine monophosphate, Ino = inosine,

Hx = hypoxanthine, Xa = xanthine

ที่มา: Gill (1992)

เนื่องจากไฮโปแซนทีนเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการย่อยสลายตัวเอง และจุลินทรีย์ จึงสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดได้ดี การแปรรูปด้วยความร้อนหรือความเย็นจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไฮโปแซนทีน ดังนั้น จึงสามารถใช้ไฮโปแซนทีนเป็นดัชนีบ่งชี้ความสดของวัตถุดิบก่อนการแปรรูปได้ (สุทรววัฒน์, 2548) Jahns and Rand (1997) รายงานว่าปริมาณไฮโปแซนทีนในปลา whiting ที่เก็บแช่เย็นอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ โดยปริมาณไฮโปแซนทีนเพิ่มขึ้นสูงสุด และลดลงในระยะเวลาต่อมา ในการประเมินความสดของปลานั้นได้กำหนดให้ค่าไฮโปแซนทีนไม่เกิน 1.5-2 ไมโคร-โมลต่อกรัม (Parry, 1993) อย่างไรก็ตามปริมาณไฮโปแซนทีนแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์น้ำ

กระบวนการจับ และอุณหภูมิที่ใช้เก็บรักษา (Botta, 1995) ดังนั้นค่ามาตรฐานของไฮโปแซนทีนซึ่งบ่งชี้ความสดจึงแตกต่างกันตามแต่ละชนิดของปลา การใช้ไฮโปแซนทีนเป็นดัชนีบ่งชี้ความสดมีข้อดีหลายประการ เช่น อัตราการเกิดไฮโปแซนทีนขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ และปริมาณจะแตกต่างกันไปตามชนิดของกล้ามเนื้อ โดยในกล้ามเนื้อดำมักพบไฮโปแซนทีนในปริมาณที่สูงกว่าในกล้ามเนื้อขาว (สุทรวัดน์, 2548)

ค่าเค (K-value) เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลา และสัตว์น้ำโดยเป็นการวัดสัดส่วนการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบนิวคลีโอไทด์ ดังสมการที่ 1 แต่เนื่องจาก ATP สามารถสลายตัวอย่างรวดเร็วไปเป็น IMP ในช่วง 1 วันแรก ดังนั้น จึงมีการใช้ค่าเคไอ (K_i value) ซึ่งไม่จำเป็นต้องตรวจสอบปริมาณ ATP ADP และ AMP ดังสมการที่ 2 เมื่อเปรียบเทียบการใช้ปริมาณไฮโปแซนทีนเพียงอย่างเดียว การใช้ค่าเคไอจะลดความแปรปรวนต่างๆ อันเกิดจากความแตกต่างของชนิดของสัตว์น้ำ และปัจจัยอื่นๆ

$$\%K - \text{value} = \frac{(Ino + Hx)}{(ATP + ADP + AMP + IMP + Ino + Hx)} \times 100 \quad \text{--- (1)}$$

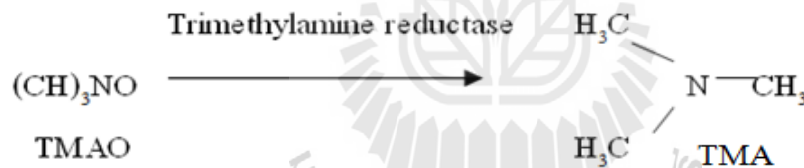
$$\%K_i - \text{value} = \frac{(Ino + Hx)}{(IMP + Ino + Hx)} \times 100 \quad \text{--- (2)}$$

Surette, Gill, and LeBlanc (1988) รายงานว่าทั้งการย่อยสลายตัวเองของกล้ามเนื้อปลา และจากเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียมีส่วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารประกอบนิวคลีโอไทด์ Burt (1977) รายงานว่าปลาสดที่จับมาใหม่ๆ จะมีค่าเคไม่เกิน 10% และในช่วงระยะแรกๆ จะมีการเพิ่มปริมาณอย่างช้าๆ จากนั้นจึงจะเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเจริญของจุลินทรีย์ และมีการตั้งค่าของการปฏิเสธผลิตภัณฑ์ปลา (rejection limit) คือ 60% ทั้งนี้ปลาแต่ละชนิดจะมีระดับการเปลี่ยนแปลงค่าเคแตกต่างกัน ค่าเคของปลาที่ใช้สำหรับทำผลิตภัณฑ์ปลาดิบ (ซาซิมิ) มีค่าไม่เกิน 20% และนอกจากนี้ค่าเคยังขึ้นกับอุณหภูมิในการเก็บรักษาด้วย ปลายังคงความสดเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส นาน 2 สัปดาห์ และค่าเคเพิ่มขึ้นถึง 58% เมื่อเก็บรักษาปลาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 5 วัน (Uchiyama and Kato, 1974) ในขณะที่ค่าเคของปลาทูน่าครีบลีโง (Yellowfin tuna, *Thunnus albacares*) ที่ยังสด มีค่าเท่ากับ $17 \pm 4\%$ และค่าเคเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 2.4% ต่อวัน จนถึง 58.7% หลังเก็บปลาเป็นระยะเวลา 17 วัน โดยปลาทูน่าครีบลีโงที่เก็บรักษานาน 2 วันยังคงความสดสำหรับทำซาซิมิ (K value = 20%) และมีอายุการเก็บได้นาน 12 วัน (K value = 50%) ส่วนปลาที่เก็บที่

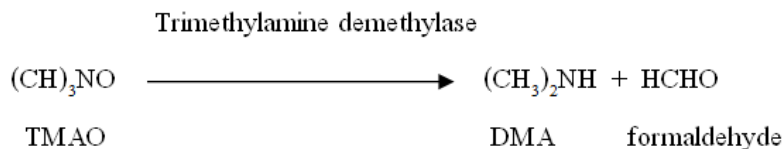
อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ค่าเคเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 6.08% ต่อวัน และปลายังเป็นที่ยอมรับเมื่อเก็บรักษาที่ อุณหภูมิดังกล่าวนาน 5 วัน (K value = 56%) และไม่เป็นที่ยอมรับเมื่อเก็บปลาเป็นเวลา 8 วัน ซึ่งมีค่าเค เท่ากับ 68% ค่าเคของปลาทูน่าครีบลีโงที่เก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วด้วย อัตรา 32.4% ต่อวัน และสูงถึง 90% หลังจาก 24 ชั่วโมง ดังนั้นจากผลของค่าเค ปลาทูน่าครีบลีโงที่เก็บ รักษาที่อุณหภูมิ 0, 8 และ 20 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บ 12, 5 และ 1 วัน ตามลำดับ (Guizani et al., 2005)

2.4.2 การสลายตัวของไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide, TMAO)

ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide, TMAO) เป็นสารอนินทรีย์มวล โมเลกุลต่ำที่พบในปลาทะเลและสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง และเป็นสารป้องกันการเสื่อมสภาพของ โปรตีนเนื่องจากความดันออสโมติก (Osmoregulator) รวมถึงป้องกันการสูญเสียน้ำออกจากตัวปลา (water logout) (Barrett and Kwan, 1985) หลังจากปลาตาย TMAO สามารถเปลี่ยนเป็น ไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ด้วยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนรีดักเตส (trimethylamine reductase) จากปฏิกิริยา รีดักชันของแบคทีเรีย เช่น *Shewanella putrifaciens* (Ocaño-Higuera et al., 2009) ดังแสดงในสมการ



โดย TMA ที่เกิดขึ้นก่อให้เกิดกลิ่นคาวปลา และกลิ่นเหม็นเน่าของปลาและสัตว์น้ำ และมีความสัมพันธ์โดยตรงกับจำนวนแบคทีเรีย คุณภาพทางประสาทสัมผัส และความสดของปลา นอกจากนี้เอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนดีเมทิลเลส (trimethylamine demethylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ในตัวปลา (endogenous enzyme) เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน TMAO ไปเป็นไดเมทิลเอมีน (DMA) และฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) ซึ่งมักเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บแช่แข็ง ดังแสดงในสมการ ซึ่งเอนไซม์นี้จะพบมากใน ปลา whiting ปลา hoki และ ปลา pollock เป็นต้น ฟอร์มัลดีไฮด์ที่เกิดขึ้นจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ ธรรมชาติ ปลาเนื้อสัมผัสแข็งกระด้าง และมีสมบัติในการเกิดเจลลดลง (Lanier, 2000)



TMA ที่ผลิตขึ้นสามารถใช้เป็นดัชนีคุณภาพทางเคมีเพื่อวัดการเสื่อมเสียของปลา ซึ่งกำหนดว่า ปลาที่มีความสดและยังมีคุณภาพดีจะมีค่า TMA น้อยกว่า 1.5 มิลลิกรัม/100 กรัม แต่ถ้ามีปริมาณสูงถึง 10-15 มิลลิกรัม/100 กรัม จะไม่เป็นที่ยอมรับแล้ว เนื่องจากมีกลิ่นเหม็นเน่าและควาปลาอย่างรุนแรง (Debever and Boskou, 1996, Sleat and Robinson, 1984) Ocaño-Higuera et al. (2009) รายงานว่าเมื่อเก็บปลา Cazon ซึ่งเป็นปลาที่อยู่ในตระกูลเดียวกับปลาฉลาม เมื่อเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 วัน ปริมาณ TMA เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บจาก 0.62 ถึง 2.84 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนปลาซาร์ดีน (Monterey sardine) มีปริมาณ TMA เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บเช่นเดียวกัน โดยจากวันแรกมีค่า 0.82 มิลลิกรัม/100 กรัม และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน ปริมาณ TMA เพิ่มขึ้นเป็น 1.62 มิลลิกรัม/100 กรัม (Pacheco-Aguilar et al., 2000) นอกจากนี้ปลา hake สด มีปริมาณ TMA เท่ากับ 0.29 มิลลิกรัม/100 กรัม และเมื่อเก็บในน้ำแข็ง 12 วันแรก ค่า TMA เพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้า และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากวันดังกล่าว โดยมีปริมาณ TMA เท่ากับ 19.96 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งนาน 25 วัน (Ruiz-Capillas and Moral, 2001) สหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดปริมาณ TMA ให้มีได้สูงสุดไม่เกิน 12 มิลลิกรัม/100 กรัม (Directive 91/493/EEC)

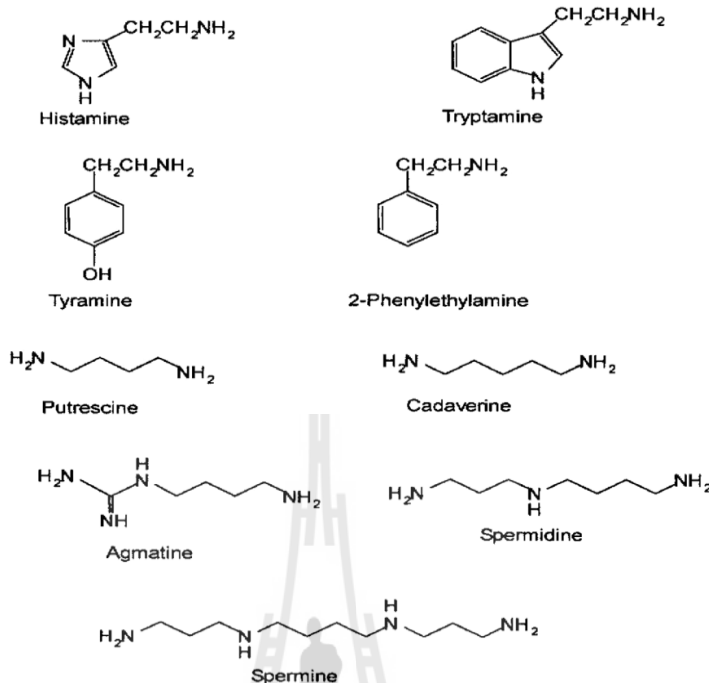
2.4.3 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total Volatile Basic Nitrogen, TVB-N)

สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (TVB-N) เป็นดัชนีคุณภาพทางเคมีที่บ่งชี้ถึงการเน่าเสียของปลา โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณแอมโมเนีย เอมีน ไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ไดเมทิลเอมีน (dimethylamine, DMA) และสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ที่ระเหยได้ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของโปรตีน และสารประกอบไนโตรเจน (Botta, 1995) โดยปริมาณ TVB-N ที่เกิดขึ้นมีความสัมพันธ์กับคุณภาพทางประสาทสัมผัส คุณลักษณะปรากฏของเนื้อปลา การเจริญและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ รวมถึงปริมาณ TMA ด้วย สหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดคุณภาพปลาสดต้องมีปริมาณ TVB-N ไม่เกิน 35 มิลลิกรัม/100 กรัม (EC, 1995) Ruiz-Capillas and Moral (2001) รายงานว่าปริมาณ TVB-N ของปลา hake สด มีค่าเท่ากับ 10.92 มิลลิกรัม/100 กรัม ค่า TVB-N เพิ่มขึ้นในอัตราที่ช้าจนถึงวันที่ 12 และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากนั้น ซึ่งมีแนวโน้มเช่นเดียวกับค่า TMA และปลา hake ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เมื่อเก็บในน้ำแข็งนาน 25 วัน ซึ่งมีปริมาณ TVB-N

เท่ากับ 44.45 มิลลิกรัม/100 กรัม ค่า TVB-N ของปลา hake มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า TMA ซึ่งบ่งชี้ว่าสามารถใช้ค่า TVB-N หรือ TMA ในการประเมินคุณภาพความสดของปลาดังกล่าว Ocaño-Higuera et al. (2009) วิเคราะห์ปริมาณ TVB-N เพื่อใช้เป็นดัชนีบ่งชี้การเน่าเสียของปลา Cazon ที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 ถึง 18 วัน พบว่า ปลา Cazon มีค่า TVB-N อยู่ระหว่าง 40-45 มิลลิกรัม/100 กรัม ส่วนปลา ray ที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 0-18 วันมีค่า TVB-N อยู่ระหว่าง 20-30 มิลลิกรัม/100 กรัม (Ocaño-Higuera et al., 2011) อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างค่า TVB-N และการเน่าเสียของปลาขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ปลาที่มีค่า TVB-N เกิน 30 มิลลิกรัม/100 กรัม อาจจะไม่เกิดการเน่าเสีย เมื่อประเมินด้วยคุณภาพทางประสาทสัมผัส (Ocaño-Higuera et al. (2009) Hozbor, Saiz, Yeannes, and Fritz (2006) รายงานว่าปลาแซลมอน (salmon, *Pseudoperca semifasciata*) สด มีค่า TVB-N เท่ากับ 35 มิลลิกรัม/100 กรัม และเพิ่มขึ้นเท่ากับ 70 มิลลิกรัม/100 กรัม เมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 20 วัน ส่วนปลา cod (*Gadus morhua*) เริ่มมีกลิ่นเน่า เมื่อค่า TVB-N เท่ากับ 64 มิลลิกรัม/100 กรัม (McCarthy, Ellis, Silvia, and Mills 1989) Varga, Keith, Michalik, Sims, and Reiger (1980) รายงานว่า ปลา cod ที่มีค่า TVB-N เท่ากับ 20, 60 และ ≥ 80 มิลลิกรัม/100 กรัม จัดเป็นพลาสติก เกือบเน่าเสีย และเน่าเสีย ตามลำดับ

2.4.4 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine)

ไบโอจีนิกเอมีน (biogenic amines) คือสารประกอบเอมีนที่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโน โดยเอนไซม์อะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (amino decarboxylase) หรือปฏิกิริยาเอมีเนชัน (amination) และปฏิกิริยาทรานส์เอมีเนชัน (transamination) ของอัลดีไฮด์ หรือคีโตน ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ แต่การสะสมของไบโอ-จีนิกเอมีนในอาหารมีสาเหตุจากกิจกรรมของแบคทีเรียเป็นสำคัญ (Maijala et al., 1995) ไบโอจีนิกเอมีนพบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะอาหารหมัก เช่น เนยแข็ง กิมจิ ไวน์ มิโซ เนื้อหมัก และอาหารทะเล ไบโอจีนิกเอมีนสำคัญที่มักพบในอาหารได้แก่ ฮิสตามีน (histamine) ไทรามีน (tyramine) 2-ฟีนิลเอธิลเอมีน (2-phenylethylamine) คาดาเวอรีน (cadaverine) ทริปตามีน (tryptamine) สเปออร์มีน (spermine) และสเปออร์มิดีน (spermidine) ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของไบโอจีนิกเอมีนแสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 ตัวอย่างโครงสร้างของไบโอจีนิกเอมีน

ที่มา : onal (2007)

ฮิสตามีน ไทรามิน และ ทริปตามีน จัดเป็นสารประกอบที่มีเอมีนกลุ่มเดียว (โมโนเอมีน) ส่วนพิวทริสซีน และคาดาเวอรินจัดเป็นสารประกอบเอมีน 2 กลุ่ม (ไดเอมีน) ถูกสร้างมาจากกรดอะมิโนฮิสติดีน ไทโรซีน ทริปโตเฟน ออร์นิทีน และไลซีน ตามลำดับ ส่วนสเปอร์มินและสเปอร์มิดีนถูกสร้างจากพิวทริสซีน (Onal, 2007) ไบโอจีนิกเอมีนเป็นสารที่อันตรายต่อสุขภาพเมื่อบริโภคอาหารที่มีระดับของฮิสตามีนสูง จะมีผลทำให้เกิดอาการแพ้ที่เรียกว่า สคอมโบทอกซิโคซิส (Scombrototoxicosis) โดยฮิสตามีนจะไปเพิ่มไบโอจีนิกเอมีนตัวอื่นๆ ได้แก่ คาดาเวอริน และพิวทริสซีน อาการแพ้ฮิสตามีนจะแตกต่างกันไปขึ้นกับบุคคล โดยทั่วไปมักจะมีอาการคลื่นไส้ หายใจขัด ปวดหัว มีผื่นแดง ความดันเลือดต่ำ เป็นต้น

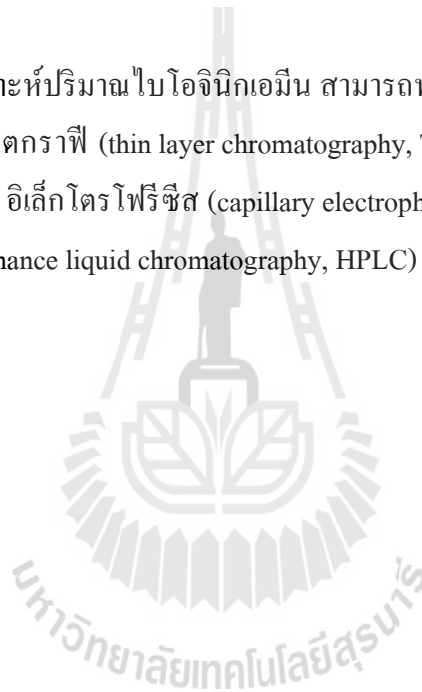
ไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อปลาโดยเฉพาะปลาในวงศ์ Scombridae และ Carpeidae เช่น ปลาทูน่า ปลาอินทรี และปลาทู เป็นปลาที่มีรายงานถึงการสะสมของฮิสตามีนเมื่อเกิดการเน่าเสีย ปลาเหล่านี้มีปริมาณกรดอะมิโนฮิสติดีนสูง เมื่อเกิดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ฮิสติดีนดีคาร์บอกซิเลส กรดอะมิโนฮิสติดีนจะถูกเปลี่ยนเป็นฮิสตามีน สารฮิสตามีนนี้มีเสถียรภาพต่อความร้อนสูง จึงพบได้ในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการนึ่งมาเชื้อ เช่น ใน

ผลิตภัณฑ์ปลากระป๋อง ดังนั้นหากผลิตภัณฑ์ปลากระป๋องมีปริมาณฮีสตามีนในระดับสูง อาจสันนิษฐานได้ว่าวัตถุดิบปลาที่ใช้ในการผลิตมีคุณภาพความสดต่ำ ซึ่งไบโอจีนิกเอมีนเป็นตัวบ่งชี้ถึงการเสื่อมเสียของปลาชนิดต่างๆ ไบโอจีนิกเอมีนที่พบมากในปลา goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) ได้แก่ ฮีสตามีน แอ็กมาทีน (agmatine) โดปามีน (dopamine) และ พิวทริสซีน ในปริมาณ 4.37, 3.88, 3.38 และ 2.00 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ หลังการเก็บแช่เย็น 8 วัน (Özyurt et al., 2009) ส่วนปลา red mullet (*Mullus barbatus*) พบแอ็กมาทีน ซีโรโทนิน (serotonin) ฮีสตามีน และ โดปามีน ในระดับ 7.30, 5.97, 2.52 และ 2.31 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ หลังการเก็บแช่เย็น 11 วัน (Özyurt et al., 2009) นอกจากนี้พิวทริสซีน และ คาตาเวอรินเป็นไบโอจีนิกเอมีนหลักที่พบในปลากระพง (sea bass, *Dicentrarchus labrax*) และ ปลา white grouper (*Epinephelus aeneus*) แต่ในปริมาณที่ไม่สูง คือ 2.39 และ 0.65 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ หลังการเก็บแช่เย็น 11 วัน (Paleologos et al., 2004; Özogul et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบ 2-ฟีนิลเอซิลเอมีน โดปามีน แอ็กมาทีน ทริปตามีน (tryptamine) และ ซีโรโทนิน ซึ่งเป็นดัชนีความเน่าเสียของปลา white grouper หลังการเก็บแช่เย็น 22 วัน (Özogul et al., 2008) Bakar et al. (2010) พบฮีสตามีนในปลา barramundi (*Lates calcarifer*) ในระดับ 27.5 มิลลิกรัม/100 กรัม หลังการเก็บแช่เย็น 15 วัน Malle et al. (1996) รายงานว่าปริมาณพิวทริสซีน และ คาตาเวอรินที่พบในปลา herring (*Clupea harengus*) คือ 1.01 และ 2.30 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ Rossi et al. (2002) พบว่าอัตราการเพิ่มขึ้นของคาตาเวอรินในระหว่างการเก็บรักษาปลาทูน่าที่อุณหภูมิห้องมีค่าสูงกว่าฮีสตามีน ในขณะที่พิวทริสซีนมีการเพิ่มในอัตราที่ช้ากว่า ดังนั้นปริมาณคาตาเวอรินจึงอาจใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาทูน่าร่วมกับฮีสตามีนได้ สำหรับในปลากระดักพบว่าตัวอย่างที่เน่าเสียหลังจากเก็บที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง มีการสะสมของฮีสตามีน คาตาเวอริน พิวทริสซีน และ ไทรามีน (Yongsawatdigul et al., 2004) ดังนั้นไบโอจีนิกเอมีนเหล่านี้สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลากระดักได้ Baixas-Nogueras et al. (2005) เสนอแนะให้ใช้ไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดหรือการเสื่อมเสียของปลาในเขตหนาว และเขตอบอุ่นเช่น ปลา mediterranean hake

แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ฮีสติดีน ดีคาร์บอกซิเลส เป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของฮีสตามีนในปลาทูน่าได้แก่ *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas putrefaciens*, *Aeromonas hydrophila*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio alginolyticus* (Middlebrooks et al., 1988), *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, และ *Hafnia alvei* (Ward, 1994) Ben-Gogirey et al. (2000) แยกเชื้อ *Stenotrophomonas maltophilia* จากปลาทูน่า albacore ซึ่งเชื่อกันว่าสามารถผลิตคาตาเวอรินได้สูงถึง 1736-4821 ppm ภายใน 48 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Kim et al. (2002) พบการสะสมของฮีสตา

มีนสูงสุดในปลา mackerel, albacore tuna และ mahi-mahi เมื่อเก็บที่ 25 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าแนวทางในการควบคุมปริมาณฮีสตามีนคือการเก็บปลาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หรือแช่แข็ง อย่างไรก็ตามเมื่อนำปลาแช่แข็งมาทำละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ปริมาณฮีสตามีนจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างการทำละลาย แบคทีเรียที่พบในปลา albacore tuna ที่สดและไม่สดคือ *Hafnia alvei* ซึ่งสามารถสร้างฮีสตามีนในระดับ 26.4-497 ppm แต่แบคทีเรียที่มีความสามารถสร้างฮีสตามีนได้สูงสุดคือ *Morganella morganii* ซึ่งสามารถผลิตฮีสตามีนได้สูงถึง 3582-3672 ppm (Kim et al., 2001) สหภาพยุโรป (EU) ได้กำหนดปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมดให้มีได้สูงสุดไม่เกิน 30 มิลลิกรัม/100 กรัม (EC, 1991)

การวิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีน สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทินเลเยอร์โครมาโตกราฟี (thin layer chromatography, TLC) แก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography, GC) แคปิลลารี อิเล็กโตรโฟรีซิส (capillary electrophoresis, CE) และลิควิดโครมาโตกราฟีสมรรถนะสูง (high-performance liquid chromatography, HPLC) ซึ่งเทคนิค HPLC เป็นวิธีที่ได้รับความนิยมมากที่สุด (önal, 2007)



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและสารเคมี

สารเคมีจากบริษัท Fluka (Buchs, Switzerland) ได้แก่ Adenosine-5'-triphosphate (ATP) สารเคมีจากบริษัท Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.) ได้แก่ Bovine serum albumin (BSA) และสารมาตรฐานไบโอเจนิคเอมีน (histamine dihydrochloride, cadaverine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, putrescine dihydrochloride, spermidine trihydrochloride, และ spermine diphosphate) และสารเคมีอื่นๆ ที่ใช้ในการวิจัยเป็นคุณภาพที่ใช้ในงานวิเคราะห์ห้องปฏิบัติการ (analytical grade)

เก็บตัวอย่างปลาปากคม (lizardfish, *Saurida* spp.; LZ) ปลาทรายแดง (threadfin bream, *Nemipterus* spp.; TB) และ ปลาหนวดถาญี (goatfish, *Upeneus* spp.; GF) ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 30-61 กรัม จากบริษัทอันดามันซูริมิ อินดัสทรีส์ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งเป็นปลาที่มีอายุเฉลี่ย 7 วันหลังการจับ เก็บปลาในกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง จากนั้นขนส่งมายังห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมาทันที เก็บรักษาปลาทั้งตัวในห้องแช่เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำแข็งให้อยู่ในอัตราส่วน 1:1 ทุกวัน สุ่มตัวอย่างมาวิเคราะห์ในวันที่ 0, 5, 10 และ 20 วัน หรือเทียบเท่ากับเก็บปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 7, 12, 17 และ 27 วัน หลังการจับ ตามลำดับ อุณหภูมิเฉลี่ยของตัวอย่างปลาในระหว่างการเก็บรักษาเท่ากับ 0 ± 0.5 องศาเซลเซียส

3.2 การเตรียมตัวอย่างเนื้อปลาล้างน้ำ

นำปลามาขอดเกล็ด ตัดหัว ควักไส้ ทำความสะอาด และแล่เนื้อ นำเข้าเครื่องกำจัดกระดูก (deboning machine) จากนั้นนำเนื้อปลาไปบดด้วยเครื่องบดเนื้อ (PM 500, Kenwood, Hampshire, UK) นำเนื้อปลาล้างน้ำ 3 ครั้ง โดยใช้น้ำคุณภาพน้ำดื่มที่ผ่านกระบวนการ reverse osmosis (RO) อัตราส่วนระหว่างเนื้อปลาต่อน้ำ คือ 1: 3 และควบคุมอุณหภูมิของน้ำที่ 4 องศาเซลเซียส การล้างครั้งที่ 3 ใช้น้ำเกลือเข้มข้น 0.3% ในการล้างแต่ละครั้งจะมีการกวนผสม เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแยกเนื้อ และน้ำล้างโดยการกรองผ่านตาข่ายขนาดละเอียดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 มิลลิเมตร และผ้าขาวบาง กำจัดน้ำในแต่ ละรอบของการล้างโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 4,500×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany) เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาณความชื้น โปรตีน ไขมัน และเถ้า ของเนื้อปลา และเนื้อปลาล้างน้ำ ตามวิธี AOAC (2005) จากนั้นนำเนื้อปลาล้างน้ำมาผสมกับสารป้องกันการสูญเสียสภาพเนื่องจากการแช่

แข็ง (cryoprotectants) ที่ประกอบด้วย น้ำตาลทราย 6% และโซเดียมไตรพอลิฟอสเฟต 0.3% โดยสับผสมด้วยเครื่อง Stephan vacuum cutter แบ่งบรรจุใส่ถุงพลาสติก ปิดผนึกสุญญากาศ และเก็บแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์สมบัติทางเคมีของเนื้อปลา และเนื้อปลาบดล้างน้ำภายใน 7 วัน หลังการแช่แข็ง

3.3 การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี

3.3.1 กิจกรรมแคลเซียมเอทีพีเอส (Ca^{2+} -ATPase activity)

สกัดแอคโตมัยโอซินตามวิธีของ Yongsawatdigul and Park (2003) โดยนำตัวอย่างเนื้อปลา หรือเนื้อปลาบดล้างน้ำ 2 กรัม บดผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-maleate เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ และโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 7.0 (แช่เย็น) ในอัตราส่วน 1:9 บดหิว้งที่ 8000×g ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) เก็บสารละลายส่วนใสเพื่อวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Bradford, 1976) โดยใช้ BSA (bovine serum albumin) เป็นสารมาตรฐาน แสดงค่าปริมาณโปรตีนที่ละลายในเกลือในหน่วยมิลลิกรัม/กรัม โปรตีน วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นสารมาตรฐานตามวิธีของ Fiske and Subbarow (1925) วิเคราะห์กิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ตามวิธีของ Hemung et al. (2008) โดยใช้สารละลายแอคโตมัยโอซินปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย Tris-maleate เข้มข้น 0.6 โมลาร์ pH 7 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 3.75 มิลลิลิตร บ่มที่ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย ATP (Adenosine 5'-triphosphate) เข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 8 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid; TCA) เข้มข้น 15% (แช่เย็น) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นหิว้งที่ 3000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สำหรับตัวอย่าง blank เตรียมเช่นเดียวกับข้างต้นเพียงแต่เติมสารละลาย TCA ก่อนสารละลาย ATP วิเคราะห์ปริมาณฟอสเฟตในสารละลายส่วนใส (supernatant) ด้วยสารละลายอีลอน (Elon reagent) และ Ammonium molybdate tetrahydrate วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 640 นาโนเมตร แสดงค่ากิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ในหน่วยของไมโครโมล/มิลลิกรัมโปรตีน/นาที

3.3.2 ไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine, Hx)

สกัดตัวอย่างโดยดัดแปลงตามวิธีของ Burns and Kee (1985) ปั่นผสมตัวอย่างจำนวน 5 กรัม กับสารละลายกรดเปอร์คลอริก (perchloric) แชน์เข้มข้น 7.5% ปริมาตร 40 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที กรองสารละลายส่วนใส (supernatant) ด้วยกระดาษ Whatman No.1 และปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกรดเปอร์คลอริกแชน์เข้มข้น 7.5% จากนั้นเติมสารละลาย neutralizing buffer เข้มข้น 0.6 โมลาร์ (KH₂PO₄ 5.91 กรัม และ K₂HPO₄ 18.56 กรัม ละลายด้วยน้ำปราศจากอ็อกซิเจน 220 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.6 ด้วยสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 50% ปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 (v/v) เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กรองสารผสมผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1260 Infinity series, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) ฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าไปในคอลัมน์ Hypersil BDS C₁₈ (100×4 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร, Agilent Technologies, California, USA) ชะสารประกอบด้วยสารละลาย KH₂PO₄ เข้มข้น 0.02 โมลาร์ และ K₂HPO₄ เข้มข้น 0.03 โมลาร์ ด้วยอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที ใช้การชะแบบคงที่ (isocratic) เป็นเวลา 10 นาที ตรวจวัดไฮโปแซนทีนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร แสดงค่าปริมาณไฮโปแซนทีนในหน่วยไมโครโมลต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

3.3.3 ไตรเมทิลเอมีน (Trimethylamine, TMA)

วิเคราะห์ปริมาณ ไตรเมทิลเอมีน โดยดัดแปลงตามวิธีของ Dyer Picrate method (AOAC, 2005) ปั่นผสมตัวอย่างด้วยสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติกแชน์เข้มข้น (trichloroacetic acid; TCA) เข้มข้น 7.5% ในอัตราส่วน 1:4 (w/w) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 8,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สกัดไตรเมทิลเอมีนในสารละลายส่วนใสด้วยสารละลายโทลูอีน และกรดพิคริก (picric acid) เข้มข้น 1% อย่างละ 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นที่ 410 นาโนเมตร โดยใช้สารไตรเมทิลเอมีนเป็นสารมาตรฐาน แสดงค่าปริมาณ ไตรเมทิลเอมีนในหน่วยมิลลิกรัมต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

3.3.4 สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (Total volatile base nitrogen, TVB-N)

วิเคราะห์ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดโดยดัดแปลงตามวิธีของ Botta et al. (1984) ชั่งตัวอย่างจำนวน 10 กรัม และแมกนีเซียมออกไซด์ (MgO) จำนวน 2 กรัม ในหลอดกลั่น เติมน้ำปราศจากอ็อกซิเจนปริมาตร 40 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น

20% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปกลั่นด้วยเครื่องกลั่นไอน้ำ (Kjeltech System, Hoganas, Sweden) คัดจับสารที่กลั่นออกด้วยสารละลายกรดบอริกเข้มข้น 4% ปริมาตร 25 มิลลิลิตร กลั่นต่อจนกระทั่งได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 50 มิลลิลิตร จากนั้นหยดอินดิเคเตอร์ methyl red-bromocresol green 2-3 หยดในตัวอย่างที่กลั่นได้ นำตัวอย่างไปไทเทรตด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 0.1 นอร์มอล และแสดงปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมไนโตรเจนต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

3.3.5 ไบโอจีนิกเอมีน (Biogenic amine)

สกัดตัวอย่างโดยตัดแปลงตามวิธีของ Eerola et al. (1993) ปั่นผสมตัวอย่างกับสารละลายกรดเปอร์คลอริก (perchloric) แห้งเย็นเข้มข้น 0.4 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:4 (w/w) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000×g (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสของตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน 1 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐานภายใน (internal standard) ไดอะมิโนเฮปแทน (diaminoheptane) เข้มข้น 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร มาเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 นอร์มอล ปริมาตร 200 ไมโครลิตร สารละลายอิมัลชันโซเดียมโบคาร์บอเนตปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ แคนซิลคลอไรด์ (dansyl chloride) เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มสารผสมที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา Dansylation อย่างสมบูรณ์ จากนั้นเติมแอมโมเนียเข้มข้น 30% ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เพื่อกำจัดแคนซิลคลอไรด์ที่คงเหลือจากปฏิกิริยา ปรับปริมาตรสารละลายผสมให้ครบ 5 มิลลิลิตร ด้วยอะซิโตนไไตรล์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2500×g เป็นเวลา 5 นาที (Legend™ MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Lengensellbold, Germany) กรองสารละลายส่วนใสด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

วิเคราะห์ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนด้วยเครื่อง HPLC (Agilent 1260 Infinity series, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าไปในคอลัมน์ Hypersil BDS C18 (100×4 มิลลิเมตร, 3 ไมโครเมตร, 100 Å) ซะสารประกอบด้วยส่วนผสมของ Mobile phase A และ B โดย Mobile phase A คือ สารผสมของอะซิโตนไไตรล์ และกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์ ในอัตราส่วน 1:9 ส่วน Mobile phase B คือสารผสมของกรดอะซิติกเข้มข้น 0.02 โมลาร์:อะซิโตนไไตรล์:เมทานอล ในอัตราส่วน 1:4.5:4.5 ใช้การชะแบบ Gradient ด้วยอัตราส่วนของ Mobile phase A และ B ดังรายละเอียดด้านล่าง ด้วยอัตราการไหลที่ 1 มิลลิลิตร/นาที โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ที่ 28 องศาเซลเซียส ตรวจวัดค่าไบโอจีนิกเอมีนที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร (Yongsawatdigul et al., 2004)

เวลา (นาที)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	50	50
5	50	50
10	40	60
15	30	70
20	20	80
25	10	90

3.4 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการทดลองสองซ้ำแยกกัน โดยแต่ละการทดลองทำการวัดอย่างน้อย 2-3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) เพื่อหาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาต่อการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่าง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan Multiple Range Test (DMRT) วิเคราะห์ผลการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่ระยะเวลาการเก็บรักษาต่างๆ ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (principal Component Analysis, PCA) โดยใช้ซอฟต์แวร์ XLSTAT (Addinsoft, New York, NY, USA) และโปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติ SPSS for Windows (Version 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL., U.S.A.) ที่ระดับนัยสำคัญ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี

ปริมาณโปรตีนของปลาทั้งสามชนิดลดลงระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน โดยปริมาณโปรตีนของปลาหนวดดาบ (GF) ลดลงมากที่สุด ประมาณ 25% โดยน้ำหนักแห้ง (dry basis, db) ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1) ปริมาณไขมันลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาแต่ไม่เด่นชัดเท่ากับการลดลงของปริมาณโปรตีน ทั้งนี้อาจเนื่องจากในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง เอนไซม์ที่อยู่ในตัวปลา (endogenous proteinases) อาจย่อยสลายมายโอไฟบริลลาร์โปรตีน (myofibrillar protein) ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนลดลง นอกจากนี้โปรตีนที่ละลายน้ำได้อาจซึมออกมาในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนลดลงอีกด้วย ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Reza et al. (2009) ซึ่งรายงานว่าปริมาณโปรตีนของปลา silver jewfish ปลา Bombay duck และ ปลาตาบ ลดลงหลังการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 13 วัน

ปริมาณเถ้าของเนื้อปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดดาบ (GF) ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง (ตารางที่ 4.1) การที่ปริมาณเถ้าลดลงอาจเนื่องมาจากการสูญเสียเกลือแร่จากเนื้อเยื่อปลา ปริมาณไขมันของเนื้อปลาปากคม และปลาหนวดดาบลดลงในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ($p \leq 0.05$) ในขณะที่ปริมาณไขมันของเนื้อปลาทูรายแดง (TB) ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน ($p > 0.05$) ส่วนปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาหนวดดาบ และปลาปากคม ซึ่งปริมาณน้ำที่เพิ่มขึ้นในเนื้อปลาเกิดจากเนื้อปลาคูดูดซึมน้ำที่ละลายจากน้ำแข็งกลับเข้าไปในกล้ามเนื้อ ทำให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น และส่งผลให้สัดส่วนปริมาณโปรตีน และไขมันลดลง Reza et al. (2009) รายงานว่าปริมาณความชื้นของปลา silver jewfish (*Johnius argentatus*), ปลา Bombay duck (*Harpodon nehereus*), ปลาทูน่าตาโต (big-eye tuna, *Scomberomorus gottatus*), ปลาจระเม็ด (Chinese pomfret, *Stromateus chinensis*) และ ปลาตาบ (ribbon, *Trichiurus haumela*) เพิ่มขึ้นหลังการเก็บในน้ำแข็ง เป็นเวลา 13 วัน การที่ปริมาณไขมันของปลาปากคม และปลาหนวดดาบลดลง บ่งชี้ได้ว่าไขมันในปลาทั้ง 2 ชนิดนี้เกิดออกซิเดชันสูงกว่าไขมันในปลาทูรายแดงระหว่างที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง

หลังจากกระบวนการล้าง ปริมาณความชื้น โปรตีน และไขมัน (น้ำหนักแห้ง) ของตัวอย่างเนื้อปลาล้างน้ำจากปลาทั้งสามชนิดลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1)

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในกระบวนการล้าง โปรตีนที่ละลายน้ำได้ ไขมัน และไอออนที่อยู่ในกล้ามเนื้อถูกกำจัดออกด้วย ปริมาณไขมันของตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยเมื่อเวลาในการเก็บรักษา วัตถุประสงค์ในน้ำแข็งเพิ่มขึ้น ($p > 0.05$) ในขณะที่ปริมาณเถ้าของตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำเพิ่มขึ้น ปริมาณความชื้นของตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่ผลิตจากเนื้อปลาปากคม และปลาทรายแดงเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาเก็บรักษาวัตถุประสงค์ด้วย ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1) pH ของเนื้อปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลานานมีค่าประมาณ 7.2 ซึ่งค่า pH ดังกล่าวห่างจากค่า pH ที่ทำให้ประจุสุทธิในโมเลกุลของโปรตีนเป็นศูนย์ (pI) ทำให้โปรตีนคูดน้ำกลับในขั้นตอนการล้างได้มากขึ้น ส่งผลให้ปริมาณความชื้นเพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลาสดล้างน้ำขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษา วัตถุประสงค์ โดยการสูญเสียโปรตีนในขั้นตอนการล้างจะเกิดมากขึ้นเมื่อใช้ปลาที่เก็บรักษาไว้นานในน้ำแข็ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเกิดการย่อยสลายโปรตีนกล้ามเนื้อจากเอนไซม์โปรตีนเอสที่อยู่ในตัวปลา และจากจุลินทรีย์ในระหว่างการเก็บรักษาเป็นเวลานาน งานวิจัยนี้บ่งชี้ว่าตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่ผลิตได้จากปลาเขตร้อนที่มีคุณภาพความสดต่ำ มีแนวโน้มที่จะมีปริมาณความชื้นสูง และโปรตีนต่ำ

4.2 การเปลี่ยนแปลงสมบัติทางเคมี

4.2.1 ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมด (total biogenic amines)

ไบโอจีนิกเอมีนที่พบมากในปลาเขตร้อนทั้ง 3 ชนิด คือ พิวทริสซีน (putrescine) คาดาเวอรีน (cadaverine) และไทรามีน (tyramine) ซึ่งถูกรายงานค่าเป็นปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมดในการศึกษานี้ ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมดของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาวัตถุประสงค์ ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1) เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าไบโอจีนิกเอมีนเป็นดัชนีบ่งชี้การเสื่อมเสียของปลาหลายชนิด ไบโอจีนิกเอมีนที่พบมากในปลา goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) คือ ฮีสตามีน แอกมาทีน (agmatine) โดปามีน (dopamine) และ พิวทริสซีน ส่วนปลา red mullet (*Mullus barbatus*) พบแอกมาทีน ซีโรโทนิน (serotonin) ฮีสตามีน และ โดปามีน (Özyurt et al., 2009) พิวทริสซีน และคาดาเวอรีนเป็นไบโอจีนิกเอมีนที่พบมากในปลา white grouper (*Epinephelus aeneus*) ในระหว่างที่เก็บในน้ำแข็ง (Özogul et al., 2008) นอกจากนี้ยังพบ 2-ฟีนิลเอทิลเอมีน (2-phenylethylamine) โดปามีน แอกมาทีน ทริปตามีน (tryptamine) และ ซีโรโทนินในปลา white grouper ที่เน่าเสีย หลังการเก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 22 วัน (Özogul et al., 2008) ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมดของเนื้อปลาสูงกว่าในตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำประมาณ 7 เท่า (ตารางที่ 4.1) บ่งชี้ได้ว่าไบโอจีนิกเอมีนสูญเสียไปในระหว่างกระบวนการล้าง (washing process) ปริมาณไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมดที่ยอมรับได้ใน



ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบ และสมบัติทางเคมีของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาลบค้ำน้ำที่ผลิตจากปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ)

Sample		Storage time of raw material (day)	Protein (%)*	Ash (%)*	Fat (%)*	Moisture (%)**	Total biogenic amine (mg/100 g)	Salt extractable protein (mg/g protein)	Ca ²⁺ -ATPase activity (μmole/mg protein/min)	
Fish	LZ	7	87.70 ^a	1.34 ^a	4.05 ^a	82.2	3.26 ^c	682.7 ^a	0.1370 ^a	
		12	86.35 ^a	0.68 ^b	4.48 ^a	81.54	5.47 ^c	419.1 ^b	0.1197 ^b	
		17	69.42 ^b	1.38 ^a	3.81 ^a	81.74	26.87 ^b	419.9 ^b	0.0505 ^c	
		27	67.79 ^b	0.97 ^{ab}	2.93 ^b	82.29	47.70 ^a	186.7 ^c	0.0387 ^d	
	TB และปลาหนวดยักษ์ (GF) ระหว่างการดูแลรักษาในตู้เลี้ยง	GF	7	79.71 ^a	4.17 ^a	5.91	81.69 ^b	0.68 ^d	850.3 ^a	0.1117 ^a
			17	66.92 ^b	4.4	5.12	81.59 ^b	10.38 ^b	407.9 ^c	0.0607 ^c
			27	68.85 ^b	3.42	5.13	83.32 ^a	16.71 ^a	224.8 ^d	0.0384 ^d
	GF	GF	7	60.32 ^b	10.09 ^b	5.16 ^a	78.52 ^b	0.00 ^d	840.0 ^a	0.1138 ^a
			12	56.64 ^b	9.25 ^{bc}	4.77 ^{ab}	78.76 ^b	1.25 ^c	536.5 ^b	0.1021 ^b
			17	70.14 ^a	7.48 ^c	4.71 ^{ab}	79.63 ^a	9.80 ^b	346.8 ^c	0.0468 ^c
			27	44.98 ^c	13.36 ^a	4.33 ^b	79.95 ^a	16.38 ^a	365.1 ^c	0.0364 ^d
	Washed mince	LZ	7	60.31 ^a	0.05 ^c	2.74	79.61 ^b	0.13 ^c	784.1 ^a	0.1187 ^a
12			51.53 ^b	0.53 ^a	3.23	81.75 ^a	3.04 ^b	741.2 ^a	0.1001 ^b	
17			55.05 ^b	0.64 ^a	2.75	80.73 ^{ab}	8.04 ^a	549.4 ^b	0.0680 ^c	
27			46.92 ^c	0.22 ^b	2.75	80.84 ^a	10.24 ^a	240.7 ^c	0.0432 ^d	
TB		TB	7	53.45 ^a	1.69	2.93	80.60 ^c	0.00 ^d	986.2 ^a	0.1337 ^a
			12	57.61 ^a	0.97	3.14	82.32 ^b	0.34 ^c	576.4 ^b	0.1267 ^b
			17	43.23 ^b	1.99	3.12	82.30 ^b	1.93 ^b	578.7 ^b	0.0773 ^c
			27	44.21 ^b	1.28	3.13	83.95 ^a	3.45 ^a	298.6 ^c	0.0470 ^d
GF		GF	7	56.71 ^a	3.82 ^c	2.71	79.43	0.00 ^c	1078.7 ^a	0.1075 ^a
			12	42.01 ^b	4.98 ^b	2.56	79.63	0.04 ^c	1086.2 ^a	0.0893 ^b
			17	45.52 ^b	5.17 ^{ab}	2.73	80.29	1.41 ^b	451.8 ^b	0.0603 ^c
			27	45.23 ^b	5.80 ^a	2.71	79.63	2.73 ^a	348.6 ^b	0.0439 ^d

*% dry basis; **% wet basis; Different superscripts in the same column within each fish indicate statistical difference ($p \leq 0.05$). Data are mean of duplicates.

ปลา Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งมีค่าอยู่ในช่วง 1.5-2.0 มิลลิกรัม/100 กรัม โดยไบโอจินิกเอมีนที่พบมากคือ พิวทริสซีน และคาตาเวอริน ส่วนฮีสตามีน และไทราซีนพบในปริมาณเล็กน้อย (Baixas-Nogueras et al., 2005)

นอกจากนี้ Veciana-Nogués et al. (1997) รายงานว่าผลรวมของปริมาณฮีสตามีน ไทราซีน พิวทริสซีน และคาตาเวอรินสูงสุดที่ยอมรับได้ในปลาทูน่า (*Thunnus thynnus*) ซึ่งเก็บรักษาที่ 0 องศาเซลเซียส มีค่าไม่เกิน 5 มิลลิกรัม/100 กรัม ในงานวิจัยนี้พบว่าปลาเริ่มเกิดการเสื่อมเสียเมื่อเก็บรักษาปลาในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 12 วัน โดยมีปริมาณไบโอจินิกเอมีนทั้งหมดอยู่ในช่วง 1-5 มิลลิกรัม/100 กรัม ขึ้นอยู่กับชนิดปลาที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 4.1) การพบไบโอจินิกเอมีนในปริมาณต่ำในการศึกษานี้ อาจเนื่องจากปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นไบโอจินิกเอมีนในปลามีปริมาณต่ำ ซึ่งปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่อยู่ในเนื้อเยื่อปลา และการเน่าเสียจากแบคทีเรียขึ้นกับสิ่งแวดล้อม ชนิดของปลา และแบคทีเรียประจำถิ่น (microflora) ที่จำเพาะ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในตัวปลาในขั้นตอนหลังการจับ ปลาปากคมมีไบโอจินิกเอมีนในปริมาณสูงเมื่อเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน ซึ่งสอดคล้องกับสภาวะการเน่าเสียอย่างรุนแรง ไบโอจินิกเอมีนที่พบมากในปลาปากคมที่เน่าเสียอย่างรุนแรง คือ คาตาเวอริน พิวทริสซีน และไทราซีน ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 23.2, 12.8 และ 10.5 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณฮีสตามีนในปลาที่เน่าเสียดังกล่าวมีเพียงเล็กน้อย คือ 1.0 มิลลิกรัม/100 กรัม Baixas-Nogueras et al (2005) รายงานว่าคาตาเวอรินเป็นไบโอจินิกเอมีนที่มีปริมาณมากในปลา Mediterranean hake ที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง ซึ่งปริมาณของคาตาเวอรินสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรีย *Shewanella putrefaciens* นอกจากนี้ Enterobacter สองสายพันธุ์ที่แยกได้จากปลาแมคเคอเรล ปลา Saury ปลา Spanish Mackerel และปลาสำลีน้ำลึก (Amberjack) สามารถผลิตพิวทริสซีน และคาตาเวอรินในปริมาณที่สูง (Kim et al., 2009) งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอาจใช้ไบโอจินิกเอมีนทั้งหมดเป็นดัชนีการบ่งชี้ความเน่าเสียของเนื้อปลาทั้ง 3 ชนิดได้ แต่อย่างไรก็ตามไบโอจินิกเอมีนทั้งหมดไม่เหมาะสมสำหรับเป็นดัชนีคุณภาพในการตรวจสอบย้อนกลับถึงความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิของปลาทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากไบโอจินิกเอมีนถูกกำจัดในขั้นตอนการล้างในปริมาณมาก ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณไบโอจินิกเอมีนทั้งหมดของตัวอย่างเนื้อปลาล้างน้ำมีค่าต่ำมากถึงแม้ว่าจะใช้วัตถุดิบที่เน่าเสียอย่างรุนแรงในการผลิต (อายุการเก็บรักษาปลา 17-27 วัน) ก็ตาม

4.2.2 ความสมบูรณ์ของโครงสร้างโปรตีนมัชโอฟิบริลลาร์

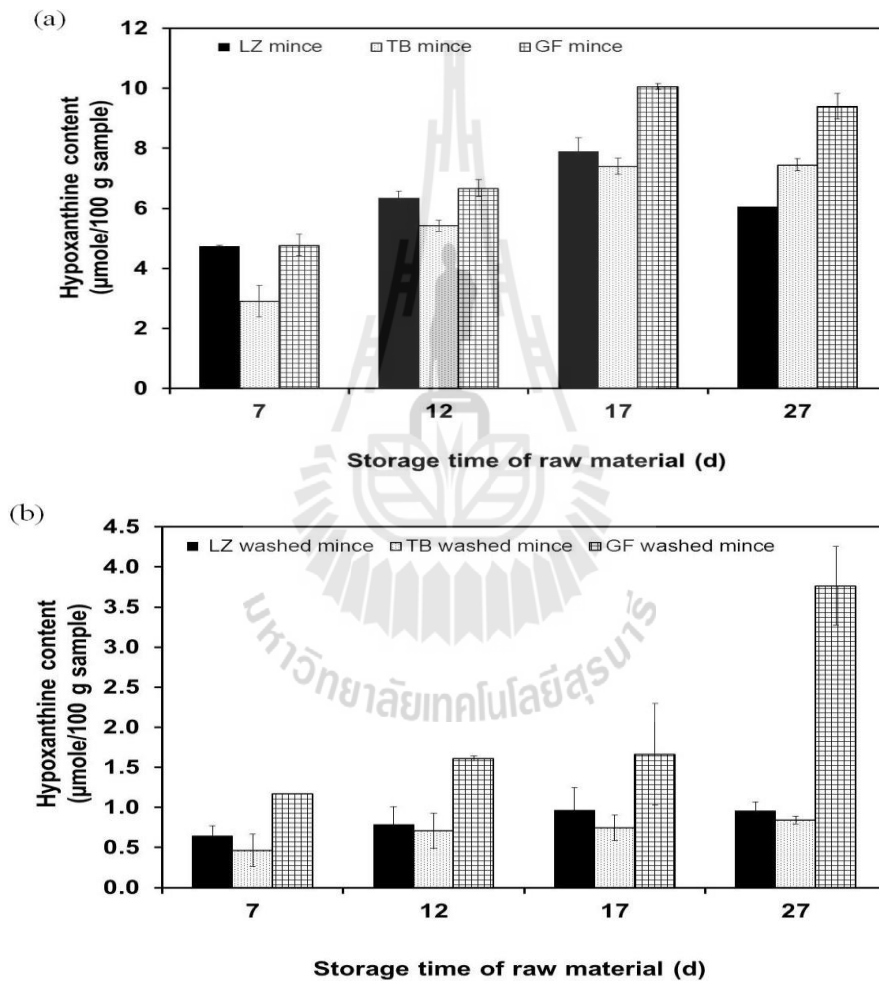
โปรตีนมัชโอฟิบริลลาร์เป็นโปรตีนที่สำคัญต่อสมบัติเชิงหน้าที่ในการเกิดเจลในเนื้อปลา และซูริมิ ความสมบูรณ์ของโปรตีนมัชโอฟิบริลลาร์มีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ใน

สารละลายเกลือ (salt soluble protein) และกิจกรรมของเอนไซม์ Ca^{2+} -ATPase ปริมาณโปรตีนที่ละลายในเกลือของเนื้อปลาทรายแดงที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 7 วัน มีค่าสูงสุด คือ 850.3 มิลลิกรัม/กรัม-โปรตีน ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1) ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในสารละลายเกลือของตัวอย่างเนื้อปลามีค่าลดลงอย่างเด่นชัดในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ซึ่งบ่งชี้ว่าโปรตีนมัยโอไฟบริลลาร์เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (configuration) ในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง กิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ในเนื้อปลาปากคม และปลาหนวดฤๅษีมีค่าลดลงมาก ประมาณ 58.9-63.1% หลังจากเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 17 วัน ในขณะที่เนื้อปลาทรายแดงมีค่ากิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ลดลง ประมาณ 45.7% จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างมัยโอซินส่วนหัว (globular head) ของปลาทรายแดงมีความสมบูรณ์มากที่สุดในตัวอย่างปลา 3 ชนิดที่ทำการศึกษา Yongsawatdigul and Park (2002) รายงานว่ากิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ในปลาทรายแดงลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ซึ่งส่งผลให้คุณสมบัติด้านเนื้อสัมผัสลดลงด้วย นอกจากนี้ Benjakul et al. (2003) พบว่าการลดลงของกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ของปลาปากคมอาจเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายในโมเลกุลของมัยโอซิน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของมัยโอซินส่วนหัวเกิดจากการรวมกัน และ/หรือการสลายของโปรตีนระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็ง ส่งผลให้กิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ลดลง ตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลานานมีปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ต่ำกว่าตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่เตรียมจากปลาสด ($p \leq 0.05$, ตารางที่ 4.1) บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่เก็บรักษาเป็นเวลานานมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของมัยโอซินส่วนหัวมากกว่าตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่เตรียมจากปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งในระยะเวลาที่สั้นกว่า ผลการศึกษานี้พบว่าทั้งปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase สามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อปลา และเป็นดัชนีในการตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิได้ แต่อย่างไรก็ตามในทางปฏิบัติอาจไม่ได้นำค่ากิจกรรม Ca^{2+} -ATPase และปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือมาใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพในซูริมิแช่แข็ง เนื่องจากโปรตีนเกิดการเสียสภาพธรรมชาติระหว่างเก็บแช่แข็ง ส่งผลให้ปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ลดลง ดังนั้นเมื่อตรวจพบปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ในปริมาณต่ำ อาจบ่งชี้ได้ว่าวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมามีคุณภาพความสดต่ำ หรือโปรตีนเกิดการสูญเสียธรรมชาติเนื่องจากการเก็บแช่แข็ง

4.2.3 ดัชนีบ่งชี้การเน่าเสีย

ปริมาณไฮโปแซนทีน (hypoxanthines, Hx) ของเนื้อปลาทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษาในน้ำแข็งจนถึงวันที่ 17 และลดลงในวันที่ 27 ($p \leq 0.05$, รูปที่ 4.1a) การลดลงของ

ปริมาณไฮโปแซนทีนเนื่องจากการสลายของไฮโปแซนทีนเป็นแซนทีน และผลิตภัณฑ์อื่น โดยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปลา พบว่าคุณภาพความสดของปลาทั้ง 3 ชนิด เป็นที่ยอมรับ เมื่อเก็บรักษาปลาในน้ำแข็งเป็นเวลา 7 วัน เริ่มตรวจพบการเน่าเสียเมื่อเก็บปลานาน 12 วัน และเกิดการเน่าเสียอย่างรุนแรงเมื่อเก็บปลาในน้ำแข็งนาน 17-27 วัน ดังนั้นไฮโปแซนทีนเป็นดัชนีที่ไม่เหมาะสมในการบ่งชี้คุณภาพความสดของเนื้อปลาที่อยู่ในสภาวะที่เน่าเสียอย่างรุนแรง เนื่องจากปลาที่เก็บรักษาในน้ำแข็งนาน 27 วัน มีค่าไฮโปแซนทีนต่ำกว่าปลาที่เก็บรักษาไว้ 17 วัน



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine, Hx) ของปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดถาญี (GF) ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 27 วัน; (a) เนื้อปลา และ (b) เนื้อปลาค้างน้ำ

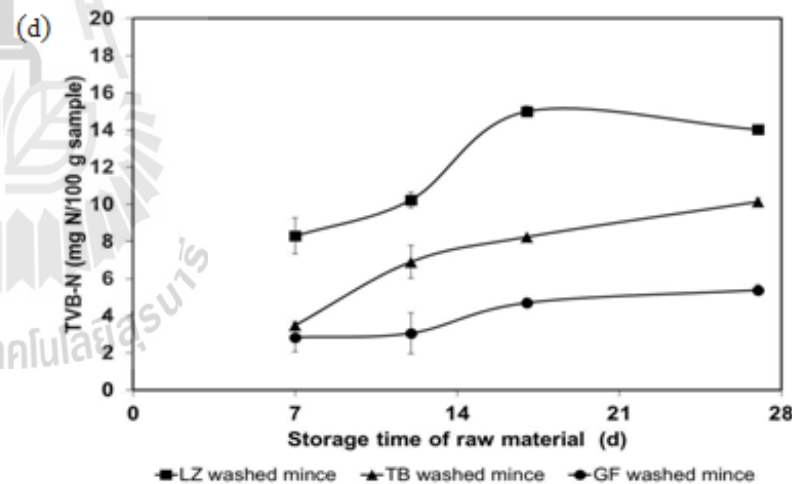
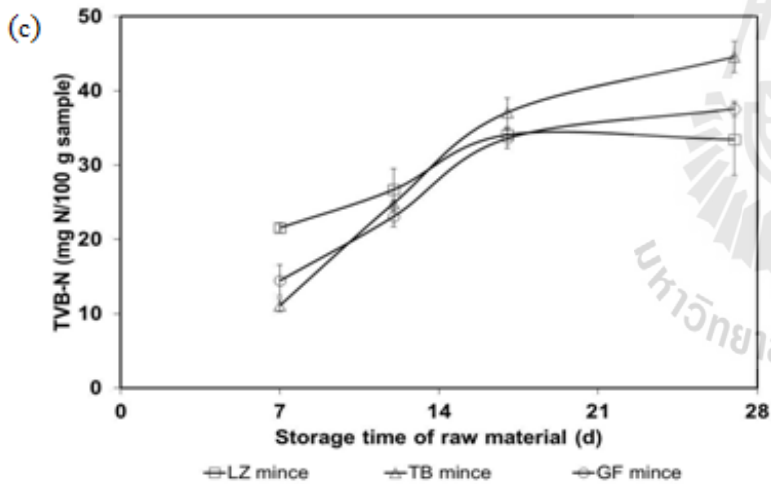
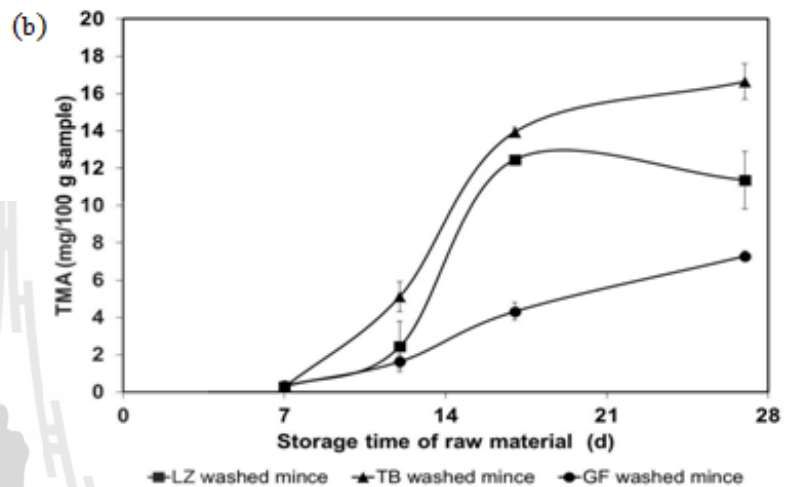
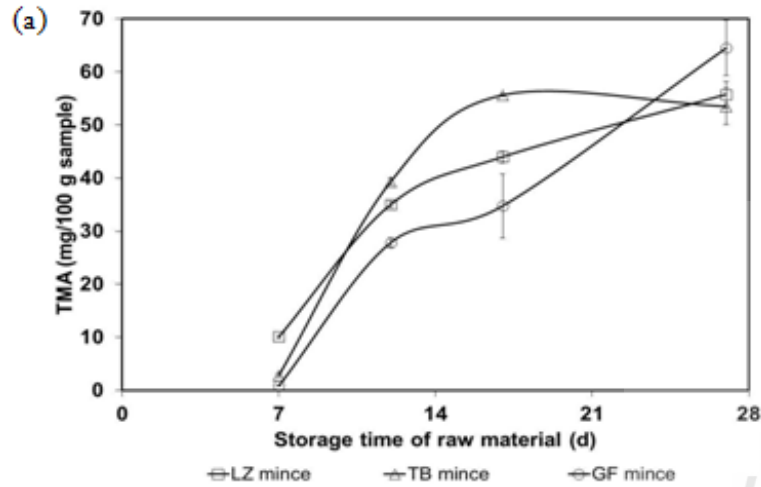
ปริมาณไฮโปแซนทีนของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเช่นเดียวกันกับตัวอย่างเนื้อปลา ($p \leq 0.05$, รูปที่ 4.1b) แต่ปริมาณไฮโปแซนทีนของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำมีค่าต่ำกว่าเนื้อปลา ประมาณ 6.6 เท่า แต่ค่าดังกล่าวยังอยู่ในช่วงค่าต่ำสุดที่สามารถวิเคราะห์ได้ (detection limit) ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าไฮโปแซนทีนเป็นดัชนีบ่งชี้ความสดที่เหมาะสมในเนื้อปลาที่เริ่มเน่าเสีย แต่เป็นดัชนีบ่งชี้ความสดที่ไม่เหมาะสมในเนื้อปลาที่เกิดการเน่าเสียอย่างรุนแรงของปลาทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ ไฮโปแซนทีนยังสามารถใช้เป็นดัชนีตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสุริมิของปลาทั้ง 3 ชนิดนี้ได้

ไตรเมทิลเอมีนออกไซด์ (trimethylamine oxide, TMAO) สามารถเปลี่ยนเป็นไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) ด้วยเอนไซม์ไตรเมทิลเอมีนออกซิเดส (trimethylamine oxidase) จากปฏิกิริยารีดักชันของแบคทีเรีย (Ocaño-Higuera et al., 2009) ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด และไตรเมทิลเอมีนของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาทั้ง 3 ชนิด เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ ($p \leq 0.05$, รูปที่ 4.2a-2d) เนื้อปลาทั้ง 3 ชนิด คือ ปลาหนวดฤๅษี ปลาทรายแดง และปลาปากคมมีค่าไตรเมทิลเอมีนเริ่มต้นอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือ 0.9, 2.9 และ 10 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ค่าไตรเมทิลเอมีนสูงสุดที่ยอมรับได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา โดยค่าไตรเมทิลเอมีนของปลา Mediterranean hake เท่ากับ 5 มิลลิกรัม/100 กรัม เป็นค่าที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ (Baixas-Nogueras et al., 2003) ผลการศึกษานี้พบว่าปลาทั้ง 3 ชนิด เริ่มเน่าเสียหลังจากการเก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 12 วัน ซึ่งมีปริมาณไตรเมทิลเอมีนสูงเกินกว่า 25 มิลลิกรัม/100 กรัม โดยเนื้อปลาหนวดฤๅษีมีค่าไตรเมทิลเอมีนสูงสุดหลังจากการเก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน ผลการทดลองนี้ยืนยันว่าไตรเมทิลเอมีนสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของปลาในเขตร้อนทั้ง 3 ชนิดได้ ตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาหนวดฤๅษีมีการเปลี่ยนแปลงค่าไตรเมทิลเอมีนต่ำสุด ค่าไตรเมทิลเอมีน และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำมีค่าต่ำกว่าเนื้อปลาประมาณ 4.4-10.1 เท่า ซึ่งบ่งชี้ว่าสารทั้ง 2 นี้ สูญเสียไปในกระบวนการล้าง ปริมาณไตรเมทิลเอมีนของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากเนื้อปลาหนวดฤๅษี ปลาทรายแดง และปลาปากคมที่เกิดการเน่าเสียในระยะเริ่มต้นที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 12 วัน มีค่าเท่ากับ 2, 5 และ 2 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ (รูปที่ 4.2b) ซึ่งค่าดังกล่าวอาจตั้งเป็นค่าไตรเมทิลเอมีนสูงสุดที่ผู้บริโภคยอมรับได้ของปลาในเขตร้อนทั้ง 3 ชนิดนี้ ตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาหนวดฤๅษีมีปริมาณไตรเมทิลเอมีนต่ำสุดในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่ผลิตจากปลาชนิดอื่น ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่าปริมาณไตรเมทิลเอมีนที่ถูกกำจัดออกไปในขั้นตอนการล้างแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

สหภาพยุโรปกำหนดปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดที่ผู้บริโภคยอมรับได้ในปลาชนิดต่างๆ ให้มีค่าอยู่ในช่วง 25-35 มิลลิกรัม/100 กรัม (European Regulation, 2008) จากผลการทดลองนี้ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดของปลาทั้ง 3 ชนิดที่เกิดการเน่าเสียในระยะเริ่มต้นที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 12 วัน มีค่าอยู่ในช่วง 23-27 มิลลิกรัม/100 กรัม (รูปที่ 4.2c) ในขณะที่ปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดของตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำที่เตรียมจากปลาหนวดดาฮี ปลาทรายแดง และปลาปากคมมีค่าเท่ากับ 3, 7 และ 10 มิลลิกรัม/100 กรัม ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวสามารถใช้กำหนดเป็นค่าปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดสูงสุดที่ยอมรับได้ของตัวอย่างซูริมิ ดังนั้นถ้าปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดของตัวอย่างซูริมิสูงกว่า 3, 7 และ 10 มิลลิกรัม/100 สำหรับซูริมิที่เตรียมจาก ปลาหนวดดาฮี ปลาทรายแดง และปลาปากคมตามลำดับ บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างซูริมิผลิตจากวัตถุดิบที่มีคุณภาพต่ำ ปริมาณไตรเมทิลเอมีน และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมดของตัวอย่างซูริมิมิความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้

4.3 ผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA)

เมื่อนำผลการวิเคราะห์ทางเคมีมาจัดกลุ่มด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis; PCA) ซึ่งมีค่า Eigenvalue เท่ากับหรือไม่ต่ำกว่า 1 พบว่า สามารถจัดกลุ่มของการวิเคราะห์ทางเคมีได้ 3 องค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถอธิบายความแปรปรวนในชุดข้อมูลทั้งหมดได้ 86.31% (รูปที่ 4.3a, b) ซึ่งองค์ประกอบหลักที่ 1 (PC1) ประกอบด้วยไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N) ไฮโปแซนทีน ไบโอจีนิกเอมีนทั้งหมด และโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ส่วนองค์ประกอบหลักที่ 2 (PC2) คือปริมาณเถ้า (ตารางที่ 4.2) ในขณะที่โปรตีน และความชื้นจัดอยู่ในองค์ประกอบหลักที่ 3 (PC3, ตารางที่ 4.2) ส่วนค่ากิจกรรม Ca^{2+} -ATPase จัดอยู่ในองค์ประกอบหลักที่ 1 และ 2 (PC1 และ PC2, ตารางที่ 4.2) ในขณะที่ไขมันจัดอยู่ในองค์ประกอบหลักที่ 2 และ 3 (PC2 และ PC3) จากผลการวิเคราะห์ด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (PCA) พบว่า สมบัติทางเคมีของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำเปลี่ยนแปลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาวัตถุดิบในน้ำแข็ง (รูปที่ 4.3a, b) และสามารถแบ่งตัวอย่างเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำตามระยะเวลาการเก็บรักษาของวัตถุดิบได้เป็น 2 กลุ่ม ปลาปากคมที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 27 วัน (LM27) มีค่าองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากปลาชนิดอื่นอย่างเด่นชัด โดยเฉพาะปริมาณไบโอจีนิกเอมีน (รูปที่ 4.3a) ในขณะที่ปลาหนวดดาฮีที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน (GM27) มีค่าองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างจากปลาชนิดอื่น โดย



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA); (a) เนื้อปลา และ (b) เนื้อปลาล้างน้ำ และปริมาณสารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N); (c) เนื้อปลา และ (d) เนื้อปลาล้างน้ำของปลาทรายแดง (TB) ปลาปากคม (LZ) และปลาหนวดดาบ (GF) ระหว่างการเก็บในน้ำแข็งเป็นระยะเวลา 27 วัน

ตารางที่ 4.2 ค่า loading factor ของแต่ละองค์ประกอบดัชนีชี้วัดคุณภาพ

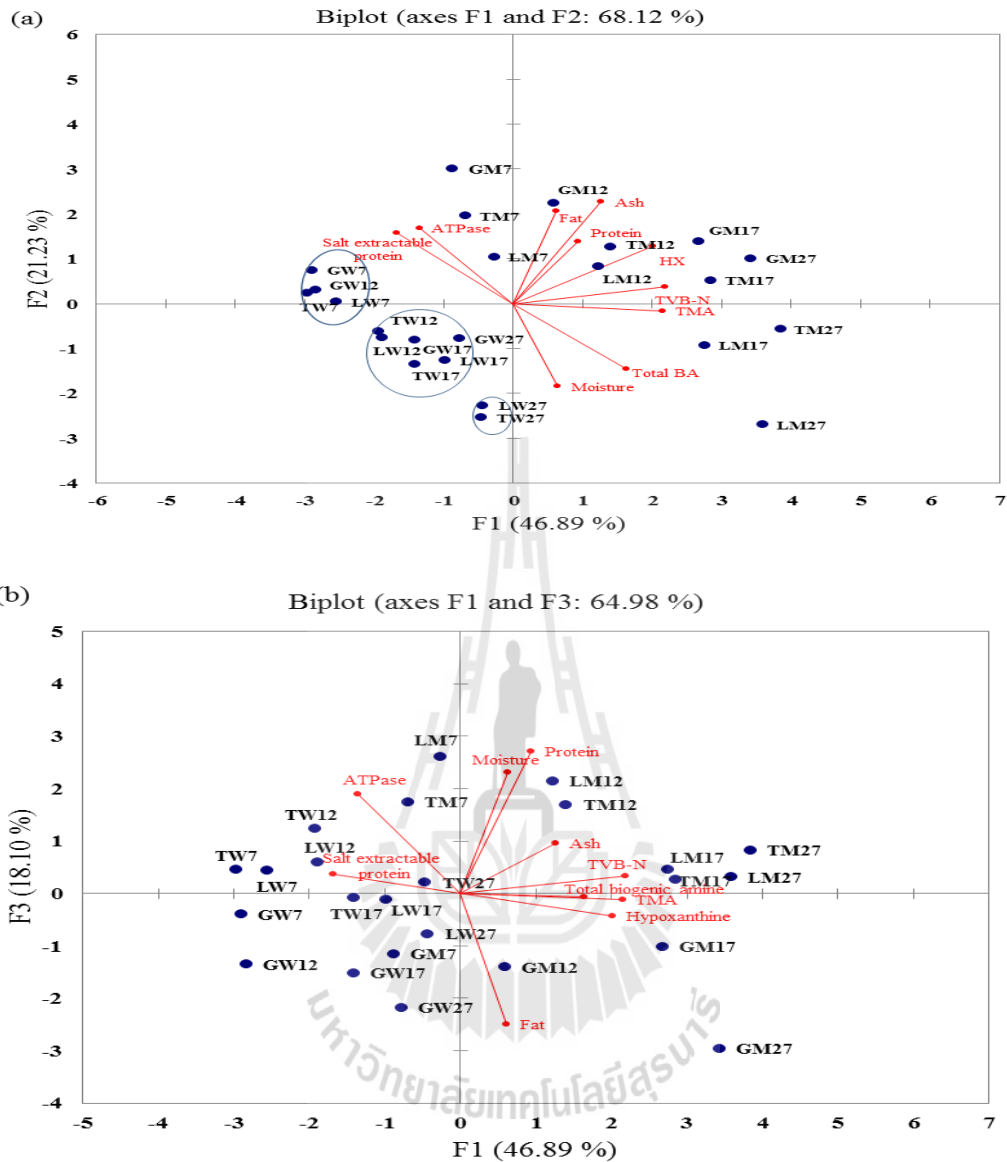
Parameter	PC1	PC2	PC3
Hypoxanthine	0.888	0.382	-0.117
TMA	0.951	-0.048	-0.034
ATPase	-0.598	0.501	0.522
Salt extractable protein	-0.743	0.469	0.099
TVB-N	0.963	0.109	0.090
Protein	0.414	0.415	0.746
Fat	0.273	0.614	-0.687
Moisture	0.280	-0.547	0.637
Ash	0.558	0.675	0.265
Total biogenic amine	0.723	-0.434	-0.016

มีปริมาณโปรตีนต่ำ (รูปที่ 4.3b, ตารางที่ 4.1) สำหรับตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่จัดกลุ่มตามระยะเวลาการเก็บรักษาวัตถุดิบในน้ำแข็ง (รูปที่ 4.3a) โดยพบว่าตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาหนวดฤาษีที่เตรียมจากปลาที่เก็บในน้ำแข็ง 7 วัน (GW7) และเตรียมจากปลาที่เริ่มเน่าเสีย (เก็บรักษาปลาในน้ำแข็งนาน 12 วัน) (GW12) จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันกับตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาทรายแดง (TW7) และปลาปากคม (LW7) ที่เตรียมจากปลาที่เก็บไว้ในน้ำแข็งนาน 7 วัน (รูปที่ 4.3a) ตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาหนวดฤาษีที่เตรียมจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน (GW27) มีคุณลักษณะทางเคมีและชีวเคมีในภาพรวมไม่แตกต่างจากตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่เตรียมจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 17 วัน ในขณะที่ตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาทรายแดง (TW17) และปลาปากคม (LW17) เตรียมจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 17 วัน แตกต่างอย่างชัดเจนจากตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำที่เตรียมจากปลาที่เก็บในน้ำแข็งเป็นเวลา 27 วัน (TW27 และ LW27)

ผลนี้บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและชีวเคมีหลังการจับ และการปนเปื้อนเบ็ดจลินทรีย์ในเนื้อปลาแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่เสื่อมเสีย และกระบวนการสร้างและสลายของสารที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียแตกต่างกันตามชนิดของปลา ปลาหนวดถาญีที่เก็บรักษาในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 17 และ 27 วัน มีการเน่าเสียไม่แตกต่างกัน ทำให้คุณลักษณะของซูริมิที่ผลิตได้ไม่แตกต่างกันด้วย

ปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ของตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำมีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณภาพความสดของวัตถุดิบ (รูปที่ 4.3a, b) บ่งชี้ได้ว่าปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase สามารถใช้เป็นดัชนีตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบได้ แต่อย่างไรก็ตามค่าดังกล่าวสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพในตัวอย่างซูริมิสดเท่านั้น แต่ไม่สามารถใช้ในตัวอย่างซูริมิแช่แข็งได้ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่ละลายในสารละลายเกลือ และกิจกรรม Ca^{2+} -ATPase ลดลงในระหว่างการแช่แข็ง การศึกษานี้บ่งชี้ว่าคุณลักษณะทางชีวเคมีของตัวอย่างซูริมิขึ้นอยู่กับคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ซึ่งค่าไตรเมทิลเอมีน สารประกอบไนโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด และไฮโปรแซนทินที่วิเคราะห์จากตัวอย่างเนื้อปลาบดล้างน้ำของปลาทั้ง 3 ชนิด สามารถใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบในการผลิตซูริมิได้





รูปที่ 4.3 การวิเคราะห์ผลของการเปลี่ยนแปลงทางเคมี และชีวเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal component analysis, PCA) ของเนื้อปลา และตัวอย่างเนื้อปลาดิบล้างน้ำของปลาทูทรายแดง (TB) ปลาทูปากคม (LZ) และปลาทูหนวดดาฮี (GF) ระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งที่ 7-27 วัน โดย TM7-TM27 (TB mince), TW7-TW27 (TB washed mince), LM7-LM27 (LZ mince), LW7-LW27 (washed mince LZ), GM7-GM27 (GF mince), GW7-GW27 (GF washed mince); (a) PC1 และ PC2; (b) PC1 และ PC3

บทที่ 5

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้พยายามที่จะค้นหาดัชนีที่บ่งชี้คุณภาพในตัวอย่างซูริมิเพื่อใช้เป็นดัชนีในการตรวจสอบย้อนกลับถึงคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตซูริมิ ซึ่งเป็นการวัดที่มีความสำคัญเพื่อเป็นการประกันว่าในกระบวนการผลิตซูริมิ ใช้เฉพาะปลาที่มีคุณภาพสูงในการผลิต จากจำนวนค่าดัชนีที่ทำการศึกษาทั้งหมดพบว่า ค่าไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) สารประกอบในโตรเจนที่ระเหยได้ทั้งหมด (total volatile base nitrogen, TVB-N) และไฮโปแซนทีน (hypoxanthine, Hx) ที่วิเคราะห์จากตัวอย่างเนื้อปลาสดล้างน้ำสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพความสดของวัตถุดิบได้ เนื่องจากชนิดของปลาไม่มีผลต่อค่าดังกล่าวมาก ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธีการวิเคราะห์องค์ประกอบหลัก (Principal Component Analysis, PCA) บ่งชี้ได้ว่าตัวอย่างซูริมิที่ผลิตจากปลาในเขตร้อนทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณภาพความสดของวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต

สำหรับงานวิจัยในอนาคตควรมีการเก็บตัวอย่างวัตถุดิบและซูริมิจากโรงงานมาวิเคราะห์เพื่อยืนยันผลการทดลองที่ได้จากการศึกษานี้



บรรณานุกรม

- ฉาตยา ศรีจันทิก. 2013. การบริโภคเนื้อปลาสดและผลิตภัณฑ์ (ซูริมิ) ในประเทศไทย. เข้าถึงได้จาก: <http://fishco.fisheries.go.th/fisheconomic/Doc/Surimi%20%2027-9-2013.pdf>.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International 18th ed. Latimer, G.W., and Horwitz, W. (Eds.) Gaithersburg, MD. p. 473.
- Bakar, J., Yassoralipour, A., Abu bakar, F., and Rahman, R.A. 2010. Biogenic amine changes in barramundi (*Lates calcarifer*) slices stored at 0°C and 4°C. Food Chem. 119: 467–470
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Mariné- Font, A., and Vidal-Carou, M.C. 2005. Biogenic amines index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). J. Food Prot. 68: 2433–2438.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., and Vidal-Carou, M.C. 2003. Suitability of volatile amines as freshness indexes for iced Mediterranean hake. J. Food Sci. 68: 1607-1610.
- Barrett, E. L. and Kwan, H. S. 1985. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. Annu. Rev. Microbiol. 39: 131- 149.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tueksuban, J. 2003. Changes in physico-chemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. Food Chem. 80: 535–544.
- Botta, J.R. 1995. Evaluation of Seafood Freshness Quality. USA: VCH Publishers.
- Botta, J.R., Lauder, J.T., and Jewer, M.A. 1984. Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVBN) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Food Sci. 49: 734-736, 750.
- Bradford, M.B. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 21: 248-254.
- Burns, B.G., and Kee, P.J. 1985. Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 68: 444–448.
- Burt, J.R. 1977. Hypoxanthine : a biochemical index of fish quality. Process Biochem. 13: 32-35.

- Debevere, J. and Boskou, G. 1996. Effect of modified atmosphere packaging on the VB/TMA producing microflora of cod fillets. *Int. J. Food Microbiol.* 31: 221-229.
- EC. 1991. Laying down the health conditions for the production and the placing on the market of fishery products: Council Directive 91/493/EEC of 22 July. *Offic. J. Eur. Comm.* L268: 15–32.
- European Regulation. 2008. Commission Regulation (EC) No 1022/2008 of 17 October 2008. Amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards the total volatile basic nitrogen (TVB-N) limits. *Offic. J. Eur. Comm.* L277: 18–20.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Linfords, E., and Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem. Int.* 76: 575–577.
- European Communities (EC). 1995. Determination of the concentration of volatile nitrogenous bases (TVBN) in fish and fish products: A reference procedure. *O.J. E.C.* p.15.
- FAO. 2013. Global Production Statistics 1950-2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved November 2010, from http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_19988953236922551.xml&outtype=html.
- Fiske, C. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Bio. Chem.* 66: 375–400.
- Fraser, O.P. and Sumar S. 1998. Composition changes and spoilage fish (part II) microbiological induced deterioration. *Nutr. Food Sci.* 6: 325-329.
- Gill, T.A. 1992. Biochemical and chemical indices of seafood quality. In: *Quality Assurance in the Fish Industry*. Huss, H.H., Jakobsen, M., and Liston, J. (Eds.) Amsterdam, Elsevier Science Publishers, pp. 377-388.
- Guenneugues, P., and Ianelli, J. 2014. Surimi resources and market. In: *Surimi and Surimi Seafood 3rd edition*. Park, J.W. (Ed.). Taylors & Francis Group, Boca Raton (FL), pp. 25-53.
- Guizani, N., Al-Busaïdy, M.A., Al-Belushi, I.M., Mothershaw A., and Rahman, M.S. 2005. The effect of storage temperature on histamine production and the freshness of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Res. Int.*, 38: 215-222.
- Hall, G.M., and Ahmad, N.H. 1997. Surimi and fish mince products. In: *Fish Processing Technology*. Hall, G.M. (Ed.). Blackie Academic and Professional, London, pp. 74-91.

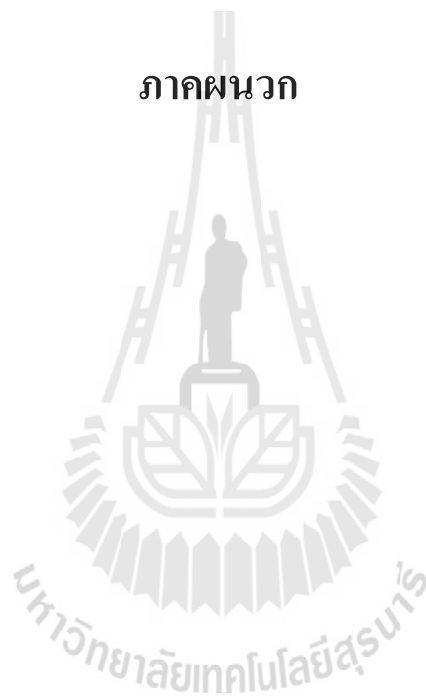
- Hemung, B.O., Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, Y. 2008. Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. *Food Chem.* 111: 439–446.
- Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., GarcíaGarcía, B. and Garrido, M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) filets during ice storage. *Food Chem.* 114: 237-245.
- Hozbor, M. C., Saiz, A. I., Yeannes, M. I., and Fritz, R. 2006. Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT – Food sci. technol.* 39: 99–104.
- Jahns, F.D., and Rand, A.G.JR. 1997. Enzyme methods to assess marine food quality. In: *Enzymes in Food and Beverage Processing ACS Symposium No. 47*. Ory, R.L. and Angelo, A.J.St. (Eds.). American Chemical Society, Washington, DC.
- Kim, M.K., Mah, J.H., and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* 116: 87-95.
- Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I., and An, H. 2001. Occurrence of histamine-forming bacteria in albacore and histamine accumulation in muscle at ambient temperature. *J. Food Sci.* 67: 1515-1521.
- Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I., and An, H. (2002). Histamine production by *Morganella moegonii* in mackerel, albacore, mahi-mahi, and salmon at various storage temperatures. *J. Food Sci.* 67: 1522-1528.
- Lanier, T.C. 2000. Surimi gelation chemistry. In: *Surimi and surimi seafood*. Park, J W. (Ed.). Marcel Dekker Inc, New York, pp. 237-268.
- Lawrie, R. A. and Ledward, D. A. 2006. Chemical and biochemical constitution of muscle. In: *Lawrie's meat science*. 7th ed. Woodhead Publishing Ltd & CRP Press LLC, Cambridge, England, pp. 75-126.
- Mackie, I. M. 1994. Fish protein. In: *New and developing sources of food proteins*. Hudson, B. J. F. (Ed.). Chapman and Hall, Inc, London, pp. 95-144.

- Maijala, R., Eerola, S., Lievonen, S., Hill, P., and Hirvi, T. 1995. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *J. Food Sci.* 60: 1187-1190.
- Malle, P., Valle, M., Bouquelet, S. 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *J. AOAC Int.* 79: 43-49.
- Massa, A.E., Palacios, D.L., Paredi, M. and Crupkin, M. 2005. Postmortem changes in quality indices of ice stored flounder (*Paralichthys patagonicus*). *Food Biochem.* 29: 570-590.
- Middlebrooks, B.S., Toom, P.M., Douglas, W.L., Harrison, R.E., McDowell, S. 1988. Effect of storage, time and temperature on the microflora and amine development in Spanish mackerel. *J. Food Sci.* 53: 1024-1029.
- McCarthy, H. T., Ellis, C. P., Silvia, M. L., and Mills, B. (1989). Comparison of volatile acid number test with enzymatic acetic acid assay for assessment of seafood Quality. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72: 828–834.
- Ocaño-Higuera, V.M., Marquez-Ríos, E., Canizales-Dávila, M., Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguila, R., Lugo-Sánchez, M.E., García-Orozco, K.D., and Graciano-Verdugo, A.Z. 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. *Food Chem.* 116: 933–938.
- Ocaño-Higuera, V.M., A.N. Maeda-Martínez, E. Marquez-Ríos, D.F. Canizales-Rodríguez, F.J. Castillo-Yáñez, E. Ruíz-Bustos, A.Z. Graciano-Verdugo and M. Plascencia-Jatomea, 2011. Freshness assessment of ray fish stored in ice by biochemical, chemical and physical methods. *Food Chem.* 125: 49-54
- Okada, M. 1992. History of surimi technology in Japan. In: *Surimi Technology*. Lanier, T. C. and Lee, C. M. (Eds). Marcel Dekker Inc, New York, pp. 1-20.
- Okada, M. 1999. *Science of kamaboko*. Seizandoshoten, Tokyo, Japan.
- Önal A., 2007. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chem.* 103: 1475-1486.
- Özogul, F. and Özogul, Y. 2006. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardina pilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chem.* 99: 574–578.

- Özogul, F., Gökbulut, C., Özogul, Y. and Özyurt, G. 2006. Biogenic amine production and nucleotide ratios in gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, wrapped in aluminium foil and wrapped in cling film at 4 °C. *Food Chem.* 98:76-84.
- Özogul, F., Özogul, Y., and Kuley, E. 2008. Nucleotide degradation and biogenic amine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chill temperature (4°C). *Food Chem.* 108: 933–941.
- Özoğul, Y., Boğa, E.K., Tokur, B. and Özoğul, F. 2011. Changes in biochemical, sensory and microbiological quality indices of common sole (*Solea solea*) from the Mediterranean sea during ice storage. *Turkish J. Fish Aquat. Sci.* 11: 243-251.
- Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., and Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullus barbatus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. *Food Chem.* 114: 505–510.
- Pacheco-Aguilar, R., Lugo-Sánchez, M.E., and Robles-Burgueño, M.R. 2000. Postmortem biochemical and functional characteristic of Monterey sardine muscle stored at 0°C. *J. Food Sci.* 65: 40-47.
- Paleologos, E.K., Savvaidis, I.N., and Kontominas, M.G. 2004. Biogenic amines formation and its relation to microbiological and sensory attributes in ice-stored whole, gutted and filleted Mediterranean Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Food Microbiology.* 21: 549–557.
- Parry, R.T. 1993. Principles and Applications of Modified Atmosphere Packaging of Foods. Glasgow: Blackie.
- Reza, M.S., Bapary, M.A.J., Ahasan, C.T., Islam, M.N., and Kamal, M. 2009. Shelf life of several marine fish species of Bangladesh during ice storage. *Int. J. Food Sci. Tech.* 44: 1485–1494.
- Rossi, S., Lee, C., Ellis, P.C. and Pivarnik, L.F. 2002. Biogenic amines formation in bigeye tuna steaks and whole skipjack tuna. *J. Food Sci.* 67: 2056-2060
- Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agri. Food Chem.* 33: 678–680.
- Ruiz-Capillas, C., and Moral, A. 2001. Production of Biogenic amines and their potential use as quality control indices for hake (*Merluccius merluccius*) stored in ice. *J. Agri. Food Chem.* 66: 1030–1032.
- Sleat, R. and Robinson, J.P. 1984. A Review The bacteriology of anaerobic degradation of aromatic

- compounds. *J. Applied. Bacteriol.* 57: 381-394.
- Surette, M. E., Gill, T. A., and LeBlanc, P. J. 1988. Biochemical basis of postmortem nucleotide catabolism in cod (*Gadus morhua*) and its relationship to spoilage. *J. Agri. Food Chem.* 36, 19–22.
- Suzuki, T. 1981. *Fish and krill protein: Processing technology*. London, UK: Applied science publisher.
- Technitisawad, A. 2012. Surimi and surimi seafood in Thailand. *Presented at the 12th Surimi Industry Forum USA* (May 8), Astoria, OR.
- Uchiyama, H., and Kato, N. 1974. Partial freezing as a means of preserving fish freshness-1 changes in free amino acids, TMAO-N, ATP and its related compounds, and nucleic acids during storage. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 40: 1145–1154.
- Varga, S., Keith, R. A., Michalik, P., Sims, G. G., and Reiger, L. W. 1980. Stability of lean and fatty fish in hypobaric storage. *J. Food Sci.* 45: 1487–1491.
- Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., and Vidal-Carou, M.C. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric.Food Chem.*45: 2036–2041.
- Ward, D.R. 1994. Microbiological quality of fishery products. In: *Fisheries Processing Biotechnological Application*. Martin, A.M. (Ed.) Chapman Hall, United Kingdom, London, pp. 1-17.
- 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.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. *Food Chem.* 83: 409–416.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., and Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci.* 69: FCT312- FCT319.
- Zen, J.M., Lai, Y.Y., Yang, H.H., and Kumar, A.S. 2002. Multianalyte sensor for the simultaneous determination of hypoxanthine, xanthine and uric acid based on a preanodized nontronite-coated screen-printed electrode. *Sens. Actuators, B: Chemistry.* 84: 237–244.

ภาคผนวก



ใบตอบรับการตีพิมพ์ผลงานวิจัย

To: Jirawat Yongsawatdigul

Subject: Journal of Aquatic Food Product Technology - Decision on Manuscript ID WAFP-2014-0031.R1

01-Aug-2014

Dear Dr Yongsawatdigul:

Ref: Chemical Parameters for Traceability of Raw Material Freshness of Tropical Surimi

Our reviewers have now considered your paper and have recommended publication in Journal of Aquatic Food Product Technology. We are pleased to accept your paper in its current form which will now be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

We will forward your manuscript to the publisher for final editing and formatting. The publisher will send proofs (read notice below) to you about two months prior to the assigned publication date and requests that proofs be checked and returned to the publisher within 48 hours of receipt.

Please be aware that the Journal has accepted a large number of manuscripts recently. This has caused an unfortunate delay in publication. From the time a paper is accepted, there may be a period of two years before the paper appears in print. You will not receive proofs until approximately 1-2 months prior to publication.

However, the authors' version of your manuscript will be pre-published online (with citable DOI number) 1 year prior to the print publication. Our publisher will notify you when your author's manuscript is available online.

Thank you for your contribution to Journal of Aquatic Food Product Technology. We look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,

Professor Green
Co-Editor, Journal of Aquatic Food Product Technology
dpg@ncsu.edu

To be submitted to
Journal of Aquatic Food Product Technology

Chemical Parameters for Traceability of Raw Material Freshness of Tropical Surimi

Jirawat Yongsawatdigul¹, Wasana Wongngam¹, and Buratin Khampirat²

¹School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of
Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

²School of General Education, Institute of Social Technology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima 30000, Thailand

Running title: Traceability of raw material freshness of surimi

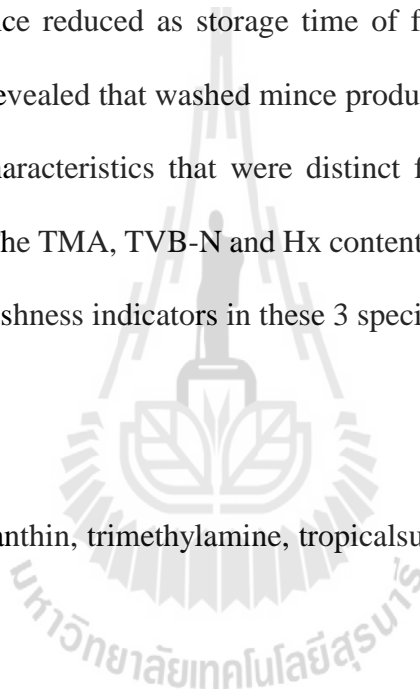
This research was financially supported by the Suranaree University of Technology under a grant agreement (SUT 19/2555). WW received a Postgraduate Fellowship from the Suranaree University of Technology, supported by the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission.

Corresponding should be addressed to Dr. Jirawat Yongsawatdigul, Associate Professor, School of Food Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand. E-mail: jirawat@sut.ac.th.

Abstract

Changes in chemical parameters of tropical fish used for surimi production, namely, threadfin bream (TB, *Nemipterus* spp.), lizardfish (LZ, *Saurida* spp.) and goatfish (GF, *Upeneus* spp.), during ice storage and their respective washed mince were investigated. Total volatile base nitrogen (TVB-N), trimethylamine (TMA), hypoxanthine (Hx) and total biogenic amine (BA) content of mince increased with storage time. Crude protein of fish and their respective washed mince reduced as storage time of fish was prolonged. Principal component analysis (PCA) revealed that washed mince produced from fish stored in ice for 7-12 d showed chemical characteristics that were distinct from those of washed mince prepared from spoiled fish. The TMA, TVB-N and Hx content of washed mince appeared to be sufficient raw material freshness indicators in these 3 species.

Keywords: freshness, hypoxanthin, trimethylamine, tropical surimi, traceability



Introduction

Surimi production from tropical fish has continually increased in the past decade and has been estimated to be 500,000 metric tons (MT) in recent years (Guenneugues and Ianelli, 2014). The tropical fish used for the majority of surimi production include threadfin bream (TB, *Nemipterus* spp.), lizardfish (LZ, *Saurida* spp.) and goatfish (GF, *Upeneus* spp.), with the total catch of these 3 species estimated to be 775,431MT (FAO, 2013). The freshness of fish is considered to be a key factor governing surimi quality. Cold and temperate species, such as Alaska pollock or Pacific whiting, are typically processed into surimi within 24-48 h after catch. However, tropical fish are handled differently. Fish are stored on board with a limited amount of ice after they are caught and are then processed to surimi within 7-14 d (Guenneugues and Ianelli, 2014). After they are caught, the fish undergo biochemical and microbiological changes, which would inevitably affect the quality of the surimi. Despite their large catches, biochemical changes related to the freshness quality of these 3 species during storage have not been well elucidated.

Nucleotide degradation products including adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP), inosine monophosphate (IMP), inosine (HxR) and hypoxanthine (Hx) have long been used to estimate the freshness quality of fish (Ryder, 1985). Trimethylamine (TMA), total volatile basic nitrogen (TVB-N) and biogenic amines are quality indices correlating well with microbial deterioration (Ocaño-Higuera et al., 2009). Changes of biochemical and freshness parameters during ice storage have been studied in various fish species including flounder (*Psettodes erumei*) (Massa et al., 2005), sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Özogulet al., 2006), meagre (*Argyrosomus regius*) fillets (Hernández et al., 2009), red mullet (*Mullusbar batus*) and goldband goatfish (*Upeneus*

moluccensis) (Özyurt et al., 2009) and wild common sole (*Solea solea*) (Özoğul et al., 2011). Freshness quality of tropical Indian marine fish such as silver jewfish, Bombay duck, big-eye tuna, Chinese pomfret and ribbon fish has also been investigated (Reza et al., 2009). However, freshness indicators of tropical fish used as raw material for surimi industry, particularly threadfin bream, goat fish and Lizard fish, have not been systematically elucidated.

In surimi (washed mince) production, fish mince is extensively washed to remove sarcoplasmic proteins. The washing process inevitably removes trimethylamine, biogenic amines, hypoxanthine and other water-soluble compounds that resulted from freshness deterioration. The most studied surimi quality, its gel-forming ability, greatly varies with the freshness quality of the raw material (Yongsawatdigul and Park, 2002). However, the textural properties of surimi could be manipulated by the addition of certain functional proteins, such as egg white powder. Solely the gel-forming property might not be sufficient for the complete assessment of the freshness quality of the raw material for surimi production. Chemical parameters of surimi that allow tracing back the freshness quality of the raw material would be critical to assure the wholesomeness of the raw material used for surimi production. The objectives of this study were to investigate changes in the freshness quality and the biochemical properties of TB, LZ and GF muscle proteins stored in ice as well as their subsequent washed mince. Quality markers of these tropical fish species and their respective washed mince were also determined.

Materials and methods

Chemicals

Adenosine-5'-triphosphate (ATP) was purchased from Fluka Company (Buchs, Switzerland). Bovine serum albumin (BSA) and standard biogenic amines including histamine dihydrochloride, cadaverine dihydrochloride, tyramine hydrochloride, putrescine dihydrochloride, spermidine trihydrochloride and spermine diphosphate were obtained from Sigma Chemical Company (St. Louis, *Missouri*, USA). All other chemicals were analytical grade.

Fish samples

TB, LZ and GF with a weight of 30-61 g/fish were obtained from *Andaman Surimi Industries Co.,Ltd.* (Samutsakorn, Thailand). The fish were stored in ice on a fishing vessel and delivered to the plant within 7 d after catch. Upon off-loading, the fish were placed in a polystyrene box filled with ice and immediately transported to the School of Food Technology at Suranaree University of Technology in Nakhon Ratchasima, Thailand within 5 h. Upon arrival, the melted ice was drained off and fresh ice was added. Fish samples in polystyrene boxes filled with ice were kept in a 4⁰C cold room and were taken for all analyses at 0, 5, 10 and 20 d of storage at the laboratory, which corresponded to 7, 12, 17 and 27 d after catch, respectively. The draining of melted ice and the addition of new ice was carried out on a daily basis during the course of the study. The average temperature of fish samples during the entire storage time was 0±0.5⁰C.

Washed mince preparation

The fish were manually beheaded, gutted, and filleted. The fish fillets were ground using a meat grinder (PM 500, Kenwood, Hampshire, UK) with a screen size of 4.5-mm

perforation. A 3- washing process was performed using a 1:3 (w/v) ratio of mince to cold portable water (4⁰C). Each washing cycle was stirred for 5 min. The third washing cycle was carried out using 0.3% NaCl (w/v). Dewatering at the final washing step was carried out using centrifugation at 4,500 ×g for 15 min at 4⁰C (LegendTM MACH 1.6/R, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Germany). Proximate composition, namely moisture, ash, crude protein and crude fat, of mince and washed mince was followed AOAC (2005). The washed mince was mixed with cryoprotectants (6% sucrose and 0.3% sodium tripolyphosphate), vacuum-packed and kept frozen at -20⁰C. The chemical analyses of washed mince were carried out within 7 d.

Ca²⁺-ATPase activity

The actomyosin of mince and washed mince was prepared according to the method of Yongsawatdigul and Park (2003) with slight modifications. The sample (2 g) was mixed with cold 0.6 M NaCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7) at a ratio of 1:9 (w/w). The protein concentrations were measured by the Bradford method (Bradford, 1976) using BSA as a standard. The salt-soluble protein was expressed as mg/g protein.

The Ca²⁺-ATPase activity of actomyosin was determined according to the method of Hemung et al. (2008). The liberated inorganic phosphate content was measured according to the method of Fiske and Subbarow (1925). The Ca²⁺-ATPase activity was expressed as μmol inorganic phosphate (Pi) released/mg protein/min. A blank was prepared by adding chilled trichloroacetic acid prior to the addition of ATP.

Hypoxanthine (Hx)

The sample extraction was carried out according to the method of Burns and Kee (1985) with modifications. The sample (5 g) was homogenised with 40mL of a cold 7.5%

perchloric acid solution, and centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C for 5 min. The supernatants were filtered through Whatman No.1 filter paper and the filtrates were adjusted to a total volume of 50 mL with cold 7.5% perchloric acid solution. Subsequently, the supernatants were mixed with 0.6 M neutralising buffer (pH 7.6) at a ratio of 1:1 (v/v) and kept at 4°C for 10 min. The mixture was filtered with a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ membrane filter and analysed for nucleotides using an HPLC equipped with a multi-wavelength detector (Agilent 1260 Infinity series, Agilent Technologies, Santa Clara, *California*, USA). Samples ($10\ \mu\text{L}$) were injected onto a Hypersil BDS C_{18} column ($100 \times 4\ \text{mm}$, $3\ \mu\text{m}$, $100\ \text{\AA}$, Agilent Technologies, Santa Clara, *California*, USA). The column was eluted with a mobile phase containing $0.02\ \text{M}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ and $0.03\ \text{M}\ \text{K}_2\text{HPO}_4$ at a flow rate of $1\ \text{mL}/\text{min}$. The Hx was monitored at $254\ \text{nm}$ and is expressed as $\mu\text{mol Hx}/100\ \text{g sample}$.

Trimethylamine (TMA)

The TMA was determined by the modified Dyer Picrate method (AOAC, 2005). Samples were homogenised in cold 7.5% (w/v) trichloroacetic acid at a ratio of 1:4 (w/w). The homogenate was centrifuged at $8,000 \times g$ for 10 min at 4°C and the supernatant was collected. TMA was extracted using toluene and reacted with 1% picric acid. The absorbance was measured at $410\ \text{nm}$ using TMA as a standard. The TMA content was expressed as mg TMA/100 g sample.

Total volatile base-nitrogen (TVB-N)

The TVB-N was determined by the method of Botta et al. (1984) with a slight modification. Sample (10 g) was added to 2 g MgO and 40 mL distilled water. Steam distillation was performed using a distillation apparatus (Kjeltech System, Hoganas, Sweden) and 10 mL of 20% NaOH were added. Distillation was continued until a final

volume of 50mL was obtained in a 150mL conical flask containing 25mL of 4% boric acid and methyl red-bromocresol green indicator. The distillate was titrated with 0.1 M HCl and the TVB-N was calculated and expressed as mg TVB-N/100 g sample.

Biogenic amines

The sample extraction was carried out according to the method of Eerola et al. (1993) with slight modifications. The samples were homogenised with 0.4 M perchloric acid at a ratio of 1:4 and centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min at 4°C . One mL of the appropriately diluted extract was added to a $1 \mu\text{g/mL}$ 1, 7-diaminoheptane solution (internal standard) and reacted with a dansyl chloride solution (10 mg/mL) at 40°C for 45 min. Residual dansyl chloride was removed by the addition of $300 \mu\text{L}$ of 30% ammonia. After sitting at room temperature for 30 min, the extracts were adjusted to 5 mL with acetonitrile. The solution was filtered through a $0.45\text{-}\mu\text{m}$ regenerated cellulose membrane filter. The biogenic amines were separated by HPLC equipped with a Hypersil BDS reversed phase C_{18} column ($100 \times 4 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$, 100 \AA) as detailed by Yongsawatdigul et al. (2004).

Statistical analyses

Two separate lots of fish were used. All analyses were carried out in duplicate for each replicate. An analysis of variance (ANOVA) was performed to determine the effect of storage time. Duncan's multiple range test (DMRT) was used to determine differences between means at $p \leq 0.05$. Principal component analysis (PCA) of the chemical parameters at various storage times were analysed using the XLSTAT software (Addinsoft, New York, NY, USA). Statistical analysis was performed using the SPSS package (SPSS 17.0 for Windows, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results and discussion

Changes of proximate composition

The crude protein content of all studied species decreased during the 27-day storage in ice with the greatest reduction close to a 25% reduction in GF ($p \leq 0.05$, Table 1). The crude fat content also appeared to decrease with storage time but not as obvious as crude protein. The degradation of the myofibrillar proteins caused by endogenous proteinases during ice storage likely leads to protein reduction. In addition, leaching of water soluble protein during ice storage probably causes protein reduction. This was in agreement with Reza et al. (2009), who found that the protein content of various fish species, namely silver jewfish, Bombay duck and ribbon fish, decreased gradually during 13 d of ice storage.

The ash content of LZ and GF mince decreased with storage time. This may be related to the loss of minerals from the fish tissues. The fat content of LZ and GF decreased during ice storage ($p \leq 0.05$), whereas only subtle changes were observed in TB mince ($p > 0.05$). The moisture content generally increased with storage time, especially in TB and GF mince. Water uptake by the muscles from the melted ice could lead to an increase in moisture content. This moisture increase, in turn, reduced the protein and fat proportion. Reza et al. (2009) also reported that the moisture content of silver jewfish (*Johnius argentatus*), Bombay duck (*Harpodon nehereus*), big-eye tuna (*Scomberomorus gottatus*), Chinese pomfret (*Stromateus chinensis*) and ribbon fish (*Trichiurus haumela*) increased after 13 d of ice storage. A decrease in crude fat of LZ and GF could also imply the higher extent of lipid oxidation during ice storage of these 2 species.

After the washing process, the protein, ash and fat contents of all washed mince in dry basis were lower than their respective mince ($p \leq 0.05$, Table 1), which is attributed to the

washing process removing soluble proteins, fat and muscular ions. Change of fat content of washed minces with respect to storage time of raw material appeared to be subtle ($p>0.05$), while ash content of washed mince increased with storage time of raw material. The moisture content of washed LZ and TB mince also increased when the storage time of the raw material was extended ($p\leq 0.05$). The pH of mince with prolonged storage time was approximately 7.2, which is a shift further from the muscle pI, allowing a greater extent of water absorption after being washed. These results indicate that the composition of washed mince greatly varied with the storage time of the raw material. Protein loss during washing occurred to a greater extent when aged fish were used. This could be because muscle protein degradation induced by endogenous and microbial proteinases during extended storage. Our results indicated that washed mince (surimi) produced from tropical fish with low freshness quality tended to contain higher moisture and lower protein content.

Changes of total biogenic amines (BAs)

The major BAs found in the 3 tropical fish species were putrescine, cadaverine, histamine and tyramine, which were presented as total biogenic amine content in this study. The total BA content of minces and their respective washed minces increased with the storage time of the raw material ($p\leq 0.05$, Table 1). BAs have been known as a spoilage indicator of various fish species. The dominant BAs for the goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) are histamine, agmatine, dopamine and putrescine, while those of the red mullet (*Mullus barbatus*) are agmatine, serotonin, histamine and dopamine (Özyurt et al., 2009). Putrescine and cadaverine are predominantly found in white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice (Özogulet et al., 2008). In addition, 2-phenylethylamine, dopamine, agmatine, tryptamine and serotonin were found in spoiled white grouper after 22 d in ice

(Özogulet al., 2008). The levels of total BA in mince were approximately 7 times greater than washed mince, indicating that they were largely removed during the washing process. A total BA index limit of acceptability of iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*) stored in ice was proposed to be in a range of 1.5–2.0 mg/100g with putrescine and cadaverine being the main amines, while histamine and tyramine being less abundant (Baixas-Nogueras et al., 2005). In addition, Veciana-Nogués et al. (1997) suggested that the sum of histamine, tyramine, putrescine, and cadaverine not exceeding 5 mg/100 g could be used as an acceptance limit for tuna (*Thunnus thynnus*) stored at 0°C. In this study, early spoilage was observed after 12 day storage, corresponding to total BA content of 1–5 mg/100 g, depending on species (Table 1). Low levels of total BA were most likely due to the limited amount of free amino acid substrates. Free amino acids present in the tissues and exposure to spoilage bacteria depends on the aquatic environment, fish species, and the specific bacterial microflora, which is the number of bacteria originating from cross-contamination postharvest. Relatively high BA content was observed in LZ stored in ice for 27 d, which was in agreement with extreme spoilage condition. Major BAs of the extremely spoiled LZ were cadaverine, putrescine and tyramine with the levels of 23.2, 12.8, and 10.5 mg/100 g, respectively. Histamine was less important with the content of 1.0 mg/100 g in the spoiled LZ. Baixas-Nogueras et al., (2005) reported that cadaverine was the main biogenic amine in Mediterranean hake stored in ice and its content well correlated with the count of *Shewanella putrefaciens*. Two different species of Enterobacter isolated from mackerel, saury, Spanish mackerel and amberjack were also found to produce high levels of putrescine and cadaverine (Kim et al., 2009). Our study revealed that the total BA might be applicable as one of spoilage indicators of mince of the 3 species. However, it might not be appropriate as a

freshness indicator of washed mince raw material for these 3 species because BAs are largely removed by washing. Total BA contents of washed mince were very low despite of extremely spoiled raw materials (day 17-27) were used.

Integrity of myofibrillar proteins

Myofibrillar proteins are major component responsible for gelation of mince and washed mince. Integrity of myofibrillar proteins correlates well with salt-extractable protein content and Ca^{2+} -ATPase activity. At day 7, the TB mince exhibited the highest salt-soluble protein content of 850.3mg/g protein ($p \leq 0.05$, Table 1). The salt extractable protein of minces markedly decreased during ice storage, indicating conformational changes of myofibrillar proteins during ice storage. A drastic decrease (58.9-63.1%) in Ca^{2+} -ATPase activity was observed in LZ and GF mince after 17 d in ice, while a 45.7% decrease was found in TB mince. These results suggested that the globular head of TB myosin appeared to be the most stable among the 3 species studied. Yongsawatdigul and Park (2002) reported that the Ca^{2+} in TB muscle proteins decreased during ice storage, which corresponded to a decrease of the textural properties. In addition, Benjakulet al. (2003) found that a decrease in the Ca^{2+} -ATPase activity of lizard fish might be associated with the proteolysis of the myosin molecule. Therefore, conformational changes of myosin heads induced by aggregation and/or proteolysis during ice storage resulted in a decreased of Ca^{2+} -ATPase activity. Washed mince produced from fish stored for a longer period of time in ice also exhibited less salt-extractable protein and lower Ca^{2+} -ATPase activity ($p \leq 0.05$, Table 1), indicating a higher degree of conformational changes of myosin heads. Based on this study, both Ca^{2+} -ATPase activity and salt extractable protein content appeared to be good indicators of the freshness quality of mince and they reflected the quality of the surimi raw

material. Unfortunately, these values might not be practically applied for frozen surimi. Frozen denaturation is also a main cause of the reduction in salt extractable protein and Ca^{2+} -ATPase activity. When lower values of these parameters were observed in frozen surimi, it indicated either low freshness quality of the raw material or a greater extent of frozen denaturation.

Changes of spoilage indicators

The Hx in fish mince increased with storage time up to 17 d and decreased at day 27 ($p \leq 0.05$, Figures 1a). Such a decrease was due to degradation of Hx to xanthin and other products by microbial action. Based on the sensory characteristics of fish, the freshness quality of 3 fish species stored for 7 d in ice was considered acceptable, early spoilage was noticed at day 12 and those stored for 17-27 d underwent extreme deterioration. Thus, Hx is not a good indicator when fish is in the state of severe spoilage like 27-day-old fish. Hx content of washed mince samples also increased with storage time of their respective raw materials (Figure 1b). The Hx values of washed mince samples were approximately 6.6 times lower than those of the mince counterparts, but they were still in the detection limit. These results indicated that Hx is a good indicator for early spoilage, but not extremely spoiled condition for these 3 species. In addition, it appeared to be a potential indicator for tracing back the freshness quality of the raw material used for surimi production of these species.

TMA is related to the bacterial reduction of trimethylamine oxide (TMAO) (Ocaño-Higuera et al., 2009). TVB-N and TMA of the 3 species and their respective washed mince increased with storage time ($p \leq 0.05$, Figure 2a-d). At 7 d in ice, all 3 species, namely GF, TB, and LZ, exhibited acceptable quality with TMA content of 0.9, 2.9, and 10 mg/100 g, respectively. The maximum acceptable limit of TMA appeared to be varied with species. A

TMA value of 5 mg /100 g was proposed as the upper limit of acceptability for consumption of Mediterranean hake (Baixas-Nogueras et al., 2003). The early spoilage of all 3 species at day 12 resulted in relatively high TMA contents of > 25 mg/100g. The GF mince showed the highest TMA content when stored in ice for 27d. This result confirmed that TMA could be used as a freshness indicator of these 3 tropical species. Changes in TMA were lowest in the washed GF mince. In general, the TVB-N and TMA contents of the washed mince were up to 4.4 and 10.1 times lower than those of the mince counterparts, respectively, which indicated that these compounds were also largely removed by washing. The TMA content of washed GF, TB, and LZ mince prepared from raw material at early spoilage of 12 d was 2, 5, and 2 mg/100 g, respectively (Figure 2b). Therefore, these could be the maximum TMA limits proposed for washed mince of respective tropical species. It should be noted that TMA contents of washed GF mince were lowest during the course of ice storage as compared to other species. The extent of TMA removal from fish tissue is likely species-dependent.

European commission has currently established a limit of consumption acceptability for different fish species in the range of 25 to 35 mg/100 g (European Regulation, 2008). The early spoilage at 12-d storage in ice resulted in TVB-N of 23-27 mg/100 g in all 3 species (Figure 2c). The respective washed mince exhibited TVB-N content of 3, 7, and 10 mg/100 g for GF, TB, and LZ, respectively. Thus, these values could be used as the maximum TVB-N limit for respective washed mince. Higher TVB-N content than these set limits would suggest that washed mince would likely be prepared from unwholesome raw materials. TMA and TVB-N contents of washed mince appeared to correlate well with freshness quality of raw materials used.

PCA of chemical parameters

PCA analysis of all measured parameters generated 3 principal components that accounted for 86.23% of the total variance (Figures 3a, b). TMA, TVB-N, Hx, total BA, and salt-extractable protein content were well classified in PC1. The ash content fell in PC2, while crude protein and moisture were classified in PC3. Ca^{2+} -ATPase activity could be described by both PC1 and PC2, whereas crude fat was in both PC2 and PC3. The PC plots indicated that the measured chemical parameters of minces significantly changed with storage time and those of washed minces greatly varied with the storage time of the raw materials (Figures 3 a, b). Mince and washed mince samples were well separated into 2 clusters that had good correlation with the storage time of the raw material (Figures 3a, b). The LZ stored in ice for 27 d (LM27) showed distinct chemical parameters from others, particularly total BA content (Figure 3a), while the GF stored in ice for 27 d (GM27) uniquely differentiate from others due to its relatively low protein content (Figure 3b, Table 1). Washed mince samples were separated by storage time of their respective raw materials (Figure 3a). The washed mince of GF prepared immediately after off-loading (7-day-old) and that prepared from an early spoilage stage (12-day-old) fell into the same cluster as those prepared from 7-day-old TB and LZ (Figure 3a). It should be mentioned that washed GF mince prepared from 27-day-old fish (GM27) showed comparable biochemical characteristics as that prepared from 17-day-old fish. In contrast, washed minces of LZ and TB prepared from 17-day-old fish were clearly differentiated from those prepared from 27-day-old counterparts. These results indicated that postharvest biochemical changes and microorganisms contaminating the muscle tissue greatly varied with species, leading to different extent of formation of degraded products and metabolites associated with spoilage. The extent of spoilage of GF

stored in ice for 17 and 27 days was comparable, resulting in similar washed mince characteristics.

Salt-extractable protein and Ca^{2+} -ATPase activity of washed mince correlated well with freshness quality of raw materials (Figure 3a,b), suggesting that these are potential indicators reflecting freshness quality of raw material. However, these parameters are only applicable for fresh (unfrozen) surimi, but not frozen product since freezing also greatly reduced these values. Based on this study, biochemical characteristics of washed mince (surimi) greatly varied with freshness quality of raw material. TMA, TVB-N and Hx of washed mince of the 3 species studied could be used to reflect freshness quality of their raw material.

Conclusions

This is the first attempt to determine the quality indicators of washed mince that can reflect the freshness quality of its raw material. This is an important measure to assure that only wholesome fish are used for washed mince/surimi production. Among the various parameters studied, TMA, TVB-N and Hx of washed mince were found to be good freshness indicators of raw material with less species-specificity. A PC plot of the chemical parameters revealed that washed mince from all 3 major tropical species can be differentiated based on the freshness quality of the raw material.

References

- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists International 18th ed. Latimer, G.W., and Horwitz, W. (Eds.) Gaithersburg, MD. p. 473.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., Mariné- Font, A., and Vidal-Carou, M.C. 2005. Biogenic amines index for freshness evaluation in iced Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). J. Food Prot. 68: 2433–2438.
- Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogués, M.T., and Vidal-Carou, M.C. 2003. Suitability of volatile amines as freshness indexes for iced Mediterranean hake. J. Food Sci. 68: 1607-1610.
- Benjakul, S., Visessanguan, W., and Tueksuban, J. 2003. Changes in physico-chemical properties and gel-forming ability of lizardfish (*Saurida tumbil*) during post-mortem storage in ice. Food Chem. 80: 535–544.
- Botta, J.R., Lauder, J.T., and Jewer, M.A. 1984. Effect of methodology on total volatile basic nitrogen (TVBN) determination as an index of quality of fresh Atlantic cod (*Gadus morhua*). J. Food Sci. 49: 734-736, 750.
- Bradford, M.B. 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 21: 248-254.
- Burns, B.G., and Kee, P.J. 1985. Liquid chromatographic determination of hypoxanthine content in fish tissue. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 68: 444–448.

- European Regulation. 2008. Commission Regulation (EC) No 1022/2008 of 17 October 2008. Amending Regulation (EC) No 2074/2005 as regards the total volatile basic nitrogen (TVB-N) limits. *Offic. J. Eur. Comm. L277*: 18–20.
- Eerola, S., Hinkkanen, R., Linfords, E., and Hirvi, T. 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. *J. Assoc. Off. Analyt. Chem. Int.* 76: 575–577.
- FAO. 2013. Global Production Statistics 1950-2011. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Retrieved November 2010, from http://www.fao.org/figis/servlet/SQServlet?file=/work/FIGIS/prod/webapps/figis/temp/hqp_19988953236922551.xml&outtype=html.
- Fiske, C. H., and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Bio. Chem.* 66: 375–400.
- Guenneugues, P., and Ianelli, J. 2014. Surimi resources and market. In. *Surimi and Surimi Seafood* 3rd edition. Park, J.W. (Ed.) Boca Raton, Taylors & Francis Group. pp. 25-53.
- Hernández, M.D., López, M.B., Álvarez, A., Ferrandini, E., GarcíaGarcía, B. and Garrido, M.D. 2009. Sensory, physical, chemical and microbiological changes in aquacultured meagre (*Argyrosomus regius*) fillets during ice storage. *Food Chem.* 114: 237-245.
- Hemung, B.O., Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, Y. 2008. Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. *Food Chem.* 111: 439–446.
- Kim, M.K., Mah, J.H., and Hwang, H.J. 2009. Biogenic amine formation and bacterial contribution in fish, squid and shellfish. *Food Chem.* 116: 87-95.

- Massa, A.E., Palacios, D.L., Paredi, M. and Crupkin, M. 2005. Postmortem changes in quality indices of ice stored flounder (*Paralichthys patagonicus*). Food Biochem. 29: 570-590.
- Ocaño-Higuera, V.M., Marquez-Ríos, E., Canizales-Dávila, M., Castillo-Yáñez, F.J., Pacheco-Aguila, R., Lugo-Sánchez, M.E., García-Orozco, K.D., and Graciano-Verdugo, A.Z. 2009. Postmortem changes in cazon fish muscle stored on ice. Food Chem. 116: 933–938.
- Özyurt, G., Kuley, E., Özkütük, S., and Özogul, F. 2009. Sensory, microbiological and chemical assessment of the freshness of red mullet (*Mullusbar batus*) and goldband goatfish (*Upeneus moluccensis*) during storage in ice. Food Chem. 114: 505–510.
- Özogul, F., Gökbulut, C., Özogul, Y. and Özyurt, G. 2006. Biogenic amine production and nucleotide ratios in gutted wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*) stored in ice, wrapped in aluminium foil and wrapped in cling film at 4 °C. Food Chem. 98:76-84.
- Özogul, F., Özogul, Y., and Kuley, E. 2008. Nucleotide degradation and biogenicamine formation of wild white grouper (*Epinephelus aeneus*) stored in ice and at chilltemperature (4°C). Food Chem. 108: 933–941.
- Özoğul, Y., Boğa, E.K., Tokur, B. and Özoğul, F. 2011. Changes in biochemical, sensory and microbiological quality indices of common sole (*Solea solea*) from the Mediterranean sea, during ice storage. Turkish J. Fish Aquat. Sci. 11: 243-251.
- Reza, M.S., Bapary, M.A.J., Ahasan, C.T., Islam, M.N., and Kamal, M. 2009. Shelf life of several marine fish species of Bangladesh during ice storage. Int. J. Food Sci. Tech. 44: 1485–1494.

Ryder, J.M. 1985. Determination of adenosine triphosphate and its breakdown products in fish muscle by high performance liquid chromatography. *J. Agri. Food Chem.* 33: 678–680.

Veciana-Nogués, M.T., Mariné-Font, A., and Vidal-Carou, M.C. 1997. Biogenic amines as hygienic quality indicators of tuna. relationships with microbial counts, ATP-related compounds, volatile amines, and organoleptic changes. *J. Agric.Food Chem.*45: 2036–2041.

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.

Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. 2003. Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. *Food Chem.* 83: 409–416.

Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., and Udomporn, S. 2004. Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). *J. Food Sci.* 69: FCT312- FCT31

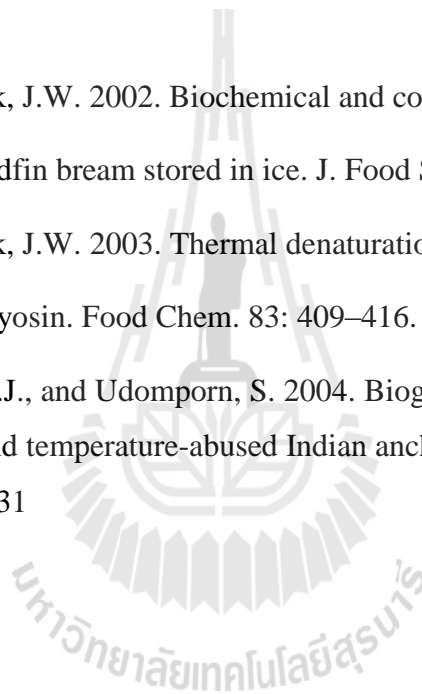


TABLE 1 Changes of proximate composition and biochemical parameters of fish and washed mince obtained from threadfin bream (TB), lizardfish (LZ), and goatfish (GF) during ice storage.

Sample	Storage time of raw material (day)	Crude protein (%) [*]	Ash (%) [*]	Crude fat (%) [*]	Moisture (%) ^{**}	Total biogenic amine (mg/100 g)	Salt extractable protein (mg/g protein)	Ca ²⁺ -ATPase activity (μmole/mg protein/min)	
Fish	LZ	7	87.70 ^a	1.34 ^a	4.05 ^a	82.2	3.26 ^c	682.7 ^a	0.1370 ^a
		12	86.35 ^a	0.68 ^b	4.48 ^a	81.54	5.47 ^c	419.1 ^b	0.1197 ^b
		17	69.42 ^b	1.38 ^a	3.81 ^a	81.74	26.87 ^b	419.9 ^b	0.0505 ^c
		27	67.79 ^b	0.97 ^{ab}	2.93 ^b	82.29	47.70 ^a	186.7 ^c	0.0387 ^d
	TB	7	79.71 ^a	4.17	5.91	81.69 ^b	0.68 ^d	850.3 ^a	0.1117 ^a
		12	86.30 ^a	3.26	5.22	81.79 ^b	2.24 ^c	549.4 ^b	0.0887 ^b
		17	66.92 ^b	4.4	5.12	81.59 ^b	10.38 ^b	407.9 ^c	0.0607 ^c
		27	68.85 ^b	3.42	5.13	83.32 ^a	16.71 ^a	224.8 ^d	0.0384 ^d
	GF	7	60.32 ^b	10.09 ^b	5.16 ^a	78.52 ^b	0.00 ^d	840.0 ^a	0.1138 ^a
		12	56.64 ^b	9.25 ^{bc}	4.77 ^{ab}	78.76 ^b	1.25 ^c	536.5 ^b	0.1021 ^b
		17	70.14 ^a	7.48 ^c	4.71 ^{ab}	79.63 ^a	9.80 ^b	346.8 ^c	0.0468 ^c
		27	44.98 ^c	13.36 ^a	4.33 ^b	79.95 ^a	16.38 ^a	365.1 ^c	0.0364 ^d
Washed mince	LZ	7	60.31 ^a	0.05 ^c	2.74	79.61 ^b	0.13 ^c	784.1 ^a	0.1187 ^a
		12	51.53 ^b	0.53 ^a	3.23	81.75 ^a	3.04 ^b	741.2 ^a	0.1001 ^b
		17	55.05 ^b	0.64 ^a	2.75	80.73 ^{ab}	8.04 ^a	549.4 ^b	0.0680 ^c
		27	46.92 ^c	0.22 ^b	2.75	80.84 ^a	10.24 ^a	240.7 ^c	0.0432 ^d
	TB	7	53.45 ^a	1.69	2.93	80.60 ^c	0.00 ^d	986.2 ^a	0.1337 ^a
		12	57.61 ^a	0.97	3.14	82.32 ^b	0.34 ^c	576.4 ^b	0.1267 ^b
		17	43.23 ^b	1.99	3.12	82.30 ^b	1.93 ^b	578.7 ^b	0.0773 ^c
		27	44.21 ^b	1.28	3.13	83.95 ^a	3.45 ^a	298.6 ^c	0.0470 ^d
	GF	7	56.71 ^a	3.82 ^c	2.71	79.43	0.00 ^c	1078.7 ^a	0.1075 ^a
		12	42.01 ^b	4.98 ^b	2.56	79.63	0.04 ^c	1086.2 ^a	0.0893 ^b
		17	45.52 ^b	5.17 ^{ab}	2.73	80.29	1.41 ^b	451.8 ^b	0.0603 ^c
		27	45.23 ^b	5.80 ^a	2.71	79.63	2.73 ^a	348.6 ^b	0.0439 ^d

* % dry basis, **% wet basis.

Different superscripts in the same column within each fish indicate statistical difference ($p \leq 0.05$).

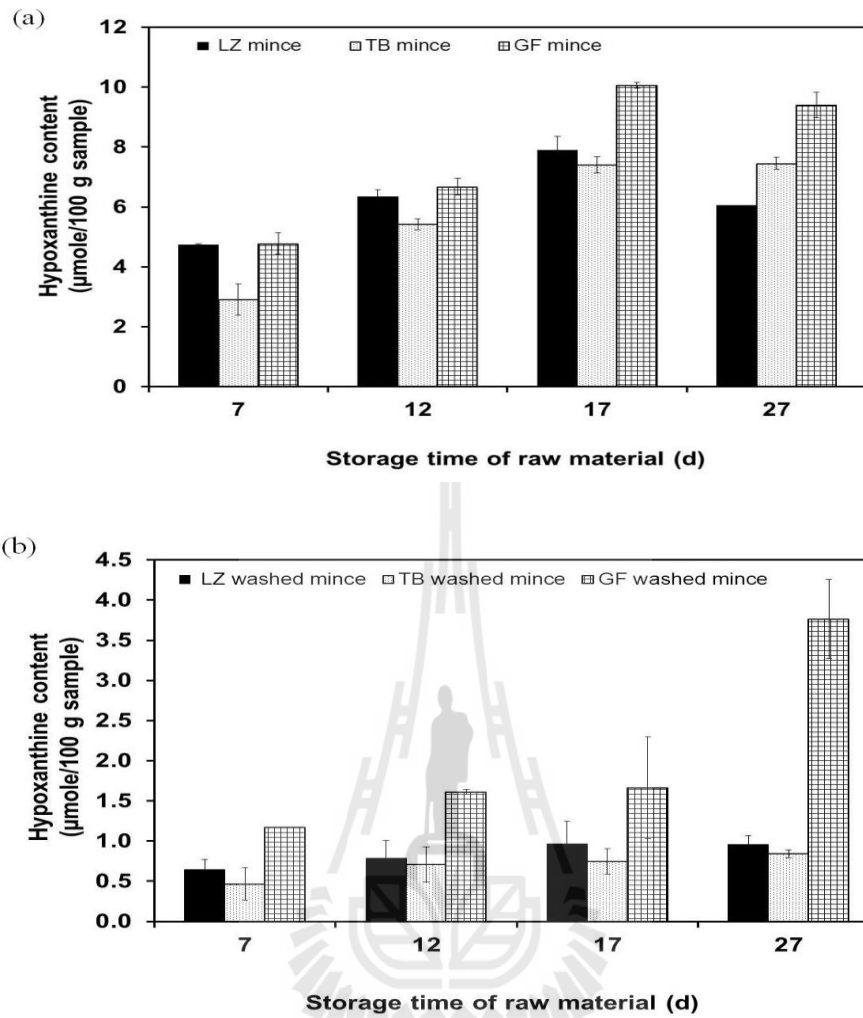


FIGURE 1 Changes in hypoxanthine in mince (a) and washed mince (b) of lizardfish (LZ), threadfin bream (TB), and goatfish (GF) during storage in ice (7, 12, 17, and 27 d). Bars represent the standard deviations (n= 4).

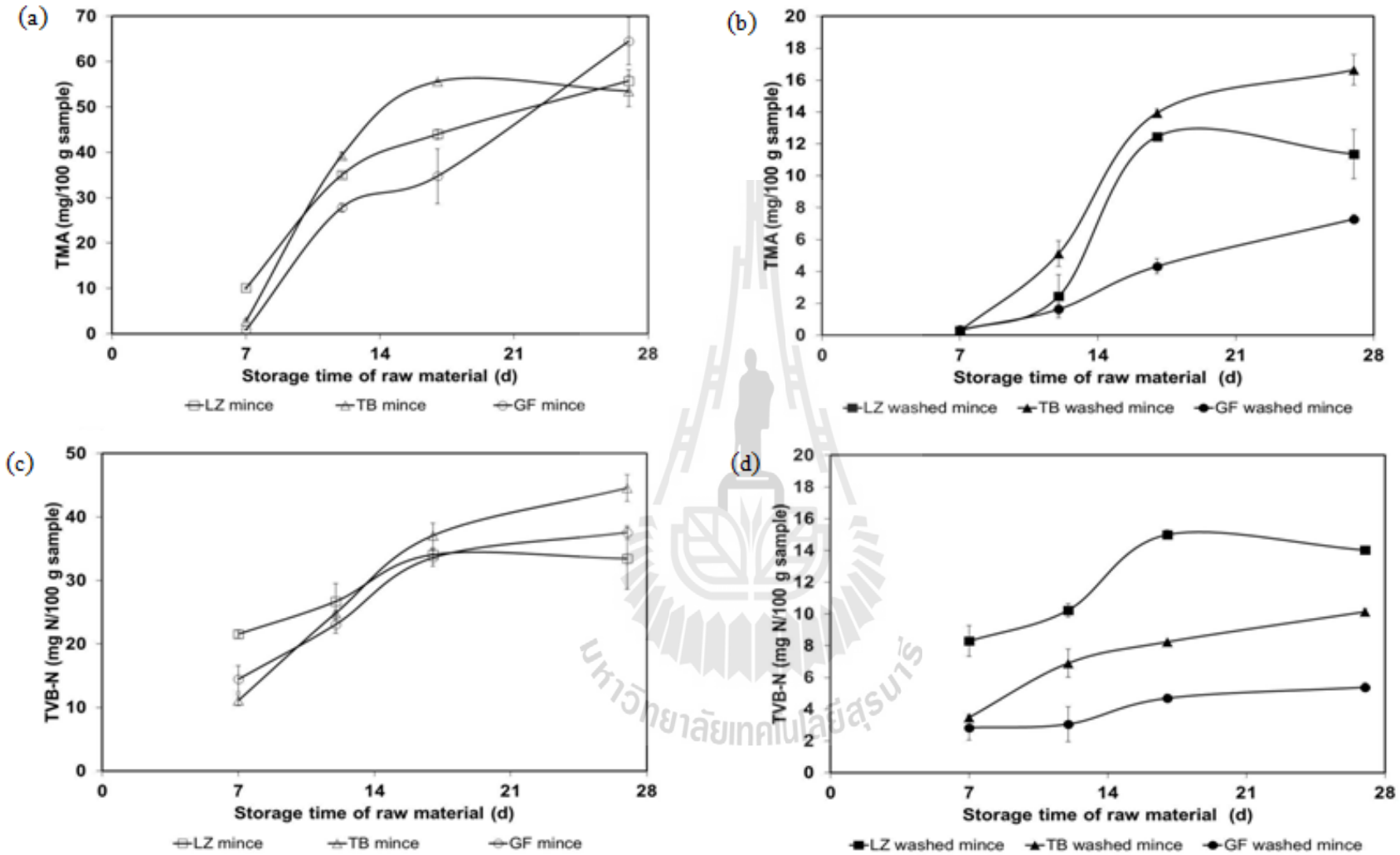


FIGURE 2 Changes in trimethylamine (TMA) in mince (a), TMA in washed mince (b), total volatile base nitrogen (TVB-N) in mince (c), and TVB-N in washed mince (d) of lizardfish (LZ), threadfin bream (TB), and goatfish (GF) during storage in ice (7, 12, 17, and 27 d). Bars represent the standard deviations (n= 4).

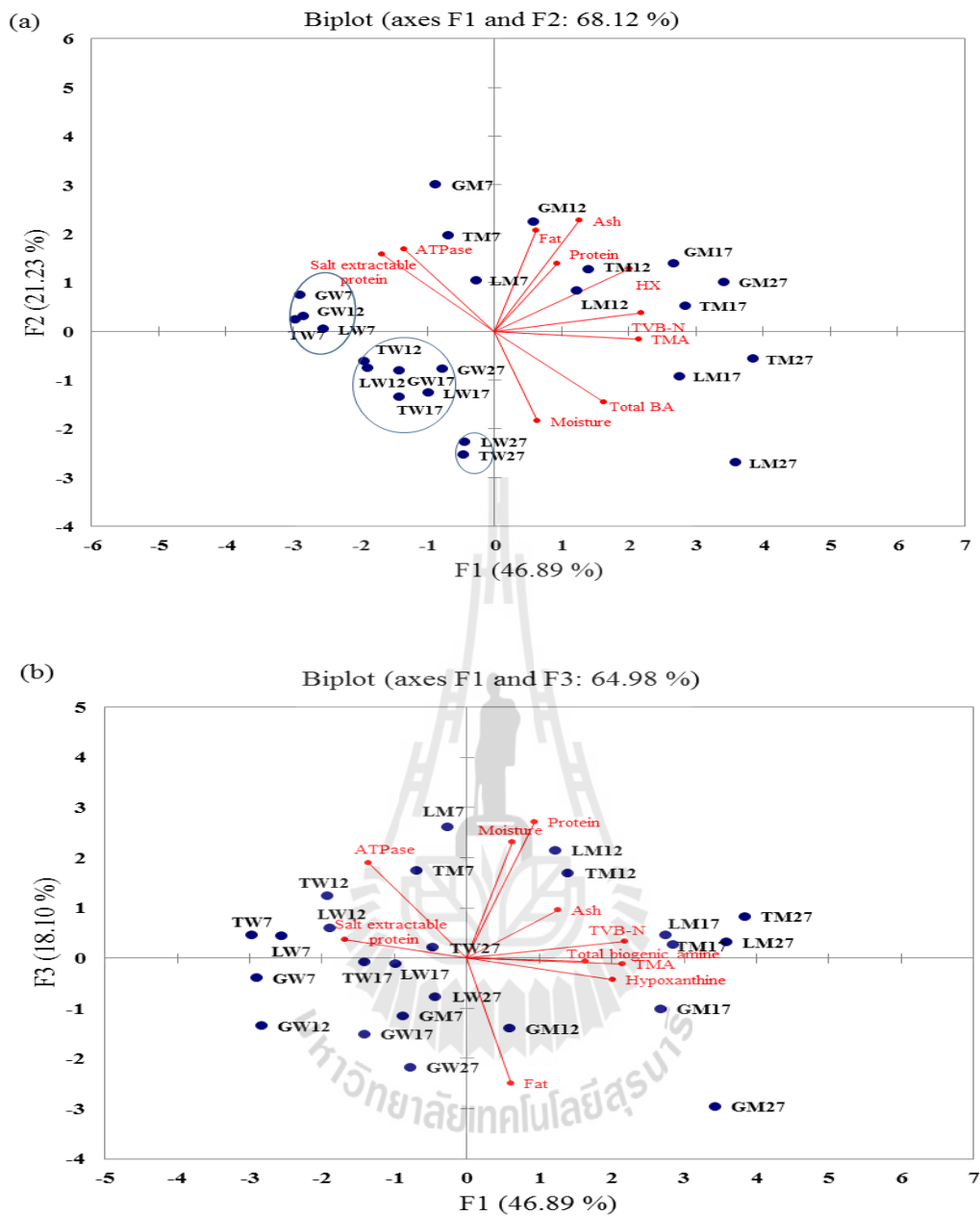


FIGURE 3 Principal component analysis (PCA) for all chemical parameters of mince and washed mince obtained from lizardfish (LZ), threadfin bream (TB), and goatfish (GF) during storage in ice (7, 12, 17, and 27 d). (LM) LZ mince; (LW) washed LZ mince; (TM) TB mince; (TW) washed TB mince; (GM) GF mince; (GW) washed GF mince. Numbers (7, 12, 17, and 27) indicate the day of ice storage. (TMA) trimethylamine; (TVB-N) total volatile base nitrogen; (ATPase) Ca^{2+} -ATPase activity. Data are mean of duplicates (n=2).

ประวัตินักวิจัย



ประวัติหัวหน้าโครงการ

- ชื่อ (ภาษาไทย) นาย จิรวัดน์ นามสกุล ขงสวัสดิกุล
(ภาษาอังกฤษ) Mr. Jirawat Yongsawatdigul
- เลขหมายประจำตัวประชาชน 3101200691826
- ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
- หน่วยงานที่อยู่ติดต่อได้พร้อมโทรศัพท์ โทรสาร และ E-mail
สาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทร 044-22-4359 โทรสาร 044-224-387
E-mail: jirawat@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันศึกษา	ประเทศ
2532	ปริญญาตรี	วท.บ.(วิทยา ศาสตร์บัณฑิต) เกียรตินิยมอันดับ 2	เทคโนโลยี อาหาร	เทคโนโลยี อาหาร	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	ไทย
2535	ปริญญาโท	M.S. (Master of Science)	Food Science Food Science	Food processing	University of Wisconsin-Madison	สหรัฐอเมริกา
2539	ปริญญาเอก	Ph.D. (Doctor of Philosophy)	and Technology	Seafood chemistry	Oregon State University	สหรัฐอเมริกา

- สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
-Food proteins, Food enzymes

- ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพ
ในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละ
ข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

- 1.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย -
- 1.2 หัวหน้าโครงการวิจัย :

1. Factors affecting histamine in fish sauce fermentation
2. Proteinases and transglutaminase activity in freshwater fish species
3. Reduction of biogenic amines content during fish sauce fermentation

1. Influence of freshness quality and actomyosin denaturation on gel-forming ability of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) muscle proteins
2. Purification and characterization of transglutaminase from Tilapia (*Oreochromis niloticus*)
3. Covalent cross-linking of threadfin bream muscle proteins by transglutaminase(s)
4. Inhibition of proteolysis and application of microbial transglutaminase in lizardfish surimi
5. Process development of fish ball and fish sausage from freshwater fish species
6. Biogenic amine formation in anchovies and fermented fish products
10. Acceleration of fish sauce production using starter cultures and proteinases
11. Study in catalytic reaction of transglutaminase in threadfin bream surimi using MALDI-TOF
12. Conformation changes of muscle proteins from tropical fish species.

7.2 ผลงานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

- Wiriyaphan, C., Xiao, H., Decker, E.A. and Yongsawatdigul, J. (2014). Chemical and cellular antioxidative properties of threadfin bream (*Nemipterus* spp.) surimi byproduct hydrolysates fractionated by ultrafiltration. **Food Chem.** 167: 7-15.
- Sirianganakun, S., Li-Chan, E.C.Y. and Yongsawatdigul, J. (2014). Identification by GeLC-MS/MS of trypsin inhibitor in sarcoplasmic proteins of three tropical fish and characterization of their inhibitory properties. **J. Food Sci.** 79: C1305-1314.
- Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Roytrakul, S., Yongsawatdigul, J. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides from hydrolysate of threadfin bream surimi processing byproduct. **J. Functional Food.** 5(4): 1654-1664.
- Lapsongphon, N., Cadwallader, K.R., Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. (2013). Characterization of protein hydrolysis and odor-active compounds of fish sauce inoculated with *Virgibacillus* sp. SK37 under reduced salt content. **J. Agric. Food Chem.** 61 (27): 6604–6613
- Lapsongphon, N. and Yongsawatdigul, J. (2013). Production and purification of antioxidant peptides from a mungbean meal hydrolysate by *Virgibacillus* sp. SK37 proteinase. **Food Chem.** 141: 992-999.
- Lapsongphon, N., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2013). Spent Brewery Yeast Sludge as a Single Nitrogen Source for Fibrinolytic Enzyme Production of *Virgibacillus* sp. SK37. Food Science and Biotechnology. **Food Sci. Biotechnol.** 22(1): 71-78.
- Yongsawatdigul, J., Pivisan, S., Wongngam, W., and Benjakul, S. (2013). Gelation characteristics of mince and washed mince from small scale mud carp and common carp. *J. Aquat. Food Prod. Tech.* 22 (5): 460-473.

- Hemung, B, Benjakul, S., Yongsawatdigul, J. (2013). pH-dependent characteristics of gel-like emulsion stabilized by threadfin bream sarcoplasmic proteins. **Food Hydrocolloids**. 30: 315-322.
- Montriwong, A, Kaewphuak, S., Rodtong, S., Roytrakul S., Yongsawatdigul, J. (2012). Novel fibrinolytic enzymes from *Virgibacillus halodenitrificans* SK1-3-7 isolated from fish sauce fermentation. **Process Biochem**. 47: 2379–2387.
- Siriangkanakun, S. and Yongsawatdigul, J. (2012). Trypsin inhibitory activity and gel-enhancing effect of sarcoplasmic proteins from common carp. **J. Food Sci**. 77(10): 1124-1130
- Sinsuwan, J. Rodtong, S., Yongsawatdigul, J. (2012). Hydrolytic activity of *Virgibacillus* sp. SK37, a starter culture of fish sauce fermentation, and its cell-bound proteinases. **World J. Microbiol. Biotechnol**. 28: 2651-2659.
- Wiriyan, A., Chitsomboon, B., and Yongsawatdigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. **Food Chem**. 132:104–111.
- Udomsil, N., Rodtong,S., Choi, Y.J., Hua, Y., and Yongsawatdigul, J. (2011). The use of *Tetragenococcus halophilus* as a starter culture for flavor improvement in fish sauce fermentation. **J. Agric. Food Chem**. 59(15): 8401-08.
- Piyadhamviboon, P., Wongngam, W., Benjakul, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Antioxidant and Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitory Activities of Protein Hydrolysates Prepared from Threadfin bream (*Nemipterus* spp.) Surimi By-products. **J. Aquat. Food Prod**. In press.
- Phommao, E., Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Yamabhai M. (2011). A novel subtilase with NaCl-activated and oxidant-stable activity from *Virgibacillus* sp. SK37. **BMC Biotech**. 11:65.
- Sinsuwan, S, Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Evidence of cell-associated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **J. Food Sci**. 76: C413-419.
- Phommao, E., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2011). Identification of novel halotolerant bacillopeptidase-like proteinases from a moderately halophilic bacterium, *Virgibacillus* sp. SK37. **J. Appl. Micro**. 1: 191-201.
- Udomsil, N., Rodtong, S., Tanasupawat, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase-producing halophilic lactic acid bacteria isolated from fish sauce fermentation and their ability to produce volatile compounds. **Int. Food Microbiol**. 141: 186–194.
- Tadpichayangkoon, P., Park, J., Mayer, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Structural Changes and Dynamic Rheological Properties of Sarcoplasmic Proteins Subjected to pH-Shift Method. **J. Agric. Food Chem**. 58: 4241-4249.
- Tadpichayangkoon, P. Park, J.W., and Yongsawatdigul, J. (2010). Physicochemical and dynamic rheological properties of fish sarcoplasmic proteins treated at various pHs. **Food Chem**. 121: 1046-1052.

- Yongsawatdigul, J., and Hemung, B. (2010). Structural changes and functional properties of threadfin bream sarcoplasmic proteins subjected to pH-shifting treatments and lyophilization. **J. Food Sci.** 75(3): C251-257.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). Purification and Characterization of a Salt-Activated and Organic Solvent-Stable Heterotrimer Proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 Isolated from Thai Fish Sauce. **J. Agric. Food Chem.** 58: 248-256.
- Piyadhamviboon, P., and Yongsawatdigul, J. (2010). Proteinase inhibitory activity of sarcoplasmic proteins from threadfin bream (*Nemipterus* spp.). **J. Sci Food Agric.** 90(2): 291-298.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2010). A NaCl-stable serine proteinase from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from Thai fish sauce. **Food Chem.** 119: 573-579.
- Tadpitchayangkoon, P., and Yongsawatdigul, J. (2009). Comparative study of washing treatments and alkali extraction on gelation characteristics of striped catfish (*Pangasius hypophthalmus*) muscle protein. **J. Food Sci.** 74(3): C284-C291.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2009). Identification of glutaminyl sites on β -lactoglobulin for threadfin bream liver and microbial transglutaminase activity by MALDI-TOF mass spectrometry. **Food Chem.** 115: 149-154.
- Piyadhamviboon, P., and Yongsawatdigul, J. (2009). Protein cross-linking ability of sarcoplasmic proteins extracted from threadfin bream. **LWT-Food Sci. Technol.** 42(1): 37-43.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2008). Reactivity of fish and microbial transglutaminases on glutaminyl sites of peptides derived from threadfin bream myosin. **J. Agric. Food Chem.** 56(16): 7510-7516.
- Hemung, B, Li-Chan, E.C.Y., and Yongsawatdigul, J. (2008). Thermal stability of fish natural actomyosin affects reactivity to cross-linking by microbial and fish transglutaminases. **Food Chem.** 111(2): 439-446.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008). Characterization of Ca^{2+} -activated cell-bound proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **LWT-Food Sci Technol.** 41: 2166-2174.
- Hemung, B., and Yongsawatdigul, J. (2008). Partial purification and characterization of transglutaminase from threadfin bream (*Nemipterus* sp.) liver. **J. Food Biochem.** 32: 182-200.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2008). Production and characterization of NaCl-activated proteinases from *Virgibacillus* sp. SK33 isolated from fish sauce fermentation. **Proc. Biochem.** 43: 185-192.

- Park, J.D., Yongsawatdigul, J., Choi, Y.J., and Park, J.W. (2008). Biochemical and conformational changes of myosin purified from Pacific sardine at various pHs. **J. Food Sci.** 73: C191-197.
- Yongsawatdigul, J., Rodtong, S., and Raksakulthai, N. (2007). Acceleration of Thai fish sauce fermentation using proteinases and bacterial starter culture. **J. Food Sci.** 72: M382-M390.
- Panpipat, V., and Yongsawatdigul, J. (2008). Stability of potassium iodide and omega-3 fatty acids in fortified freshwater fish emulsion sausage. **LWT-Food Sci Technol.** 41: 483-492.
- Sinsuwan, S., Rodtong, S., and Yongsawatdigul, J. (2007). NaCl-activated extracellular proteinase from *Virgibacillus* sp. SK37 isolated from fish sauce fermentation. **J. Food Sci.** 72: C264-C269.
- Yongsawatdigul, J. and Piyadhamviboon, P. (2007). Gel enhancing effect and protein cross-linking ability of tilapia sarcoplasmic proteins. **J. Sci Food Agric.** 87: 2810-2816.
- Yongsawatdigul, J., and Sinsuwan, S. (2007). Aggregation and conformational changes of tilapia actomyosin as affected by calcium ion during setting. **Food Hydrocol.** 21: 359-367.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2007). Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Chem.** 101: 82-89.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006). Source and changes of proteinase activities of Indian anchovy (*Stolephorus indicus*) during fish sauce fermentation. **J. Sci. Food Agric.** 86(12): 1970-1976.
- Yongsawatdigul, J., Piyadhamviboon, P., and Singchan, K. (2006). Gel-forming ability of small scale mud carp unwashed and washed mince as related to endogenous proteinases and transglutaminase activities. **Eur. Food Res. Technol.** 223(6): 769-774.
- Sirighan, P., Raksakulthai, N., and Yongsawatdigul, J. (2006). Autolytic activity and biochemical characteristics of endogenous proteinases in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Chem.** 98(4): 678-684.
- Kim, Y.S., Yongsawatdigul, J., Park, J., and Thawornchinsombat, S. (2005). Characteristics of sarcoplasmic proteins and their interaction with myofibrillar proteins. **J. Food Biochem.** 29: 517-532.
- Hemung, B., and Yongsawatdigul, J. (2005). Ca²⁺ affects physicochemical and conformational changes of threadfin bream myosin and actin in a setting model. **Food Sci.** 70: C455-460.
- Yongsawatdigul, J., and Piyadhamviboon, P. (2005). Effect of microbial transglutaminase on autolysis and gelation of lizardfish surimi. **J. Sci Food Agric.** 85(9): 1453-1460.
- Worratao, A., and Yongsawatdigul, J. (2005). Purification and characterization of transglutaminase from tropical tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chem.** 93: 651-658.

- Rodtong, S., Nawong, S, and Yongsawatdigul, J. (2005). Histamine accumulation and histamine-forming bacteria in Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **Food Microbiol.** 22(5): 475-482.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2004). Effect of alkaline and acid solubilization on gelation characteristics of rockfish proteins. **J. Food Sci.** 69(7): C499-505.
- Yongsawatdigul, J., Choi, Y.S., and Udomporn, S. (2004). Biogenic amines formation in fish sauce prepared from fresh and temperature-abused Indian anchovy (*Stolephorus indicus*). **J. Food Sci.** 69(4): FCT312-319.
- Yongsawatdigul, J., and Piyadhamviboon, P. (2004). Inhibition of autolytic activity of lizardfish surimi by proteinase inhibitors. **Food Chem.** 87: 447-455.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2003). Thermal denaturation and aggregation of threadfin bream actomyosin. **Food Chem.** 83(3): 406-416.
- Worratao, A., and Yongsawatdigul, J. (2003). Cross-linking of actomyosin by crude tilapia (*Oreochromis niloticus*) transglutaminase. **J. Food Biochem.** 27: 35-51.
- Yongsawatdigul, J., Worratao, A., and Park, J. (2002). Effect of endogenous transglutaminase on gelation of threadfin bream surimi. **J. Food Sci.** 67(9): 3258-3263.
- Yongsawatdigul, J., and Park, J.W. (2002). Biochemical and conformation changes of actomyosin from threadfin bream stored in ice. **J. Food Sci.** 67(3): 985-990.

