บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0-14 วัน พบว่าปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ตลอดระยะเวลาเก็บรักษา ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซิน ซาร์โคพลาสมิค และโปรตีนที่ละลายทั้งหมดที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (วัน)	ปริมาณโปรตีน		
	แอคโตไมโอซิน (mg/g)	ซาร์โคพลาสมิค (mg/g)	โปรตีนที่ละลายทั้งหมด (mg/g)
0	138.82 ^{a} ± 1.99	76.76 ^{ab} ± 3.85	225.59 ^{ab} ± 6.43
1	149.45 ^{ab} ± 11.47	80.56 ^{a} ± 2.75	239.91 ^{abcd} ± 5.64
2	146.40 ^{ab} ± 3.27	74.69 ^{ab} ± 1.48	231.95 ^{abc} ± 13.59
3	145.82 ^{ab} ± 7.42	71.22 ^{b} ± 6.21	226.76 ^{ab} ± 8.82
4	158.37 ^{bc} ± 10.38	60.04 ^{cd} ± 3.75	224.74 ^{a} ± 5.21
5	176.21 ^{de} ± 8.66	62.79 ^{c} ± 4.29	245.05 ^{cd} ± 2.99
6	169.57 ^{cd} ± 5.49	55.03 ^{cde} ± 1.99	229.98 ^{abc} ± 4.12
7	184.16 ^{def} ± 7.65	52.43 ^{de} ± 2.05	242.07 ^{bcd} ± 6.81
10	199.48 ^{f} ± 7.28	52.08 ^{de} ± 2.76	256.46 ^{d} ± 6.78
14	193.02 ^{ef} ± 6.61	47.82 ^{f} ± 1.51	245.46 ^{cd} ± 3.23

a, b, ..., f ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สามารถละลายได้มากขึ้น อาจเป็นผลจากการเสียหายของ fibrous protein linkage ได้แก่ การถูกทำลายของพันธะ SS และ SH ที่ยึดระหว่างสายโพลีเปปไทด์ภายในโมเลกุลของคอลลาเจน และการเสียหายของพันธะเปปไทด์ของโมเลกุลโปรตีน เนื่องจากการทำงานของ hydrolytic enzymes (Haard, 1994; Ashie and Simpson, 1997; Zayas, 1997) Zayas (1997) ได้รายงานว่าการเก็บรักษาสัตว์น้ำในระยะ post mortem ทำให้สามารถสกัดโปรตีนแอคโตไมโอซิน หรือโปรตีนมีการละลายได้มากขึ้น เนื่องจากการเสียหายของ fibrous protein linkages Papadopoulos และคณะ(1989) พบว่า myofibrillar protein สามารถละลายได้มากขึ้นหลังจากเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการสูญเสียความแข็งแรงของโปรตีนกล้ามเนื้อ Kim และคณะ (1996) พบว่า myofibrillar protein ของกุ้งน้ำจืด Crayfish จะสามารถละลายได้มากขึ้นเนื่องจากการทำงานของ proteolytic enzymes ที่มีอยู่ในระบบย่อยอาหารและในกล้ามเนื้อ

ปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สามารถละลายได้ (TP) เป็นผลรวมของปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซิน (AP) ซาร์โคพลาสมิค (SP) และคอลลาเจน (CP) ดังนั้นถ้านำปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่สามารถละลายได้ ลบออกด้วยปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินและโปรตีนซาร์โคพลาสมิค ปริมาณโปรตีนที่เหลือจะเทียบเท่ากับโปรตีนคอลลาเจน (TP-(AP+SP)) โดยประมาณ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.2 ปริมาณโปรตีนคอลลาเจนของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (วัน)	**คอลลาเจน (mg/g)**
0	10.02 [a] ± 0.79
1	9.87 [a] ± 1.33
2	10.86 [a] ± 0.23
3	9.74 [a] ± 0.40
4	6.32 [b] ± 0.45
5	6.06 [b] ± 1.34
6	5.38 [b] ± 0.53
7	5.47 [b] ± 0.57
10	4.90 [b] ± 0.44
14	4.63 [b] ± 0.57

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณคอลลาเจนในเนื้อกุ้งที่ลดลงมีสาเหตุมาจากการทำงานของเอนไซม์ collagenase ที่อาจมีอยู่ภายในตัวสัตว์น้ำเอง สำหรับในกุ้งก้ามกรามมีรายงานว่าพบ collagenase อยู่ที่บริเวณ hepatopancreas (Nip, Lan and Moy,1985; Lindner et al., 1989) นอกจาก collagenase ยังอาจมาจากการปนเปื้อนของกลุ่มจุลินทรีย์ การทำงานของเอนไซม์ collagenase นอกจากจะสามารถย่อยสลาย collagen แล้วยังพบว่าสามารถย่อยสลายกล้ามเนื้อด้วย (Lindner et al., 1989; Kim et al., 1996) ซึ่งอาจทำให้กล้ามเนื้อโครงสร้างสูญเสียความแข็งแรงและอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งในระหว่างการเก็บรักษา โดยเฉพาะการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์สามารถเกิดได้ดี นอกจากนี้ที่อุณหภูมิดังกล่าวจุลินทรีย์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดี (Botta, 1994) Nip, Lan and Moy (1985) ได้ศึกษาสภาวะการทำงานของ collgenolytic enzyme ที่สกัดได้จากต่อม hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 6.5-7.5 และยังพบว่าเอนไซม์สามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 0 °C, pH 6.5-8.0 แต่การทำงานจะเกิดขึ้นได้ช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 °C โดยได้เสนอแนะว่าการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นระยะเวลานานขึ้น อาจทำให้กล้ามเนื้อกุ้งมีการเสื่อมเสียคุณภาพเนื้อสัมผัส

การตรวจสอบการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อ ที่เกิดจากการทำงานของ proteolytic enzymes ทำให้มีการย่อยสลายโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง เนื่องจากการเสียหายของพันธะเปปไทด์ (Flores and Crawford, 1973; Haard, 1994; Lindner et al., 1989) ซึ่งทำได้โดยการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงปริมาณ oligopeptide และ tyrosine (Morrissey et al., 1993; Benjakul et al., 1997) และเนื่องจากในสัตว์น้ำทั่วไปจะมีปริมาณเอนไซม์ tyrosinase อยู่มาก (นงลักษณ์ สุทธิวนิช, 2531) จึงนิยมวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาณ oligopeptide และ tyrosine เพื่อใช้เป็นดัชนีการเสื่อมเสียของโปรตีนกล้ามเนื้อเนื่องจากการย่อยสลาย ดังแสดงผลในตารางที่ 4.3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 ปริมาณ hydrolytic degradation products จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน และจุลินทรีย์ทั้งหมด ของกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (วัน)	Hydrolytic degradation products (μmole/g)	จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (log cfu/g)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g)
0	0.70^{a}±0.08	5.49^{a}±0.06	5.96^{a}±0.03
1	1.83^{b}±0.20	5.77^{ab}±0.04	6.70^{b}±0.05
2	2.41^{c}±0.10	5.92^{b}±0.05	6.90^{b}±0.07
3	3.06^{d}±0.10	6.02^{b}±0.04	6.95^{bc}±0.01
4	4.82^{e}±0.14	6.46^{c}±0.23	7.02^{c}±0.03
5	5.17^{f}±0.18	6.79^{d}±0.08	7.25^{d}±0.07
6	5.77^{g}±0.29	6.94^{d}±0.04	7.38^{e}±0.03
7	6.68^{h}±0.47	7.23^{e}±0.26	8.01^{f}±0.04
10	8.04^{i}±0.17	7.46^{ef}±0.11	8.53^{g}±0.04
14	9.35^{j}±0.19	7.67^{f}±0.10	8.63^{g}±0.06

a, b, ..., j ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 0-14 วัน พบว่าปริมาณ hydrolytic degradation products มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สังเกตได้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ในช่วงระหว่างการเก็บรักษา 0-3 วัน จะเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยสัมพันธ์กับปริมาณแอคโตไมโอซินที่มีการละลายเพิ่มขึ้นในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 4-14 วัน พบว่าปริมาณ hydrolytic degradation products มีค่าเพิ่มมากขึ้นโดยสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่มีการละลายเพิ่มขึ้น มากกว่าในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 0-3 วัน ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Benjakul และคณะ (1997) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติกายภาพเคมีของกล้ามเนื้อปลา Pacific Whiting ระหว่างการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลานาน 8 วัน พบว่าปริมาณ hydrolytic degradation products มีค่า

เพิ่มขึ้นจากเริ่มต้น 0.25 เป็น 3.25 μmole/g muscle เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเป็น 8 วัน โดยสัมพันธ์กับการเสียหายของโปรตีนไมโอซินที่เพิ่มขึ้น

ปริมาณ hydrolytic degradation products ที่เพิ่มขึ้นอาจมีสาเหตุมาจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเอง หรือจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Venugopal, Alur and Lewis, 1983; Baranowski, Nip and Moy, 1984) การทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายในตัวสัตว์น้ำเองจะเกิดขึ้นทันทีหลังจากสัตว์น้ำตายเนื่องจากระบบการทำงานต่างๆ ของเซลล์ รวมทั้งกระบวนการ metabolism หยุดชะงักหลังจากสัตว์น้ำตายแต่เอนไซม์ที่มีอยู่ภายในตัวสัตว์น้ำไม่ถูกทำลาย แต่ก็มีระบบการทำงานที่แตกต่างไปจากขณะที่สัตว์มีชีวิต (Davis, 1995) แหล่งสำคัญของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อยู่ภายในสัตว์น้ำ ได้แก่ อวัยวะภายในหรือระบบย่อยอาหารซึ่งในกุ้งจะอยู่บริเวณส่วนหัว กล้ามเนื้อ และของเหลวที่อยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ประจวบ หลำอุบล, 2537; Haard, 1994; Etherington and Bardsley, 1995; Nip and Moy,1988; Angel et al., 1986) นอกจากนี้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มาจากจุลินทรีย์ก็อาจมีบทบาทสำคัญ ต่อการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีน แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์ผลิตผลโดยรวม ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายของโปรตีน โดยไม่ได้แยกสาเหตุการย่อยสลายของโปรตีนที่เกิดขึ้น ว่ามีสาเหตุเนื่องจากเอนไซม์ภายในตัวสัตว์น้ำเอง หรือจากจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ว่าการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นผลมาจากความเด่นชัดของปัจจัยการเสื่อมเสียเนื่องจากตัวสัตว์น้ำเองหรือจากจุลินทรีย์

การศึกษาเกี่ยวกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกราม Baranowski, Nip และMoy (1984) ได้ศึกษาคุณสมบัติของ crude enzyme ที่สกัดได้จากต่อม hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่าเอนไซม์ที่สกัดได้มีการทำงานคล้ายกับ collagenase ซึ่งสามารถใช้ lyophilized prawn tissue เป็นสับสเตรท รวมทั้งมี trypsinolytic enzyme และ chymotrypsinolytic enzyme บ้างเล็กน้อย Nip, Lan และMoy (1985) ได้ศึกษาคุณสมบัติบางอย่างของ collagenolytic enzymes ที่สกัดจากต่อม hepatopancreas ของกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) พบว่า collgenolytic enzyme สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิ 37 °C และมีค่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานอยู่ในช่วงระหว่าง 6.5 – 7.5 นอกจากนี้ collagenase ยังสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิ 0 °C แต่มีการทำงานช้ากว่าที่อุณหภูมิ 37 °C Pan และ Yeh (1993) พบว่ามี cathepsin D-like activity enzyme ใน lysosomal fraction ที่สกัดได้จาก grass shrimp (*Penaeus monodon*) เนื่องจากมีข้อมูลค่อนข้างน้อยที่ศึกษาเกี่ยวกับชนิด

และการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในกุ้งก้ามกราม ดังนั้นจึงยากที่จะระบุถึงแหล่งและชนิดของเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products

ผลการย่อยสลายตัวเองของสัตว์น้ำทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และมีปริมาณกรดอะมิโนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะช่วยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้ดีเนื่องจากมีสารอาหารที่จุลินทรีย์สามารถใช้ได้มากขึ้น ดังนั้นจุลินทรีย์จึงเข้ามามีบทบาทต่อการเสื่อมเสียของสัตว์น้ำ (Botta, 1995; Davis, 1995) จากการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด พบว่าจะมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (5.96-8.63 log cfu/g) ตลอดเวลาในการเก็บรักษา ดังตารางที่ 4.3 นอกจากนี้ยังได้ทำการวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากการนับจำนวนโคโลนีที่มีลักษณะ clear zone อยู่รอบๆ ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ milk nutrient agar (Lee and Kraft, 1992) พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้น จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 นอกจากนี้ยังพบว่าสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของปริมาณจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ยังมีค่ามากถึงร้อยละ 80 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด แสดงว่ากลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ส่วนมากที่พบอยู่ในกุ้งก้ามกราม ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C

การเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงคล้ายกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products (ตารางที่ 4.3) ในระยะแรกของการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามเป็นเวลา 0-3 วัน จำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีการเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จากนั้นจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษานาน 4-14 วัน คาดว่าการเพิ่มขึ้นของจำนวนจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียของโปรตีนแอคโตไมโอซิน และการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ถึงแม้ว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C จะเป็นการช่วยชะลอให้จุลินทรีย์ทำงานได้ช้าลง อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์ก็ยังสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนขึ้นได้อย่างช้าๆ Venugopal, Alur and Lewis. (1983) ได้รายงานว่า *Pseudomonas marinoglutinosa* สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งเอนไซม์สามารถทำงานได้ในสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2 $^{\circ}$C และมีค่า pH มากกว่า 7 Angel และคณะ (1986b) พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ในน้ำแข็งทำให้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^5 เป็น 5.6×10^6 cfu/g เมื่อเวลาในการเก็บรักษาเป็น 14 วัน

นอกจากปัจจัยการทำงานของ hydrolytic enzymes เนื่องจากเอนไซม์ที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเองและจากจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่อาจเป็นสาเหตุให้โปรตีนแอคโตไมโอซินละลายได้มากขึ้นแล้ว ยังอาจเป็นผลของการเปลี่ยนแปลงแรงปฏิสัมพันธ์ดึงดูดระหว่างแรง electrostatic ของสารละลายภายในเซลล์กล้ามเนื้อกับโมเลกุลของโปรตีนที่มีค่ามากกว่าแรงปฏิสัมพันธ์ระหว่าง hydrophobic ของสารละลายภายในเซลล์กล้ามเนื้อกับโมเลกุลของโปรตีน เนื่องจากแรง electrostatic repulsion ระหว่างโมเลกุลโปรตีนมีค่ามากกว่าแรง hydrophobic interaction โปรตีนจึงสามารถละลายได้มากขึ้น (Zayas, 1997) การเปลี่ยนแปลงแรงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโปรตีนกับน้ำขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงของค่า pH กรณีที่แรงปฏิสัมพันธ์ของการดึงดูดระหว่างโปรตีนกับน้ำมีค่าสูงขึ้น อาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของกล้ามเนื้อกุ้งที่มีค่าสูงกว่าหรือต่ำกว่า isoelectric point (pI) ของโปรตีน ทำให้โปรตีนมีประจุรวมเป็นลบหรือบวกและสามารถละลายได้ดีขึ้น จากการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อกุ้งพบว่ามีค่าเพิ่มขึ้น (6.60-7.51) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 โดยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Lin และ Park (1998) ซึ่งพบว่าโปรตีนไมโอซินที่สกัดจากเนื้อปลา salmon จะไม่ละลายในสารละลายที่มีค่า pH 4 - 5 ละลายได้เล็กน้อยในค่า pH 5 - 7 และละลายได้มากเมื่อค่า pH มากกว่า 7 หรือต่ำกว่า 4 นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าโปรตีนไมโอซินจะละลายได้ดีขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายต่ำกว่าหรือมากกว่า 4.8 - 6.2 ซึ่งเป็น isoelectric point ของโปรตีนไมโอซิน (Kinsella, 1981)

อย่างไรก็ตามการที่ปริมาณโปรตีนซาร์โคพลาสมิคมีแนวโน้มลดลง ($P \leq 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้น ดังตารางที่ 4.1 อาจเป็นผลจากการย่อยสลายโปรตีนทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อเสียหาย และสูญเสียโปรตีนที่สามารถละลายน้ำได้ออกมาภายนอกเซลล์มากขึ้น โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ drip loss ที่เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.4 การเพิ่มขึ้นของปริมาณ drip loss อาจเป็นผลของการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการย่อยสลายของโปรตีน เนื่องจากการทำงานของ proteolytic enzymes ทำให้กล้ามเนื้อกุ้งเสียหายและสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Haard, 1994) โดยเฉพาะในสภาวะการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ทั้งที่มีอยู่ในตัวกุ้งก้ามกรามเองและจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ยังคงสามารถเกิดขึ้นได้ (Davis, 1995) ดังนั้นเมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้เป็นเวลานานขึ้นอาจทำให้โปรตีนมีการเสื่อมเสียคุณภาพหรือถูกย่อยสลายมากขึ้น

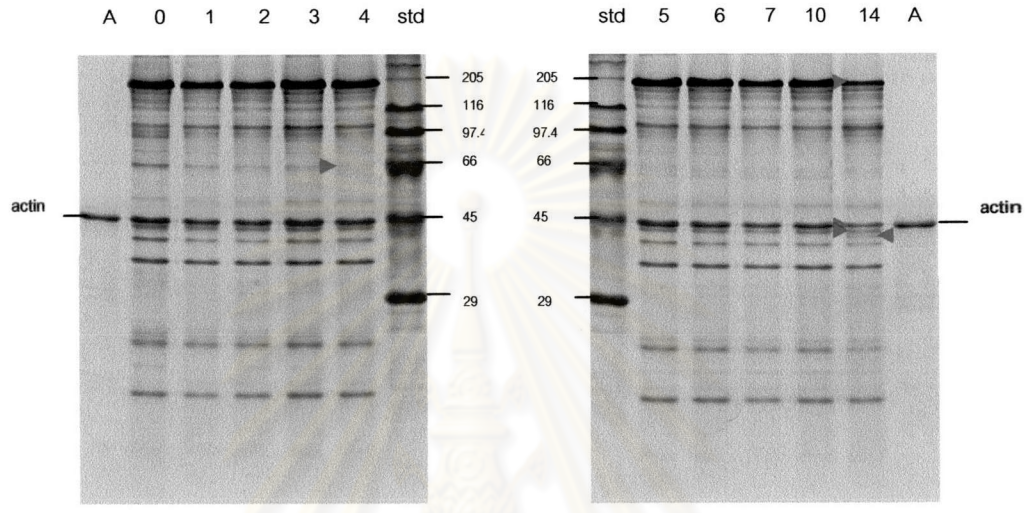
ตารางที่ 4.4 ค่าความเป็นกรดด่าง และปริมาณ drip loss ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (วัน)	ค่าความเป็นกรดด่างของกล้ามเนื้อกุ้ง	Drip loss (%)
0	$6.60^{a}\pm0.07$	-
1	$6.85^{b}\pm0.03$	$0.53^{a}\pm0.07$
2	$7.03^{c}\pm0.15$	$0.97^{bc}\pm0.25$
3	$7.15^{d}\pm0.08$	$1.14^{bcd}\pm0.25$
4	$7.28^{e}\pm0.08$	$0.87^{ab}\pm0.07$
5	$7.32^{ef}\pm0.10$	$1.34^{d}\pm0.06$
6	$7.43^{fg}\pm0.11$	$1.32^{cd}\pm0.15$
7	$7.45^{g}\pm0.08$	$1.77^{e}\pm0.20$
10	$7.50^{g}\pm0.01$	$1.90^{e}\pm0.11$
14	$7.51^{g}\pm0.00$	$2.09^{e}\pm0.06$

a, b, ..., g ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสื่อมเสียคุณภาพโปรตีนแอคโตไมโอซินเนื่องจากการทำงานของhydrolytic enzymes พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลของโปรตีน ผลการวัดขนาดโมเลกุลของโปรตีนแอคโตไมโอซินด้วย SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 electrophoretic pattern ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C A; actin, 0, 1, 2.....,7, 10 และ 14 เวลาในการเก็บรักษา(วัน), std; standard mixture (mw. 30,000-200,000) Myosin, Rabbit muscle 205 kDa, β-galactosidase, E coli 116 kDa, Phosphorylase b, Rabbit muscle 97.4 kDa, Albumin, bovine 66 kDa, Albumin, egg 45 kDa and Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes 29 kDa ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยก 38 ไมโครกรัมต่อ lane

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จาก electrophoretic pattern ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (รูปที่ 4.1) พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานานขึ้น มีการเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลโปรตีนแอคโตไมโอซิน โดยสังเกตว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66 kDa หายไปเมื่อเวลาในการเก็บรักษา 4 วัน และพบว่าแถบโปรตีนไมโอซินและแอคตินมีความเข้มลดลง หลังจากการเก็บรักษานาน 7 วัน และการเปลี่ยนแปลงจะชัดเจนมากขึ้นเมื่อเวลาในการเก็บรักษานาน 14 วัน และยังพบว่าแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 42 kDa มีความเข้มลดลง เมื่อเวลาในการเก็บรักษา 14 วัน นอกจากนี้ยังพบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38 kDa เกิดขึ้นใหม่ ผลของการเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 14 วัน ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนแอคโตไมซิน ที่อาจมีสาเหตุเนื่องจากการทำงานของ hydrolytic enzymes

การเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลของโปรตีนแอคโตไมโอซิน อาจมีความสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สามารถละลายได้เพิ่มขึ้น (Scopes, 1994) อย่างไรก็ตามผลที่ได้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแถบโปรตีนไมโอซินและแอคตินมีความเข้มลดลงหลังจากการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 7 วัน ขณะที่การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ hydrolytic degradation products ยังคงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาในการเก็บ จึงเป็นไปได้ว่าการเสื่อมเสียของโปรตีนในระยะแรกของการเก็บรักษา (0-6 วัน) อาจเป็นผลมาจากการเสียหายของ cytoskeletal และ regulatory proteins ที่เป็นองค์ประกอบของ myofibrillar protein โดยมีหน้าที่ยึดจับและเชื่อมโยงโปรตีนที่เป็นโครงสร้างหลักให้อยู่ร่วมกัน (Pearson and Young, 1989; Olafsdottir et al., 1997) มากกว่าการเสียหายของโปรตีนไมโอซินและแอคตินที่เป็นโครงสร้างหลัก การเสียหายของกลุ่มโปรตีน cytoskeletal และ regulatory ทำให้โครงสร้างโปรตีนกล้ามเนื้อสูญเสียความแข็งแรงและอาจทำให้โปรตีนแอคโตไมโอซินสามารถละลายได้มากขึ้น เมื่อเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามมากกว่า 7 วัน การละลายของแอคโตไมโอซินที่เพิ่มขึ้นอาจเป็นผลร่วมจากการเสียหายของโปรตีนไมโอซินและแอคตินและการเสียหายของ cytoskeletal และ regulatory proteins

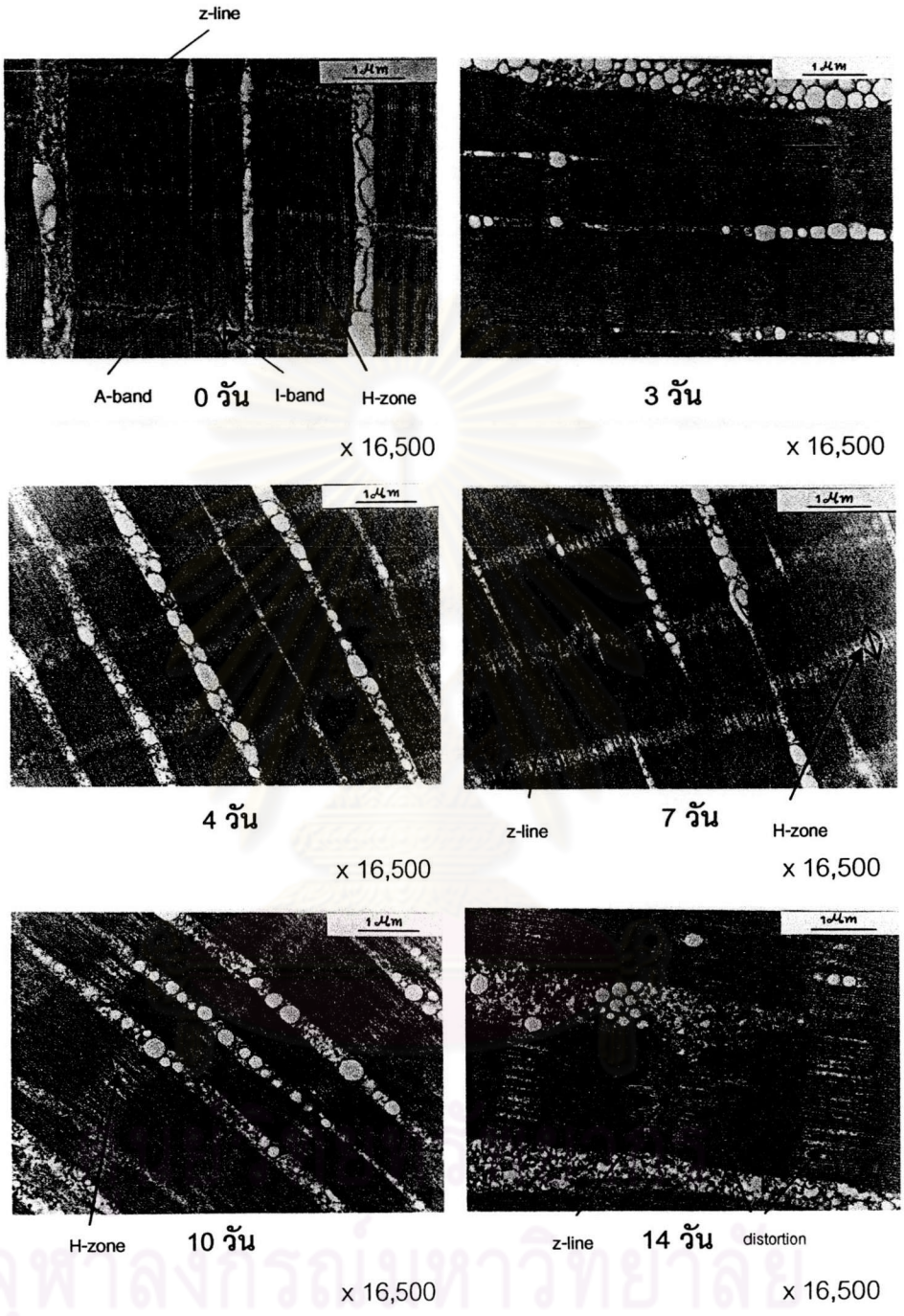
การเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Martinez, Friis และ Careche (2001) พบว่ามีการลดความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซิน และมีการหายไปของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 และ 50 kDa หลังจากการเก็บรักษากุ้ง (*Pandalus borealis*) ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C เป็นเวลานาน 5 วัน Lindner และคณะ (1989) พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 7 วัน มีการเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ของ myofibrillar protein เพียง

เล็กน้อย โดยพบว่ามีแถบโปรตีนที่อยู่ต่ำกว่าโปรตีนไมโอซินเกิดใหม่เพียง 1 แถบ และความเข้มของแถบโปรตีนที่อยู่ระหว่างโปรตีนแอคตินและโทโพรไมโอซินลดลง Hernendez-Herrero และคณะ (2003) รายงานว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงความเข้มของแถบโปรตีนไมโอซินและแอคตินของเนื้อปลา cod ระหว่างการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 9 วัน แต่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน titin อย่างชัดเจน โดยเฉพาะเมื่อเนื้อปลา cod มีการเสื่อมเสียมากขึ้น

จากงานวิจัยของ Lindner และคณะ (1988); Martinez, Friis and Careche (2001) พบว่าการเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลโปรตีนแอคโตไมโอซินของกุ้ง *Macrobrachium rosenbergii* และ *Pandalus borealis* ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C จะคล้ายกับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ที่ได้ในครั้งนี้ โดยพบว่ามีแถบโปรตีนไมโอซินมีความเข้มลดลง และมีการหายไปของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 kDa รวมทั้งมีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าโปรตีนไมโอซิน อย่างไรก็ตามก็ยังพบว่ามีความแตกต่างของแถบโปรตีนเกิดขึ้นเช่นกัน คาดว่าอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของชนิดและการทำงานเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในตัวกุ้ง หรือจากจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ของกุ้งที่พบว่ามีความแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนที่พบในเนื้อปลาคอด (Hernendez-Herrero, 2003) แสดงว่าชนิดของสัตว์น้ำอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนและชนิดเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีนที่ต่างกัน

เนื่องจากโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักที่สำคัญของกล้ามเนื้อ ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงสร้างให้ความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพของเนื้อสัมผัส (Pearson and Young, 1989) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงใดๆ ที่มีผลต่อการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อ หรือโปรตีนแอคโตไมโอซินจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อ (Dutson, Pearson and Merkel. 1974; Abbott et al., 1977; Olafsdottir et al., 1997; Olsson, Olsen and Ofstad, 2003) การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับต่ำกว่าจุลภาคของเนื้อเยื่อ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 ภาพ electron micrographs ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

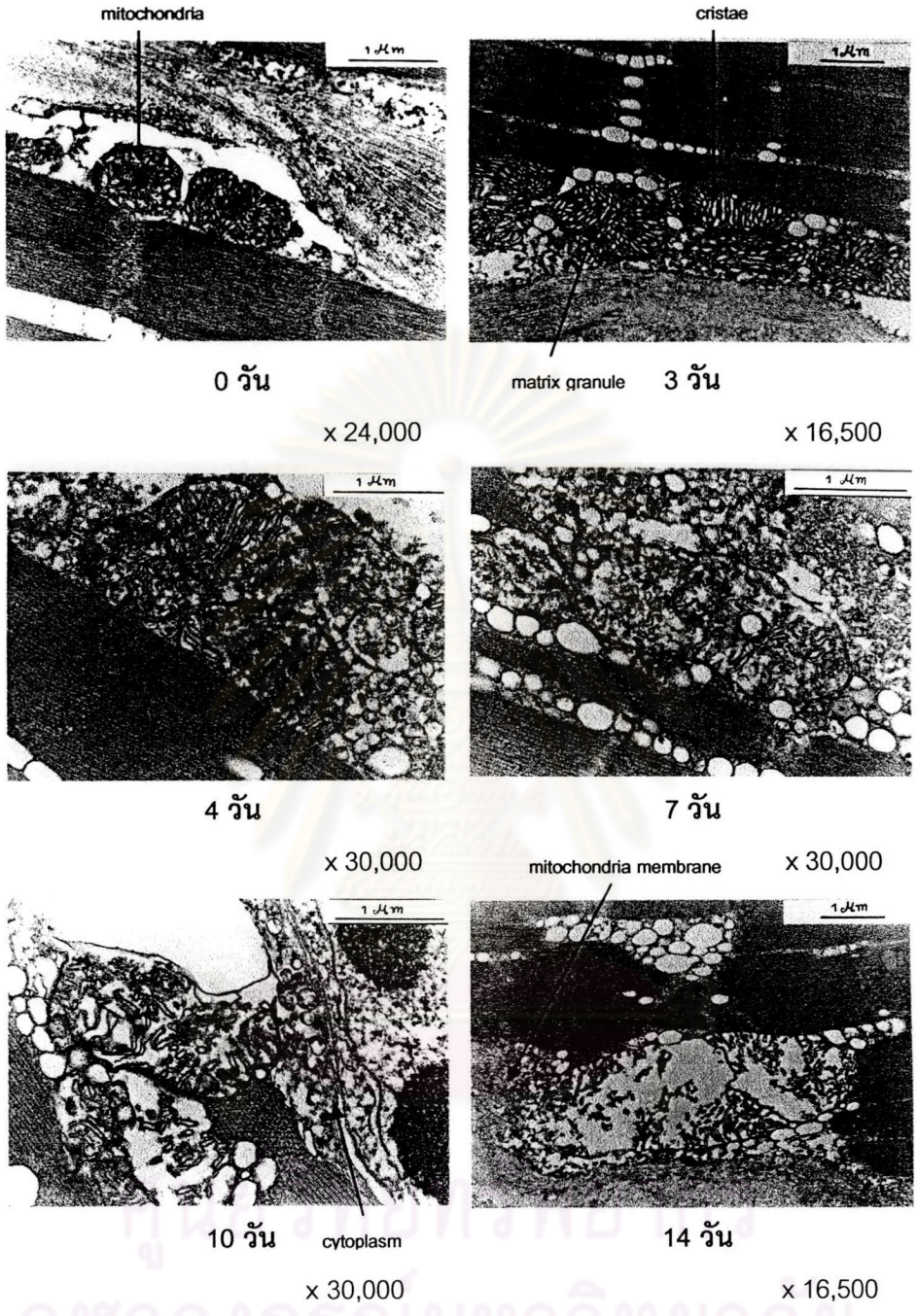
ภาพ transmission electron micrographs ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามสด (รูปที่ 4.2) พบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อมีการจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และสังเกต Z-line, A-band, I-band และ H-zone ได้ อย่างชัดเจน ซึ่งคล้ายกับการจัดเรียงตัวของกล้ามเนื้อลายของสัตว์ทั่วไป (Pearson and Young, 1989) เมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานานขึ้น พบว่า Z-line มีการเสียหายและสูญเสียความเป็นระเบียบของการจัดเรียงตัวของเส้นใย Z-line มากขึ้น การเสียหายของ Z-line คาดว่าเป็นผลมาจากการทำงานของ hydrolytic enzymes (Haard, 1994; Prates et al., 2002) ที่ทำให้เกิดการเสียหายของโปรตีนในกลุ่ม regulatory ได้แก่ α-actinin และ nebulin ที่ทำหน้าที่ยึด thin filament กับ Z- filament การสูญเสียโปรตีน Eu-actinin ที่เป็นตัวเกิดปฏิสัมพันธ์กับ actin และ α-actinin ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับความหนาแน่นของ z-line และการเสียหายของโปรตีนในกลุ่ม cytoskeletal ได้แก่ desmin และ filamin ที่ทำหน้าที่เชื่อมโยงระหว่าง myofibrils กับ Z-line (Pearson and Young, 1989; Xiong, 1997; Kijowski, 2001) โดยเฉพาะการสูญเสีย Eu-actinin (42 kDa) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 42 kDa ที่มีความเข้มลดลง ดังรูปที่ 4.1 เมื่อการเก็บรักษากุ้งเป็นเวลานาน 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่า Z-line มีความไวต่อการเสียหาย ซึ่งอาจเป็นผลจากการเสียหายของโปรตีน α-actinin, nebulin, Eu-actinin, desmin และ filamin ที่มีความไวต่อการเสียหายเนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Goll et al., 1983; Haard, 1994) Papadopoulos และคณะ (1989); Prates และคณะ (2002) พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามและเนื้อกระต่ายในระหว่าง post mortem พบว่า Z-line จะเกิดการเสียหายและสูญเสียการจัดเรียงตัว ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะพบว่ามีการเสียหายของ Z-line แล้วยังพบว่า H-zone มีการยืดตัวหรือหายไป โดยจะสังเกตการเสียหายได้อย่างชัดเจนในช่วงสุดท้ายของการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามมากกว่า 7 วัน การยืดตัวหรือหายไป H-zone เป็นผลจากการเสียหายของโปรตีนในส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมระยะความยาวของ thick และ thin filament ได้แก่ β-actinin รวมทั้งมีการเสียหายของเส้นใยโปรตีนไมโอซินและแอคตินเกิดขึ้น (Pearson and Young, 1989) การเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ hydrolytic degradation products ที่เพิ่มขึ้น

ผลการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เกิดขึ้น พบว่ามีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Papadopoulos และคณะ (1989) ที่พบว่า Z-line มีการเสียหายและมีความหนาแน่นลดลง และมีการยืดตัวของ I-band และ H-zone รวมทั้งมีการเสียหายของเส้นใยกล้ามเนื้อเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของ proteolytic enzymes ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 วัน โดยสอดคล้องกับปริมาณ myofibrillar proteins ที่สามารถละลายได้มากขึ้น นอกจากนี้ Nip และ Moy(1988) รายงานว่ามีการเสียหายของ Z-line และ H-zone ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C และนำกุ้งมาต้มสุก

Olafsdottir และคณะ (1997) รายงานว่า Z-line ของกล้ามเนื้อปลามีการเสียหายเกิดขึ้นรวมทั้งมีการสูญเสีย α-actinin เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ในระหว่างการเก็บรักษาสัตว์น้ำในระยะ post mortem นอกจากนี้คณะผู้วิจัยหลายกลุ่ม (Henderson et al.,1970; Dutson et al.,1974; Abbott et al.,1977; Olsson, Olsen and Ofstad, 2003) ได้รายงานว่ามีการเสียหายของ Z-line และ I-band ในเนื้อหมูและเนื้อปลา Atlantic halibut ในระหว่าง postmortem ตลอดจนได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการเสียหาย Z-line ว่าเป็นผลมาจากการเสียหายของกลุ่มโปรตีน cytoskeletal เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ โดยพบว่าโปรตีน cytoskeletal ถูกทำลายและมีการสูญเสีย α–actinin, nebulin และ titin filaments (Pearson and Young, 1989; Busconi et al, 1989; Olafsdottir et al, 1997; Luther and Squire, 2002; Hernandez-Herrero et al, 2003) เนื่องจากการจัดเรียงตัวหรือความแข็งแรงของโครงสร้างกล้ามเนื้อ มีความสัมพันธ์โดยตรงกับลักษณะคุณภาพของเนื้อสัมผัส ดังนั้นการเสียหายของการจัดเรียงตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อเป็นผลให้โครงสร้างกล้ามเนื้อสูญเสียความแข็งแรง และอาจทำให้กล้ามเนื้อกุ้งมีลักษณะเนื้อสัมผัสนิ่มลง

นอกจากการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อที่พบว่ามีการเสียหายของ Z-line และการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อแล้ว ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไมโตคอนเดรียของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ผลดังแสดงในรูปที่ 4.3 และมีการบวมพองของ endoplasmic reticulum ที่ดันกล้ามเนื้อให้อัดกันทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้น



รูปที่ 4.3 ภาพ electron micrographs ของไมโตคอนเดรียของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

ภายในโครงสร้างไมโตคอนเดรียของกุ้งก้ามกรามสด ประกอบด้วยผนัง 2 ชั้น คือ ผนังชั้นนอก และผนังชั้นใน โดยที่ผนังชั้นในมีลักษณะโค้งเว้าสูงมากเพื่อเป็นการเพิ่มพื้นที่ผิวในการทำงาน หรือเรียกว่า cristae ภายในผนังชั้นในประกอบด้วย matrix ที่มีเอนไซม์ทำหน้าที่เกี่ยวกับกระบวนการ metabolize pyruvate และกรดไขมัน นอกจากนี้บนผนังชั้นในของไมโตคอนเดรียยังมี oxidative enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP (Alberts et al., 2002) การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 0-14 วัน พบว่าโครงสร้างไมโตคอนเดรียมีการเสียหายเกิดขึ้น โดยสังเกตว่า cristae บวมพองขึ้น เนื่องจากการย่อยสลายตัวเองของสัตว์น้ำ ทำให้ผนังเซลล์ไมโตคอนเดรียเกิดการเสียหาย และทำให้เกิดความบกพร่องในการควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำและสารต่างๆ รวมทั้งสูญเสียการควบคุมระบบ hydro-static pressure เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามนานขึ้นการเสื่อมเสียจะเพิ่มมากขึ้น และสังเกตว่ามีการฉีกขาดของผนังไมโตคอนเดรียด้วย ซึ่งอาจเป็นผลจากการย่อยสลายตัวเองของสัตว์น้ำ และพบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ hydrolytic degradation products ที่เพิ่มขึ้น และยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Liljimark (1969); Dutson และคณะ (1974); Abbott และคณะ (1977) พบว่ามีการเสียหายของโครงสร้างไมโตคอนเดรียระหว่างการเก็บรักษาเนื้อหมูเป็นเวลานานขึ้น

ผลการเสื่อมเสียคุณภาพโปรตีนแอคโตไมโอซิน จะส่งผลให้โปรตีนกล้ามเนื้อเกิดการเสียหายและสูญเสียความแข็งแรงของโครงสร้าง โดยพบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทางเดียวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกราม และค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งก้ามกรามดิบและสุก ดังแสดงในตารางที่ 4.5

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ค่าแรงต้านทานการตัดขาดและลักษณะคุณภาพเนื้อสัมผัสของเนื้อกุ้งก้ามกรามดิบและสุก ของกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

เวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (วัน)	ค่าแรงต้านทานการตัดขาด (N/cm)		ลักษณะคุณภาพเนื้อสัมผัสของเนื้อกุ้งก้ามกรามดิบและสุก (การทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส)
	เนื้อกุ้งก้ามกรามดิบ	เนื้อกุ้งก้ามกรามสุก	
0	18.21^{a}±3.2	16.35^{a} ±2.9	แน่น (4.78-3.25)
1	16.01^{ab}±1.4	14.04^{a} ±2.4	
2	14.71^{bc} ±2.3	10.92^{b} ±1.3	
3	14.50^{bc}±2.9	10.40^{b} ±2.5	
4	13.06^{cd}±2.2	9.52^{b} ±2.0	นิ่มเล็กน้อย (2.88-2.05)
5	12.73^{cd} ±2.4	9.98^{b} ±2.0	
6	12.46^{cd} ±2.4	9.43^{b} ±4.1	
7	11.88^{cd} ±1.8	9.03^{b} ±2.1	นิ่มเละมาก (ไม่ได้ทำการทดสอบ)
10	10.92^{d}±0.8	8.34^{b} ±1.4	
14	10.79^{d} ±1.1	5.48^{b} ±1.9	

a, b, ..., d ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีน ซึ่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ electrophoretic pattern และการลดลงของความสามารถในการละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซิน ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Huidobro (2003) ที่พบว่ามีความสัมพันธ์ของค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อวัวที่ลดลงกับการนิ่มของเนื้อสัมผัสเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นที่อุณหภูมิ 4°C Nip และ Moy (1988), Angel และคณะ (1986), Lindner และคณะ (1988) พบว่ากุ้งมีเนื้อสัมผัสนิ่มหลังจากการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง(0°C) เป็นเวลาประมาณ 7 ถึง 9 วัน อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่ากุ้งก้ามกรามมีเนื้อสัมผัสนิ่มหลังจากการเก็บรักษาเป็นเวลา 4 วัน และมีเนื้อสัมผัสนิ่มเละมากขึ้นหลังการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา > 6 วัน ความแตกต่างที่เกิดขึ้นน่าจะเป็นผลของสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษากุ้ง ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ 4±1 °C ดังนั้นจึงอาจทำให้กุ้งมีโอกาสเสื่อมเสียได้เร็วกว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0 °C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

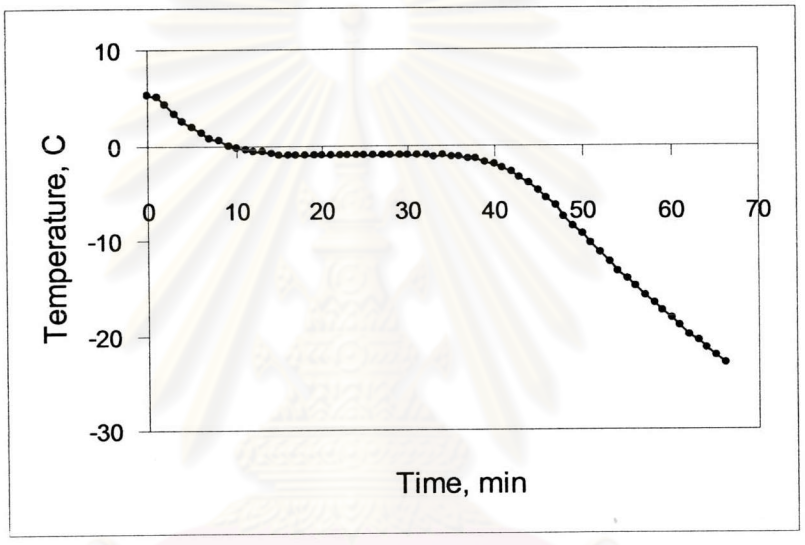
เมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานานขึ้น พบว่าค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งก้ามกรามดิบและสุกมีแนวโน้มลดลง ($P \leq 0.05$) ในระหว่างการเก็บรักษา 0-3 วัน ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งก้ามกรามดิบและสุกมีค่าลดลงค่อนข้างเร็ว และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสัมพันธ์กับคะแนนการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของคุณภาพเนื้อกุ้งก้ามกรามทั้งดิบและสุกที่พบว่ามีค่าลดลง (4.78-3.25) ดังตารางที่ 4.5 โดยกุ้งยังคงมีเนื้อสัมผัสที่แน่น สำหรับในช่วงการเก็บรักษานาน 4-6 วัน ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งดิบและสุกจะมีค่าลดลงเล็กน้อยและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลง คุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกรามดิบและสุกที่มีเนื้อสัมผัสนิ่มลงเล็กน้อย เมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามเป็นเวลามากกว่า 6 วัน ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งดิบและสุกยังคงมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยสัมพันธ์กับการเสื่อมเสียเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกรามที่พบว่ามีเนื้อสัมผัสนิ่มเละมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ากุ้งก้ามกรามเริ่มมีคุณภาพเน่าเสียและไม่เหมาะสมต่อการนำไปบริโภค จึงไม่ได้ทำการทดสอบคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสหลังจากการเก็บรักษากุ้งไว้มากกว่า 7 วัน

การเปลี่ยนแปลงค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งดิบและสุก จะมีแนวโน้มการลดลงที่คล้ายกัน และพบว่าค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งสุกมีค่าน้อยกว่าเนื้อกุ้งดิบทุกๆ ระยะเวลาของการเก็บรักษา อาจเป็นผลจากการละลายของโปรตีนคอลลาเจน ที่มีคุณสมบัติสามารถละลายน้ำได้ในช่วงอุณหภูมิ 50-60 °C (Bouton et al., 1975) ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการนึ่งกุ้งให้สุก คือ 70 °C (Nip and Moy, 1988) นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นให้สามารถทำงานได้ดีขึ้น ในระหว่างการเพิ่มอุณหภูมิขณะที่ต้มกุ้งสุก (Srinivasan et al., 1998) แม้ว่าอาจจะมีผลการรวมตัวของโปรตีนจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากความร้อนร่วมด้วย (Nip and Moy, 1988)

จากความสัมพันธ์ระหว่างคุณภาพเนื้อสัมผัส กับคุณสมบัติโครงสร้างกล้ามเนื้อและคุณสมบัติของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Pearson and Young, 1989; Olafsdottir et al., 1997; Olsson, Olsen and Ofstad, 2003) ดังนั้นการที่กุ้งมีเนื้อสัมผัสนิ่มลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นอาจเป็นผลจากการย่อยสลายของโปรตีนกล้ามเนื้อ ซึ่งคาดว่าจะทำให้โครงสร้างกล้ามเนื้อและโครงสร้างค้ำจุนสูญเสียความแข็งแรง โดยสัมพันธ์กับปริมาณ hydrolytic degradation products ที่เพิ่มขึ้น ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อพบว่า Z-line มีการเสียหาย และมีการฉีกขาดของเส้นใยโปรตีนภายในกล้ามเนื้อโครงสร้าง รวมทั้งมีการบวมพองของ sarcoplasmic reticulum ที่ดันให้ช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อห่างออกจากกันมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเสียหายของโครงสร้างไมโตคอนเดรีย การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นพบว่ามีความสัมพันธ์กับการ

4.2 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachium rosenbergii*) ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C

การแช่เยือกแข็งผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีการเก็บรักษาคุณภาพผลิตภัณฑ์ไว้ได้เป็นระยะเวลานาน อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งจะมีคุณภาพดีขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ คุณภาพวัตถุดิบ วิธีการแช่เยือกแข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บรักษา (Fennema, Powrie and Marth, 1973; George, 1993; Reid, 1997) การศึกษาในงานวิจัยนี้ใช้กุ้งก้ามกรามสดแช่เยือกแข็งด้วย still freezer ที่อุณหภูมิ -65 °C โดยมี freezing curve ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาของการแช่เยือกแข็งกุ้งก้ามกรามด้วย still freezer (-65 °C)

จากข้อมูล freezing curve สามารถนำมาคำนวณหาอัตราเร็วในการแช่เยือกแข็งกุ้งก้ามกราม โดยการวัดระยะทางจากผิวเปลือกกุ้งปล้องที่ 1 ไปจนถึงบริเวณจุดกึ่งกลางของเนื้อกุ้ง (เซนติเมตร) แล้วหารด้วยเวลา (ชั่วโมง) ที่ใช้ในการแข็งตัวของน้ำหรือระยะเวลาที่น้ำมีการเปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็งมากที่สุดจากกราฟอัตราเร็วของการแช่เยือกแข็งกุ้งก้ามกราม ดังรูปที่ 4.4 พบว่าอัตราเร็วในการแช่เยือกแข็งมีค่าเท่ากับ 1.8 cm/h ซึ่งจัดอยู่ในการแช่เยือกแข็งแบบเร็ว เนื่องจากมีอัตราเร็วการแช่เยือกแข็งอยู่ในช่วง 1-10 cm/h (Boegh-Soerensen and Jul, 1985)

โปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักของกล้ามเนื้อ ดังนั้นการเสื่อมเสียใดๆ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อ หรือโปรตีนแอคโตไมโอซิน จะส่งผลถึงการเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Taub and Singh, 1997; Xiong,1997) โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงการละลายของโปรตีน myofibrillar สามารถใช้เป็นดัชนีติดตามการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง (Jiang and Lee, 1985) ผลการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินในกุ้งก้ามกรามระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซิน ซาร์โคพลาสมิค และโปรตีนที่ละลายทั้งหมดที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	ปริมาณโปรตีน		
	แอคโตไมโอซิน (mg/g)	ซาร์โคพลาสมิค (mg/g)	โปรตีนที่ละลายทั้งหมด (mg/g)
0(กุ้งสด)	150.50 ^{a} ± 2.1	77.40 ^{ns} ± 3.8	235.56 ^{ns} ± 7.7
1	149.00 ^{a} ± 1.4	78.35 ^{ns} ± 3.7	236.2 ^{ns} ± 6.7
2	140.65 ^{b} ± 0.5	76.96 ^{ns} ± 0.1	225.7 ^{ns} ± 4.0
3	144.75 ^{ab} ± 2.5	79.70 ^{ns} ± 0.4	231.81 ^{ns} ± 2.4
4	124.55 ^{c} ±0.8	77.85 ^{ns} ± 4.0	210.17 ^{ns} ± 2.9
5	125.9 ^{c} ± 4.4	77.55 ^{ns} ± 1.4	210.86 ^{ns} ± 6.3
6	121.90 ^{c} ± 4.4	75.68 ^{ns} ± 2.7	204.45 ^{ns} ± 0.6

a, b, …., f ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามแช่เยือกแข็งไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 0-6 เดือน พบว่าโปรตีนแอคโตไมโอซินมีแนวโน้มการละลายลดลง เนื่องจากการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็งและระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ทำให้โปรตีนเกิดการรวมตัวกันมีโมเลกุลใหญ่ขึ้นและละลายได้ยากขึ้น (Buttkus, 1970; Jiang et al., 1991; Hsu et al., 1993) หรือเป็นผลจากการคลายตัวบางส่วนของโมเลกุลโปรตีน ทำให้โปรตีนสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่และความสามารถในการละลาย (Wagner and Anon, 1985) นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลจากการลดลงของแรงอิเลคโตรสเตติคระหว่างน้ำกับโปรตีน ทำให้เกิดปรากฏการณ์ salting out เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเกลือหรืออิออน รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงปฏิสัมพันธ์ระหว่างโมเลกุลโปรตีนกับน้ำ ทำให้โปรตีนมีการเปิดพันธะไฮโดรโฟบิคออกมาที่ผิวหน้ามากขึ้นเนื่องจากเซลล์มีการสูญเสียน้ำ (Zayas, 1997)

ผลที่ได้พบว่าสอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang และคณะ (1991) พบว่าปริมาณโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกุ้งกุลาดำ ในระหว่างการเก็บรักษาแบบแช่เยือกแข็งจะมีค่าลดลงเนื่องจากการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนไมโอซิน ทำให้โมเลกุลไมโอซินมีการรวมตัวกันและมีน้ำหนักโมเลกุลสูงขึ้นเป็นผลให้โปรตีนแอคโตไมโอซินละลายได้ลดลง Hsu และคณะ (1993) รายงานว่ามีการลดลงของโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากเนื้อปลา Pacific Whiting (*Merluccius productus*) หลังการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลานาน 10 เดือน Huidobro et al., (1998) ศึกษาผลของ frozen storage กับการละลายของแอคโตไมโอซิน ในระหว่างการเก็บรักษาเนื้อปลา Hake ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลานาน 1 ปี พบว่าแอคโตไมโอซินมีการละลายลดลง และได้นำตะกอนในส่วนที่ไม่ละลายมาสกัดด้วย 2%SDS+8M urea, 2%SDS +5%ME พบว่าการละลายของตะกอนจะลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้น ผู้วิจัยได้อธิบายว่าการละลายของแอคโตไมโอซินที่ลดลงเป็นผลมาจากการรวมตัวของโมเลกุลแอคโตไมซินด้วยพันธะ covalent bonds Ramirez, Martin-Polo and Bandman (2000) ศึกษาการละลายของแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากเนื้อปลานิล (*Tilapia nilotica*) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลานาน 9 เดือน พบว่าการละลายของแอคโตไมโอซินมีค่าลดลง ซึ่งเป็นผลจากการรวมตัวที่ส่วนหัวของโมเลกุลไมโอซิน (head-to-head interaction)

ในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นโปรตีนแอคโตไมโอซินมีการละลายลดลง ซึ่งต่างจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สามารถละลายได้มากขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อาจมีสาเหตุและปัจจัยสำคัญที่แตกต่างกันเนื่องจากการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อาจมีสาเหตุหลักของการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีน

ทั้งที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำเองหรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ส่วนที่อุณหภูมิ -18 °C สาเหตุหลักของการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนอาจเนื่องจากการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง รวมทั้งการเสียหายทางกายภาพของการเปลี่ยนแปลงของผลึกน้ำแข็ง (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Jay, 1992; Botta, 1994; Davis, 1995) ที่อุณหภูมิ -18 °C น้ำที่อยู่ในอาหารส่วนมากจะกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ถึงแม้ว่าจะมีน้ำบางส่วน หรือ bounded water ที่ไม่เปลี่ยนเป็นผลึกน้ำแข็ง ซึ่งสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกลางพาสารต่างๆ เคลื่อนที่และเป็นตัวกลางในการเกิดปฏิกิริยา ทำให้ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ และการเสื่อมเสียจะมากขึ้นเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งนานขึ้น (Fennema, Powrie and Marth, 1973)

นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงสถานะของน้ำกลายเป็นผลึกน้ำแข็งทำให้ค่า a_w ลดลง ดังนั้นจุลินทรีย์จึงไม่สามารถเจริญ (Jay, 1992) และยังอาจเป็นผลของการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติที่อาจทำให้จุลินทรีย์เกิดการบาดเจ็บ (injured cell) และไม่สามารถดำเนินเมตาบอลิซึมได้ตามปกติ (Golden and Arroyo-Gollyoun, 1997) ดังนั้นบทบาทของจุลินทรีย์ต่อการเสื่อมเสียคุณภาพกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จึงมีความสำคัญน้อยกว่าในการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

จากเหตุผลที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นเป็นผลให้การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C อาจมีปัจจัยการเสื่อมเสียเนื่องจาก hydrolytic enzymes น้อยกว่าที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และยังพบว่าไม่มีความแตกต่างของปริมาณโปรตีนคอลลาเจน เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C นานขึ้น ดังตารางที่ 4.7 และในทางตรงข้ามยังพบว่าผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่เหนี่ยวนำให้โปรตีนเกิดการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติ ทำให้โปรตีนแอคโตไมโอซินเกิดการรวมตัวและสามารถละลายได้น้อยลง ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 ปริมาณโปรตีนคอลลาเจนของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	คอลลาเจน (mg/g)
0	$7.66^{ns} \pm 1.54$
1	$8.86^{ns} \pm 0.26$
2	$8.09^{ns} \pm 0.86$
3	$7.36^{ns} \pm 0.30$
4	$7.76^{ns} \pm 0.40$
5	$7.41^{ns} \pm 0.60$
6	$6.87^{ns} \pm 2.28$

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การรวมตัวของโปรตีนไมโอซินจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไมโอซิน และสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Buttkus, 1970; Jiang et al., 1991; Hsu et al., 1993) โดยเฉพาะการสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ Ca^{2+}ATPase activity ของโปรตีนไมโอซิน ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ของโปรตีนแอคโตไมซินที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน แสดงในตารางที่ 4.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.8 ปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	Ca^{2+}ATPase activity (μmole/min/g)
0	$0.71^{a} \pm 0.11$
1	$0.65^{a} \pm 0.13$
2	$0.57^{ab} \pm 0.08$
3	$0.45^{b} \pm 0.05$
4	$0.39^{b} \pm 0.06$
5	$0.40^{b} \pm 0.02$
6	$0.38^{b} \pm 0.01$

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากตารางที่ 4.8 พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามในสภาพแช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้น ปริมาณ Ca^{2+}ATPase จะมีแนวโน้มลดลงอาจเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในส่วนหัวของโมเลกุลไมโอซิน ทำให้มีการเสียหายของ alkaline light chains และไม่สามารถทำหน้าที่เป็น reactive site และจับกับสับเสตรท หรือ ATP (adenosine tripolyphosphate) (Bandman, 1987; Kijowski, 2001) ซึ่งอาจเป็นผลการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของโปรตีนภายในเซลล์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของตัวถูกละลายและค่าอิเลคโตไลซ์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากการแช่เยือกแข็งและในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง และพบว่าการลดลงของปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ยังมีความสัมพันธ์กับการละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น Hsu และคณะ (1993) พบว่าการเก็บรักษาเนื้อปลา Pacific Whiting (*Merluccius productus*) ไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เป็นเวลานาน 10 เดือน ปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินลดลงเนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน

การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนแอคโตไมโอซิน จะมีความสัมพันธ์กับการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ รวมทั้งคุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน (Zayas, 1997) ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน และ ปริมาณ thawing loss ของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีน (%)	Thawing loss (%)
0	$96.02^{a} \pm 0.5$	$0.43^{a} \pm 0.16$
1	$95.58^{a} \pm 1.0$	$1.20^{ab} \pm 0.26$
2	$94.37^{ab} \pm 0.7$	$1.51^{ab} \pm 0.43$
3	$92.70^{bc} \pm 1.8$	$1.83^{b} \pm 0.84$
4	$91.63^{c} \pm 0.8$	$2.03^{b} \pm 0.76$
5	$91.94^{c} \pm 0.9$	$1.94^{b} \pm 0.23$
6	$90.60^{c} \pm 0.7$	$2.17^{b} \pm 0.23$

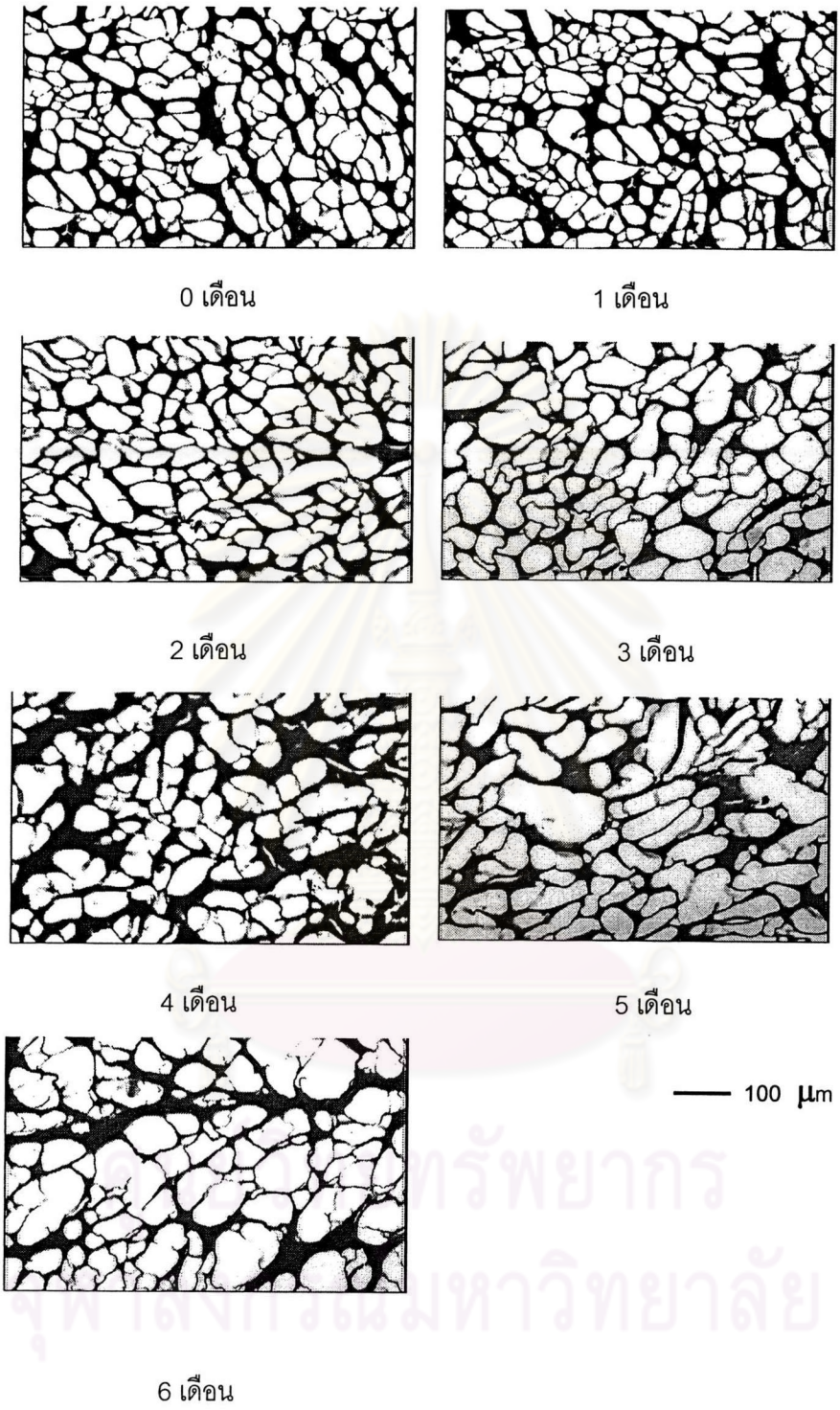
a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น พบว่าจะทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อมีคุณสมบัติของการอุ้มน้ำลดลง อาจเป็นผลจากการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนแอคโตไมโอซินเนื่องจากการสูญเสียคุณสมบัติโครงสร้าง และการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเชิงหน้าที่ นอกจากนี้โปรตีนแอคโตไมโอซินยังเป็นกลุ่มโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนกล้ามเนื้อ (Pearson and Young, 1989) สาเหตุการเสื่อมเสียคุณภาพโปรตีนแอคโตไมโอซินอาจเป็นผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ผลที่ได้พบว่ามีความสัมพันธ์กับการสูญเสียคุณสมบัติการละลายและการเป็นเอนไซม์ Ca^{2+}ATPase ของโปรตีนแอคโตไมโอซิน นอกจากนี้ยังพบว่าการสูญเสียคุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน อาจเป็นผล

มาจากการเสียหายทางกายภาพเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของขนาดผลึกน้ำแข็ง ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Awad และคณะ (1969) พบว่าการเก็บรักษาเนื้อปลา Whitefish ไว้ที่อุณหภูมิ -10 °C เป็นเวลานาน 4 เดือน ทำให้โปรตีนกล้ามเนื้อมีคุณสมบัติการอุ้มน้ำลดลง การลดลงของคุณสมบัติการอุ้มน้ำของกล้ามเนื้อกุ้งในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C พบว่ามีความสัมพันธ์กับปริมาณ thawing loss ที่คำนวณ(ดังสมการ 2)ได้จากร้อยละของผลต่างของน้ำหนักกุ้งแช่เยือกแข็งก่อนการละลายน้ำแข็งและหลังการละลายน้ำแข็ง ดังแสดงในตารางที่ 4.9 พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น ปริมาณ thawing loss จะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเนื่องจากการสูญเสียคุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติจากการแช่เยือกแข็ง ดังนั้นเมื่อนำกุ้งแช่เยือกแข็งมาผ่านการละลายน้ำแข็งออกโปรตีนจึงไม่สามารถดูดน้ำกลับคืนเข้าสู่เซลล์ได้ตามปกติ นอกจากนี้ยังอาจเป็นการเสียหายทางกายภาพของเซลล์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นภายในกล้ามเนื้อ

การเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาไว้ในสภาพแช่เยือกแข็ง นอกจากจะทำให้โปรตีนเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติแล้ว ยังพบว่าขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเกิดการเสียหายทางกายภาพ โดยเฉพาะการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้นอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็ง หรือการตกผลึกใหม่เกิดขึ้น (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Fellows, 1990; Pham and Mawson, 1997) การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงขนาดผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน ดังแสดงในรูปที่ 4.5 และตารางที่ 4.10 ตามลำดับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.5 ภาพ micrographs แสดงผลึกน้ำแข็งของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน (50x, Wright's Giemsa)

ตารางที่ 4.10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางผลึกน้ำแข็งของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	เส้นผ่านศูนย์กลางของผลึกน้ำแข็ง (μm)
0	$30.36^{a} \pm 1.4$
1	$31.16^{b} \pm 0.8$
2	$33.92^{bc} \pm 1.7$
3	$33.25^{bc} \pm 0.6$
4	$34.30^{bc} \pm 3.0$
5	$37.51^{cd} \pm 0.8$
6	$40.87^{d} \pm 2.87$

a, b, c, d ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

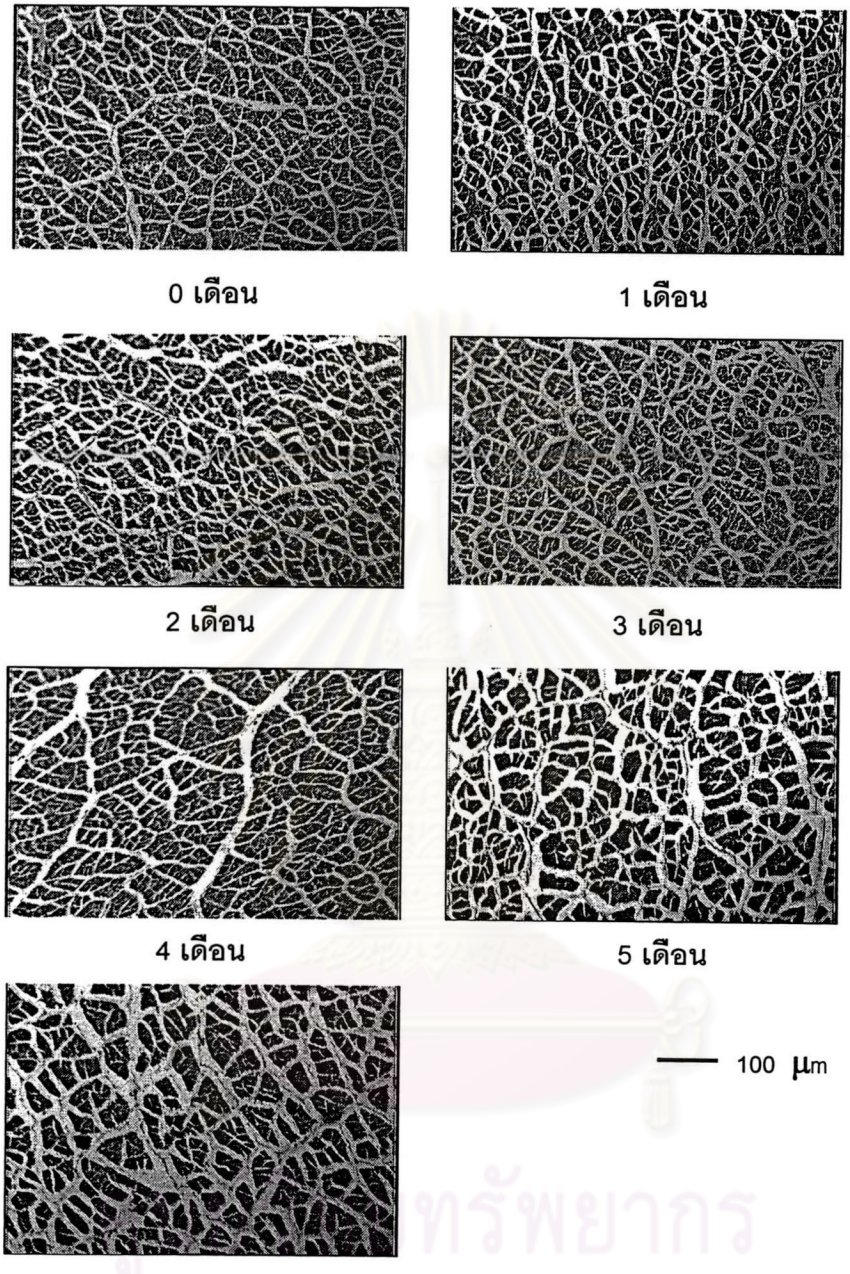
การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นระยะเวลานานขึ้น ทำให้ผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อกุ้งมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่ขึ้น หรือมีขนาดผลึกใหญ่ขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลของการตกผลึกใหม่ (recrystallization) ที่คาดว่าน่าจะเกิดขึ้นจากความไม่สม่ำเสมอของอุณหภูมิในระหว่างการเก็บรักษา งานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C และพบว่าในระหว่างการเก็บรักษามีการขึ้นลงของอุณหภูมิอยู่ในช่วงของค่าการเบี่ยงเบน ±2°C จึงมีความเป็นไปได้ที่อาจทำให้มีการตกผลึกใหม่ในรูปแบบของ migratory (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Fellow, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าการโตขึ้นของขนาดผลึกน้ำแข็ง อาจเป็นผลเนื่องจากการเคลื่อนที่ของน้ำในส่วนที่กลายเป็นน้ำแข็งไม่หมด หลังจากการแช่เยือกแข็งอย่างสมบูรณ์แล้ว (Fennema, Powrie and Marth, 1973) เนื่องจากความแตกต่างของความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่อยู่ภายในเซลล์และนอกเซลล์ ทำให้มีการเคลื่อนที่ของน้ำจากภายในเซลล์ออกไปนอกเซลล์และเกิดการรวมตัวกับผลึกน้ำแข็งที่มีอยู่เดิม จึงทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้น

จากภาพ micrographs (รูปที่ 4.5) สังเกตได้ว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งแช่เยือกแข็งนานขึ้น ผลึกน้ำแข็งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของผลึกน้ำแข็งจะไม่สม่ำเสมอมากขึ้น ขนาดของผลึกน้ำแข็งที่ใหญ่ขึ้นอาจเป็นผลมาจากการรวมตัวของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กในบริเวณใกล้เคียงกัน การตกผลึกใหม่ในลักษณะนี้เรียกว่าการตกผลึกแบบ accretive (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Fellow, 1990) ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Ngapo และคณะ (1999a, b) ที่พบว่าการเก็บรักษาเนื้อหมูไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 0 ถึง 4 สัปดาห์ทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเพิ่มขึ้นเนื่องจากการตกผลึกใหม่

การโตขึ้นของผลึกน้ำแข็งหรือการตกผลึกใหม่ เป็นผลโดยตรงมาจากการเคลื่อนที่ของน้ำและ/หรือการสูญเสียน้ำของเซลล์ ซึ่งอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมของโปรตีนและเป็นสาเหตุชักนำให้เกิดการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Xiong, 1997) โดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับคุณสมบัติของแอคโตไมโอซินที่มีความสามารถละลายได้ลดลง เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C นานขึ้น

ผลการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม มีผลโดยตรงกับการเสียหายทางกายภาพของเนื้อเยื่อหรือโปรตีนกล้ามเนื้อ โดยพบว่าขนาดของผลึกน้ำแข็งจะเป็นตัวเพิ่มแรงกดให้เซลล์หรือเส้นใยกล้ามเนื้อรวมตัวอัดแน่นมากขึ้น รวมทั้งอาจทำให้เซลล์มีการฉีกขาดเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นพบว่าผลึกน้ำแข็งจะมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งจะทำให้การเสียหายทางกายภาพดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ว่าผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม อาจมีโอกาสเกิดขึ้นได้ทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์ เพราะว่าอัตราเร็วที่ใช้ในการแช่แข็งกุ้งก้ามกรามครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 1.8 cm/h ซึ่งอาจไม่เร็วพอที่จะทำให้ผลึกน้ำแข็งเกิดขึ้นเฉพาะภายในเซลล์ (Grujic et al., 1993) การเกิดผลึกน้ำแข็งทั้งภายในเซลล์และนอกเซลล์จะเป็นตัวช่วยเพิ่มแรงกดในทิศทางที่ตรงข้ามกัน และอาจทำให้เซลล์หรือเนื้อเยื่อมีการเสียหายหรือฉีกขาดมากขึ้น (Grujic et al., 1993)

การเสื่อมเสียทางกายภาพของโครงสร้างกล้ามเนื้อ ที่มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็ง จากผลการศึกษาโครงสร้างกล้ามเนื้อในระดับต่ำกว่าจุลภาค เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.6 และผลการวัดระยะห่างด้วย image analyzer ดังแสดงผลในตารางที่ 4.11 ตามลำดับ



รูปที่ 4.6 ภาพ micrographs แสดงระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อกล้ามของกุ้งก้ามกราม ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ-18 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือน (50x, hematoxylin and eosin)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.11 ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C(เดือน)	ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ (μm)
0	$9.61^{a} \pm 0.45$
1	$10.62^{ab} \pm 0.41$
2	$10.24^{a} \pm 0.63$
3	$11.55^{abc} \pm 0.44$
4	$12.40^{bcd} \pm 0.69$
5	$13.55^{cd} \pm 1.25$
6	$13.96^{d} \pm 1.32$

a, b, c, d ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกรามจะมีค่ามากขึ้น อาจเป็นผลเนื่องจากขนาดของผลึกน้ำแข็งทำให้มีการเพิ่มแรงกดหรือแรงอัดให้เซลล์มาอยู่รวมกันแน่นมากขึ้น โดยเฉพาะการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้เป็นเวลานานขึ้นจะทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้น และส่งผลให้มีการเพิ่มแรงกดให้เซลล์อัดตัวกันได้มากกว่าผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กกว่า นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลของการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ในสภาพแช่เยือกแข็ง ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อเกิดการหดตัว (Bello et al., 1981; Hurling and MacArthur, 1996)

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ไว้ในสภาพแช่เยือกแข็ง แม้ว่าจะช่วยรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไว้ได้เป็นเวลานานขึ้น แต่ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ยังคงสามารถเกิดขึ้นได้อย่างช้าๆ (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Fellow, 1990) ดังนั้นการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้นจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีการเสื่อมเสียมากขึ้น การติดตามการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนเนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีน ดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ปริมาณ hydrolytic degradation products ของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

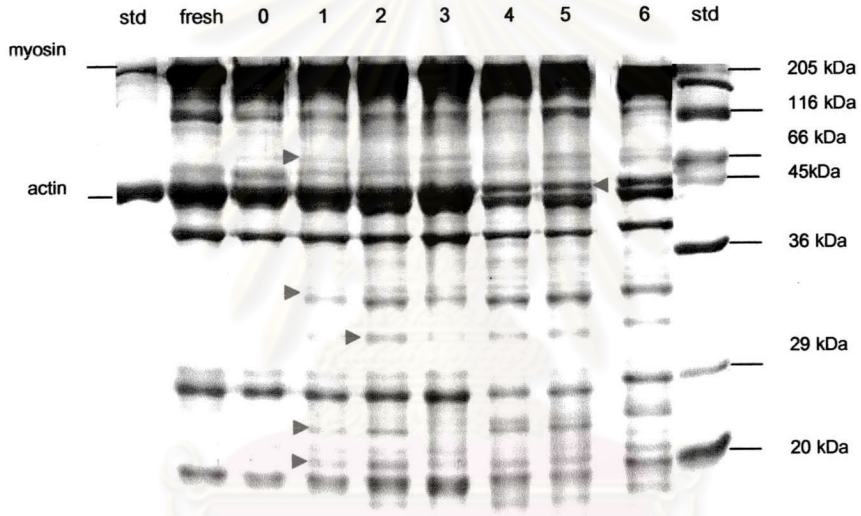
ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	Hydrolytic degradation products (μmole/g)
0	$0.625^{ns} \pm 0.18$
1	$0.750^{ns} \pm 0.11$
2	$1.250^{ns} \pm 0.21$
3	$1.750^{ns} \pm 0.18$
4	$2.375^{ns} \pm 0.08$
5	$2.250^{ns} \pm 0.19$
6	$3.000^{ns} \pm 0.44$

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 0-6 เดือน พบว่าปริมาณ hydrolytic degradation products มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งคล้ายกับการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C แต่มีอัตราการเพิ่มขึ้นต่ำกว่า อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา (Botta, 1994) ยิ่งการใช้อุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ต่ำกว่าจะช่วยชะลอปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์ให้เกิดขึ้นได้ช้ากว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูงกว่า (Davis, 1995) การเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ในกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อาจเป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ในตัวสัตว์น้ำและจากจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ในการเก็บ

รักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C พบว่าการเสื่อมเสียเนื่องจากการทำงานของจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน อาจไม่มีบทบาทสำคัญในการเสื่อมเสีย เพราะว่าผลของการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็งทำให้น้ำส่วนมากที่อยู่ในโปรตีนกล้ามเนื้อกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง และเป็นผลให้ค่า a_w ต่ำลงจนกระทั่งกลุ่มจุลินทรีย์ส่วนมากไม่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ในสภาวะดังกล่าว (Jay, 1992; Golden and Arroyo-Gollyoun, 1997)

การเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนแอคโตไมโอซินเนื่องจากการย่อยสลาย จะทำให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนหรือการเปลี่ยนแปลงของ electrophoretic pattern ดังแสดงในรูปที่ 4.7

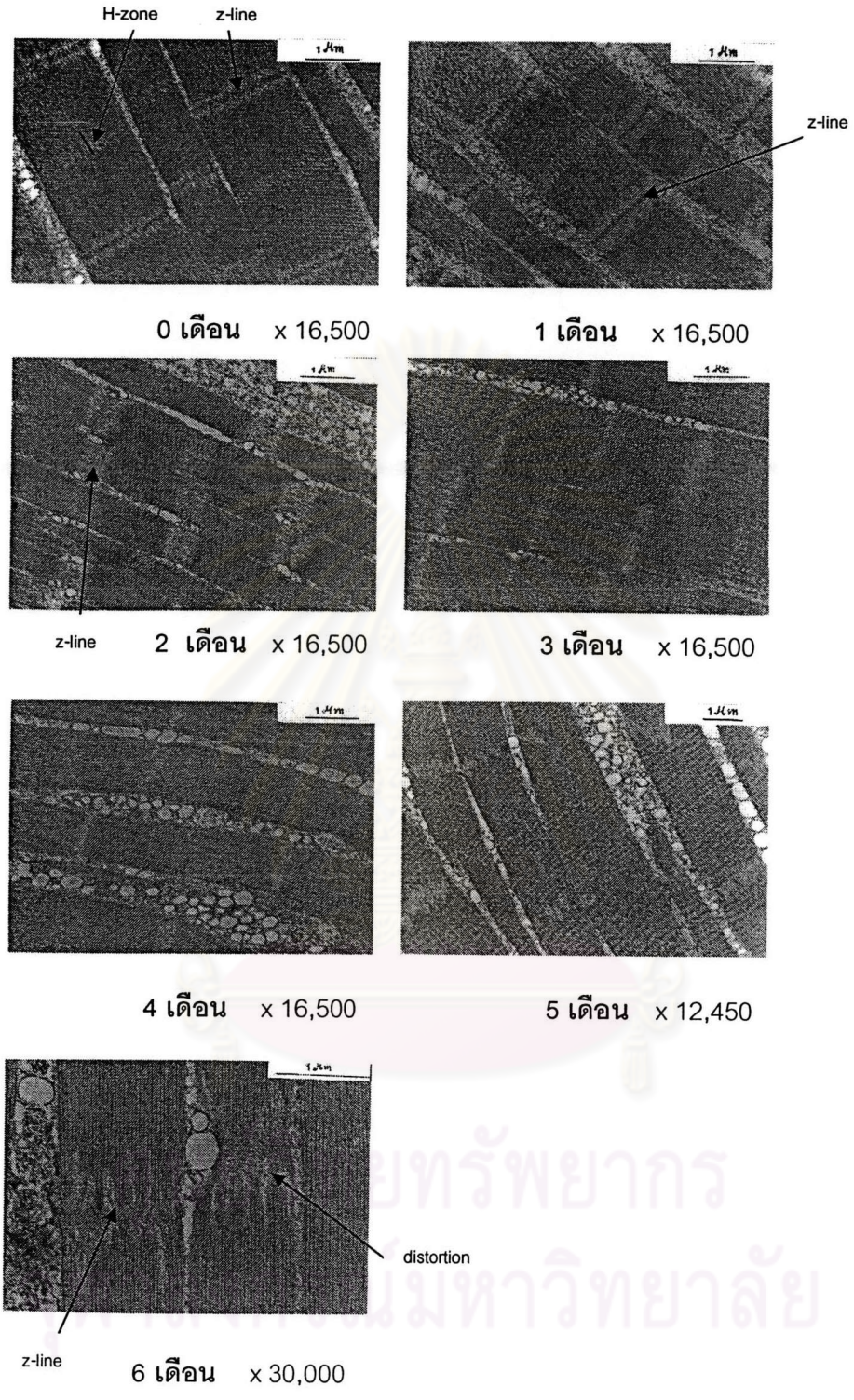


รูปที่ 4.7 electrophoretic pattern ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C std; myosin, actin fresh; กุ้งก้ามกรามสด 0, 1.....และ 6 เวลาการเก็บรักษา(เดือน) std; standard mixture (mw. 20,000-200,000) Myosin, rabbit muscle 205 kDa, β-galactosidase, E coli 116 kDa, Albumin, bovine 66 kDa, Albumin, egg 45 kDa, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle 36 kDa, Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes 29 kDa and Trypsin inhibitor, soybean 20 kDa ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยก 38 ไมโครกรัม / 5μL

จากภาพ electrophoretic pattern ของโปรตีนแอคโตไมโอซิน สังเกตว่ามีการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66, 33, 31, 24 และ 20 kDa เมื่อเก็บรักษากุ้งไว้เป็นเวลา 1 เดือน และยังพบว่าแถบโปรตีนแอคตินมีความเข้มลดลง เมื่อเก็บรักษากุ้งไว้เป็นเวลานาน 4 เดือน แสดงว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงแถบโปรตีนหรือขนาดโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการถูกย่อยสลายของโปรตีนโดยพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products เมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่ามีความแตกต่างของแถบโปรตีนของแอคโตไมโอซินที่เกิดขึ้น ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และ -18 °C คาดว่าเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของการทำงานของเอนไซม์โดยขึ้นกับสภาวะอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา

เนื่องจาก myofibrillar protein หรือแอคโตไมโอซิน เป็นโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักของกล้ามเนื้อและทำหน้าที่เป็นโครงสร้างกล้ามเนื้อ ดังนั้นการเสื่อมเสียคุณภาพของโปรตีนกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของโครงสร้างกล้ามเนื้อ ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระดับจุลภาค ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเคตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope, TEM) ดังแสดงในรูปที่ 4.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.8 ภาพ electron micrographs แสดงโครงสร้างกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกรามระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C

จากภาพ electron micrographs ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (รูปที่ 4.8) พบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษากุ้งแช่เยือกแข็งนานขึ้น สังเกตได้ว่าโครงสร้างของเส้นใยกล้ามเนื้อมีการเสียหายมากขึ้น โดยพบว่า Z-line มีความชัดเจนลดลงหลังจากการเก็บรักษากุ้งแช่เยือกแข็งเป็นเวลามากกว่า 3 เดือน และเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษานานขึ้น Z-line จะมีการเสียหายมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ H-zone มีการขยายตัวกว้างขึ้นหรืออาจมีการหายไป รวมทั้งมีการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อในบริเวณ I-band ผลการเสียหายของ Z-line และการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อน่าจะเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีน ซึ่งได้เคยกล่าวรายละเอียดไว้แล้วในข้อ 4.1

แม้ว่าการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้น ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C และ 4 °C จะมีลักษณะคล้ายกัน คือ มีการเสียหายของ Z-line และมีการยืดตัวหรือการหายไปของ H-zone รวมทั้งมีการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อ และยังพบว่ามีการบวมพองของ endoplasmic reticulum ที่ดันกล้ามเนื้อให้อัดกันทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเส้นใยกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้น แต่ก็พบว่าการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จะเกิดการเสียหายช้ากว่าที่อุณหภูมิ 4 °C

จากข้อมูลในข้อ 4.1 พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จะทำให้โปรตีนมีการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติเนื่องจากการทำงานของ hydrolytic enzymes ซึ่งต่างจากการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ที่พบว่าการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนอาจมีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็งและการทำงานของ hydrolytic enzymes ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อในระดับจุลภาค เพื่อใช้ติดตามการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของเส้นใยโปรตีนภายในซาร์โคเมียร์ ไม่สามารถใช้อธิบายถึงผลการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็ง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำแช่เยือกแข็ง ถือเป็นปัจจัยคุณภาพสำคัญที่แสดงถึงการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ (Botta, 1994) เนื่องจากสัตว์น้ำทั่วไป รวมทั้งกุ้งก้ามกรามจัดเป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในประเภทโปรตีนกล้ามเนื้อ และจากคุณสมบัติของโปรตีนที่ไวต่อการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติ อาจทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเนื้อสัมผัส จากการวิเคราะห์คุณภาพเนื้อสัมผัสของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม โดยการวัดค่าแรงต้านทานการตัดขาดที่ทำให้เนื้อกุ้งแยกขาดออกจากกัน (N/cm) ผลดังแสดงในตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 6 เดือน

ระยะเวลาในการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (เดือน)	ค่าแรงต้านทานการตัดขาด (N/cm)
0	$17.88^{ns} \pm 1.4$
1	$18.45^{ns} \pm 1.0$
2	$18.43^{ns} \pm 2.0$
3	$19.73^{ns} \pm 1.6$
4	$20.44^{ns} \pm 0.3$
5	$20.66^{ns} \pm 0.5$
6	$21.03^{ns} \pm 1.7$

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C นานขึ้น พบว่าค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเนื่องจากการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็งและในระหว่างการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง ทำให้โปรตีนแอคโตไมโอซินมีการรวมตัวกันและส่งผลให้เนื้อสัมผัสของกุ้งมีความเหนียวมากขึ้น (Owusu-Ansah and Hultin, 1986; Jiang et al., 1991; Hsu et al., 1993) แม้ว่าการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C จะมีปัจจัยการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการทำงานของ hydrolytic enzymes ร่วมด้วย โดยจะทำให้กุ้งมีเนื้อสัมผัสนิ่มลงซึ่งให้ผลในลักษณะที่ตรง

ข้ามกับการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็ง (Srinivisan et al., 1998) ดังนั้นจึงคาดว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ปัจจัยการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็ง อาจมีบทบาทความสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกราม มากกว่าการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการทำงานของ hydrolytic enzymes นอกจากนี้ยังพบว่าการเหนียวของเนื้อสัมผัสกุ้งก้ามกราม อาจเป็นผลมาจากการเสียหายทางกายภาพที่เกิดขึ้นจากขนาดของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้เซลล์มีการอัดตัวกันแน่นมากขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การเสื่อมเสียคุณภาพของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม (*Macrobrachuim rosenbergii*) ระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ

การละลายน้ำแข็งออกจากผลิตภัณฑ์ที่ถูกแช่เยือกแข็งอย่างสมบูรณ์แล้ว จากนั้นก็มีการนำผลิตภัณฑ์กลับไปแช่เยือกแข็งซ้ำใหม่ การกระทำซ้ำๆ เช่นนี้ เรียกว่า การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ เป็นที่ทราบกันดีว่าการแช่เยือกแข็งจะทำให้โปรตีนมีการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติ ส่วนในระหว่างการละลายน้ำแข็งออกจากผลิตภัณฑ์แช่เยือกแข็ง จะทำให้ปฏิกิริยาการเสื่อมเสียต่างๆ รวมทั้งการทำงานของเอนไซม์สามารถทำงานได้ดีขึ้นเนื่องจากผลของการเพิ่มอุณหภูมิ (Fennema, Poerie and Marth, 1973; Fellow, 1990) ดังนั้นการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งผลิตภัณฑ์เป็นจำนวนซ้ำมากขึ้น อาจทำให้โปรตีนเกิดการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติมากขึ้น

ในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการละลายของโปรตีน สามารถใช้เป็นดัชนีติดตามการเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่เกิดขึ้นเนื่องจากการแช่เยือกแข็ง (Jiang and Lee, 1985) ผลการวิเคราะห์การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากเนื้อกุ้งก้ามกราม เมื่อมีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ ดังแสดงในตารางที่ 4.14

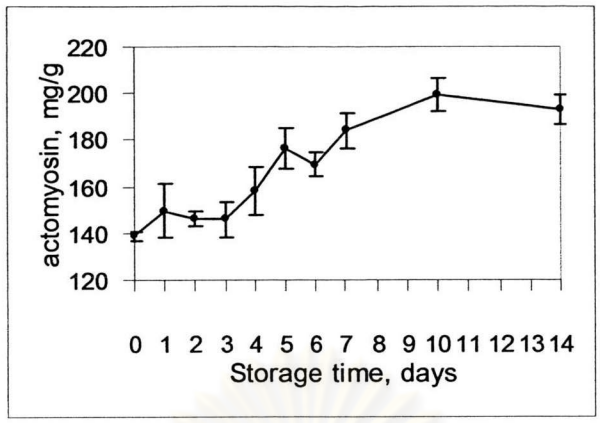
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.14 การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซิน ซาร์โคพลาสมิค และโปรตีนที่ละลายทั้งหมด ที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

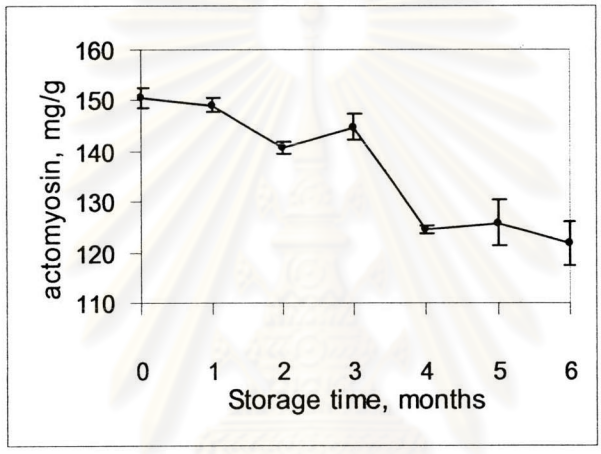
จำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ	การละลายของโปรตีน		
	แอคโตไมโอซิน (mg/g)	ซาร์โคพลาสมิค (mg/g)	โปรตีนที่ละลายทั้งหมด (mg/g)
0	149.20 ^{a} ± 9.6	82.08 ^{a} ± 1.97	239.60 ^{a} ± 7.0
1	152.85 ^{ab} ± 3.2	64.43 ^{b} ± 2.7	225.56 ^{b} ± 4.2
2	153.70 ^{ab} ± 5.1	65.00 ^{b} ± 6.89	225.82 ^{b} ± 4.5
3	164.80 ^{bc} ± 2.4	50.73 ^{c} ± 8.5	223.31 ^{b} ± 1.61
4	167.30 ^{bc} ± 3.8	44.95 ^{c} ± 2.6	219.53 ^{b} ± 0.8
5	170.35 ^{c} ± 2.6	43.55 ^{c} ± 1.3	220.72 ^{b} ± 1.81

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

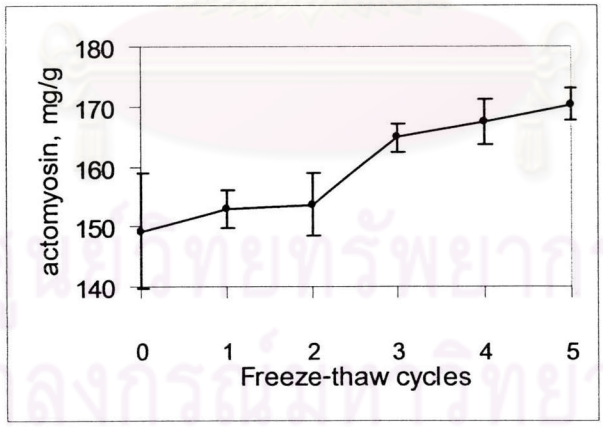
การนำกุ้งก้ามกรามมาผ่านการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ เป็นจำนวนรอบมากขึ้น ทำให้การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินเพิ่มขึ้น ซึ่งคล้ายกับการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C แต่มีการเพิ่มขึ้นของการละลายของแอคโตไมโอซินน้อยกว่า (รูปที่ 4.9) คาดว่าอาจเป็นผลเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่มีอยู่ทั้งภายในตัวสัตว์น้ำเอง หรือจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ ทำให้มีการเสียหายของพันธะเปปไทด์ SS และ SH รวมทั้งสูญเสียคุณสมบัติของโครงสร้างโปรตีนและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ดังได้เคยอธิบายรายละเอียดไว้แล้วในข้อ 4.1 การเสื่อมเสียดังกล่าวน่าจะเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิในระหว่างการละลายน้ำแข็ง ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งตรงข้ามกับผลของการแช่เยือกแข็งอาจทำให้การทำงานของเอนไซม์ต่างๆ เกิดขึ้นช้าลง นอกจากนี้ยังพบว่าการเสียหายทางกายภาพของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจทำให้เซลล์มีการฉีกขาด และมีการรั่วของเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ ทำให้การทำงานของ hydrolytic enzymes มากขึ้น และยังพบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวนรอบมากขึ้น ทำให้ปริมาณโปรตีนซาร์โคพลาสมิค (ดังตารางที่ 4.14) และโปรตีนคอลลาเจน (ดังตารางที่ 4.15) ที่สกัดได้จากกล้ามเนื้อในกุ้งก้ามกรามมีแนวโน้มลดลง



a



b



c

รูปที่ 4.9 ปริมาณการละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (a) -18 °C (b) และในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (c)

การละลายของแอคโตไมโอซินที่เพิ่มขึ้น เมื่อมีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำกุ้งก้ามกรามมากขึ้น พบว่าต่างจากการละลายของแอคโตไมซินที่ลดลงในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (รูปที่ 4.9) อาจเนื่องจากผลของการแช่เยือกแข็งที่ทำให้น้ำส่วนมากที่อยู่ภายในอาหารเปลี่ยนสถานะกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง เป็นผลให้ค่า a_w ของน้ำลดลงจุลินทรีย์ส่วนมากจึงไม่สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนได้ (Fennema, Powrie and Marth, 1973; Jay, 1992; Golden and Arroyo-Gollyoun, 1997) นอกจากนี้ยังอาจเป็นผลของการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่เกิดขึ้นจากการแช่เยือกแข็ง ทำให้โปรตีนไมโอซินมีการรวมตัวมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้นและละลายได้ยากขึ้น (Buttkus, 1970; Jiang et al., 1991; Hsu et al., 1993) ดังนั้นการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ในสภาพแช่เยือกแข็งเป็นเวลานานขึ้นอาจทำให้การละลายของโปรตีนแอคโตไมโอซินลดลงมากกว่า การนำกุ้งมาผ่านการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งเป็นจำนวนหลายรอบ เนื่องจากความแตกต่างของสภาวะการเก็บรักษาที่อาจทำให้ปัจจัยสำคัญของการเสื่อมเสียคุณภาพของแอคโตไมโอซินต่างกัน

ตารางที่ 4.15 ปริมาณโปรตีนคอลลาเจนของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

จำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ	คอลลาเจน (mg/g)
0	$8.32^{ns} \pm 0.69$
1	$8.28^{ns} \pm 1.68$
2	$7.12^{ns} \pm 1.87$
3	$7.78^{ns} \pm 1.27$
4	$7.28^{ns} \pm 0.54$
5	$6.82^{ns} \pm 0.83$

ns ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การลดลงของโปรตีนซาร์โคพลาสมิค ในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งเป็นจำนวนรอบมากขึ้น พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ thawing loss ดังตารางที่ 4.16

ตารางที่ 4.16 ปริมาณ thawing loss และการอุ้มน้ำของโปรตีน ของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

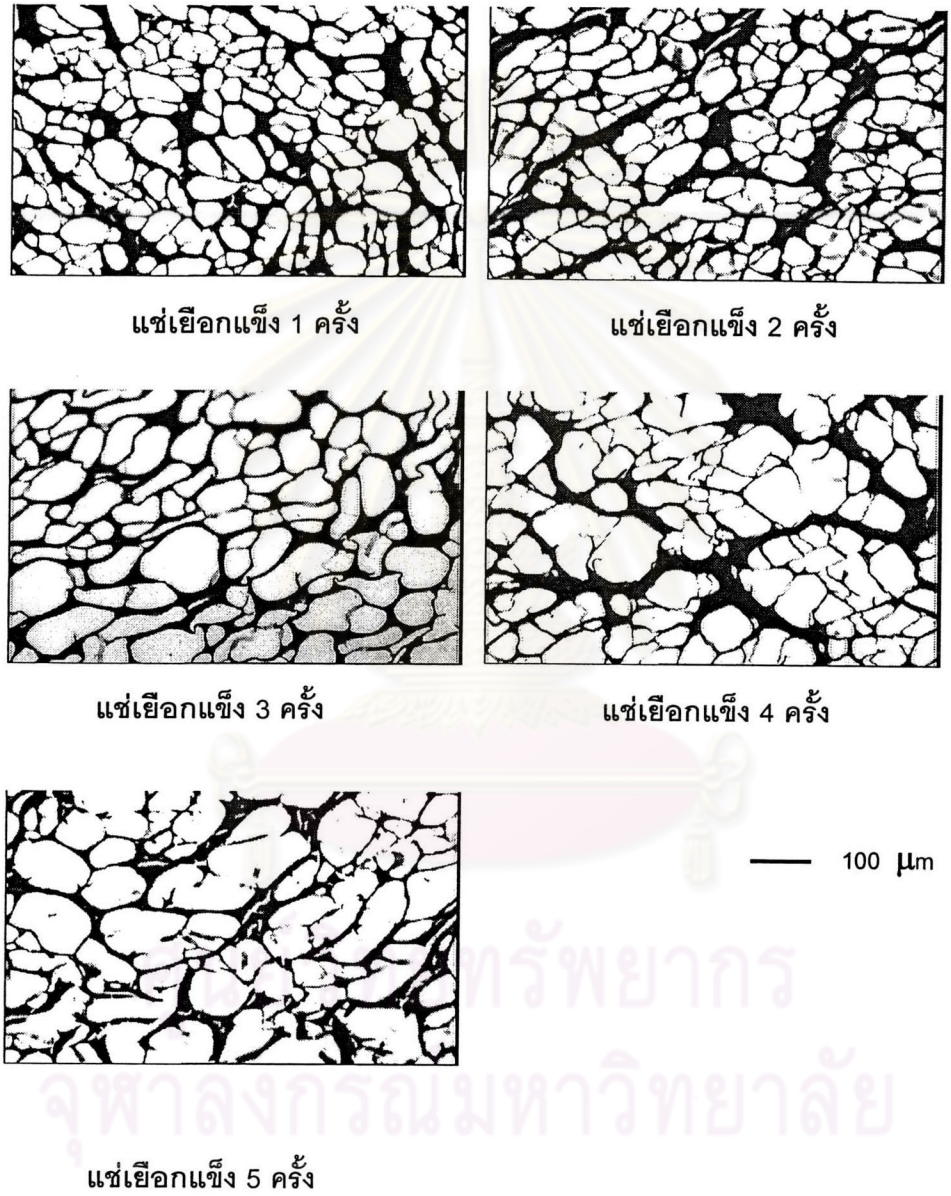
การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (รอบ)	Thawing loss (%)	การอุ้มน้ำของโปรตีน (%)
0	-	$95.81^{a} \pm 0.1$
1	$0.51^{a} \pm 0.4$	$94.42^{ab} \pm 0.8$
2	$1.17^{ab} \pm 0.1$	$94.11^{ab} \pm 1.3$
3	$1.69^{b} \pm 0.3$	$92.28^{bc} \pm 0.1$
4	$1.87^{b} \pm 0.6$	$92.13^{bc} \pm 2.2$
5	$2.24^{b} \pm 0.6$	$91.19^{c} \pm 0.2$

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณ thawing loss เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลเนื่องจากการเสียหายหรือการฉีกขาดของเซลล์เนื่องจากผลึกน้ำแข็ง และอาจทำให้โปรตีนซาร์โคพลาสมิคซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติละลายน้ำได้มีการสูญเสียออกมากับของเหลวหรือ thawing loss (Fennema, Powrie and Marth, 1973) นอกจากนี้ยังพบว่าการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน หรือการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการละลายของโปรตีนที่เกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ อาจทำให้มีการสูญเสียคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของโปรตีนรวมทั้งสูญเสียคุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีน (Fellow, 1990; Zayas, 1997) ดังตารางที่ 4.17 พบว่าการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งกุ้งก้ามกรามเป็นจำนวนรอบมากขึ้นทำให้คุณสมบัติการอุ้มน้ำของโปรตีนลดลงโดยสัมพันธ์กับปริมาณ thawing loss ที่เพิ่มขึ้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็ง ที่เกิดขึ้นในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.10 และผลการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของผลึกน้ำแข็งดังแสดงในตารางที่ 4.17



รูปที่ 4.10 ภาพ micrographs แสดงผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามและจำนวนครั้งในการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (50x, Wright's Giemsa)

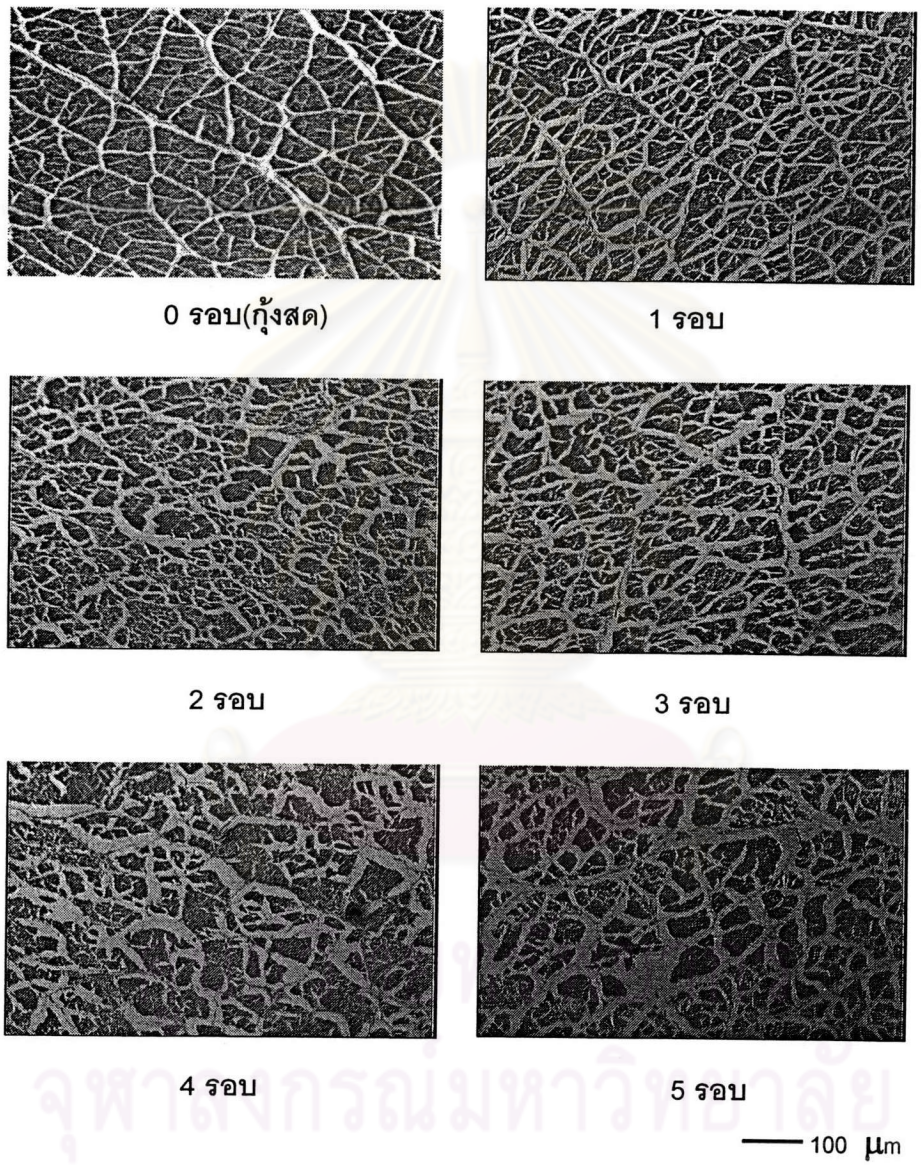
ตารางที่ 4.17 เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกน้ำแข็งในกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามและจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ

การละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำ (รอบ)	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของผลึกน้ำแข็ง (μm)
1	$32.12^{a} \pm 3.2$
2	$35.70^{ab} \pm 3.3$
3	$37.26^{abc} \pm 2.8$
4	$41.80^{bc} \pm 2.7$
5	$43.61^{c} \pm 1.4$

a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p \leq 0.05$)

เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเพิ่มขึ้น พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของผลึกน้ำแข็งจะมีขนาดเพิ่มขึ้น และยังพบว่าการกระจายขนาดของผลึกน้ำแข็งมีความไม่สม่ำเสมอมากขึ้น (ดังรูปที่ 4.10) การเพิ่มขึ้นของขนาดผลึกน้ำแข็งอาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของแรงดันออสโมซิส ระหว่างภายในเซลล์กับนอกเซลล์ทำให้มีการเคลื่อนที่ของน้ำเกิดขึ้นในระหว่างการแช่เยือกแข็ง ผลกระทบของผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเพิ่มขึ้นจะส่งผลโดยตรงกับการเสียหายทางกายภาพและการฉีกขาดของเซลล์ (Fennema, Poerie and Marth, 1973; Fellow, 1990) เป็นผลให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่อยู่ในส่วนของเหลวภายนอกเซลล์เพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของตัวถูกละลายทำให้น้ำมีจุดเยือกแข็งลดต่ำลง ดังนั้นเมื่อนำกุ้งก้ามกรามไปแช่เยือกแข็งซ้ำในสภาวะเดิม(still freezer -65 °C 6 h) จุดเยือกแข็งของน้ำที่ลดต่ำลงจะเป็นสาเหตุให้การเกิดนิวเคลียสผลึกมีจำนวนลดลงและทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้น ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hurling และ McArthur (1996) ที่พบว่าผลึกน้ำแข็งในเนื้อปลาคอดจะมีขนาดผลึกใหญ่ขึ้น เมื่อมีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ

การเพิ่มขึ้นของขนาดผลึกน้ำแข็ง อาจทำให้กล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามมีการเสียหายทางกายภาพมากขึ้น และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.11 และตารางที่ 4.18 ตามลำดับ



รูปที่ 4.11 ภาพ micrographs แสดงระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (50x, hematoxylin and eosin)

ตารางที่ 4.18 ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามและจำนวนรอบของการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำ

การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (รอบ)	ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ (μm)
0 (กุ้งก้ามกรามสด)	8.98 [a] ± 0.5
1	9.14 [a] ± 1.3
2	10.06 [a] ± 1.4
3	11.15 [a] ± 1.0
4	14.01 [b] ± 0.9
5	15.24 [b] ± 1.6

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p \leq 0.05$)

การเพิ่มจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมากขึ้น พบว่าจะมีผลต่อระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลจากแรงกดหรือแรงอัดของขนาดผลึกน้ำแข็งที่ทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีการเรียงตัวอัดกันแน่นมากขึ้น (Bello et al.,1981; Huring and McArthur ,1996) ผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะส่งผลให้มีการเพิ่มแรงกดให้เซลล์มารวมตัวกันแน่นมากกว่าผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเล็กกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้น อาจเป็นผลจากการหดตัวของเซลล์ที่เกิดขึ้นจากการสูญเสียน้ำของเซลล์ในระหว่างการแช่เยือกแข็ง (Huring and McArthur ,1996) ผลจากภาพ micrographs (รูปที่ 4.11) จะสังเกตได้ว่ามัดเส้นใยกล้ามเนื้อบางส่วนมีการเสียหายมากขึ้น เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียหายและการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีสาเหตุมาจากการเพิ่มขนาดของผลึกน้ำแข็ง Sigurgisladottir et al (2000) พบว่าการนำเนื้อปลา salmon (*Salmo salar*) มาผ่านการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ จะทำให้ระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อมีค่ามากขึ้น รวมทั้งมีการหดตัวของเส้นใยโปรตีนเนื่องจากการสูญเสียน้ำของเซลล์

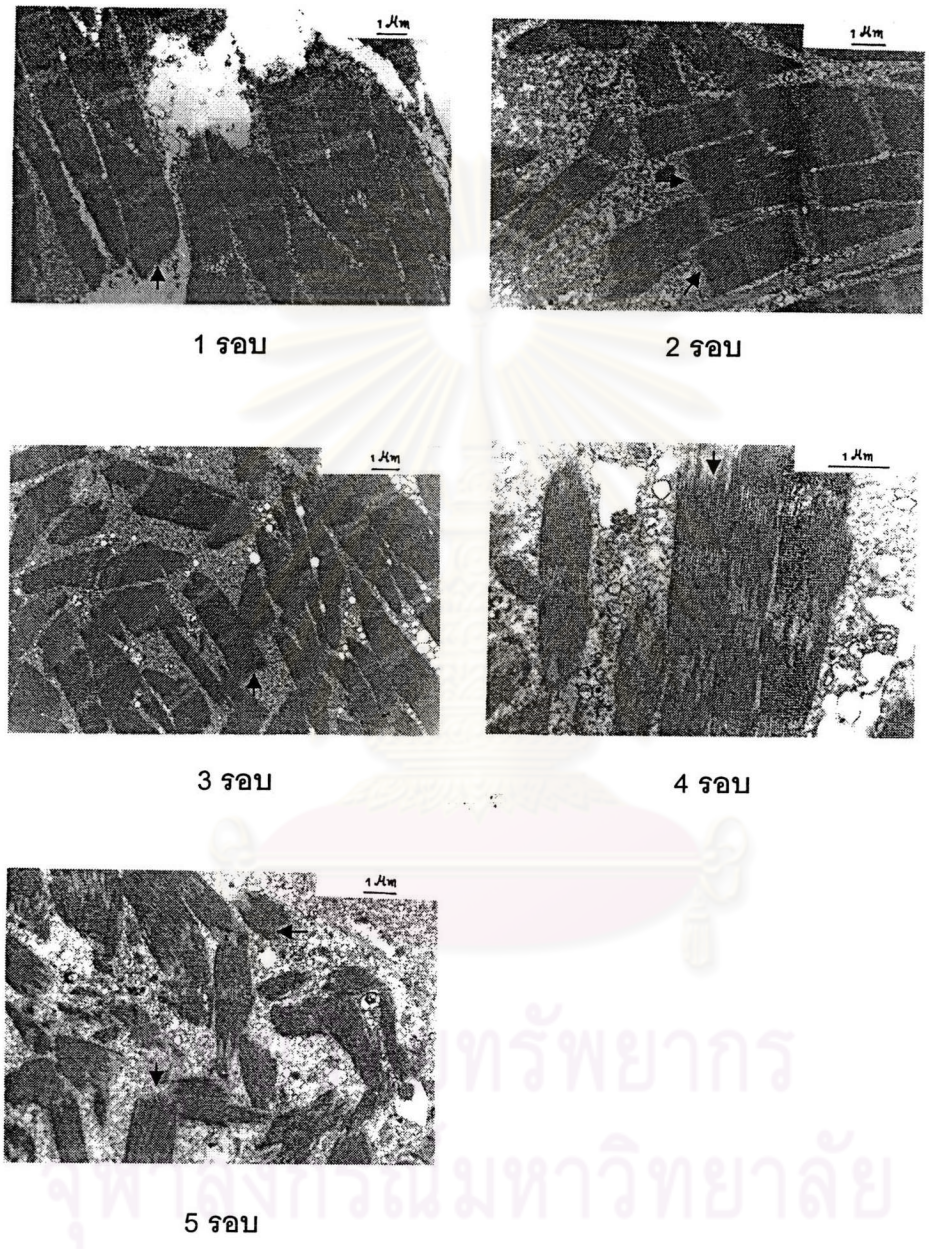
ในทางปฏิบัติของโรงงานอุตสาหกรรมกุ้งแช่เยือกแข็ง จะเก็บรักษากุ้งแช่เยือกแข็งไว้ไม่เกิน 6 เดือน ประกอบกับสภาวะการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งอาจมีโอกาสเกิดขึ้นซ้ำกันได้หลายๆ ครั้ง ในระหว่างร้านอาหาร หรือในครัวเรือน ซึ่งไม่น่าจะมากกว่า 5 ครั้งจึงได้เลือกสภาวะดังกล่าวเพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อที่เพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4.12 พบว่าในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ จะมีการเพิ่มขึ้นของระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อ (15.24 μm) มากกว่า ($P \leq 0.05$) การเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลา 6 เดือน (13.96 μm) และจากภาพ micrographs (รูปที่ 4.12) พบว่าผลของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ สังเกตได้ว่ามีการเสียหายของมัดกล้ามเนื้อเกิดขึ้นอย่างชัดเจนและมากกว่าการเสียหายที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ –18 °C เป็นเวลา 6 เดือน อาจเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างของสภาวะการเก็บรักษาที่มีผลต่อการเสียหายทางกายภาพ ที่มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของผลึกน้ำแข็ง ซึ่งในการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำทำให้ตำแหน่งของการเกิดผลึกน้ำแข็งในแต่ละครั้งของการแช่เยือกแข็งซ้ำใหม่ มีโอกาสเปลี่ยนตำแหน่งไปจากเดิม รวมทั้งยังมีการโตขึ้นของขนาดผลึกน้ำแข็งเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะส่งผลให้เซลล์มีการเสียหายทางกายภาพมากกว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C ซึ่งพบว่าการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็งที่โตขึ้นจะเป็นผลมาจากการตกผลึกใหม่ที่เกิดขึ้นหลังจากการเกิดผลึกน้ำแข็งอย่างสมบูรณ์แล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4.12 ภาพ micrographs เปรียบเทียบระยะห่างระหว่างมัดกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกราม ที่มีการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C และระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (50x, hematoxylin and eosin)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเสียหายทางกายภาพของการเปลี่ยนแปลงขนาดของผลึกน้ำแข็ง กับความสัมพันธ์ของการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้อในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวนรอบมากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4.13

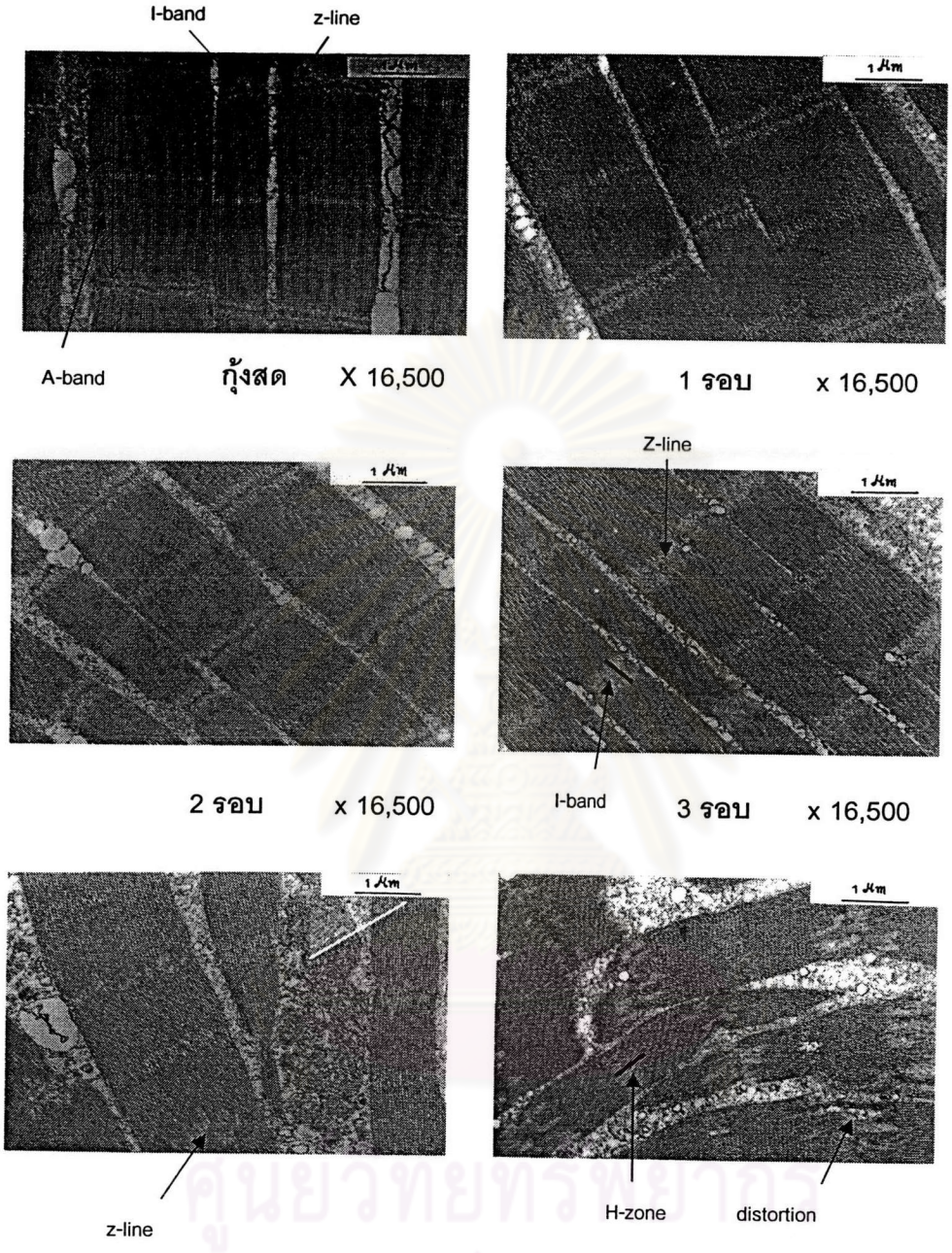


รูปที่ 4.13 ภาพ electron micrographs แสดงการฉีกขาด(ตำแหน่งที่ลูกศรชี้)ของเส้นใยกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

จากภาพ transmission electron micrographs ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม พบว่าเมื่อนำกุ้งก้ามกรามมาผ่านการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวนรอบมากขึ้น จะทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อมีการฉีกขาดมากขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของขนาดผลึกน้ำแข็งที่มีขนาดเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะเมื่อนำกุ้งก้ามกรามมาผ่านการแช่เยือกแข็งซ้ำใหม่ ผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นอาจมีการเปลี่ยนแปลง ตำแหน่ง ขนาด หรือรูปร่างต่างไปจากเดิม และเป็นผลให้เซลล์มีการฉีกขาดของเนื้อเยื่อมากขึ้น ซึ่งต่างจากการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานาน 0-6 เดือน ซึ่งไม่สังเกตพบการฉีกขาดของเส้นใยกล้ามเนื้ออย่างชัดเจนทั้งที่มีการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็ง อธิบายได้ว่าอาจเป็นผลความแตกต่างของสาเหตุการโตของผลึกน้ำแข็งซึ่งได้เคยกล่าวรายละเอียดไว้แล้วในข้อ 4.2 ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hurling และ McArthur (1996) ที่พบว่าการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำของเนื้อปลาคอด จะทำให้เกิดการเสียหายของเส้นใยกล้ามเนื้อที่มีสาเหตุเนื่องจากการโตขึ้นของผลึกน้ำแข็ง

ผลการติดตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อของกุ้งก้ามกรามในระดับต่ำกว่าจุลภาค ระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ ดังแสดงในรูปที่ 4.14

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

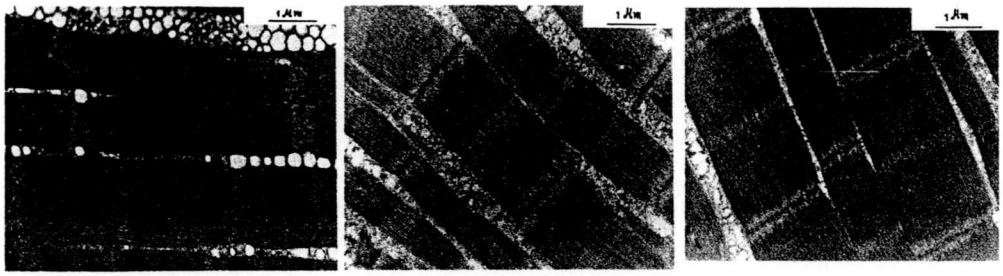


รูปที่ 4.14 ภาพ electron micrographs ของโครงสร้างกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามและจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ

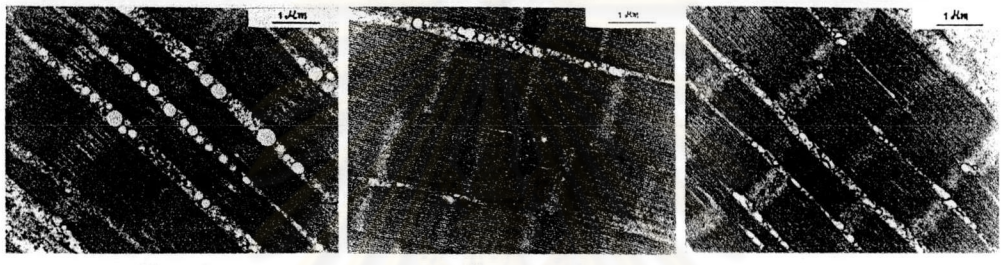
จากภาพ electron micrographs (รูปที่ 4.14) พบว่าเมื่อจำนวนครั้งของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมากขึ้น การจัดเรียงของเส้นใยโปรตีนภายในซาร์โคเมียร์จะมีการเสียหายมากขึ้น โดยสังเกตว่า Z-line มีความหนาแน่นลดลง หลังจากนำกุ้งมาผ่านการละลายน้ำแข็งและแช่เยือกแข็งซ้ำเป็นจำนวนมากกว่า 3 รอบ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและลายน้ำแข็งมากขึ้น Z-line จะมีการเสียหายมากขึ้น รวมทั้งมีการเสียหายของเส้นใยแอคตินบริเวณ I-band และมีการฉีกขาดของเส้นใยโปรตีนในบริเวณ I-band และ A-band ที่เสียหาย การเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อคาดว่าอาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีนและผลที่ได้คล้ายกับการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C และ -18 °C ดังแสดงในรูปที่ 4.15 โดยแสดงเฉพาะการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อในระยะสุดท้ายของการเก็บรักษาเนื่องจากมีการเสียหายอย่างชัดเจน

จากภาพ electron micrographs (รูปที่ 4.15) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนของการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างกล้ามเนื้อในระดับต่ำกว่าจุลภาคที่เกิดขึ้น ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C -18 °C และเมื่อมีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ แม้ว่าจะมีความแตกต่างของปัจจัยการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน ที่ต่างกันในแต่ละสภาวะของการเก็บรักษา โดยเฉพาะการเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุมาจากการแช่เยือกแข็งและพบว่าไม่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ด้วยวิธีการวิเคราะห์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตามผลการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อที่เกิดขึ้น สามารถใช้อธิบายการสูญเสียความแข็งแรงของโครงสร้างที่มีสาเหตุเนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีน

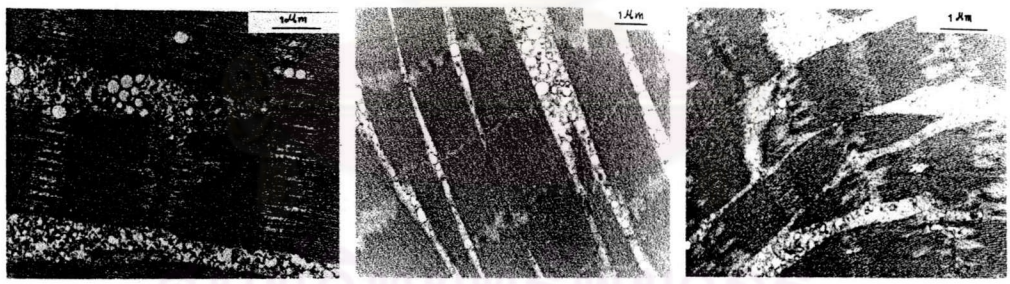
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



3 วัน(4 °C) x 16,500 | 1 เดือน(-18 °C) x 16,500 | 1 รอบ(freeze-thaw) x 16,500



7 วัน(4 °C) x 16,500 | 3 เดือน(-18 °C) x 16,500 | 3 รอบ(freeze-thaw) x 16,500



14 วัน(4 °C) x 16,500 | 5 เดือน(-18 °C) x 12,450 | 5 รอบ(freeze-thaw) x 16,500

รูปที่ 4.15 ภาพ electron micrographs ของโครงสร้างกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกราม ระหว่างการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C -18 °C และระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ

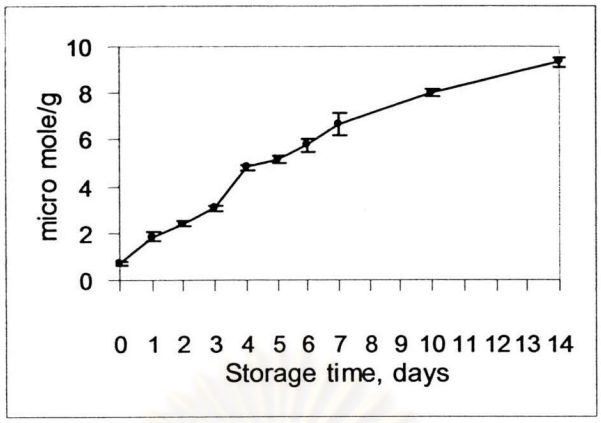
การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนที่มีสาเหตุเนื่องจากการย่อยสลาย พบว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามในสภาวะที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวนรอบมากขึ้น ทำให้ปริมาณ hydrolytic degradation products เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.19

ตารางที่ 4.19 ปริมาณ hydrolytic degradation products ของกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

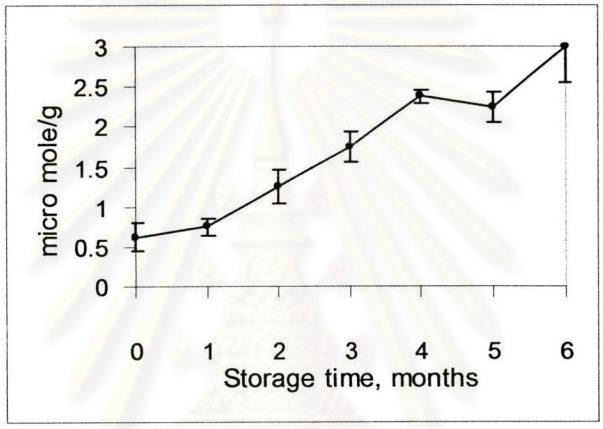
การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (รอบ)	Hydrolytic degradation products (μmole/g)
0	$0.640^{a} \pm 0.04$
1	$0.645^{a} \pm 0.08$
2	$1.150^{b} \pm 0.11$
3	$0.875^{a} \pm 0.05$
4	$1.745^{c} \pm 0.21$
5	$2.135^{d} \pm 0.06$

a, b, c, d ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

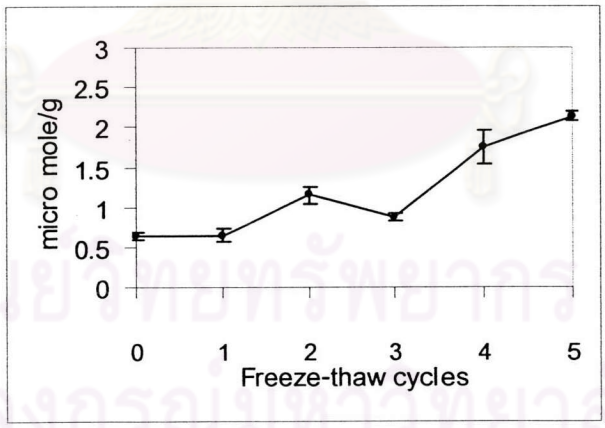
การเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products อาจมีสาเหตุมาจากการทำงานของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน ที่สามารถทำงานได้ดีในระหว่างการละลายน้ำแข็งเนื่องจากผลของการเพิ่มอุณหภูมิ เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C -18 °C และระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 การเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C และระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ พบว่าปริมาณ hydrolytic degradation products มีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และไม่มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัด แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าจะมีการเพิ่มขึ้นในอัตราเร็วที่ช้ากว่าการเก็บรักษากุ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C อธิบายได้ว่าผลของการแช่เยือกแข็งและการเก็บรักษาในสภาพแช่เยือกแข็ง อาจทำให้การทำงานของเอนไซม์มีกิจกรรมที่ต่ำมาก เนื่องจากการใช้อุณหภูมิต่ำในการเก็บรักษา (Davis, 1995) นอกจากนี้การแช่เยือกแข็งยังทำให้ค่า a_w ลดลง จุลินทรีย์ส่วนมากจึงไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (Jay, 1992) และยังอาจทำให้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีจำนวนลดลง



a



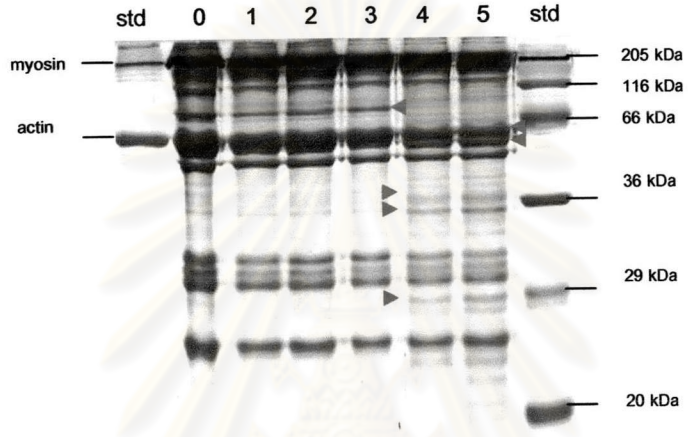
b



c

รูปที่ 4.16 ปริมาณ hydrolytic degradation products (μmole/g) ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (a) -18 °C (b) และในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ(c)

การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีน เนื่องจากการทำงานของ proteolytic enzymes จะทำให้เกิดการเสียหายของพันธะเปปไทด์ SS และ SH (Zayas, 1997) เป็นผลให้โปรตีนมีขนาดโมเลกุลเล็กลง และสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงขนาดโมเลกุลของโปรตีนได้จากผลการวิเคราะห์ SDS-PAGE ดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 electrophoretic pattern ของสารละลายโปรตีนแอคโตไมโอซินที่สกัดได้จากกุ้งก้ามกราม เมื่อมีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ std; myosin, actin 0, 1.....และ 5 จำนวนครั้งของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ std; standard mixture (mw. 20,000-200,000) Myosin, rabbit muscle 205 kDa, β-galactosidase, E coli 116 kDa, Albumin, bovine 66 kDa, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, rabbit muscle 36 kDa, Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes 29 kDa and Trypsin inhibitor, soybean 20 kDa ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการแยก 38 ไมโครกรัม / 5μL

ภาพ electrophoretic pattern ของโปรตีนแอคโตไมโอซิน พบว่าเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งมากขึ้น จะมีการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนแอคโตไมโอซิน โดย สังเกตว่าแถบโปรตีนแอคตินมีความเข้มลดลง และมีการหายไปของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa นอกจากนี้ยังพบว่ามีแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นใหม่โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 40, 36, 32 และ 20 kDa เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็น 4 รอบ การเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนดังกล่าวมีความชัดเจนมากขึ้น เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเพิ่มเป็น 5 รอบ

การลดลงของแถบโปรตีนแอคตินและแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 100 kDa รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าโปรตีนแอคติน อาจเป็นผลมาจากการย่อยสลายของโปรตีน โดยมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydrolytic degradation products เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง electrophoretic pattern ของโปรตีนแอคโตไมโอซินในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C (ดังรูปที่ 4.1) -18 $^{\circ}$C(ดังรูปที่ 4.7) และระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ(ดังรูปที่ 4.17) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของแถบโปรตีนจะมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างของการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในสภาวะการเก็บรักษาที่ต่างกัน

การเสื่อมเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนกล้ามเนื้อ ในระหว่างที่มีการนำกุ้งก้ามกรามมาผ่านการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ นอกจากจะมีสาเหตุมาจากการเสียหายทางกายภาพเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงขนาดของผลึกน้ำแข็ง และการเสียหายจากการย่อยสลายของโปรตีน ยังพบว่ามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไมโอซิน และอาจทำให้โปรตีนแอคโตไมโอซินสูญเสียคุณสมบัติการเป็นเอนไซม์ Ca^{2+}ATPase activity ผลการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ในระหว่างที่มีการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.20

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

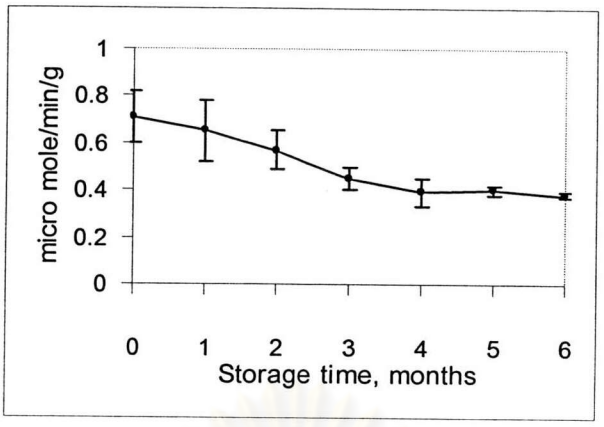
ตารางที่ 4.20 ปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (รอบ)	Ca^{2+}ATPase activity (μmole/min/g)
0	$0.675^{a} \pm 0.03$
1	$0.619^{a} \pm 0.03$
2	$0.686^{a} \pm 0.04$
3	$0.517^{b} \pm 0.01$
4	$0.484^{bc} \pm 0.02$
5	$0.429^{bc} \pm 0.01$

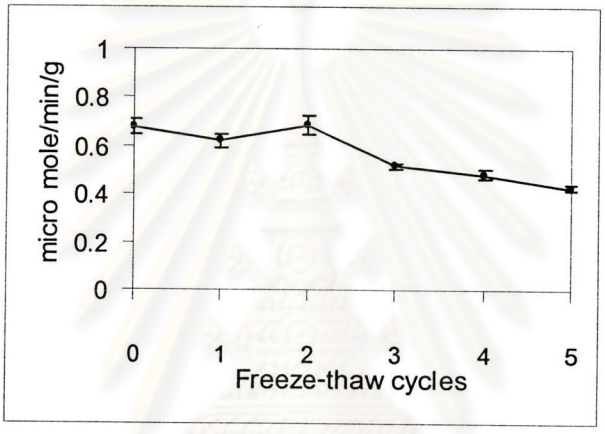
a, b, c ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งมากขึ้น พบว่าปริมาณ Ca^{2+}ATPase จะมีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโมเลกุลไมโอซินในส่วนหัวของ alkaline light chain ที่มีหน้าที่เป็น reactive site ของเอนไซม์ Ca^{2+}ATPase ทำให้เอนไซม์ Ca^{2+}ATPase ไม่สามารถจับกับสับสเตรทได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Jiang และคณะ (1991) ที่พบว่ามีการลดลงของปริมาณ Ca^{2+}ATPase ของโปรตีนแอคโตไมโอซินในกุ้ง (*Penaeus monodon*) หลังจากที่มีการแช่เยือกแข็ง

เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของปริมาณ Ca^{2+}ATPase ในระหว่างการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C -18 °C และระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ ดังรูปที่ 4.18 พบว่าการลดลงของปริมาณ Ca^{2+}ATPase ในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมีอัตราเร็วในการลดลงช้ากว่าการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C แสดงว่าการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามในสภาพแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -18 °C เป็นเวลานานขึ้น อาจทำให้โปรตีนไมโอซินมีการเสียหายของโครงสร้างในส่วนหัวมากกว่า ผลของการเก็บรักษากุ้งก้ามกรามในสภาวะแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ



a



b

รูปที่ 4.18 ปริมาณ Ca^{2+}ATPase activity ของกล้ามเนื้อกุ้งก้ามกรามที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -18 °C (a) และในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (b)

จากความสัมพันธ์ของการเสื่อมเสียคุณภาพโปรตีนกล้ามเนื้อ ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกราม (Pearson and Young, 1989; Xiong, 1997) จึงได้มีการติดตามการเปลี่ยนแปลงคุณภาพเนื้อสัมผัสของกุ้งก้ามกราม ด้วยการวัดค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งให้แยกขาดออกจากกัน (N/cm) ดังแสดงในตารางที่ 4.21

ตารางที่ 4.21 ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งก้ามกรามในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเป็นจำนวน 5 รอบ

การแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ (รอบ)	ค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้ง (N/cm)
0	17.62 [a] ± 2.9
1	14.83 [ab] ± 1.3
2	15.15 [ab] ± 1.6
3	13.98 [ab] ± 0.8
4	12.40 [b] ± 1.6
5	11.94 [b] ± 1.0

a, b ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรกำกับต่างกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

เมื่อจำนวนครั้งของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำเพิ่มขึ้น พบว่าผลการวัดค่าแรงต้านทานการตัดขาดของเนื้อกุ้งจะมีแนวโน้มลดลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อทำให้โครงสร้างกล้ามเนื้อสูญเสียความแข็งแรง สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเสียหายของโครงสร้างกล้ามเนื้อในระหว่างการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำ อาจเป็นผลมาจากการเสียหายทางกายภาพของผลึกน้ำแข็ง และการเสียหายเนื่องจากการย่อยสลายของโปรตีน โดยพบว่าเมื่อจำนวนรอบของการแช่เยือกแข็งและละลายน้ำแข็งซ้ำมากขึ้น กุ้งก้ามกรามจะมีเนื้อสัมผัสนิ่มลง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย